



153

ZS

H3128

ELŻBIETA SALIŃSKA

ZMIANY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO STĘŻENIA WAPNIA W
HIPOKAMPIE KRÓLIKA IN VIVO WYWOŁANE PRZEZ
CAŁKOWITE NIEDOKRWIENIE MÓZGOWIA ORAZ PRÓBA
OKREŚLENIA ICH MECHANIZMÓW

Praca doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. med. Jerzy W. Łazarewicz

ZAKŁAD NEUROCHEMII

INSTYTUT CENTRUM MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ PAN

WARSZAWA 1992

Panu prof. dr hab. Jerzemu Łazarewiczowi, promotorowi pracy, składam gorące podziękowania za okazaną życzliwość, pomoc i cenne uwagi podczas przygotowywania tej pracy. Panu dr Ryszardowi Plucie dziękuję za pomoc w trakcie wykonywania badań. Szczególne wyrazy uznania należą się Pani Poli Ziembowicz i Panu Sławomirowi Januszewskiemu za niezwykle staranną i sprawną pomoc techniczną przy wykonywaniu pracy doświadczalnej.

Badania dotyczące niedokrwienia mózgowia królika wykonane zostały we współpracy z Zakładem Neuropatologii Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

SPIS TREŚCI

| | |
|---|----|
| 1. WSTĘP | 1 |
| 1.1. Niedokrwienie mózgu | 1 |
| 1.2. Ischemiczne uszkodzenie neuronów mózgu | 2 |
| 1.3. Bariera krew – mózg a patologia niedokrwienia mózgu | 5 |
| 1.4. Specyfika ischemicznego uszkodzenia neuronów mózgu | 6 |
| 1.5. Ekscytotoksyczna hipoteza uszkodzeń ischemicznych | 9 |
| 1.6. Homeostaza wapnia w komórkach | 15 |
| 1.7. Wapniowa hipoteza uszkodzenia mózgu spowodowanego przez niedokrwienie | 16 |
| 1.8. Potencjalne mechanizmy wnikania jonów wapnia do wnętrza neuronów w czasie niedokrwienia | 20 |
| 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY | 25 |
| 3. MATERIAŁ I METODY | 27 |
| 3.1. Materiał doświadczalny | 27 |
| 3.2. Metoda mikrodializy hipokampa | 27 |
| 3.2.1. Implantacja sondy dializacyjnej | 27 |
| 3.2.2. Dializa – perfuzja hipokampa | 29 |
| 3.3. Model całkowitego niedokrwienia mózgu | 29 |
| 3.4. Podawanie związków o działaniu farmakologicznym | 31 |
| 3.4.1. Nimodipina | 32 |
| 3.4.2. Kwas N-metylo-D-asparaginowy i kwas kainowy | 33 |
| 3.4.3. Bay K 8644 | 33 |
| 3.4.4. Kwas 2-amino-5-fosfono-walerowy | 33 |
| 3.4.5. MK-801 | 33 |
| 3.4.6. Amilorid oraz 5-(N-N-dimetylo)-amilorid | 34 |
| 3.4.7. DNQX | 34 |

| | |
|---|----|
| 3.5. Pomiar zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia | 34 |
| 3.6. Pomiar przepuszczalności bariery krew-mózg | 36 |
| 3.7. Pomiar zmian zewnątrzkomórkowego stężenia neurotransmiterów aminokwasowych: kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego | 37 |
| 3.8. Ocena zmian objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa | 38 |
| 3.9. Metody statystyczne..... | 38 |
| 3.10. Odczynniki | 39 |
| 4. WYNIKI | 40 |
| 4.1. Zmiany stężeń jonów wapnia oraz niektórych neuroprzekazników aminokwasowych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa królika zachodzące pod wpływem całkowitego niedokrwienia mózgowia | 40 |
| 4.1.1. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika zachodzące pod wpływem całkowitego niedokrwienia mózgowia | 40 |
| 4.1.2. Zmiany stężeń pobudzających neuroprzekazników aminokwasowych; glutaminianu i asparaginianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa pod wpływem całkowitego niedokrwienia mózgowia | 41 |
| 4.2. Wpływ związków farmakologicznie czynnych na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane całkowitym niedokrwieniem mózgowia | 43 |
| 4.2.1. Wpływ APV na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane całkowitym niedokrwieniem mózgowia | 44 |
| 4.2.2. Oddziaływanie nimodipiny podanej miejscowo do hipokampa na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w czasie i po niedokrwieniu mózgowia | 45 |
| 4.2.3. Wpływ nimodipinu podawanej dożylnie na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez całkowite niedokrwienie mózgowia | 47 |
| 4.3. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia zachodzące pod wpływem agonistów receptorów aminokwasowych neuroprzekazników pobudzających - NMDA i kwasu kainowego | 48 |
| 4.3.1. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w hipokampie królika zachodzące pod wpływem NMDA | 49 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.3.2. | Wpływ APV oraz MK-801 na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podawaniem NMDA | 50 |
| 4.3.3. | Wpływ nimodipiny na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez NMDA | 52 |
| 4.3.4. | Wpływ amiloridu na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez NMDA | 54 |
| 4.3.5. | Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika wywołane przez podawanie kwasu kainowego | 55 |
| 4.3.6. | Wpływ DNQX na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez kwas kainowy | 56 |
| 4.3.7. | Oddziaływanie APV na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez podawanie kwasu kainowego | 57 |
| 4.3.8. | Wpływ nimodipiny na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podawaniem kwasu kainowego | 58 |
| 4.3.9. | Wpływ podawania amiloridu oraz 5-(N,N-dimetylo)-amiloridu na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez podawanie kwasu kainowego | 58 |
| 4.4. | Wpływ depolaryzacji na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika | 61 |
| 4.4.1. | Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia pod wpływem podawania przez sondę dializacyjną 120 mM KCl | 61 |
| 4.4.2. | Wpływ nimodipiny i MK-801 na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez podawanie 120 mM KCl | 62 |
| 4.4.3. | Spadek stężenia wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa wywołany przez BAY K 8644 | 64 |
| 4.5. | Zmiany objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej w hipokampie królika pod wpływem niedokrwienia mózgowia | 65 |
| 4.5.1. | Wpływ niedokrwienia na przestrzeń sacharozową w hipokampie królika | 66 |
| 4.6. | Zmiany przepuszczalności bariery krew - mózg zachodzące pod wpływem niedokrwienia mózgowia | 67 |

| | |
|---|-----|
| 4.6.1. Zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg wywołane przez 15 minutowe całkowite niedokrwienie mózgowia | 67 |
| 4.6.2. Wpływ APV na zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg wywołane przez niedokrwienie mózgowia | 68 |
| 4.6.3. Wpływ nimodipiny na zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg wywołane przez całkowite niedokrwienie mózgowia | 69 |
| 5. DYSKUSJA | 71 |
| 6. WNIOSKI | 107 |
| 7. PIŚMIENNICTWO | 108 |

SKRÓTY STOSOWANE W TEKŚCIE

- AMPA – 2-amino-3-hydroksy-5-metyloizoxazolo-4-propionian
AP7 – kwas 2-amino-7-fosfono heptanowy
APV – kwas 2-amino-5-fosfono-walerowy
Asp – kwas asparaginowy
ATP – adenozyno-5'-trójfosforan
 Ca^{2+}_e – zewnątrzkomórkowe jony wapnia
DNQX – 6,7-dinitrochinoksalino-2,3-dion
Glu – kwas glutaminowy
KA – kwas kainowy
KRB – płyn Krebsa – Ringera z buforem dwuwęglanowym
NMDA – kwas N – metylo – D – asparaginowy
PCP – fencyklidyna
PKC – kinaza białkowa C
SEM – standardowy błąd średniej

1. WSTĘP

1.1. Niedokrwienie mózgu

Niedokrwienie mózgu jest częstym i groźnym w skutkach następstwem niewydolności serca, chorób naczyniowo-mózgowych, szczególnie udaru mózgu, jak również szoków o różnej etiologii. Z danych literaturowych wiadomo, że w samych tylko Stanach Zjednoczonych w ciągu roku odnotowuje się ok. 85 tysięcy przypadków śmiertelnych, spowodowanych niedokrwieniem mózgu, a osoby, które przeżywają, wykazują różnego stopnia zaburzenia funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego (Bes, 1984). Niedokrwienie mózgu wyzwała bowiem procesy, które prowadzą do nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej. Komórkowe mechanizmy prowadzące do powstania tych zmian do tej pory nie zostały w pełni wyjaśnione.

Mianem niedokrwienia mózgu (ischemii) określa się stan, w którym mózgowe krążenie krwi zredukowane jest do poziomu niewystarczającego do utrzymania normalnego funkcjonowania mózgu. Przyjmując za Siesjo (1981), z niepełną ischemią mózgu mamy do czynienia wówczas, gdy mózgowe krążenie krwi spada poniżej 40% wartości kontrolnej, natomiast z pełną ischemią, gdy krążenie zatrzymane jest całkowicie.

W warunkach całkowitego niedokrwienia mózgu zablokowany jest dopływ do komórek nerwowych nie tylko tlenu, ale także i podstawowego substratu energetycznego – glukozy. Wstrzymany jest również proces usuwania produktów zachodzących przemian metabolicznych i dochodzi do nagromadzania się ich w tkance. Prowadzi to do szybko narastającego deficytu energetycznego i rozregulowania homeostazy komórek. W rezultacie w czasie niedokrwienia obserwowane są błyskawicznie rozwijające się zaburzenia czynnościowe wyrażające

się początkowo nadmiernym, patologicznym pobudzeniem neuronów, szybko przechodzącym w całkowity zanik aktywności elektrycznej mózgu.

Pierwszy, kompleksowy opis zmian metabolicznych zachodzących w czasie ischemii przedstawił w 1964 r. Lowry (Lowry i wsp., 1964), a niedługo po nim Goldberg (Goldberg i wsp., 1966). Prace ich przeprowadzone były na myszach i dotyczyły zmian metabolizmu glukozy, kwasu cytrynowego i aktywności fosfataz. Wykazano, że całkowite niedokrwienie mózgu prowadzi w pierwszym rzędzie do zaburzeń równowagi energetycznej komórki, następnie obserwowano rozregulowanie mechanizmów utrzymujących równowagę jonową oraz uszkodzenia struktur komórkowych. W warunkach przerwanego dopływu tlenu, tkanki mózgu mogą uzyskiwać energię tylko przez zużycie ograniczonych rezerw fosforanów wysokoenergetycznych, oraz przez beztlenową przemianę glukozy do kwasu mlekowego. Gwałtowny spadek zawartości alfa-ketoglutaranu i acetoctanu, będący wynikiem zahamowania reakcji tlenowych, dodatkowo dezorganizuje proces uzyskiwania energii w cyklu kwasów trójkarboksylowych (Ljunggren, 1974). W badaniach przeprowadzonych na szczurach, wykazano, że po 2–3 min. ischemii poziom ATP obniżał się do ok. 10% kontroli (Siesjo, 1973), a u królików w ciągu 5 min. ischemii obserwowano 35% spadek zawartości ATP, który po 10 min. osiągał 80% (Siesjo, 1978).

1.2. Ischemiczne uszkodzenia neuronów mózgu

Wobec faktu, że tkanka nerwowa wykazuje ogromne zapotrzebowanie energetyczne, sugerowano, że deficyt związków wysokoenergetycznych odgrywa kluczową rolę w mechanizmie niedokrwiennego uszkodzenia neuronów, a normalizacja zawartości ATP w komórkach mózgu po niedokrwieniu jest czynnikiem decydującym o jej zdolności do powrotu do normalnego funkcjonowania. Kramer i wsp. (1968) oraz Michenfelder i Theyre

(1970) wykazali, że powrót aktywności jest niemożliwy, jeśli zawartość ATP utrzymuje się na poziomie niższym niż 20 – 25% kontroli. Mimo niewątpliwego znaczenia metabolizmu energetycznego dla podtrzymania integralności funkcjonalnej i strukturalnej neuronów, dalsze badania wykazały, że przypisywanie zaburzeniom energetycznym roli czynnika wyłącznie czy głównie odpowiedzialnego za uszkodzenie neuronów mózgu w czasie i po niedokrwieniu jest daleko idącym uproszczeniem. Po pierwsze – pomiar zawartości ATP w tkance poddanej ischemii nie daje informacji o jego zawartości w poszczególnych komórkach, a mogą wśród nich być i takie, które są odporne nawet na długotrwałe niedokrwienie (Siesjo, 1978). Ponadto wykazano, że większość komórek mózgowych znosi trwający 15–30 min. niedobór ATP, bez wykazywania nieodwracalnych uszkodzeń (Siesjo, 1978). I wreszcie – różne zwierzęta wykazują różny stopień odporności na ischemię (Siesjo, 1978).

Chociaż utrata energii i zaburzenia mechanizmów regeneracji zasobów energetycznych należą do czynników prowadzących do uszkodzenia komórek w wyniku ischemii, wydaje się, że inne mechanizmy odgrywają tu nie mniej ważną rolę. Pojawiająca się w czasie ischemii kwasica mlekowa, spowodowana zahamowaniem usuwania kwasu mlekowego nagromadzającego się w przebiegu glikolizy beztlenowej wymieniana bywa również jako czynnik wpływający na uszkodzenie tkanki nerwowej. Nie wyjaśnione jednak pozostało, czy wywołane przez kwasicę uszkodzenia tkanki mózgowej są wynikiem nagromadzenia kwasu mlekowego, czy jonów H^+ . Obserwowany tuż po niedokrwieniu obrzęk mózgu próbowano łączyć z powstającą kwasicą. Jednakże Myers (1979a) w swoich badaniach nad ischemią i hipoksją stwierdził, że stężenie kwasu mlekowego musi wzrosnąć do ok. 25 $\mu\text{mol/g}$, by spowodować obrzęk mózgu i uszkodzenie tkanki mózgowej. Takie stężenie kwasu mlekowego zanotowano jedynie w hipoksji w której zawartość kwasu mlekowego może wzrosnąć nawet do 35 $\mu\text{mol/g}$. W całkowitym niedokrwieniu maksymalne oznaczone stężenia wynosiły 12–15 $\mu\text{mol/g}$.

Myers (1979b) stwierdził brak związku między kwasica mleczanową a szybkością występowania zaburzeń energetycznych w czasie niedokrwienia. W doświadczalnej ischemii stężenie kwasu mlekowego wzrasta do 12 $\mu\text{mol/g}$, podczas gdy u zwierząt perfundowanych glukozą może osiągnąć 30 $\mu\text{mol/g}$, a jednak w obu przypadkach stężenie ATP spada do 0.1 $\mu\text{mol/g}$. Ponadto eksperymenty przeprowadzane przez Ljunggrena i wsp. (1974) wykazały, że wzrost stężenia kwasu mlekowego występujący po 5 minutowej ischemii nie ma wpływu na normalizację metabolizmu po niedokrwieniu. Jedną z głównych przesłanek przemawiających za niekorzystnym wpływem zmniejszonego pH jest fakt, że niektóre z enzymów lizosomalnych mogących wywołać autolizę tkanki, są uwalniane, bądź aktywowane, przy niskim pH. Jest jednak wątpliwe, by kwasica była w decydujący sposób odpowiedzialna za wczesne zmiany poischemiczne w mózgu, a zwłaszcza by ewentualny negatywny wpływ tego niespecyficznego czynnika był ważny dla rozwoju późnych, specyficznych i wybiórczo zlokalizowanych uszkodzeń.

Mechanizm bardziej specyficzny dla tkanki nerwowej polegać może na tym, że zakłócony bilans energetyczny, jak również wzmożone pobudzenie neuronów w czasie ischemii powodują aktywację kanałów jonowych w ich błonach komórkowych i niekontrolowany przepływ jonów pomiędzy komórką a przestrzenią zewnątrzkomórkową mózgu. Zgodnie z przewidywaniami, opartymi na znajomości gradientu stężeń jonów na zewnątrz i wewnątrz neuronów, w czasie niedokrwienia stwierdzono początkowo masywny wypływ jonów K^+ z neuronów (Alansen, 1977; Hossman, 1970) a następnie napływ do ich wnętrza jonów Na^+ i Ca^{2+} (Nicholson, 1980; Harris, 1981). Wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia jonów K^+ powoduje zwiększenie pobierania przez komórkę jonów Na^+ oraz Cl^- . Z kolei zwiększenie pobierania ekwiwalentów osmotycznych oraz wody prowadzi do pęcznienia komórek i ich uszkodzenia. Odrębnym zagadnieniem omawianym obszerniej w dalszej części tego rozdziału jest zwiększony napływ jonów Ca^{2+} zgodnie z gradientem stężeń. Powoduje on uruchomienie szeregu reakcji

wewnątrzkomórkowych, które w efekcie końcowym mogą przyczynić się do śmierci komórek.

1.3. Bariera krew – mózg a patologia niedokrwienia mózgu

Na całym obszarze organizmu zachodzą fluktuacje w stężeniu hormonów, aminokwasów, jonów, szczególnie po posiłkach, wysiłku czy w czasie stresu. Podobne zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym mogłyby prowadzić do niekontrolowanych zmian w funkcjonowaniu mózgu, gdyż część tych związków jest agonistą receptorów w neuronach, a równowaga jonowa jest warunkiem prawidłowego funkcjonowania systemu nerwowego. Stąd przepływ wszystkich substancji pomiędzy ośrodkowym układem nerwowym a układem krwionośnym jest ściśle kontrolowany przez tzw. barierę krew – mózg. Tworzą ją mózgowie naczynia krwionośne o cechach nieco odmiennych niż na obszarze reszty ciała. Komórki endotelium w mózgu tworzą ściśle, ciągłe połączenia, które zabezpieczają przed przemieszczaniem się polarnych cząsteczek o różnych rozmiarach od białek do jonów. Nie stwierdza się również obecności kanałów transkomórkowych. Procesami umożliwiającymi przemieszczanie się substancji przez barierę i jednocześnie będącymi czynnikami kontrolującymi są pinocytoza, dyfuzja na zasadzie różnicy stężeń dotycząca głównie gazów oddechowych, oraz transport transkomórkowy wymagający obecności specyficznych przenośników lub kanałów. Znacznie ułatwiony jest przepływ substancji lipofilnych m.inn. etanolu, nikotyny czy większości leków psychotropowych. Jednak nie w całym mózgu kapilary tworzą szczelną barierę. Występują miejsca w których kapilary mają budowę taką jak w innych obszarach ciała. Brak bariery w tych miejscach najprawdopodobniej odgrywa rolę w uwalnianiu hormonów peptydowych.

Niektóre stany chorobowe czy urazy mogą powodować uszkodzenie funkcjonowania bariery krew – mózg, a co za tym idzie zaburzenia funkcjonowania

centralnego układu nerwowego, a nawet jego uszkodzenie. Niedokrwienie mózgowia jest jednym z przypadków w którym wystąpić może przerwanie szczelności bariery krew – mózg. Fakt ten został stwierdzony przez wielu badaczy, jednakże jego znaczenie oraz sposób w jaki przerwanie bariery krew – mózg wpływa na obserwowane po niedokrwieniu uszkodzenia neuronów nie zostało do tej pory jednoznacznie określone.

1.4. Specyfika ischemicznego uszkodzenia neuronów mózgu

Uszkodzenia wywołane w mózgu przez niedokrwienie mają szczególną specyfikę, której dogłębne poznanie może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów tych uszkodzeń. Te specyficzne cechy to selektywna wrażliwość różnych okolic mózgu oraz tzw. efekt dojrzewania uszkodzeń. Liczne badania wykazały, że nie wszystkie rejony mózgu są w jednakowym stopniu wrażliwe na niedokrwienie. Niektóre obszary wykazują szczególną wrażliwość na zanik krążenia mózgowego. Należą tu komórki piramidowe kory mózgu, hipokamp, a szczególnie jego rejon CA1 i CA2, komórki Purkiniego mózdzku oraz komórki prążkowania, jądra migdałowatego i wzgórza. Stwierdzono również, że poza wczesnymi zmianami komórkowymi, obserwowanymi bezpośrednio po niedokrwieniu, może występować stopniowy rozwój uszkodzeń poischemicznych, objawiający się czasami ze znacznym opóźnieniem. Zjawisko takie zostało opisane jako efekt dojrzewania uszkodzeń poischemicznych (Siesjo, 1981).

W czasie pierwszych badań nad ischemią, Spielmeyer (1925), oraz Vogt i Vogt (1937) usiłując wyjaśnić przyczyny selektywnej wrażliwości mózgu na niedokrwienie, stworzyli dwie, odrębne teorie. Spielmeyer tłumaczył występowanie odmiennej wrażliwości różnych rejonów mózgu na ischemię czynnikami naczyniowymi – stąd określenie "hipoteza naczyniowa". Pojawianie się wąskich, intensywnie nekrotycznych pasów tkanki w rejonach zaopatrywanych w krew przez

pojedyncze odgałęzienia głównych naczyń potwierdzają tę teorię. Zdjęcie zacisków naczyniowych po ischemii doświadczalnej związane jest ze spadkiem systemowego ciśnienia krwi, co może prowadzić do znacznego zredukowania ciśnienia krwi w takich naczyniach obwodowych lub nawet do całkowitego braku przepływu (no reflow phenomenon). Ponadto pojawiający się obrzęk mózgu może powodować ścisnięcie rozgałęzień naczyniowych doprowadzających krew w głąb różnych warstw komórek mózgu. Tłumaczy to brak ognisk nekrotycznych na powierzchni struktur mózgu.

Hipoteza naczyniowa nie wyjaśnia jednak w pełni mechanizmów zmian poischemicznych obserwowanych w hipokampie. Pomimo opisanego przez Uchimurę i Scharrera (Yamaguchi i Klatzo, 1984) różnych osobliwości dopływu krwi do tych rejonów, nie wystarczyło to jednak do wytłumaczenia charakterystycznych zmian komórek rejonu CA1. Nie stwierdzono ponadto, by w wyniku niedokrwienia dochodziło do znacznych różnic w regionalnym przepływie krwi w czasie niedokrwienia w różnych sektorach hipokampa, a sektory te objawiały wyraźną selektywną wrażliwość (Suzuki i wsp., 1983).

Vogt i Vogt (1937) stworzyli alternatywną teorię skłonności patologicznych, opartą na różnych wewnętrznych, fizykochemicznych właściwościach komórek nerwowych, które mogą wpływać na odmienną ich odpowiedź na niedokrwienie. Patogenne czynniki i mechanizmy, które aktywują się w czasie niedokrwienia w różnym stopniu, w zależności od specyficznych właściwości komórek, powodują różny stopień ich uszkodzeń. To tłumaczyłoby, obserwowane przez Yamaguchi i wsp. (1984), zniszczenie neuronów w rejonie CA1 hipokampa w kilka dni po 5 min. ischemii mózgu gerbilla i znaczne zmniejszenie uszkodzenia w rejonie CA4.

Ani teoria naczyniowa, ani bardzo ogólnikowo sformułowana teoria skłonności patologicznych komórek, rozpatrywane odrębnie nie tłumaczą w pełni mechanizmów uszkodzeń neuronów w wyniku ischemii, można natomiast

postulować współdziałanie obu czynników wymienionych w tych teoriach. Należy przyjąć za oczywisty udział czynników naczyniowych zarówno jako pierwotnych elementów patogenezy większości przypadków niedokrwienia mózgu, jak i jako składników wtórnych uszkodzeń poischemicznych związanych z zaburzeniami lokalnego mikrokrążenia mózgowego (no reflow phenomenon) (Ames i wsp., 1968), których szczegółowe omawianie wykracza jednak poza zakres tej rozprawy. Z kolei konieczne jest sprecyzownie jakiego typu specyficzne właściwości niektórych neuronów warunkować mogą ich szczególną wrażliwość na niedokrwienie. Najprawdopodobniej wśród tych właśnie hipotetycznych czynników zwiększających wrażliwość komórek na ischemię można upatrywać mechanizmów zapoczątkowujących reakcje, prowadzące do śmierci tego typu komórek. W latach osiemdziesiątych uwagę badaczy przyciągnęły kolejno dwa potencjalne czynniki patogenezy, a mianowicie zwiększona gęstość kanałów jonowych, a szczególnie kanałów wapniowych na błonach plazmatycznych określonej grupy neuronów, oraz koncentracja na nich receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych. Stwierdzono również, że niektóre komórki posiadają wysokie stężenie proteaz wrażliwych na jony Ca^{2+} , mogących degradować struktury komórkowe. Zwrócono uwagę na fakt, że zaburzenia patofizjologiczne i metaboliczne zachodzące w mózgu przy hipoglikemii i epilepsji wykazują duże podobieństwo do obserwowanych w ischemii (Siesjo, 1978). Obok różnic w przepływie krwi, który jest wzmożony w epilepsji a normalny lub zwiększony w hipoglikemii, oraz w dostępie tlenu (zahamowany tylko w ischemii), substratów energetycznych i w występowaniu kwasicy (brak jej w hipoglikemii), we wszystkich trzech patologiach powtarza się fakt zwiększonego pobudzenia komórek nerwowych, uwalniania pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych oraz masowego napływu jonów wapnia do wnętrza neuronów w okolicach cechujących się szczególną wrażliwością na czynniki uszkodzające (Siesjo, 1981; Łazarewicz i wsp., 1978). Istnieją podstawy by twierdzić, że mogą to być owe poszukiwane

czynniki odpowiedzialne za zapoczątkowanie degradacji komórek w określonych, wrażliwych okolicach mózgu. Jak zostanie omówione w następnych podrozdziałach, wiązanie mechanizmów uszkodzenia neuronów spowodowanego przez ischemię z nadmiernym pobudzeniem receptorów kwasu glutaminowego i/lub z masowym napływem wapnia do komórek może także przyczynić się do wyjaśnienia podstaw zjawiska dojrzewania uszkodzenia neuronów (maturation phenomenon). W sumie wydaje się, że odpowiedź na pytanie o specyficzne dla tkanki nerwowej mechanizmy uszkodzenia wywołanego przez ischemię, może dać weryfikacja tzw. hipotez ekscytotoksycznej i wapniowej. Wówczas szczególna podatność niektórych neuronów na ekscytotoksyczne działanie endogennych, pobudzających neurotransmiterów i na przeciążenie jonami wapnia mogą stanowić postulowane przez Vogtów czynniki warunkujące zwiększoną wrażliwość komórek na ischemię. Jednakże należy pamiętać, że końcowy rezultat procesów uszkadzających jest wynikiem nałożenia się na zaburzenia energetyczne neuronów kombinacji zjawisk zachodzących w początkowej fazie niedokrwienia oraz późniejszego rozwoju zaburzeń w różnych czasach po przywróceniu krążenia, z uwzględnieniem zarówno mechanizmów komórkowych jak i naczyniowych (Klatzo, 1979).

1.5. Ekscytotoksyczna hipoteza uszkodzeń ischemicznych

Wykazano, że glutaminian i zapewne asparaginian są podstawowymi neurotransmiterami pobudzającymi w ośrodkowym układzie nerwowym (Fagg i wsp., 1983). Te same receptory aminokwasów pobudzających, które biorą udział w pobudzeniu neuronów, mogą jednak być w warunkach patologicznych odpowiedzialne za uszkodzenie neuronów. Już w 1957 roku Lucas i Newhouse (1957) stwierdzili, że systemowe podawanie glutaminianu młodym myszom niszczy neurony w siatkówce. Była to pierwsza wskazówka, że neurotransmitter

pobudzający może być równocześnie czynnikiem prowadzącym do uszkodzeń tkanki nerwowej.

Po 12 latach nagromadzono dowody na to, że glutaminian podawany systemowo niszczy neurony mózgu myszy, szczurów i małp (Olney, 1969; Olney i wsp., 1971; Olney, 1978). W swoich wczesnych pracach charakteryzujących neurotoksyczność aminokwasów Olney i wsp. (1986) wykazali zależność pomiędzy działaniem niektórych czynników pobudzających neurony, a ich toksycznością i wysunęli hipotezę toksyczności tych czynników wobec tkanki nerwowej. Sugerowali w niej, że neurotoksyczność aminokwasów pobudzających związana jest z nadmierną depolaryzacją, co prowadzi do zaburzenia homeostazy jonów i zużycia komórkowych rezerw energetycznych. Chociaż komórkowe mechanizmy tych uszkodzeń nie zostały do końca wyjaśnione, a takie proste powiązanie pomiędzy nadmierną aktywacją receptorów pobudzających a ich neurotoksycznym działaniem jest dalekie od precyzji, ekscytotoksyczna hipoteza uszkodzeń neuronów mózgu, dotycząca głównie toksycznego działania glutaminianu (Rothman i wsp., 1987), jest ogólnie przyjmowana. Sugeruje się, że z nadmiernym, toksycznym w skutkach pobudzeniem mamy do czynienia w takich stanach patologicznych jak szok, hipoglikemia, epilepsja, choroba Huntingtona, ischemia, niektóre zatrucia środowiskowe (Lehmann, 1987; Rothman i Olney, 1987).

Od roku 1984 wiedziano, że w czasie niedokrwienia obserwuje się zwiększone stężenie aminokwasów pobudzających w przestrzeni zewnątrzkomórkowej różnych okolic mózgu (Benveniste i wsp., 1984). Ten wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia aminokwasów jest przypisywany zarówno zależnemu od depolaryzacji i jonów wapnia uwalnianiu neurotransmitterowej puli glutaminianu i asparaginianu, jak też, i to w głównej mierze, niezależnemu od wapnia uwalnianiu glutaminianu pochodzącego z puli metabolicznej komórek. Jednocześnie pobieranie zwrotne neurotransmitterów, które zależy od obecności związków wysokoenergetycznych jest zahamowane z powodu wywołanego przez

ischemię deficytu energetycznego. Kombinacja wymienionych czynników doprowadza do znacznego nagromadzenia aminokwasów pobudzających w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

Aminokwasy pobudzające oddziałują na komórkę nerwową poprzez specyficzne receptory błonowe. Wszystkie one są wrażliwe na glutaminian, ale ze względu na różnice we wrażliwości na działanie specyficznych agonistów lub antagonistów, wyróżniono kilka klas receptorów kwasu glutaminianowego. Na podstawie selektywnego działania agonistów – kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA), kwasu kainowego (K) i AMPA wyodrębniono odpowiednie receptory jonotropowe. Ponadto wyróżnia się receptory metabotropowe dla kwasu kwiskwalowego (Q). Wyodrębniono także receptory wrażliwe na kwas L-2-aminofosfonomasłowy (L-AP4) (Cotman i wsp., 1987b; Farooqui, 1991). Klasy te zostały scharakteryzowane elektrofizjologicznie, biochemicznie i anatomicznie. Różnią się one pod względem odpowiedzi, mechanizmów transdukcji sygnałów, profilu farmakologicznego i szczegółów budowy. Ponieważ brak jest specyficznych antagonistów, pozwalających odróżnić receptory wrażliwe na kwas kainowy i AMPA, przyjęto inny, ogólniejszy podział na receptory jonotropowe wrażliwe i niewrażliwe na NMDA. Z dwoma typami receptorów związane są dwa różne typy kanałów. Receptory nie-NMDA generują szybką odpowiedź depolaryzacyjną związaną z otwarciem kanałów dla jonów jednowartościowych, napływem do wnętrza komórek jonów sodu i wypływem jonów potasu. Specyficzną cechą receptorów NMDA jest zależność ich aktywacji od potencjału komórki. Zaktywowanie receptorów wrażliwych na NMDA generuje napływ do komórek obok jonów Na^+ również jonów Ca^{2+} .

Benveniste i wsp.(1984) przy użyciu mikrodializy wykazali 8-krotny wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia glutaminianu w hipokampie w czasie niedokrwienia. Również asparaginian, drugi z aminokwasów pobudzających, osiąga w czasie niedokrwienia poziom, przy którym staje się czynnikiem toksycznym

(Lehmann, 1987; Hagberg, 1985). Ekscytotoksyczna teoria ischemicznego uszkodzenia mózgu została dodatkowo poparta obserwacjami korelacji między rozmieszczeniem receptorów glutamatergicznych, w szczególności wrażliwych na NMDA, a wrażliwością neuronów piramidowych okolicy CA1 hipokampa na niedokrwienie (Jorgensen i wsp. 1982). Obecność receptorów wrażliwych na NMDA stwierdzono na obszarze całego mózgu, jednak największe ich zagęszczenie występuje w warstwie CA1 hipokampa, większa część rejonu CA3 i zakrętu zębatego mają średnie zagęszczenie tych receptorów, a warstwa jasna jest w nie uboga. Ponadto stwierdzono, że rozmieszczenie innych receptorów glutamatergicznych jest komplementarne do receptorów wrażliwych na NMDA (Cotman i wsp., 1987a). Większa ilość receptorów kwasu kainowego znajdowana była w hipokampie w rejonach o niskiej liczbie receptorów NMDA, np. w strefie jasnej.

Pobudzenie receptorów kwasu glutaminowego związane jest z otwarciem sprzężonych z nimi kanałów jonowych. Szczególną cechą kanału sprzężonego z receptorem wrażliwym na NMDA jest to, że kanał ten normalnie blokowany jest przez endogenne jony Mg^{2+} , w sposób zależny od potencjału. Depolaryzacja powoduje zwolnienie bloku i umożliwia napływ wapnia do komórki. Dokładniejsze badania nad budową receptora NMDA wykazały, że obok miejsca wiążącego naturalny aktywator – glutaminian, posiada on szereg miejsc wiążących związki chemiczne oddziałujące jako efektory o charakterze allosterycznym. Wyodrębniono miejsce wiążące glicynę oraz miejsce wiążące poliaminy: sperminę i spermidynę, które zwiększają otwarcie kanałów jonowych sprzężonych z receptorami NMDA (Stumpo i wsp., 1989). Działanie poliamin wymaga wcześniejszego zaktywowania miejsc wiążących glutaminian i glicynę, stąd też uważa się, że do pełnego otwarcia kanałów niezbędna jest obecność wszystkich trzech aktywatorów (Canton i wsp., 1989). W tym samym kompleksie białkowym zidentyfikowano niedawno miejsce wrażliwe na jony Zn^{2+} . Jony te oddziałują

negatywnie i hamują otwarcie kanałów jonowych (Stumpo i wsp., 1989). Uważa się, że glutaminian, jako uniwersalny agonista aktywujący zarówno receptory NMDA jak i nie-NMDA, może uruchomić napływ wapnia poprzez sekwencyjny mechanizm. Pobudzenie receptorów nie-NMDA powoduje napływ jonów Na^+ i depolaryzację, która zwalnia blok magnezowy kanału jonowego sprzężonego z receptorem NMDA i powoduje jego otwarcie dla jonów wapnia.

Chociaż mechanizm toksycznego działania glutaminianu nie został ostatecznie wyjaśniony, można na podstawie eksperymentów przeprowadzonych *in vitro*, różnicować pomiędzy wczesnym uszkodzeniem związanym z gwałtownym pęcznieniem komórek w wyniku napływu jonów Na^+ , Cl^- i wody, oraz powoli rozwijającą się degeneracją neuronów, związaną przyczynowo z nadmiernym napływem do komórki jonów Ca^{2+} w czasie i tuż po pobudzeniu (Rothman i Olney, 1987). Dowodów na to dostarczyły badania przeprowadzone na hodowlach neuronów kory mózgu myszy (Choi, 1988). Chociaż usunięcie zewnątrzkomórkowego Na^+ ze środowiska inkubacyjnego znosiło pęcznienie neuronów, wywołane przez 5 – minutowe działanie glutaminianu, większość neuronów wykazywała degenerację rozwijającą się w ciągu dnia następnego. Z drugiej strony, chociaż pominięcie w medium inkubacyjnym jonów Ca^{2+} zwiększało pęcznienie neuronów, następnego dnia obserwowano zmniejszoną ilość martwych komórek. Usunięcie zarówno jonów Na^+ jak i Ca^{2+} zapobiegało całkowicie zarówno wywołanemu przez glutaminian wczesnemu, osmotycznemu jak i późnemu uszkodzeniu neuronów kory mózgu myszy (Choi, 1987). Stwierdzono ponadto, że neurotoksyczne działanie niskiego stężenia glutaminianu może być zwiększone przez podwyższenie zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} (Choi, 1988).

Osmotyczne uszkodzenia są prostą konsekwencją aktywacji kanałów Na^+ , związanych z receptorami nie-NMDA. Po wejściu jonów Na^+ do komórki zgodnie z gradientem stężeń, siły elektrostatyczne powodują napływ jonów Cl^- przez kanały anionowe zależne od potencjału lub otwierane przez agonistów. W

warunkach zniesienia potencjału błonowego jony Cl^- napływają spontanicznie zgodnie ze swoim gradientem elektrochemicznym. Napływowi jonów Na^+ i Cl^- do komórki, niezależnie od sposobu w jaki to się odbywa, zawsze towarzyszy osmotyczne pobieranie wody. Proces pęcznienia komórek wywołany przez pobudzenie receptorów kwasu glutaminowego był już w 1970 roku sugerowany przez van Harrevelda (1970), a później dyskutowany przez Rothmana i Olney'a (1987) jako mechanizm ekscytotoksycznego uszkodzenia komórek nerwowych.

Jak już wspomniano poprzednio, poza indukowanym przez glutaminian ostrym uszkodzeniem neuronów, zależnym od jonów Na^+ i obejmującym szybkie pęcznienie komórek, wyodrębnić można mechanizm opóźnionego uszkodzenia, zależny od obecności jonów wapnia i rozwijającego się zaburzenia homeostazy wapnia w neuronach. Należy tu dodać, że rozpatrując napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek wywołany przez nadmierne pobudzenie receptorów kwasu glutaminowego w czasie ischemii, nie można ograniczać się jedynie do otwarcia kanałów wapniowych związanych z receptorami NMDA. Stymulacji receptorów kwasu glutaminowego i aktywacji kanałów NMDA towarzyszy i je warunkuje depolaryzacja, prowadząca zarazem do aktywacji zależnych od potencjału kanałów wapniowych. Oprócz tego działania pobudzenie glutamatergiczne może prowadzić do odwrócenia przepływu jonów w systemie wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, jak również może powodować niespecyficzne cieknięcie przez błony zmienione na skutek pęcznienia komórek. Zagadnienie to będzie omówione szerzej w dalszej części tego rozdziału.

1.6. Homeostaza wapnia w komórkach

W warunkach spoczynkowych przepuszczalność błony komórkowej neuronów dla jonów wapnia jest znikoma. Jest to niezbędne do utrzymania bardzo dużej różnicy pomiędzy zewnątrzkomórkowym stężeniem jonów Ca^{2+} wynoszącym 10^{-3} M, a stężeniem wewnątrzkomórkowym, utrzymującym się na poziomie poniżej 10^{-7} M (Wieloch i Siesjo, 1982). Utrzymanie tak niskiego, spoczynkowego, wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} jest warunkiem niezbędnym dla sprawnego funkcjonowania zależnych od wapnia mechanizmów transdukcji sygnałów, warunkujących z kolei m.inn. propagację impulsów nerwowych i uwalnianie neurotransmiterów w zakończeniach nerwowych. Napływ wapnia do wnętrza komórki jest odpowiedzialny nie tylko za uwalnianie neuroprzekaźników. Jony wapnia są bowiem wewnątrzkomórkowymi przekaźnikami drugiego rzędu, regulatorami wielu dróg metabolicznych, na które oddziałują wiążąc się z enzymami lub specyficznymi białkami regulatorowymi i regulując fosforylację białek efektorowych (Abdel-Latif, 1986). Zawartość jonów Ca^{2+} w komórce regulowana jest w związku z tym przez kompleksowe mechanizmy zapewniające szybkie włączanie oraz wyłączanie sygnału wapniowego, oraz zapobiegające nadmiernemu napływowi tych jonów do wnętrza i także usuwające ich nadmiar z cytosolu i z całej komórki.

Do wnętrza komórki wapń może przenikać poprzez specyficzne kanały jonowe: zależne od potencjału, aktywowane w wyniku depolaryzacji błony plazmatycznej (voltage sensitive calcium channels, VSCCs) oraz przez kanały regulowane przez receptory (receptor operated channels, ROCs). Ostatnio sugeruje się także obecność kanałów jonowych aktywowanych przez przekaźniki wewnątrzkomórkowe drugiego rzędu (second messenger operated channels, SMOCs) (Tsien i wsp., 1987). Sugeruje się także możliwość napływu wapnia przez niespecyficzne kanały jonowe (Tsien i wsp., 1987). Na zwiększenie stężenia jonów

wapnia we wnętrzu komórek może też mieć wpływ stymulacja różnych receptorów metabotropowych sprzężonych funkcjonalnie z fosfolipazą C. Stymulacja taka oraz napływ jonów Ca^{2+} do neuronów powoduje aktywację degradacji fosfolipidów inozytolowych. Jednym z produktów tej degradacji jest przekąźnik metaboliczny drugiego rzędu – trójfosfoinozytol, który aktywuje mobilizację wapnia zmagazynowanego w siateczce endoplazmatycznej.

Nadmiar jonów wapniowych usuwany jest z komórki w sposób aktywny, przy udziale specyficznej ATPazy wapniowej, bądź przez system antyportu z jonami Na^+ (Blaustein, 1974). Jony Ca^{2+} mogą wiązać się z różnymi grupami polarnymi białek i lipidów. Ponadto, w warunkach fizjologicznych nadmiar jonów Ca^{2+} we wnętrzu komórki magazynowany jest w systemie kanałów siateczki wewnątrzplazmatycznej oraz wiązany przez specyficzne białka m.inn. kalmodulinę. Sprawą kontrowersyjną jest rola nagromadzenia wapnia w mitochondriach, do których Ca^{2+} może dostawać się na zasadzie uniportu i wiązać się z jonami fosforanowymi oraz grupami polarnymi na wewnętrznej powierzchni błony wewnętrznej tych organelli (Meyer, 1989). Uważa się, że ze względu na niskie powinowactwo tego transportu do jonów Ca^{2+} , może on odgrywać rolę tylko przy patologicznym podwyższeniu stężenia wapnia w cytosolu.

1.7. Wapniowa hipoteza uszkodzenia mózgu spowodowanego przez niedokrwienie

Wykazano doświadczalnie, że zarówno ischemii jak i anoksji mózgu towarzyszy spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, co świadczy o masowym przemieszczeniu tych jonów do wnętrza komórek (Hansen i wsp., 1984). Podobne zjawisko obserwowano w śpiączce hipoglikemicznej i epilepsji (Siesjo, 1981). Stwierdzono, że miejscowe podawanie glutaminianu także powoduje znaczną redukcję zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (Berdichevsky i wsp., 1983). W podobnych warunkach może dojść również do nadmiernego uwalniania wapnia z

magazynów wewnątrzkomórkowych. Oba te mechanizmy mogą wspólnie przyczynić się do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu, jednakże większy udział w tym procesie wydaje się mieć podwyższony napływ wapnia do wnętrza komórki.

Uważa się, że zaburzenia homeostazy wapnia prowadzące do znacznego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} uruchamiają reakcje, które w warunkach prawidłowych są elementami normalnej regulacji metabolizmu komórki, natomiast zachodząc w takim natężeniu jak w czasie niedokrwienia, są przyczyną nieodwracalnych uszkodzeń i śmierci komórki. Początkowo masowemu napływowi wapnia do neuronów przypisywano wyłącznie działanie toksyczne i destrukcyjne związane z wczesną, niespecyficzną fazą uszkodzenia neuronów natychmiast po niedokrwieniu (Siesjo i Bengtsson, 1989). Dalsze badania, a zwłaszcza wpływ hipotezy ekscytotoksycznej skierował główne zainteresowanie badaczy na rolę wapnia jako przekaźnika drugiego rzędu, który może oddziaływać także na mechanizmy ekspresji genów i odgrywać kluczową rolę w rozwoju opóźnionych uszkodzeń neuronów kilka dni po niedokrwieniu.

Od dawna szczególną uwagę skupiają reakcje związane z metabolizmem fosfolipidów i kwasów tłuszczowych. Fosfolipazy, a zwłaszcza fosfolipaza A_2 są aktywowane przez jony Ca^{2+} . Z kolei wiadomo, że ischemia wywołuje lipolizę i nagromadzenie wolnych kwasów tłuszczowych, szczególnie kwasu arachidonowego oraz diacylogliceroli. Wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych oraz eikozanoidów, produktów degradacji kwasu arachidonowego może zaburzać metabolizm komórki. Lizofosfolipidy i wolne kwasy tłuszczowe oraz ich estry z CoA powodują rozprzężenie reakcji fosforylacji oksydacyjnej i blokują translokazę nukleotydu adeninowego. Ponadto powodują uwalnianie jonów Ca^{2+} gromadzonych w mitochondriach i przyczyniają się do ich pęcznienia (Wieloch i Siesjo, 1982). Obok rozprzężenia reakcji fosforylacji oksydacyjnej, oraz uwalniania jonów Ca^{2+} z zasobów wewnątrzkomórkowych, kwasy tłuszczowe modyfikują

płynność i przepuszczalność błon komórkowych (Wieloch i Siesjo, 1982). Może to prowadzić do dalszego napływu jonów Ca^{2+} do komórek i ostatecznego ich uszkodzenia. Nagromadzone w komórkach mózgu w czasie ischemii wolne kwasy tłuszczowe, a zwłaszcza kwas arachidonowy, w okresie poischemicznym utleniane są na drodze cyklooksygenazy i lipoksygenazy do prostaglandyn i leukotrienów. Temu procesowi towarzyszy wytwarzanie wolnych rodników o dużej toksyczności, powodujących dodatkowe uszkodzenia komórek (Siesjo, 1981).

Napływ jonów Ca^{2+} do neuronów może powodować również aktywację zależnych od jonów wapnia obojętnych proteaz (kalpain) i hydrolizę białek enzymatycznych i strukturalnych. Obojętne proteazy mogą poprzez degradację neurofilamentu i oddziaływanie na mikrotubule również przyczyniać się do rozpadu cytoskeletonu (Schlaepfer i wsp., 1981). Jony wapnia w połączeniu ze zaktywowaną kalmoduliną oraz czynnikiem tau powodują rozpad polimerów mikrotubuli na podjednostki (Marcum, 1978). Te procesy upośledzają funkcjonowanie aksonów. Ponadto kalpainsy poprzez ograniczoną proteolizę mogą spowodować niekontrolowaną aktywację kinazy białkowej C.

Jak już wcześniej wspomniano kinazie białkowej C przypisuje się istotną rolę w patogenezie uszkodzeń neuronów. Do aktywacji kinazy białkowej C konieczne są zarówno jony Ca^{2+} jak i fosfolipidy, a dodatkowa obecność diacylogliceroli znacznie podwyższa powinowactwo kinazy do tych związków. Wolny kwas arachidonowy uwalniany w wyniku aktywacji receptorów NMDA (Łazarewicz i wsp., 1990) należy także do aktywatorów niektórych podtypów kinazy białkowej C, ponadto wzmacnia aktywację PKC przez diacyloglicerole (Farago i wsp., 1990). W warunkach ischemii, kiedy poziom tych wszystkich związków ulega podwyższeniu, dochodzi do dekompartmentacji i aktywacji kinazy białkowej C (Domańska-Janik i Zalewska, 1992). Zmiany te mogą prowadzić do zaburzenia w przekazywaniu wewnątrzkomórkowych informacji metabolicznych, a nawet do zaburzenia ekspresji genów.

Jednakże w ostatnich badaniach obserwowano w okresie poischemicznym spadek aktywności kinazy białkowej C. Dzieje się tak być może pod wpływem uwalniania endogennego inhibitora – sfingozyny lub uaktywniania się innego, zależnego od jonów Ca^{2+} inhibitora kinazy (Crumrine, 1990). Wydaje się, że wytłumaczenia mechanizmu występującego po ischemii opóźnionego uszkodzenia neuronów, można się dopatrywać w zaburzeniu całego łańcucha transdukcji sygnałów, prowadzącego od receptora błonowego poprzez system przekaźników metabolicznych drugiego rzędu, w tym wapnia, kompleksu wapń-kalmodulina, PKC i fosforylację białek substratowych, do jądra i poprzez system przekaźników trzeciego rzędu zmianę ekspresji genów prowadzącą do zmiany fenotypu komórki na letalną.

Nie zostało jednoznacznie stwierdzone, że wapń jest czynnikiem pośredniczącym w ischemicznym uszkodzeniu we wszystkich tkankach. W niektórych modelach niedokrwiennego uszkodzenia komórek nerwowych nie obserwowano korelacji pomiędzy żywotnością komórek, a zawartością jonów Ca^{2+} . W badaniach przeprowadzanych na innych tkankach stwierdzono, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hepatocytach poddanych chemicznej hipoksji nie powodował wyraźnych zmian (Lemasters i wsp., 1987). Należy jednak pamiętać, że dojrzewanie uszkodzenia po niedokrwieniu jest fenomenem specyficznym dla określonego typu neuronów i dlatego wyniki eksperymentów prowadzonych na innych komórkach i tkankach nie zawsze są adekwatne do postawionego zagadnienia. Udowodnione fakty, a więc przemieszczenie wapnia do neuronów zachodzące w czasie niedokrwienia i hipoksji mózgu (Siesjo, 1981; Hansen, 1984), zależność uszkodzenia neuronów w hodowli poddanych niedotlenieniu od obecności jonów wapnia (Choi, 1988), protekcyjne działanie zarówno blokerów kanałów wapniowych zależnych od potencjału jak i blokerów kanałów sprzężonych z receptorami kwasu glutaminowego wrażliwych na NMDA (Simon i wsp. 1984; Greenberg i wsp. 1991), świadczą o roli przemieszczenia

wapnia do neuronów w patogenezie uszkodzeń neuronów w wyniku niedotlenienia i niedokrwienia mózgu. Wydaje się więc, że poznanie mechanizmów, prowadzących do wzmożonego napływu jonów wapnia do neuronów mózgu w ischemii może mieć nie tylko znaczenie poznawcze, ale i praktyczne – wskazując na najbardziej odpowiedni cel interwencji terapeutycznych.

1.8. Potencjalne mechanizmy wnikania jonów wapnia do wnętrza neuronów w czasie niedokrwienia

Jak podkreślono w poprzednich paragrafach, wzmożony napływ jonów wapnia do wnętrza neuronów w warunkach niedokrwienia mózgu kandydować może do roli jednego z głównych czynników inicjujących nieodwracalne uszkodzenia komórek nerwowych. Nie jest jednak jasne, który z mechanizmów umożliwiających napływ wapnia do neuronów ma dominujące znaczenie w niedokrwieniu. Istnieje bowiem szereg typów kanałów wapniowych, które ulegają aktywacji w różnych warunkach. Ogólny podział sprowadza się do wyróżnienia kanałów zależnych od depolaryzacji błon (VSCCs) i kanałów aktywowanych poprzez stymulację receptorów z którymi są sprzężone (ROCs).

Według klasycznych poglądów w komórkach tkanki nerwowej stwierdzono występowanie trzech typów kanałów wapniowych zależnych od depolaryzacji (Nowycky i wsp., 1985). **Typ L** – najbardziej rozpowszechniony, jest aktywowany przez silną depolaryzację. Jego otwarcie powoduje powolny, długotrwały napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek. Kanały **typu T** otwierają się przy bardziej ujemnym potencjale niż kanały typu L, wymagają do aktywacji mniejszej depolaryzacji. Są odpowiedzialne za napływ jonów Ca^{2+} trwający krótko, gdyż ich inaktywacja odbywa się dosyć szybko w odpowiedzi na zmiany potencjału.

Kanały wapniowe typu N – otwierają się tylko przy bardzo dużej depolaryzacji z bardzo ujemnego potencjału i bardzo szybko ulegają dezaktywacji. Typ N kanałów wapniowych zlokalizowany jest głównie w części presynaptycznej i dlatego uważa się, że kanały te biorą udział w zależnym od jonów wapnia uwalnianiu neurotransmiterów. Selektywność kanałów wapniowych jest dość ograniczona. Wykazano, iż kanały zależne od potencjału oprócz jonów Ca^{2+} mogą również przepuszczać jony Ba^{2+} i Sr^{2+} (Tsien i wsp., 1987).

Wśród kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych, kanał związany z receptorem wrażliwym na NMDA odgrywa prawdopodobnie największą rolę w ischemicznym napływie jonów wapnia do neuronów, ze względu na wysoką przepuszczalność dla jonów Ca^{2+} . Aktywacja kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami NMDA jest w pewnym stopniu zależna od depolaryzacji. Pobudzenie kanałów jonowych związanych z receptorami KA i pojawiająca się depolaryzacja może wtórnie ułatwiać otwarcie zarówno kanałów zależnych od potencjału, jak i kanałów wapniowych związanych z receptorami NMDA. Jak wynika z badań elektrofizjologicznych, napływ wapnia bezpośrednio przez kanały sprzężone z receptorami KA jest nieznaczny.

Inną możliwą drogą napływu jonów Ca^{2+} w warunkach niedokrwienia jest odwrócenie działania mechanizmu, który normalnie zaangażowany jest w usuwanie tych jonów z komórek. W warunkach niedoboru energii i dekompartamentacji jonów sodu, wymiana $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ może odbywać się w stronę przeciwną powodując napływ jonów wapnia do komórek. Zmiany metaboliczne wywołane przez niedokrwienie mogą również powodować otwarcie niespecyficznych kanałów wapniowych, jednakże wydaje się, że jest to proces wtórny, występujący później niż obserwowany w pierwszej fazie niedokrwienia, masowy napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza neuronów.

Związki chemiczne będące blokerami kanałów wapniowych okazały się bardzo przydatnymi narzędziami farmakologicznymi w badaniach prowadzących do identyfikacji dróg napływu wapnia do neuronów w czasie niedokrwienia. Najwcześniej odkryto związki blokujące kanały zależne od depolaryzacji. Już w 1960 roku Fleckenstein stwierdził, że fenyloalkyloaminy, takie jak np. verapamil, hamują przepływ jonów Ca^{2+} przez te kanały (Fleckenstein, 1985). Następną grupą zidentyfikowaną jako blokery kanałów wapniowych zależnych od depolaryzacji są dihydropirydyny, takie jak nifedipina czy nimodipina. Trzecią klasą są benzodiazepiny (np. diltiazon), które odkryte zostały najpóźniej (Kamp i Miller, 1987). Dokładniejsze badania wykazały, że blokery te działają głównie na kanały typu L, jednakże ostatnie doniesienia mówią o stwierdzonej wrażliwości na niektóre dihydropirydyny, także kanałów typu N oraz słabiej typu T. Kanały te wrażliwe są natomiast na działanie innego związku – omega-konotoksyny. Niektóre związki z grupy dihydropirydyn mające powinowactwo do miejsc wiążących te inhibitory, mają jednak działanie agonistów, pobudzających, a nie hamujących aktywację kanałów. Tak jest w przypadku związku o nazwie Bay K 8644, który oddziałując na miejsce wiążące dihydropirydyny, nie aktywuje kanałów L, ale zapobiega inaktywacji kanałów, które zostały pobudzone przez depolaryzację (Kamp i Miller, 1987).

Kanały wapniowe związane z receptorami kwasu glutaminowego mogą być skutecznie blokowane przez związki będące swoistymi antagonistami tych receptorów. Obecnie znana jest szeroka gama antagonistów receptorów NMDA, o różnej charakterystyce działania. Związki te można podzielić na dwie grupy: antagonistów o działaniu kompetycyjnym i niekompetycyjnym (Watkins i Olverman, 1987; Kemp i wsp., 1987). W grupie antagonistów kompetycyjnych stwierdzono, że najbardziej aktywne są długołańcuchowe aminokwasy o dodatkowej grupie kwasowej. Należą tu związki takie jak kwas 2-amino-5-fosfopentanowy (AP5), kwas 2-amino-7-fosfopentanoheptanowy (AP7), kwas 2-amino-5-

fosfonowalerowy (APV), ponadto często używane są kwas 3-((±)-2-karboksypiperazyno-4yl)propylo-1-fosfonowy (CPP) oraz 3-((±)-2-karboksypiperazyno-4yl)butanowy (CPC). Ze związków będących antagonistami receptorów NMDA o działaniu niekompetycyjnym należy wymienić fencyklidynę (PCP), ketaminę oraz akrylcykloheksyloaminę. Dibenzocykloheptenimina MK-801 uważana jest obecnie za najsilniejszego antagonistę niekompetycyjnego receptorów NMDA opisanego do tej pory.

Znaleziono również szereg związków oddziałujących na miejsca wiążące efekторы będące allosterycznymi, pozytywnymi modulatorami receptorów NMDA, niezbędnymi do aktywacji i otwarcia kanału wapniowego związanego z receptorem NMDA. Podczas gdy poliaminy – spermina i spermidyna działają stymulująco na otwarcie kanałów, inne, jak putrescyna czy kadaweryna działają blokująco. Kwas 7-chlorokinurenowy hamuje otwarcie kanału poprzez selektywny antagonizm w stosunku do miejsca glicynowego w kompleksie receptor/kanał NMDA. Cykloleucyna również zachowuje się jak antagonistą miejsca glicynowego.

Należy również wspomnieć o kationach – antagonistach receptorów NMDA. Należą do nich jony Mg^{2+} , które hamują, w sposób niekompetycyjny, przepływ jonów wapnia przez kanały sprzężone z receptorami NMDA. Oprócz jonów Mg^{2+} zaobserwowano również, iż jony Zn^{2+} mogą selektywnie blokować otwarcie kanałów sprzężonych z receptorami NMDA. Działanie jonów Zn^{2+} różni się w zależności od ich stężenia. Przy niskich stężeniach (1–10 μM) jony te uniemożliwiają otwarcie kanałów, natomiast wyższe stężenia (10–100 μM) powodują zablokowanie już otwartych kanałów na zasadzie podobnej jak jony Mg^{2+} .

Przez długi czas nie udawało się znaleźć absolutnie selektywnych antagonistów receptorów nie-NMDA. Najbardziej uznanym w chwili obecnej antagonistą tych receptorów jest kwas p-bromobenzyl-piperazyno dwukarboksylowy, oraz związki z grupy chinonooksalinodionów o nazwie DNQX i

CNQX. Oddziałują one silnie na receptory wrażliwe na kwas kwiskwalowy i nieco słabiej na receptory kwasu kainowego, natomiast wykazują znacznie mniejszy wpływ na receptory NMDA. Ostatnie lata przyniosły odkrycie nowych, selektywnych inhibitorów receptorów kwasu kainowego. Są to pochodne kwasu propionowego – AMOA i AMNH.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Jak przedstawiono powyżej, zaburzenia homeostazy wapnia w neuronach, wyrażające się przede wszystkim przemieszczeniem jonów wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórek, jest nie tylko jednym ze zjawisk charakterystycznych dla niedokrwienia mózgowia, ale wydaje się być ponadto jednym z najważniejszych elementów patomechanizmu uszkodzenia neuronów, zachodzącego w wyniku niedokrwienia. Nie jest jednak jasne, jakie jonofory są wykorzystywane w tym procesie. Są podstawy do przypuszczenia, że najważniejszą rolę mogą odgrywać zarówno kanały wapniowe zależne od potencjału, zwłaszcza typu L, jak i kanały regulowane przez receptory NMDA, jest jednak sprawą sporną, w jakim stopniu mogą być one aktywowane w czasie niedokrwienia. Identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za wnikanie wapnia do neuronów mózgu w czasie niedokrwienia byłaby ważna nie tylko ze względów poznawczych, ale także praktycznych, dla wybrania właściwego celu interwencji terapeutycznej prowadzącej do zmniejszenia uszkodzeń wywołanych przez ischemię.

Rejestracja zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia jest szeroko stosowaną metodą umożliwiającą ilościową ocenę przemieszczenia jonów Ca^{2+} między przestrzenią zewnątrz- i wewnątrzkomórkową, a zastosowanie odpowiednich narzędzi farmakologicznych może ułatwić różnicowanie między poszczególnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za te przemieszczenia.

Hipokamp, który jest strukturą mózgu cechującą się szczególną wrażliwością na niedokrwienie, dużym zagęszczeniem receptorów kwasu glutaminowego oraz obecności zależnych od potencjału kanałów wapniowych wrażliwych na dihydropirydyny, wydaje się materiałem odpowiednim do takich badań.

Celem pracy było wyjaśnienie, który z dwu przedstawionych wyżej mechanizmów napływu wapnia do neuronów odgrywa dominującą rolę w zależnym od niedokrwienia obniżeniu zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie. Dla osiągnięcia tego celu postanowiono:

- zbadać zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w hipokampie w warunkach całkowitego niedokrwienia mózgowia. Poza oceną dynamiki tego procesu zmierzano do farmakologicznego różnicowania między udziałem w tym procesie zależnych od potencjału kanałów wapniowych typu L oraz kanałów sprzężonych z receptorami NMDA,
- przeprowadzić badanie porównawcze zmian zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w hipokampie wywołanych przez maksymalną stymulację receptorów NMDA oraz kanałów wapniowych zależnych od potencjału,
- wyjaśnić mechanizmy zaburzeń homeostazy jonów wapnia w hipokampie spowodowane przez agonistów receptorów kwasu glutaminowego, depolaryzację i agonistę zależnych od potencjału kanałów L.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał doświadczalny

Obiektem badań były króliki obu płci o masie ciała 2.5 – 3.5 kg. Zwierzęta te pochodziły z zakupu w Zakładzie Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych Łomianki – Las lub poprzez Spółdzielnię Hodowców Drobного Inwentarza. Przed doświadczeniem króliki odbywały kwarantannę w zwierzętarni I-CMDiK PAN. Po zakończonych doświadczeniach przeprowadzano autopsję królików. Wyniki uzyskane na zwierzętach wykazujących objawy chorobowe lub przy nieprawidłowej implantacji sondy dializacyjnej w hipokampie nie były brane pod uwagę.

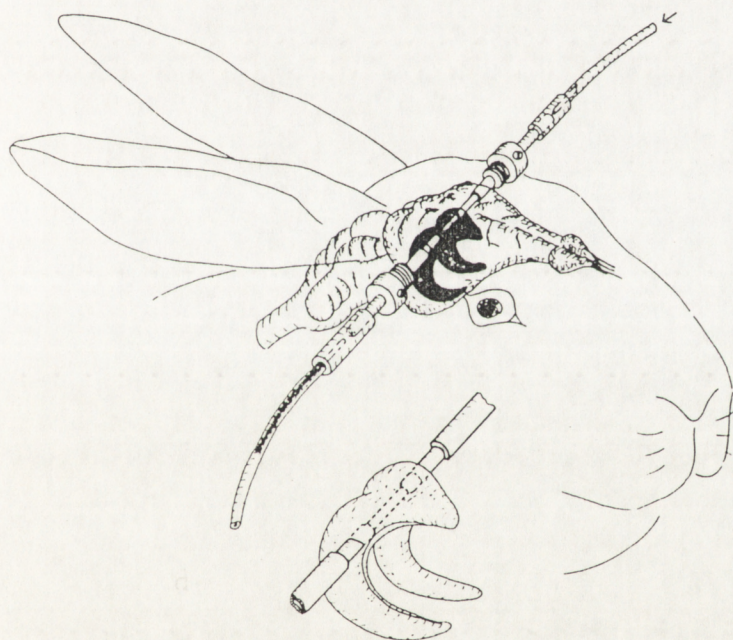
3.2. Metoda mikrodializy hipokampa

3.2.1. Implantacja sondy dializacyjnej

Królikom będącym w narkozie pentobarbitalowej (Vetbutal 30 mg na kg masy ciała) implantowano elastyczną, transhipokampalną sondę dializacyjną zgodnie z metodą Ungerstedta (Ungersted i wsp. 1982), opracowaną do doświadczeń na królikach przez Hambergera (Hamberger i wsp. 1982; Hamberger i wsp. 1985).

W tym celu z obu stron czaszki, w punktach leżących 4 mm do tyłu i 18 mm w bok w stosunku do bregmy nawiercano otwory trepanacyjne o średnicy 3.5 mm. W otwory wkręcano śruby ze stali nierdzewnej z centrycznie umieszczonymi kanałami. Przy pomocy prostego aparatu opartego na suwmiarce, śruby były wkręcane w czaszkę, w taki sposób, by centryczne otwory umieszczone były współosiowo. Sonda dializacyjna składająca się z odcinka rurki dializacyjnej o długości 10 mm i średnicy zewnętrznej 0.16 mm (Cuprophan, Gambro,

przepuszczalna dla molekuł o ciężarze cząsteczkowym 10 000 – 15 000) umocowanego pomiędzy odcinkami rurki polietylenowej (średnica zewnętrzna 0.3 mm) była umieszczona w grzbietowej części hipokampa przy pomocy stalowego drutu – prowadnicy (dł. 15 cm, śr. 0.3 mm), który przeciągano przez czaszkę, przeprowadzając go przez otwory w śrubach (Rys.1). Następnie wystające części rurek polietylenowych mocowano do śrub przy pomocy szybkoschnącego kleju cyjanoakrylowego i adaptowano z jednej strony do połączenia z pompą infuzyjną, a z drugiej do zbierania próbek.



Rys. 1
Schemat implantacji sondy dializacyjnej do hipokampa królika. Hamberger i wsp. (1982).

3.2.2. Dializa – perfuzja hipokampa

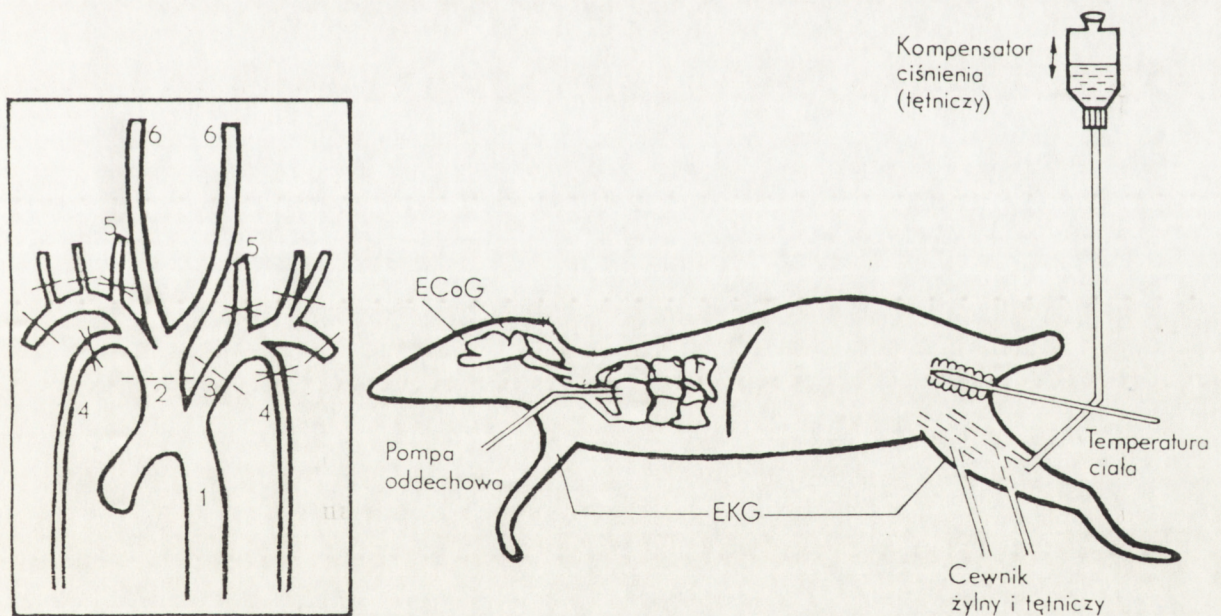
Wszystkie doświadczenia przeprowadzone były na drugi dzień po implantacji sondy dializacyjnej. Na 3.5 godz przed doświadczeniem łączono wlot rurki z pompą infuzyjną (Typ 601, Medipan, Warszawa), podającą płyn Krebsa – Ringera z buforem dwuwęglanowym (KRB) o składzie: 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM CaCl₂, pH 7.4 z szybkością 2.5 ul/min. Perfuzat zbierano w odstępach 5 lub 10 minutowych do polietylenowych mikroprobówek. Dializę hipokampa prowadzono w sposób ciągły przed i w czasie niedokrwienia lub podawania związków o działaniu farmakologicznym i kontynuowano przez dalsze 2 godziny.

3.3. Model całkowitego niedokrwienia mózgu

Całkowite niedokrwienie mózgu u królika wywoływano przy użyciu metody opracowanej i szczegółowo opisanej przez Plutę (1982). Zwierzętom uśpionym przez dożylnie wstrzyknięcie pentobarbitalu (Vetbutal, 30 mg/kg) wykonywano tracheostomię i zwiotczano je Tricuraniem (3–4 mg/kg masy ciała i.v.). Oddech kontrolowano przez podłączenie do pompy oddechowej (Medipan) i wentylowano powietrzem, a okresowo (po niedokrwieniu) mieszanką powietrza z tlenem, przy częstotliwości oddechów 20 – 30 na minutę. W miarę potrzeby podawano uzupełniające dawki Vetbutalu i Tricuranu. Zwierzętom podawano także leki przeciwbólowe – Pyralginę (2.5 ml i.v.) oraz miejscowo 1% Xylocainę.

Niedokrwienie mózgu wywoływano przez trwające 15 minut zaciśnięcie pnia ramiennie-głowego, lewej tętnicy podobojczykowej, oraz obu tętnic piersiowych wewnętrznych. Dodatkowo zakładano stałe podwiązki na obie tętnice pachowe, a na okres niedokrwienia mózgu zaciskano klipsami Heifetza obie tętnice kręgowe w miejscu ich odejścia od tętnic podobojczykowych. Ponadto, dla

uniknięcia obocznego napływu krwi do mózgowia oraz zmniejszenia reakcji wazopresyjnej obwodowych naczyń tętniczych, obniżano ciśnienie tętnicze do 70 – 50 mmHg, stosując metodę kontrolowanego skrwawienia do kompensatora ciśnienia (Pluta 1982). W tym celu cewnikowano lewą tętnicę udową i łączono ją z pojemnikiem zawierającym ok. 50 ml 0.9% NaCl z dodatkiem 2 ml (10 000 jednostek) heparyny (Rys.2). Po 15 minutach udroźniano tętnice doprowadzające krew do mózgowia, zdejmując założone uprzednio zaciski, oraz przeprowadzano retransfuzję krwi zwierzęcia z kompensatora ciśnienia.



Rys.2

Schemat modelu całkowitego niedokrwienia mózgowia. x – klipsy Heifetza, - - - - podwiązki okresowe, — — — — podwiązki stałe, 1 – tętnica główna, 2 – pień ramienny-główny, 3 – tętnica podobojczykowa lewa, 4 – tętnica piersiowa wewnętrzna, 5 – tętnica kręgową, 6 – tętnica szyjna wspólna. Pluta (1982).

Przez cały czas trwania doświadczenia (1 godz przed oraz 2-3 godz po niedokrwieniu) prowadzono zapisy czynności bioelektrycznej mózgu (EEG), pomiary ciśnienia krwi tętniczej i czynności bioelektrycznej serca (EKG). Kontrolowano również hematokryt, P_{CO_2} , P_{O_2} , HCO_3^- we krwi zwierzęcia oraz temperaturę ciała w rectum.

3.4. Podawanie związków o działaniu farmakologicznym

Zwierzętom doświadczalnym podawano następujące związki o działaniu farmakologicznym:

- kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA) – specyficzny agonista jednej z podgrup receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych,

- kwas 2-amino-5-fosfono-walerowy (APV) – specyficzny antagonist receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych wrażliwych na NMDA,

- dibenzocykloheksimina (MK-801) – niekompetycyjny antagonist receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych wrażliwych na NMDA,

- kwas kainowy (KA) – agonista jednej z podgrup receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych,

- 6,7-dinitrochinoksalino-2,3-dion (DNQX) – kompetycyjny antagonist receptorów kwasu glutaminowego nie wrażliwych na NMDA,

- Bay K 8644 – pochodna dihydropirydyny, agonista kanałów wapniowych zależnych od depolaryzacji typu L,

- nimodipina (izopropyl-2-metylo-1,4-dihydro-2,6-dimetylo-4-(3-nitrofenylo)-3,5-pirydino-karboksylian) bloker kanałów L – jednej z podgrup kanałów wapniowych zależnych od potencjału, wrażliwych na dihydropirydyny,

– amilorid – inhibitor kanałów sodowych i zarazem mało specyficzny bloker wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$,

– 5-(N,N-dimetylo)-amilorid – inhibitor wymiany Na^+/H^+ i zarazem bloker wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

3.4.1. Nimodipina

Roztwór podstawowy 10 mM nimodipiny w 96% etanolu był przygotowywany do każdego doświadczenia oddzielnie w dniu eksperymentu. Naważkę przygotowywano, rozpuszczano, rozcieńczano oraz przechowywano chroniąc przed dostępem światła; roztwór nimodipiny podawany zwierzętom także był chroniony przed działaniem światła.

Nimodipinę podawano dwoma sposobami: systemowo – dożylnie, lub poprzez sondę dializacyjną. Dożylne podawanie nimodipiny zapoczątkowane było jednorazowym wstrzyknięciem dawki 10 ug/kg masy ciała, 15 minut przed zadziałaniem czynnika patogenicznego, po czym od 10 minuty niedokrwienia lub podawania związków farmakologicznie czynnych, prowadzona była ciągła infuzja nimodipiny poprzez żyłę uszną lub, w doświadczeniach ischemicznych, żyłę udową w stężeniu 1 ug/kg/min w roztworze KRB zawierającym ok. 0.1% etanolu. Infuzja kontynuowana była przez 2 godz. po zadziałaniu czynnika patogenicznego.

Nimodipina podawana była metodą dializy w płynie KRB zawierającym 0.1% etanolu, w stężeniu 10 uM, w sposób ciągły na 30 min przed, w czasie oraz przez 2 godz po zadziałaniu czynnika patogenicznego. Jak wykazały doświadczenia kontrolne in vitro, wydajność dializy dla nimodipiny, w stosowanej w tej pracy sondzie, przy szybkości dializy 2.5 ul/min w temp. 37°C wynosiła 30%.

3.4.2. Kwas N-metylo-D-asparaginowy i kwas kainowy

Związki będące agonistami receptorów kwasu glutaminowego, NMDA i KA podawane były bezpośrednio przez sondę dializacyjną w roztworze KRB, najczęściej w stężeniu 2.5 mM, przez okres 20 min.

3.4.3. Bay K 8644

Roztwór podstawowy 10 mM Bay K 8644 w 96% etanolu był przygotowywany jak opisano dla nimodipiny. Bay K 8644 podawany był przez sondę dializacyjną w roztworze KRB zawierającym 0.1% etanol, w stężeniu 10 uM przez okres 20 min.

3.4.4. Kwas 2-amino-5-fosfono-walerowy

APV w postaci 1 mM roztworu w KRB podawany był w sposób ciągły przez sondę dializacyjną na 60 min przed, w czasie i 2 godz po niedokrwieniu lub podawaniu NMDA albo KA.

3.4.5. MK-801

MK-801 w stężeniu 10 uM w roztworze KRB podawane było w sposób ciągły przez sondę dializacyjną na 60 min przed, w czasie i przez 1.5 godz po podaniu agonisty jednej z grup receptorów aminokwasów pobudzających (NMDA lub KA) lub wysokiego stężenia potasu (65 mM KCl).

3.4.6. Amilorid oraz 5-(N,N-dimetylo)-amilorid

Amilorid oraz jego pochodna 5-(N,N,-dimetylo)-amilorid podawane były jako 0.5 mM roztwór w KRB na 60 min przed, w czasie i 1.5 godz po podaniu NMDA lub KA.

3.4.7. DNQX

DNQX podawane było w postaci 0.25 mM roztworu w KRB na 60 min przed, w czasie i 1.5 godz po podaniu kwasu kainowego.

3.5. Pomiar zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia

W celu ilościowego określenia zmian stężenia wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa zastosowano metodę wykorzystującą wapń radioaktywny ^{45}Ca , opisaną przez Łazarewicza i wsp. (1986a).

Endogenną pulę wapnia w hipokampie znakowano izotopem $^{45}\text{Ca}^{2+}$, przeprowadzając trwającą 60 minut perfuzję hipokampa płynem Krebsa – Ringera z dodatkiem dwuwęglanów zawierającym 1.2 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ (dawka całkowita 15 μCi tj. 5.55×10^5 Bq; radioaktywność specyficzna 88.3 mCi, tj. 2.9×10^{12} Bq/ μmol). Następnie kontynuowano perfuzję przy użyciu standardowego płynu KRB.

Po trwającym 90 min odpłukiwaniu nadmiaru $^{45}\text{Ca}^{2+}$, przez następne 60 min zbierano próbki perfuzatu w odstępach 10 minutowych w celu uzyskania wartości wyjściowych, a następnie rozpoczynano właściwe doświadczenie – niedokrwienie lub podawanie związków farmakologicznie czynnych, stale zbierając próbki perfuzatu w czasie trwania warunków doświadczalnych i przez 90 min po przywróceniu warunków kontrolnych. Z każdej próbki pobierano 5 μl perfuzatu i umieszczano w fiolkach scyntylicyjnych zawierających 7.5 ml płynu

Wiadomo (Łazarewicz i wsp. 1986a), że wydajność dializy dla jonów Ca^{2+} (przy zastosowaniu typowej sondy, szybkości perfuzji 2.5 ul/min i temp. 37°C) wynosi 19%, niezależnie od stężenia wapnia. Wartość ta dotyczy zarówno znakowania wapnia endogennego przez podawanie ^{45}Ca do medium perfuzyjnego jak i następczej fazy – oddializowania wyznakowanego przez $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wapnia zewnątrzkomórkowego.

Jak wykazano (Łazarewicz i wsp. 1986a), wykres radioaktywności w próbkach dializatu pobieranych podczas odpłukiwania ^{45}Ca , daje typową krzywą desaturacyjną. W okresie objętym doświadczeniem, tj. po trwającym 90 min odpłukiwaniu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ niespecyficycznie związanego z powierzchnią sondy, przez następne 2–3 godz uzyskiwano liniową zależność logarytmu radioaktywności w próbce od czasu trwania dializy, co świadczy o jednokompartmencieowym charakterze krzywej. W tych warunkach przyjmowano radioaktywność dializatu jako miernik stężenia wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Dla ilościowego wyrażenia zmian w zewnątrzkomórkowym stężeniu wapnia uzyskiwano krzywą kontrolną poprzez regresję liniową z logarytmów wartości uzyskanych z pomiarów radioaktywności próbek zbieranych przed zadziałaniem czynników zmieniających homeostazę wapnia i w ostatnich próbach eksperymentu, po przywróceniu znormalizowanej dynamiki odpłukiwania $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Następnie wartości radioaktywności próbek doświadczalnych wyrażane były jako procent odpowiednich wartości, odczytanych z krzywej kontrolnej (Łazarewicz i wsp. 1986a).

3.6. Pomiar przepuszczalności bariery krew – mózg

Zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg określane były przy użyciu metody mikrodializy hipokampa. Jako wskaźnik stosowana była fluoresceina podawana dożylnie, której stężenie badano następnie w dializacie.

Króliki otrzymywały Na-fluoresceinę (Gulati i wsp. 1982) w iniekcji dożylnej jako 1% roztwór w soli fizjologicznej, w całkowitej dawce 10 mg/kg masy ciała. W celu określenia przepuszczalności bariery krew – mózg dla fluoresceiny badano jej stężenie w próbkach perfuzatu (Pluta i wsp. 1988). Do badania pobierano 5 μ l płynu, który rozcieńczano 10-krotnie roztworem KRB. Fluorescencję mierzono przy długości fali wzbudzenia 460 nm i długości fali emisji 520 nm, przy pomocy spektrofluorymetru firmy Aminco – Bowman, Silver Spring, Maryland, USA. Do pomiarów fluorescencji badane próbki nie były zakwaszane co zalecali inni autorzy (Gulati i wsp. 1982), gdyż w przeprowadzonych wcześniej pomiarach kontrolnych wykazano, że wartość pH nie ma wpływu na stopień fluorescencji próbek perfuzatu zawierających fluoresceinę.

W badaniach kontrolnych stwierdzono, że stężenie fluoresceiny we krwi początkowo zmniejsza się w sposób wykładniczy ($t_{1/2}$ – 28.5 min), a następnie ustala się na poziomie 5% stężenia początkowego, stabilnym przez co najmniej 60 minut. Stężenie fluoresceiny w perfuzacie przyrastało w ciągu 30 – 45 minut po iniekcji i następnie utrzymywało się przez ponad 2 godziny na stabilnym poziomie. Ustalony poziom fluoresceiny w perfuzacie przyjmowany był za poziom kontrolny (100%), względem którego obliczano relatywne zmiany stężenia fluoresceiny. Doświadczenia ischemiczne rozpoczynano 1 godz po iniekcji fluoresceiny, a próby perfuzatu zbierano 30 min przed, w czasie i przez 2 godz po zadziałaniu czynników patogennych, w odstępach 5 minutowych.

3.7. Pomiar zmian zewnątrzkomórkowego stężenia neurotransmiterów aminokwasowych: kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego

Do pomiaru zewnątrzkomórkowego stężenia kwasu glutaminowego i asparaginowego w hipokampie królika wykorzystano metodę wysokosprawnościowej chromatografii cieczowej (HPLC).

Próbki perfuzatu pozostałe po pobraniu płynu w celu pomiarów radioaktywności łączone były tak, by otrzymać próbę o objętości sumarycznej 15 μ l, reprezentatywnej dla 15 min okresu perfuzji. W wyniku połączenia otrzymywano dwie próby kontroli, odzwierciedlające poziom aminokwasów przed działaniem czynników patogennych i sześć prób z których jedna odpowiadała ischemii lub działaniu związków farmakologicznie czynnych, a pozostałe okresowi powrotu do warunków kontrolnych.

Aminokwasy rozdzielano przy użyciu zestawu do HPLC firmy ISCO, Lincoln, USA, w którym fazę stałą stanowiła kolumna wypełniona oktadecysilanem (Zorbax ODS, Du Pont, 4.6 x 250 mm), a jako fazę ruchomą stosowano bufor fosforanowy pH 5.25 ze wzrastającym gradientem metanolu. Przed rozdzieleniem aminokwasy przeprowadzano we fluoryzujące pochodne izoindolowe w reakcji z o-ftaldialdehydem w środowisku zasadowym zawierającym merkaptoetanol (Lindroth i Mopper 1979).

Stężenie rozdzielonych aminokwasów określone było na podstawie pomiarów fluorescencji (fluorymetr Kratos FS 970 L.C.) i porównaniu z wartościami standardowymi. Wyniki wyrażone były jako procent wartości kontrolnych uzyskanych przed rozpoczęciem doświadczenia. Aby uzyskać bezwzględne wartości stężeń aminokwasów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa, stężenia aminokwasów oznaczone w próbkach dializatu mnożono przez 2.5, uwzględniając 40% wydajność sondy dializacyjnej dla aminokwasów (Lehmann i wsp. 1983).

3.8. Ocena zmian objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa

Do określenia zmian objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej użyto metody analogicznej do pomiaru zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, wykorzystując radioaktywną sacharozę znakowaną izotopem ^{14}C . Zewnątrzkomórkową przestrzeń w sąsiedztwie sondy dializacyjnej znakowano przeprowadzając 60 min perfuzję hipokampa płynem KRB zawierającym [^{14}C]sacharozę (dawka całkowita 3 uCi tj. 1.11×10^5 Bq; radioaktywność specyficzna 555 mCi/mmol, tj. 20.5×10^9 Bq/mmol). Następnie kontynuowano perfuzję przy użyciu standardowego płynu KRB przez 90 min w celu odpłukania nadmiaru izotopu. Po tym czasie przez 60 min w odstępach 10 minutowych zbierano próbki perfuzatu w celu uzyskania wartości wyjściowych. Zmiany objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej badano w warunkach całkowitego niedokrwienia mózgu oraz depolaryzacji wysokim stężeniem KCl (65 mM), podawanym w 20 minutowym pulsie. Niedokrwienie mózgu wywoływano przez zatrzymanie pracy serca (injektacja dożylna 10% siarczanu magnezu), zbierając stale próbki perfuzatu przez następne 40 min. Zmiany objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej oceniano na podstawie zmian radioaktywności w próbkach perfuzatu w sposób analogiczny do stosowanego przy pomiarze zmian zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia.

3.9. Metody statystyczne

Dla celów graficznych wartości wyrażono jako średnie arytmetyczne \pm standardowy błąd średniej (SEM). Znamienność statystyczną różnic poszczególnych wyników doświadczalnych obliczono na podstawie nieparametrycznych testów: testu Walsha dla wartości sparowanych oraz

nieparametrycznego U-testu Manna – Whitney, przy porównywaniu różnych grup doświadczalnych.

Różnice, zaznaczone gwiazdką (*), przyjęto za statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

3.10. Odczynniki

Specyficzne odczynniki chemiczne stosowane w tej pracy pochodziły odpowiednio:

APV, NMDA, kwas kainowy, DNQX – Sigma, USA

amilorid, 5-(N,N-dimetylo)amilorid – RBI, USA

Bay K 8644 – Miles Pharmaceuticals, USA

nimodipina – dar firmy Bayer, Niemcy

MK-801 – dar firmy Merck-Sharp and Dohme, Niemcy.

Pozostałe odczynniki o czystości analitycznej zakupiono w POCh, Gliwice.

Wodę o czystości analitycznej uzyskiwano przy pomocy zestawu filtrów firmy Millipore, Milli-RO 4 oraz Milli-Q plus.

Stosowane związki znakowane izotopami promieniotwórczymi pochodziły:

[⁴⁵Ca] CaCl₂ – IEA Świerk, Polska

[³H] sacharoza – Amersham, Wielka Brytania

4. WYNIKI

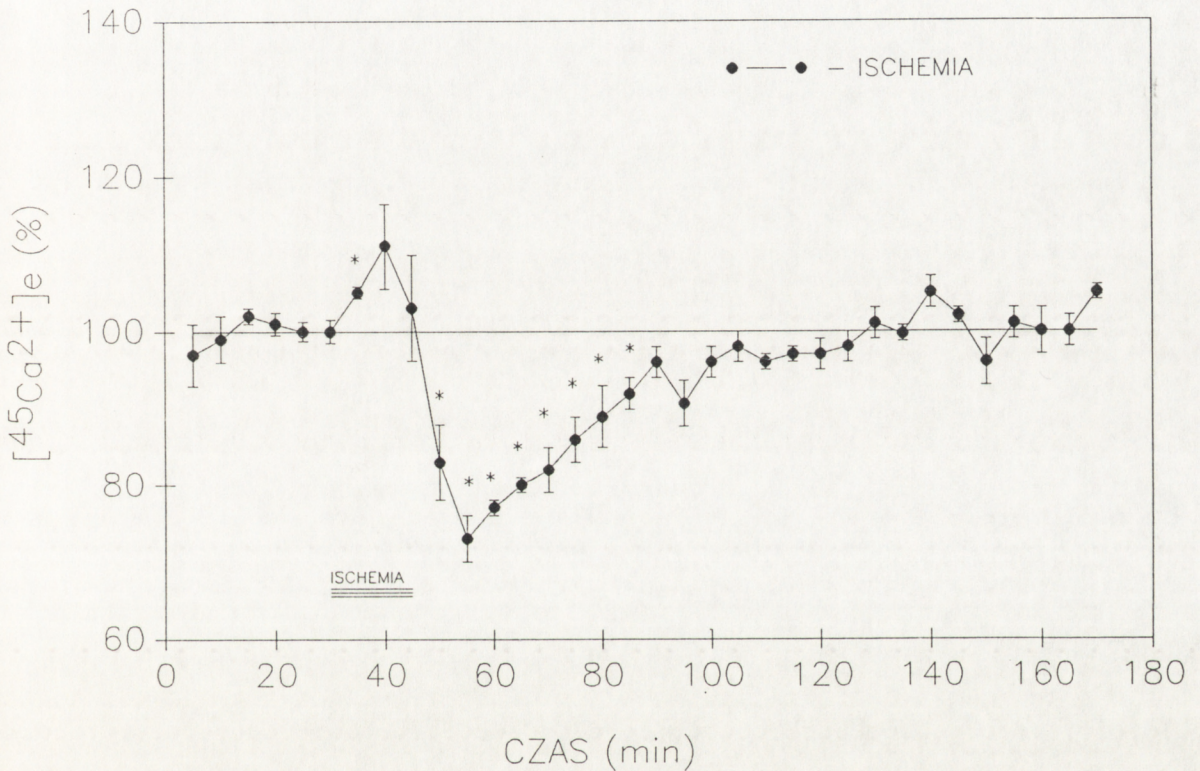
4.1. Zmiany stężeń jonów wapnia oraz niektórych neuroprzekaźników aminokwasowych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa królika zachodzące pod wpływem całkowitego niedokrwienia mózgowia

Zgodnie z założonym celem pracy, podstawowym przedmiotem badań było zachowanie się stężeń wapnia w hipokampie królika poddanego całkowitemu niedokrwieniu mózgowia. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, a dokładniej jego obniżenie, traktowane było jako wskaźnik przemieszczania jonów Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wnętrza komórek, natomiast powrót do stanu wyjściowego jako odzwierciedlenie procesu odwrotnego. Jednocześnie, dzięki zastosowaniu metody dializy – perfuzji hipokampa, możliwa była obserwacja zmian zewnątrzkomórkowych stężeń aminokwasów, a więc i pobudzających neuroprzekaźników aminokwasowych, w hipokampie. Uwalnianie tych neuroprzekaźników uważane jest za ważny element patomechanizmu ischemicznego uszkodzenia mózgowia.

4.1.1. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika zachodzące pod wpływem całkowitego niedokrwienia mózgowia

Całkowite, 15 minutowe niedokrwienie mózgowia zaburzało dynamikę zmian w poziomie radioaktywności $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w dializacie, co było odzwierciedleniem zachodzących w tym czasie zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie. Zmiany te miały charakter dwufazowy (Rys. 3). Po początkowym wzroście stężenia wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa do 110% wartości kontrolnej, następował spadek do wartości 73% poziomu kontrolnego, osiągany ok. 10 minut po przywróceniu krążenia. Powrót do

poziomą kontrolnego następował powoli i osiągnął dopiero w 45 min. po przywróceniu krążenia. Jednakże do końca doświadczenia tj. 2 godz. po przywróceniu krążenia, obserwowano cykliczne wahania stężenia wapnia.



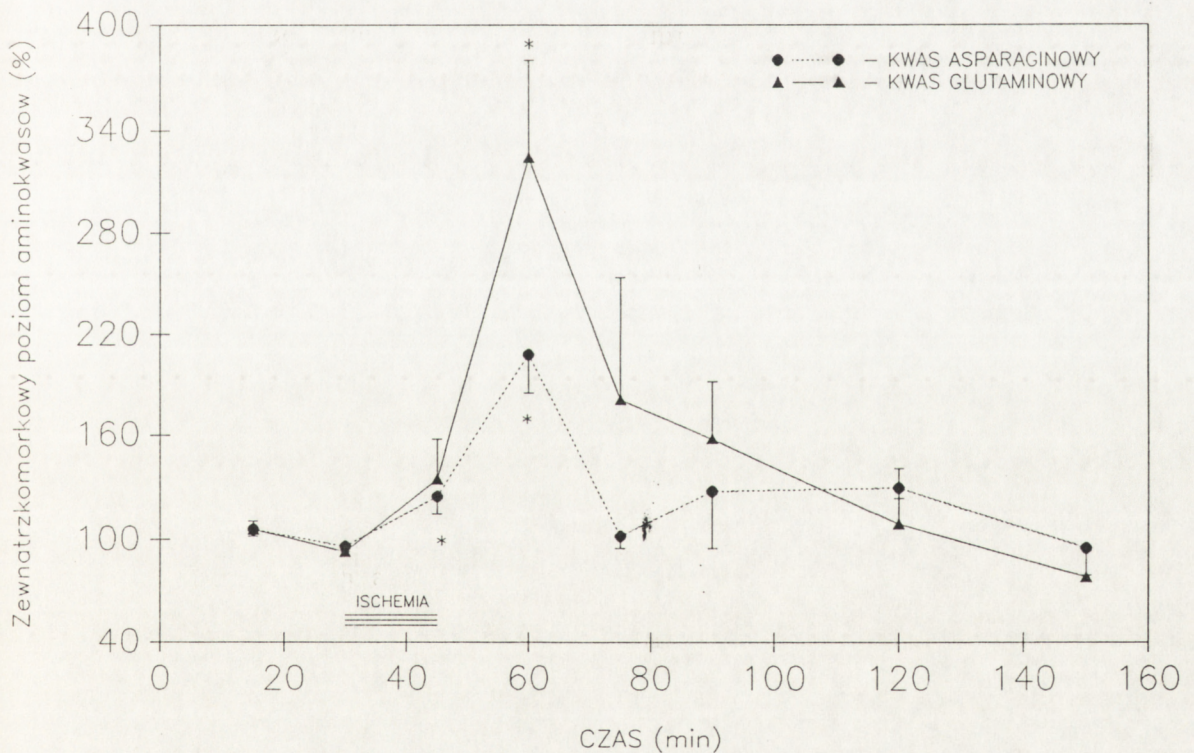
Rys. 3.

Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika poddanego 15 min. całkowitemu niedokrwieniu mózgowia. Wyniki wyrażono w procentach wartości kontrolnych. Dane są średnią z 8 doświadczeń \pm SEM. * - zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

4.1.2. Zmiany stężeń pobudzających neuroprzekaźników aminokwasowych: glutaminianu i asparaginianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa pod wpływem całkowitego niedokrwienia mózgowia

Wyjściowe stężenie kwasów glutaminowego (Glu) i asparaginowego (Asp) w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa królika wyznaczone na

podstawie stężenia tych aminokwasów w dializacie, skorygowanego o wydajność dializy wahało się w granicach 2.69 do 3.06 uM dla Glu i 0.49 do 0.55 uM dla Asp. Już w czasie całkowitego niedokrwienia mózgowia obserwowano niewielki wzrost stężenia Glu i Asp w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa, jednakże maksymalny przyrost stężenia zarówno Glu jak i Asp notowany był w próbkach dializatu zebranych 15 min. po przywróceniu krążenia (Rys. 4). W tym czasie obserwowano 3-krotny wzrost stężenia Glu w stosunku do poziomu wyjściowego, po czym następował powolny spadek. Poziom kontrolny osiągnęty był dopiero w 90 min. po przywróceniu krążenia.



Rys. 4. Zmiany stężenia Glu i Asp w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa zachodzące pod wpływem 15 min. całkowitego niedokrwienia mózgowia. Wyniki wyrażono jako procent wartości uzyskanych z pomiarów przed niedokrwieniem. Dane są średnią z 6 doświadczeń \pm SEM. * - zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

W czasie 15 min. po przywróceniu krążenia obserwowany był również wzrost stężenia Asp, które osiągało 2-krotną wartość stężenia wyjściowego.

Po tym czasie następował, szybszy niż w przypadku Glu, powrót do wartości kontrolnych, które osiągnęły już w 30 min po przywróceniu krążenia. Stężenie Asp zbliżone do kontrolnego utrzymywało się do końca doświadczenia.

4.2. Wpływ związków farmakologicznie czynnych na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane całkowitym niedokrwieniem mózgowia

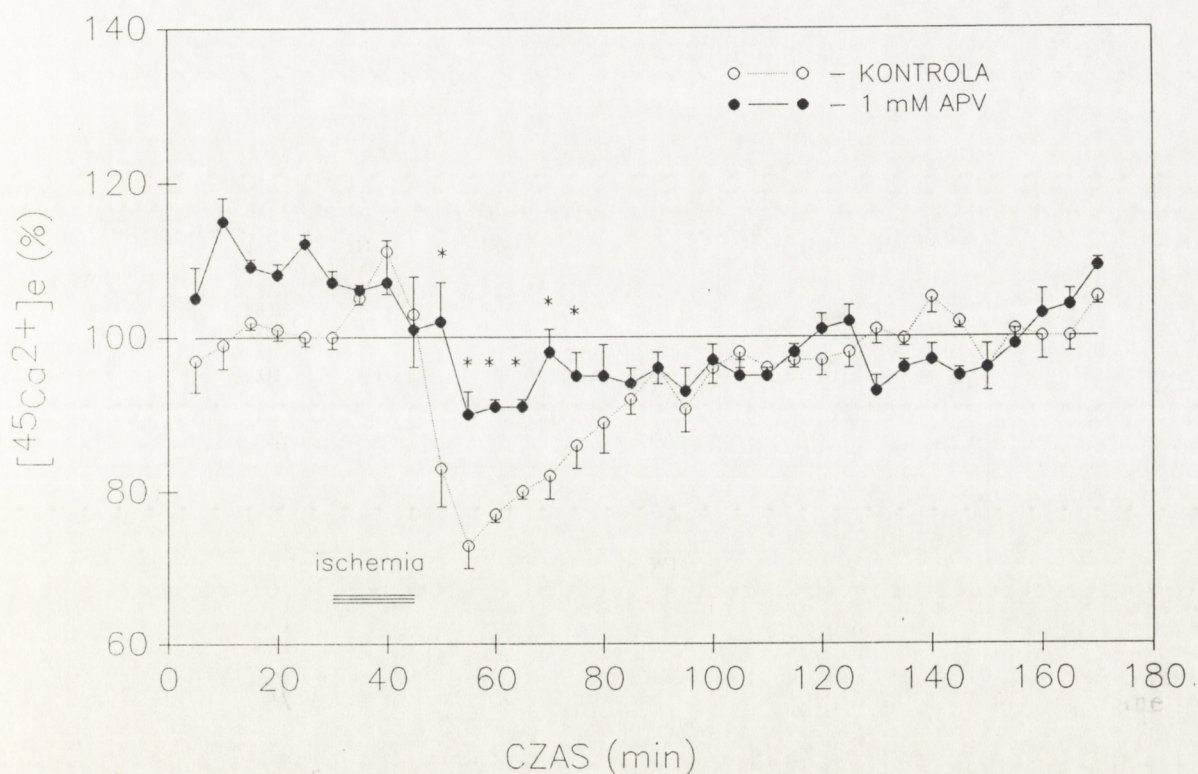
Dla poznania mechanizmu przemieszczania wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do komórek hipokampa w czasie niedokrwienia zastosowano jako narzędzia badawcze dwa inhibitory: kwas 2-amino-5-fosfonowalerowy (APV) oraz nimodipinę.

APV jest specyficznym, kompetycyjnym antagonistą receptorów aminokwasów pobudzających wrażliwych na NMDA. Zastosowanie APV pozwala więc na ujawnienie udziału receptorów aminokwasów pobudzających wrażliwych na NMDA w wywołanym przez niedokrwienie napływie jonów wapnia do neuronów. Ta informacja nie jest jednak równoznaczna z oceną udziału w tym procesie kanałów jonowych sprzężonych z receptorami pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych, ponieważ depolaryzacja i przemieszczenia jonowe wywołane przez pobudzenie receptorów glutamatergicznych może aktywować różnorodne jonofory wapniowe.

Nimodipina jest znanym blokerem zależnych od potencjału kanałów wapniowych wrażliwych na dihydropirydyny (kanałów L), które są najbardziej podatne na aktywację w warunkach niedokrwienia. Użycie nimodipiny umożliwia więc ustalenie udziału tych kanałów wapniowych w zaburzeniach homeostazy Ca^{2+} w czasie niedokrwienia.

4.2.1. Wpływ APV na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane całkowitym niedokrwieniem mózgowia

Ze względu na niewielką przepuszczalność bariery krew-mózg dla kwasu 2-amino-5-fosfonowalerowego, APV podawany był lokalnie, przez sondę dializacyjną do hipokampa poczynając od 60 min. przed niedokrwieniem do końca doświadczenia.



Rys. 5.

Wpływ 1 mM APV na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia zachodzące pod wpływem 15 min. całkowitego niedokrwienia mózgowia. Dane są średnią z 7 doświadczeń \pm SEM. * - zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

Postępowanie to wyraźnie modyfikowało wywołane przez niedokrwienie zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie. Wzrost stężenia, obserwowany w pierwszych minutach niedokrwienia w obecności APV, nie ulegał istotnym zmianom (Rys. 5), obserwowano natomiast zmniejszenie spadku stężenia wapnia wywołanego niedokrwieniem, do wartości 90% poziomu wyjściowego, w

porównaniu ze spadkiem do 73% obserwowanym w doświadczeniach w których nie stosowano żadnych środków o działaniu farmakologicznym.

Powrót do poziomu wyjściowego przy stosowaniu APV był znacznie szybszy niż u zwierząt kontrolnych – i wynosił ok. 15 min., jednakże do końca doświadczenia obserwowano wahania stężenia Ca^{2+} w hipokampie.

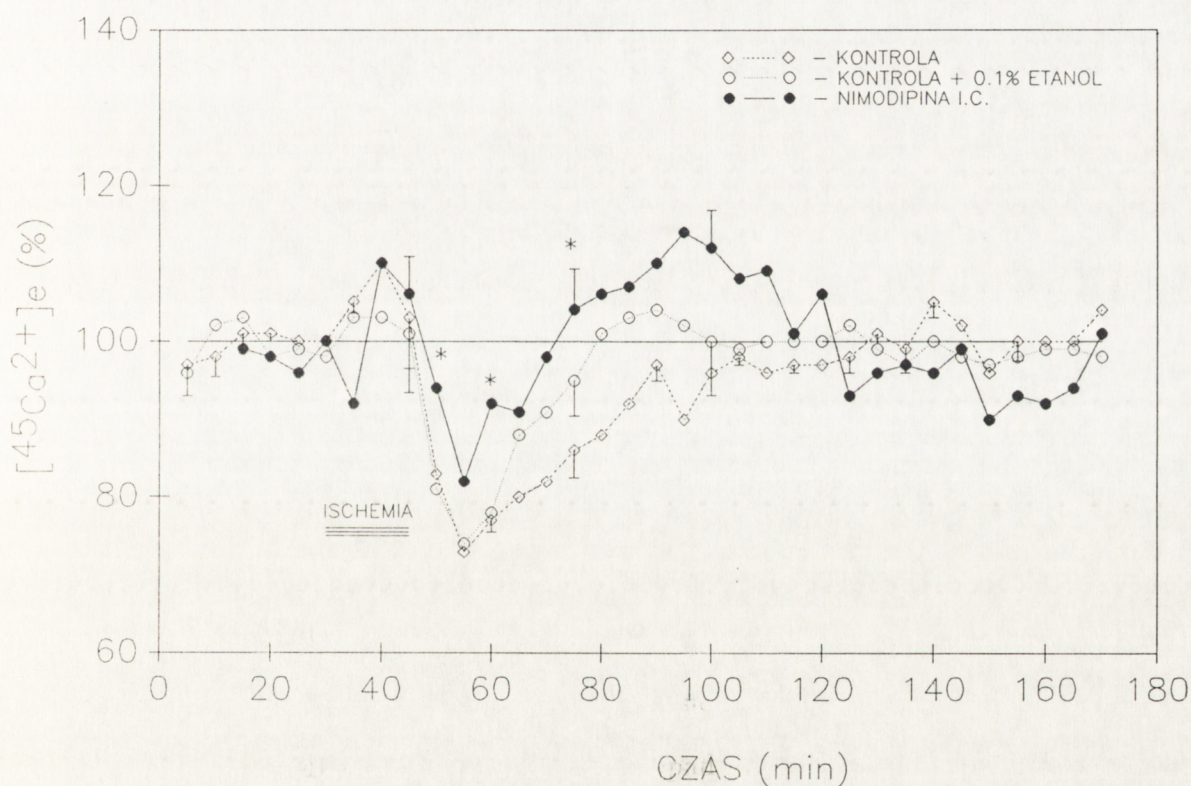
4.2.2. Oddziaływanie nimodipiny podanej miejscowo do hipokampa na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w czasie i po niedokrwieniu mózgowia

Dla omińnięcia bariery krew-mózg, której przepuszczalność dla nimodipiny jest ograniczona, oraz dla wyeliminowania znanego działania hipotensyjnego tego blokera kanałów wapniowych, inhibitor ten podawany był w sposób ciągły wraz z płynem dializacyjnym. Ze względu na fakt, że nimodipina podawana była w roztworze KRB zawierającym 0.1% etanolu, służącego jako rozpuszczalnik, przeprowadzono odpowiednie doświadczenia kontrolne, w których w czasie niedokrwienia podawano przez sondę dializacyjną płyn KRB z 0.1% etanolem.

W tych doświadczeniach stwierdzono, że etanol, choć nie miał istotnego wpływu na wartość maksymalnego obniżenia stężenia wapnia wywołanego przez niedokrwienie, przyspieszał normalizację zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} o ok. 10 minut. Wyniki doświadczeń z nimodipiną podawaną przez sondę dializacyjną odnoszono więc do kontroli, którą stanowiły dane z doświadczeń ischemicznych, w których do płynu dializacyjnego KRB dodawano 0.1% etanol (Rys. 6).

Podawanie nimodipiny rozpoczynano na 30 min. przed niedokrwieniem i kontynuowano w sposób ciągły do końca doświadczenia. Dynamika zmian stężenia wapnia w hipokampie w czasie i po niedokrwieniu mało różniła się od obserwowanej w czasie ischemii bez podawania nimodipiny.

Obserwowano wzrost stężenia wapnia w czasie pierwszych minut niedokrwienia, dochodzący do 110% kontroli (Rys. 6). Spadek stężenia wapnia w dializacie, obserwowany w następnych minutach, był jednak mniejszy niż w doświadczeniach w których niedokrwieniu nie towarzyszyło podawanie środków farmakologicznie czynnych, lecz wyraźnie większy niż przy podawaniu APV i osiągał ok. 83% poziomu podstawowego.



Rys. 6.

Wpływ 10 μM nimodipiny podanej do sondy dializacyjnej na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane 15 min. całkowitym niedokrwieniem mózgowia. Nimodipina podana była na 30 min. przed niedokrwieniem w sposób ciągły do końca doświadczenia. Dane są średnią z 5 doświadczeń \pm SEM.

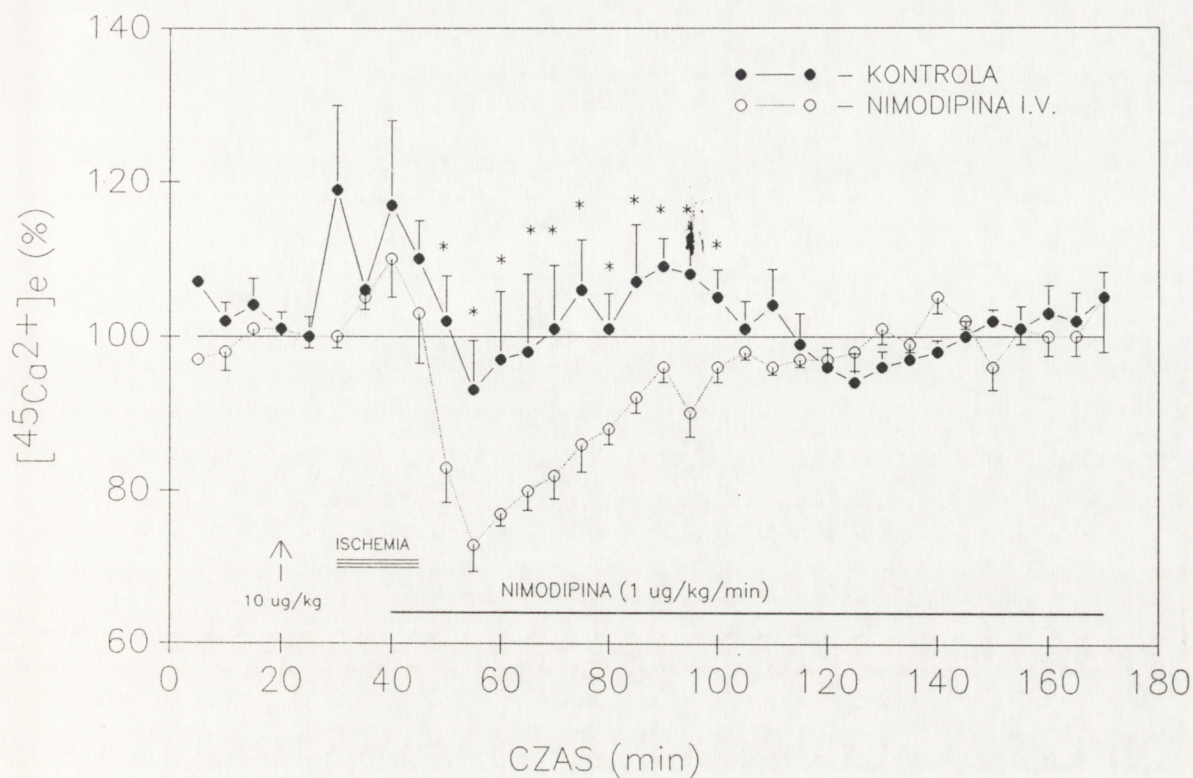
* - zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

Przy miejscowym podawaniu nimodipiny powrót stężenia wapnia do poziomu wyjściowego następował szybciej niż w kontroli, w ok. 20 min. po zakończeniu niedokrwienia. W tych doświadczeniach obserwowano jednak znaczne wahania stężenia wapnia, utrzymujące się do 2 godz. po niedokrwieniu.

4.2.3. Wpływ nimodipiny podawanej dożylnie na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez całkowite niedokrwienie mózgowia

W tej pracy stosowano także systemowe podawanie nimodipiny. Dożylne wstrzyknięcie tego blokera zależnych od potencjału kanałów wapniowych w postaci jednorazowej dawki 10 ug/kg na 15 minut przed niedokrwieniem powodowało krótkotrwały wzrost radioaktywności $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w dializacie, dochodzący do 127% wartości wyjściowej (Rys. 7). W początkowej fazie niedokrwienia mózgowia obserwowano podwyższenie stężenia wapnia w hipokampie sięgające 124%. Po tym krótkotrwałym wzroście występowało nieznaczne, bo tylko o 7.5% w stosunku do poziomu podstawowego, obniżenie zawartości $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w dializacie. Ten efekt obserwowano w 10 min. po przywróceniu krążenia.

Powrót do poziomu wyjściowego osiągniany był szybciej niż w przypadku niedokrwienia przeprowadzonego bez podawania nimodipiny i następował już w 22 minuty od momentu przywrócenia krążenia. Wahania poziomu zawartości $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w dializacie obserwowano jednak do końca doświadczenia.



Rys. 7.

Wpływ nimodipiny podawanej dożylnie na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane całkowitym niedokrwieniem mózgowia. Nimodipina podana była w jednorazowej iniekcji (10 ug/kg) na 10 min. przed niedokrwieniem, a następnie w sposób ciągły (1 ug/kg/min) od 10 min. niedokrwienia do końca doświadczenia. Dane są średnią z 5 doświadczeń \pm SEM. * - zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

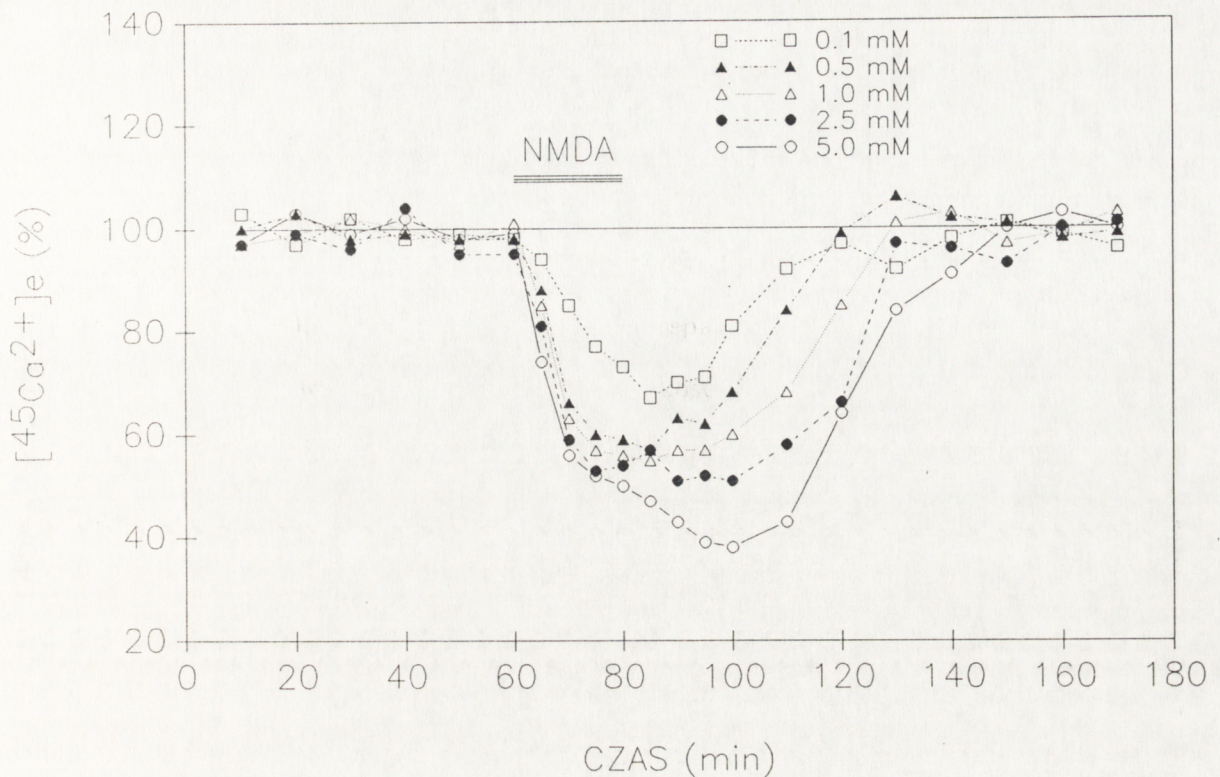
4.3. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia zachodzące pod wpływem agonistów receptorów aminokwasowych neuroprzekazników pobudzających - NMDA i kwasu kainowego

W tej pracy zostało potwierdzone zjawisko nadmiernego uwalniania pobudzających neuroprzekazników aminokwasowych w czasie niedokrwienia mózgu. Wykazane zostało także hamowanie przez APV, antagonistę receptorów wrażliwych na NMDA, wywołanego przez niedokrwienie napływu wapnia do komórek hipokampa. Nasuwa się jednak kwestia bardziej szczegółowego określenia mechanizmu wnikania wapnia do neuronów, wywołanego przez pobudzenie

receptorów glutamatergicznych, a przede wszystkim identyfikacji typu receptorów związanych z tym efektem, oraz kanałów jonowych biorących udział w napływie wapnia do neuronów. W badaniach przeprowadzono różnicowanie między aktywacją receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych wrażliwych na NMDA oraz niewrażliwych na NMDA, stymulowanych przez kwas kainowy. Zastosowane w tych badaniach związki będące agonistami receptorów pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych – NMDA i kwas kainowy podawano bezpośrednio do hipokampa w płynie dializacyjnym.

4.3.1. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w hipokampie królika zachodzące pod wpływem NMDA

Podawanie przez okres 20 min. w płynie dializacyjnym różnych stężeń NMDA (0.1 – 5 mM) powodowało spadek stężenia Ca^{2+} w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa. Wielkość spadku, którego początek zaobserwować można było już po 5 minutach podawania, zależna była od stężenia NMDA (Rys. 8). Najniższy poziom zewnątrzkomórkowego wapnia, ok. 35% kontroli, rejestrowany był po podaniu 5 mM NMDA i utrzymywał się przez ok. 25 min. Powrót do poziomu wyjściowego był powolny i następował po 70 minutach od zaprzestania podawania NMDA. Następnie normalne stężenie wapnia zewnątrzkomórkowego utrzymywało się bez większych zaburzeń do końca doświadczenia. Podawanie NMDA w różnych stężeniach: 0.5 mM, 1 mM i 2.5 mM, wywoływało wzrastający wraz z dawką spadek stężenia zewnątrzkomórkowego wapnia w zakresie od 52 do 60% wartości wyjściowej, natomiast czas powrotu do poziomu kontrolnego wahał się od 40 min. dla 0.5 mM NMDA do 50 min. dla 2.5 mM NMDA. W dalszych doświadczeniach używano NMDA w stężeniu 2.5 mM.



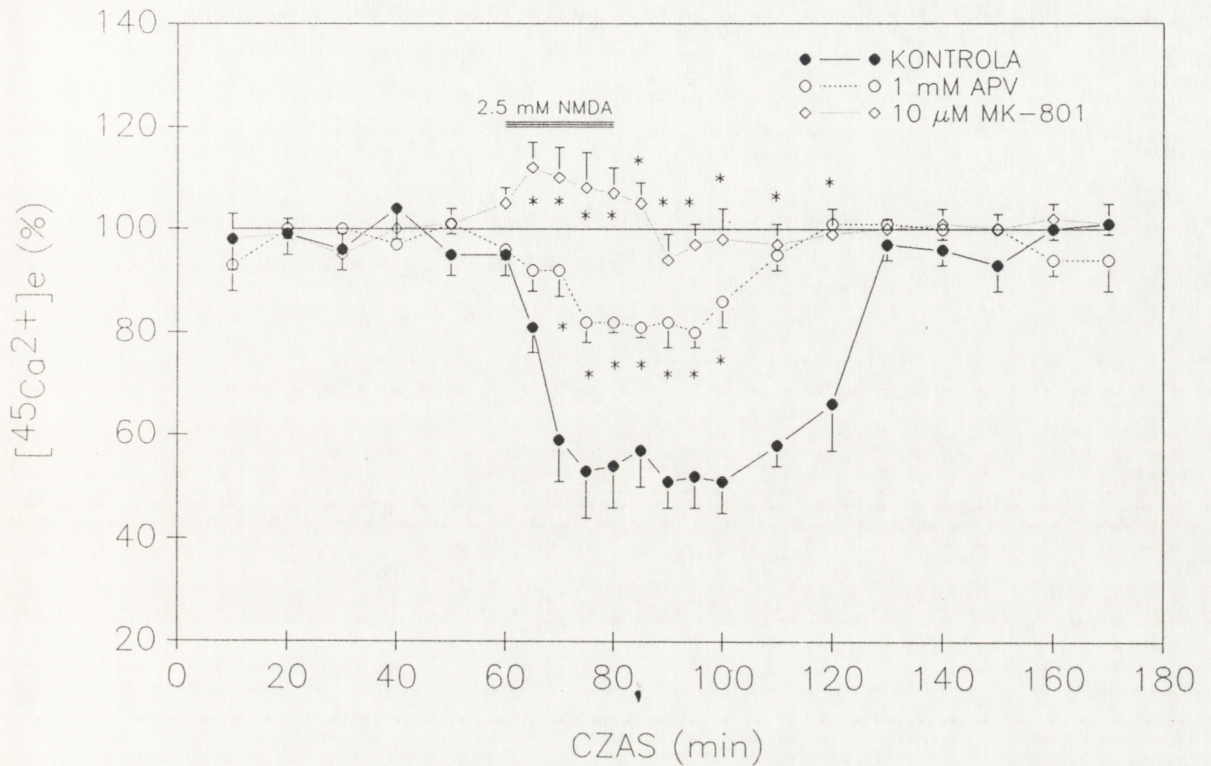
Rys. 8.

Zależność spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołanego podaniem NMDA od zastosowanego stężenia. NMDA podawany był do sondy dializacyjnej przez okres 20 min. Dane są średnią z 3 - 5 doświadczeń dla każdego stężenia NMDA \pm SEM.

4.3.2. Wpływ APV oraz MK-801 na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podawaniem NMDA

Dla oceny swoistego, receptorowego charakteru obniżenia zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie wywołanego przez 2.5 mM NMDA, stosowano 1 mM roztwór APV, kompetycyjnego antagonisty receptorów NMDA, oraz 10 μ M roztwór MK-801 - niekompetycyjnego antagonisty tych receptorów. Podawanie APV do płynu dializacyjnego w stężeniu 1 mM powodowało oczekiwane zahamowanie wywołanego przez NMDA spadku

zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w hipokampie. W obecności APV spadek ten był niewielki – do ok. 82% poziomu wyjściowego (Rys. 9).



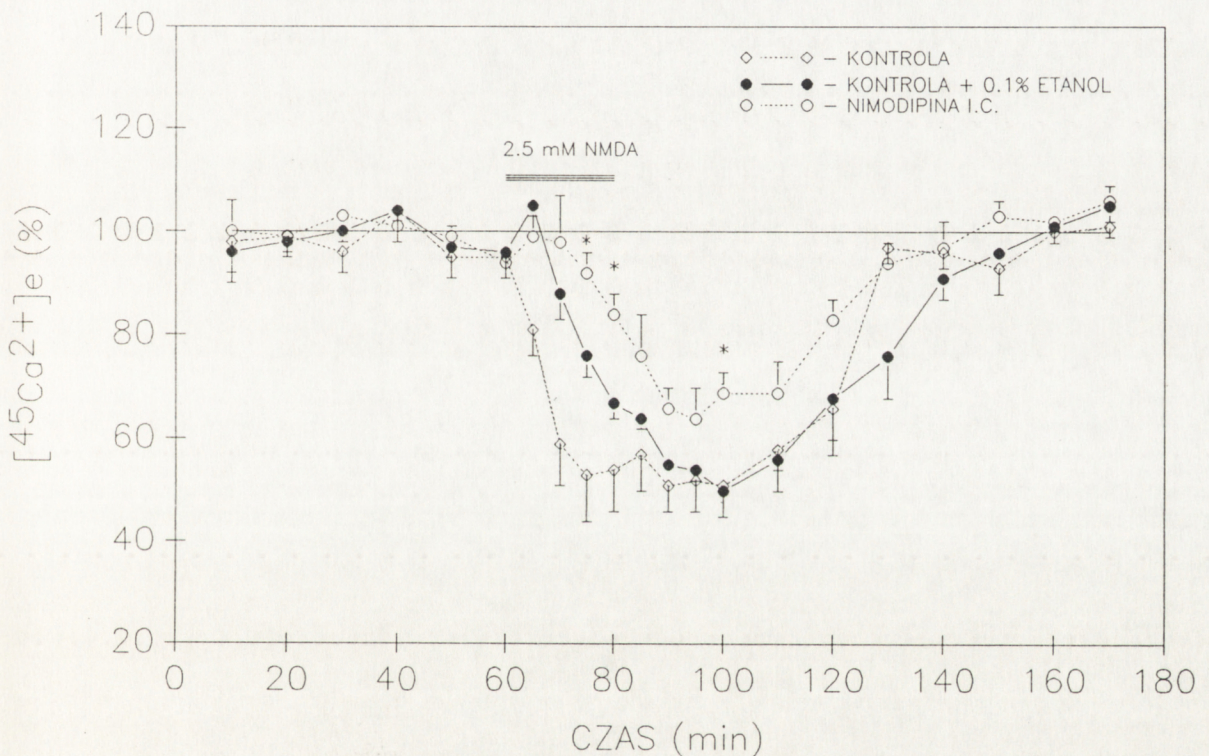
Rys. 9.

Wpływ 1 mM APV oraz 10 uM MK-801 na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podaniem 2.5 mM NMDA. Dane są średnią z 4 doświadczeń \pm SEM. * – zmiany statystycznie istotne ($p < 0.05$).

Również powrót radioaktywności do poziomu kontrolnego następował o 20 minut szybciej i osiągnął już po 40 minutach od zaprzestania podawania NMDA. Natomiast podawanie w płynie dializacyjnym 10 uM MK-801 powodowało całkowite zahamowanie spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Obserwowano natomiast niewielki wzrost (o ok. 10%) utrzymujący się przez okres podawania NMDA.

4.3.3. Wpływ nimodipiny na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez NMDA

Dla oceny udziału zależnych od potencjału wrażliwych na dihydropirydyny kanałów L w wywołanym przez NMDA napływie wapnia do neuronów hipokampa stosowano inhibitor tych kanałów – nimodipinę.



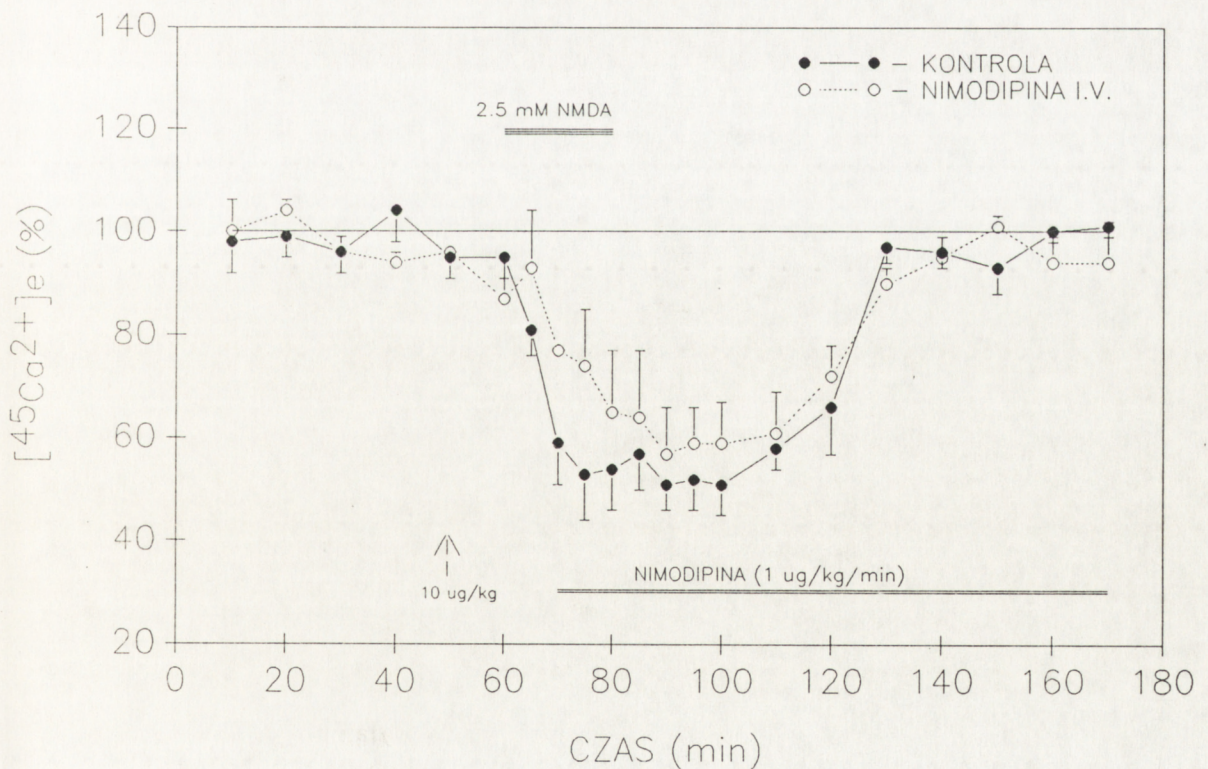
Rys. 10.

Wpływ 10 μ M nimodipiny podawanej do sondy dializacyjnej na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podaniem 2.5 mM NMDA. Dane są średnią z 5 doświadczeń \pm SEM.

* – zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

Nimodipina podawana była w roztworze KRB zawierającym 0.1% etanol. W doświadczeniach kontrolnych stwierdzono, że obecność etanolu o takim stężeniu w płynie dializacyjnym opóźnia o ok. 10 min. osiągnięcie maksymalnego

spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, wywołanego przez 2.5 mM NMDA, choć nie wpływało na jego wartość. Uwzględniając ten efekt w doświadczeniach w których nimodipinę w stężeniu 10 uM podawano lokalnie, do sondy dializacyjnej, stwierdzono, iż nieznacznie obniżała ona wywołany przez NMDA spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie (Rys. 10). Najniższe stężenie $^{45}\text{Ca}^{2+}$ obserwowane w 20 min. po przerwaniu podawania NMDA, wynosiło 64% poziomu wyjściowego i było wyższe niż stężenie wynoszące 52% poziomu wyjściowego obserwowane w doświadczeniach kontrolnych. Powrót stężenia Ca^{2+} do poziomu wyjściowego osiągnany był jednak w tym samym czasie co w doświadczeniach kontrolnych, tj. po ok. 70 minutach od momentu zaprzestania podawania NMDA.



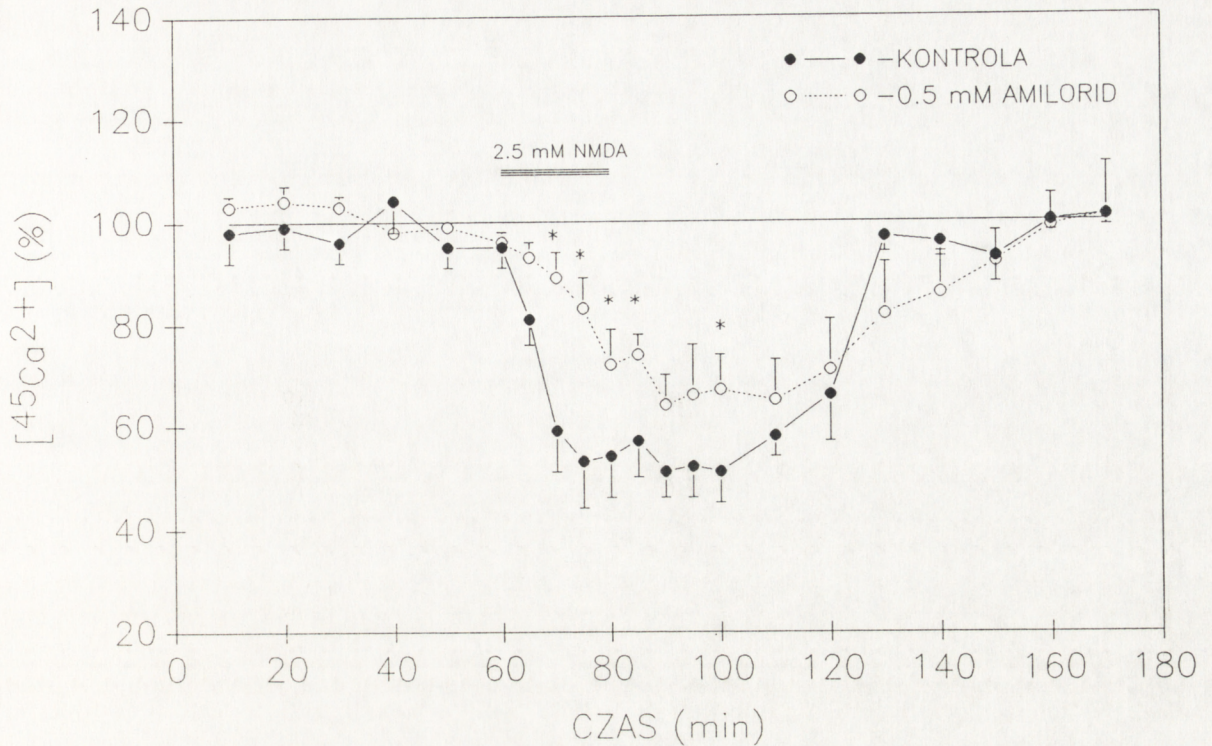
Rys. 11.

Wpływ nimodipiny podawanej dożylnie na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podaniem 2.5 mM NMDA. Dane są średnią z 5 doświadczeń \pm SEM. Różnice między średnimi są statystycznie nieznaczne ($p > 0.05$).

Dożylnie wstrzyknięcie nimodipiny w jednorazowej dawce 10 ug/kg masy ciała na 15 min. przed podaniem 2.5 mM NMDA a następnie w ciągłym wlewie dożylnym, poczynając od 10 min. podawania NMDA do hipokampa, tylko nieznacznie opóźniało spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie (Rys. 11). Maksymalny spadek nie różnił się od obserwowanego w doświadczeniach kontrolnych, w których podawaniu NMDA nie towarzyszyło stosowanie inhibitorów. Powrót stężenia wapnia do poziomu wyjściowego przebiegał w sposób bardzo zbliżony i osiągniany był w tym samym czasie co w doświadczeniach kontrolnych.

4.3.4. Wpływ amiloridu na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez NMDA

Podczas nadmiernego pobudzenia neuronów i zaburzenia mechanizmów kontrolujących wymianę jonów, może dojść do odwrócenia działania mechanizmu usuwającego jony Ca^{2+} z komórki, opartego na wymianie $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. W celu zbadania, jaki może być udział zaburzonego mechanizmu wymiany sód – wapń w napływie wapnia do neuronów podczas ich nadmiernego pobudzenia, zastosowano amilorid, jedyny osiągalny wówczas niespecyficzny bloker hamujący wymianę $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Podawanie w sposób ciągły z płynem dializacyjnym 0.5 mM amiloridu powodowało opóźnienie oraz zmniejszenie maksymalnego spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołanego przez 2.5 mM NMDA, z 50% do 65% poziomu wyjściowego (Rys. 12). Jednocześnie normalizacja zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia była opóźniona i następowała dopiero po 80 minutach od zaprzestania podawania NMDA.



Rys. 12.

Wpływ 0.5 mM amiloridu na spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołany podaniem 2.5 mM NMDA. Amilorid podawano do sondy dializacyjnej w sposób ciągły w czasie całego doświadczenia. Dane są średnią z 3 doświadczeń \pm SEM.

* - zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

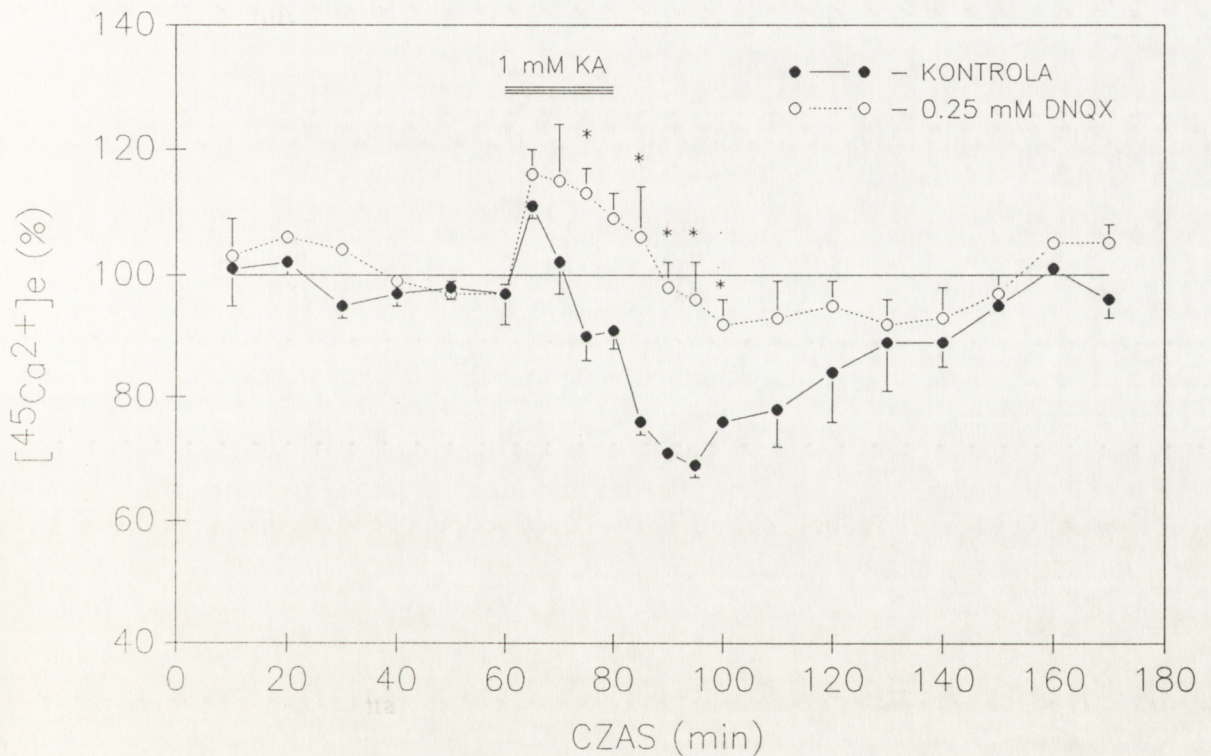
4.3.5. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika wywołane przez podawanie kwasu kainowego

Podawanie 1 mM kwasu kainowego (KA) do hipokampa królika w płynie dializacyjnym przez 20 min. powodowało spadek stężenia wapnia w hipokampie obserwowany od 10 min. podawania tego agonisty. Maksymalne obniżenie wynosiło 68% poziomu wyjściowego (Rys. 13).

Powrót zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie do poziomu wyjściowego następował po ok. 70 min. po zaprzestaniu podawania KA, po czym stężenie wapnia utrzymywało się na stałym poziomie do końca doświadczenia.

4.3.6. Wpływ DNQX na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez kwas kainowy

Podawanie 0.25 mM DNQX, będącego antagonistą receptorów aminokwasów pobudzających, wrażliwych na KA, powodowało całkowite zahamowanie spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołanego podaniem 1 mM KA (Rys. 13).

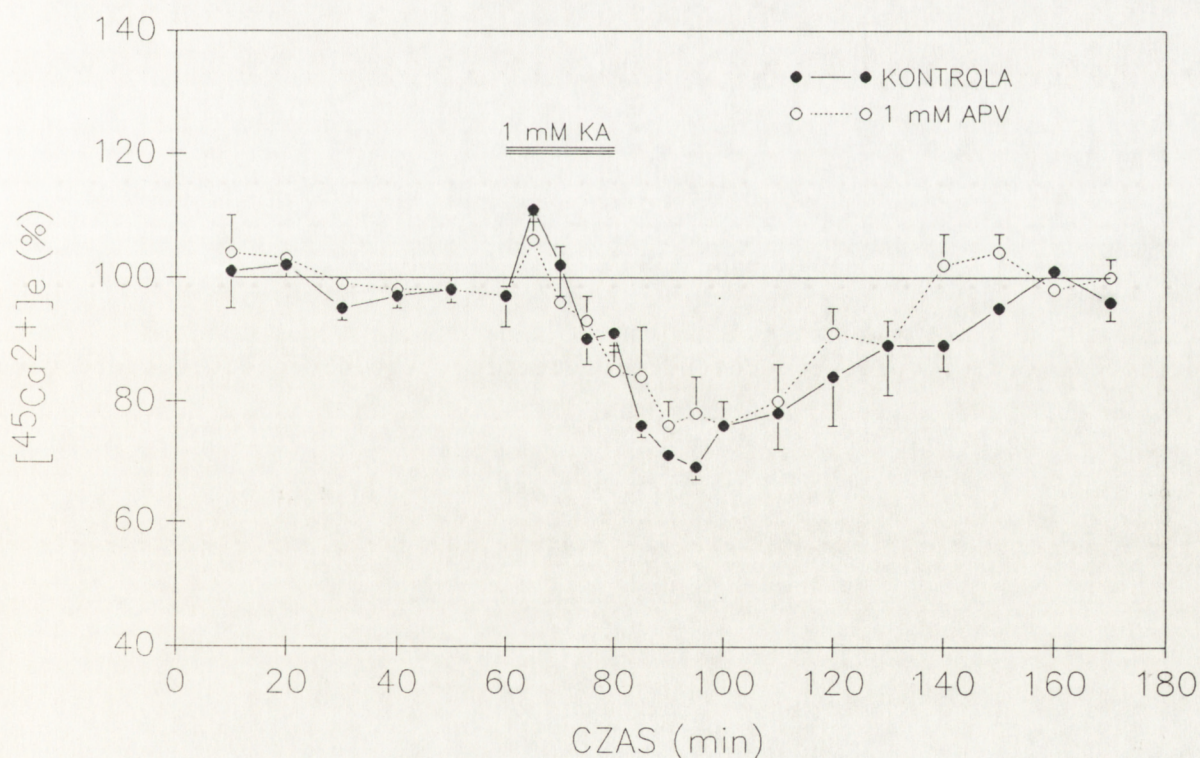


Rys. 13.

Wpływ 0.25 mM DNQX na spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołany podaniem 1 mM KA. DNQX podawano przez sondę dializacyjną w sposób ciągły w czasie całego doświadczenia. KA podawano przez sondę dializacyjną w 20 min. pulsie. Dane są średnią z 3 doświadczeń \pm SEM. * - zmiany statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

4.3.7. Oddziaływanie APV na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez podawanie kwasu kainowego

Podobnie jak w doświadczeniach z NMDA, również w przypadku efektu wywołanego przez podawanie kwasu kainowego, dla oceny swoistości działania tego agonisty, dla wykluczenia wtórnego udziału pobudzenia receptorów NMDA przez uwalniany w tych warunkach endogenny glutaminian, stosowany był APV. Obecność 1 mM APV nie powodowała istotnych zmian w wywołanym przez 1 mM KA spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie.



Rys. 14.

Wpływ 1 mM APV na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podaniem 1 mM KA. APV podawane było przez sondę dializacyjną w sposób ciągły w czasie całego doświadczenia. Dane są średnią z 3 doświadczeń \pm SEM. Różnice między średnimi są statystycznie nieznamienne ($p > 0.05$).

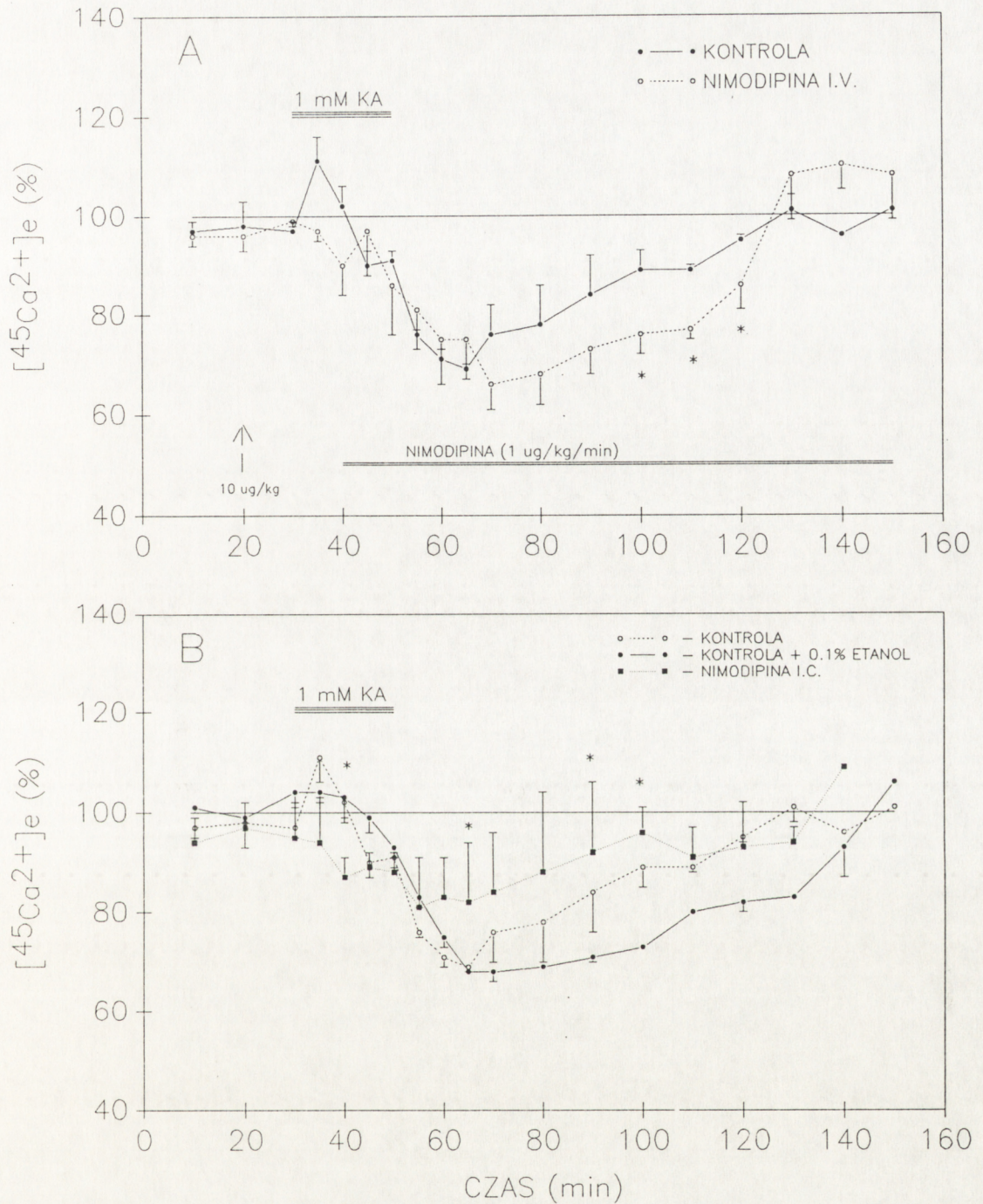
Dynamika spadku jak i powrotu stężenia wapnia do wartości kontrolnych były niemal identyczne zarówno w doświadczeniach w których badano zmiany radioaktywności pod wpływem samego KA jak i KA w obecności APV (Rys. 14).

4.3.8. Wpływ nimodipiny na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podawaniem kwasu kainowego

Przy podawaniu kwasu kainowego, którego receptory są sprzężone z kanałami jonowymi o wysokiej przepuszczalności dla sodu, dochodzi do depolaryzacji neuronów. W tych warunkach wtórna aktywacja kanałów zależnych od potencjału jest wysoce prawdopodobna. Uzasadnia to użycie nimodipiny stosowanej w sposób opisany poprzednio (Rozdz. 2). Systemowe podawanie nimodipiny nie miało istotnego wpływu na wywołany przez 1 mM kwas kainowy spadek zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} (Rys. 15 A). Podawanie nimodipiny lokalnie, w płynie dializacyjnym, powodowało obniżenie spadku stężenia wapnia o ok. 20% w porównaniu do stosowanej kontroli, tj. doświadczeń w których podawano 1 mM KA w obecności 0.1% etanolu (Rys. 15 B).

4.3.9. Wpływ podawania amiloridu oraz 5-(N,N-dimetylo)amiloridu na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez podawanie kwasu kainowego

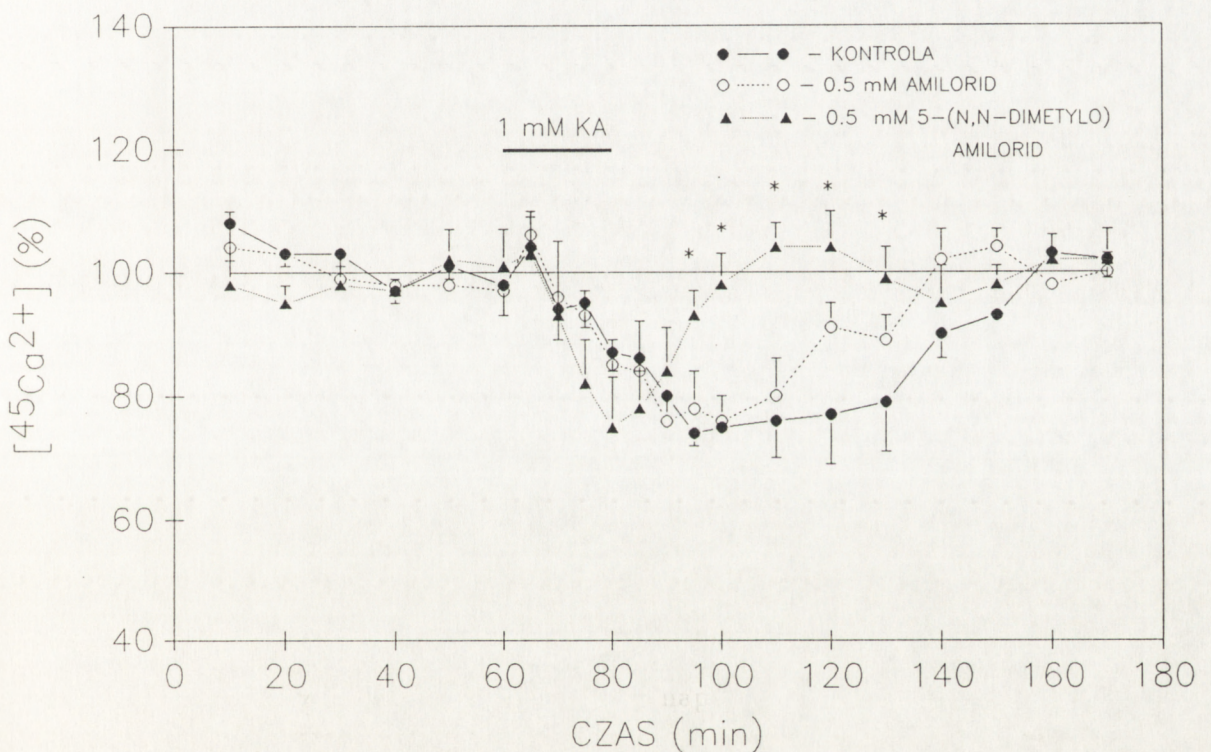
Podawanie kwasu kainowego poza bezpośrednią aktywacją kanałów jonowych związanych z receptorami tego związku, oraz wtórna aktywacją kanałów zależnych od potencjału, może zaburzać działanie mechanizmu wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. W celu zbadania, jaki jest stopień oddziaływania podawanego KA na



Rys. 15.

Wpływ nimodipiny na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podaniem 1 mM KA. A: nimodipina podawana dożylnie, B: nimodipina podawana do sondy dializacyjnej. Dane są średnią z A: 4 doświadczeń, B: 3 doświadczeń \pm SEM.

ten mechanizm oraz dla oceny jego udziału w napływie wapnia do neuronów, użyto niespecyficznego blokera m.inn. wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ – amiloridu oraz 5-(N,N-dimetyl) amiloridu, którego działanie uznawano za silniejsze i bardziej specyficzne w odniesieniu do wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Podanie przez sondę dializacyjną 0.5 mM amiloridu nie zmniejszyło procentowej wartości spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołanego przez podanie 1 mM KA, jednakże znacznie przyspieszyło powrót do poziomu kontrolnego (Rys. 16).



Rys. 16.

Wpływ 0.5 mM amiloridu oraz 0.5 mM 5-(N,N-dimetylo)amiloridu na spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołany podaniem 1 mM KA. Oba związki podawane były przez sondę dializacyjną w sposób ciągły w czasie całego doświadczenia. Dane są średnią z 4-3 doświadczeń \pm SEM. * – różnice statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

Podanie w płynie dializacyjnym 0.5 mM 5-(N,N-dimetylo) amiloridu zmniejszyło spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i jeszcze bardziej skracało czas powrotu do poziomu kontrolnego, który osiągnany był już po 20 min. od zaprzestania podawania KA (Rys. 16).

4.4. Wpływ depolaryzacji na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika

Wykazano, że wzrost stężenia jonów K^+ w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu w niedokrwieniu wyprzedza przemieszczanie innych jonów, w tym spadek zewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Ten wzrost stężenia K^+ prowadzi do depolaryzacji błon przez co może wtórnie modyfikować działanie szeregu mechanizmów regulujących przepływ jonów wapnia przez błonę komórkową, zwłaszcza procesów zależnych od różnicy potencjałów. W tych warunkach dochodzić może między innymi do aktywacji kanałów wapniowych zależnych od potencjału, a także do zniesienia blokady kanałów NMDA przez jony Mg^{2+} , co w sumie może prowadzić do zwiększonego napływu jonów wapnia do komórki. Dotychczasowe wyniki wskazują na dominujący udział kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami kwasu glutaminowego w napływie jonów wapnia do neuronów, obserwowanym w czasie i po niedokrwieniu mózgu. Dla wyjaśnienia, czy możliwe jest znaczące zaangażowanie kanałów wapniowych zależnych od potencjału w napływie jonów Ca^{2+} do komórek hipokampa, zastosowano lokalną depolaryzację neuronów hipokampa przy pomocy wysokich stężeń jonów potasu.

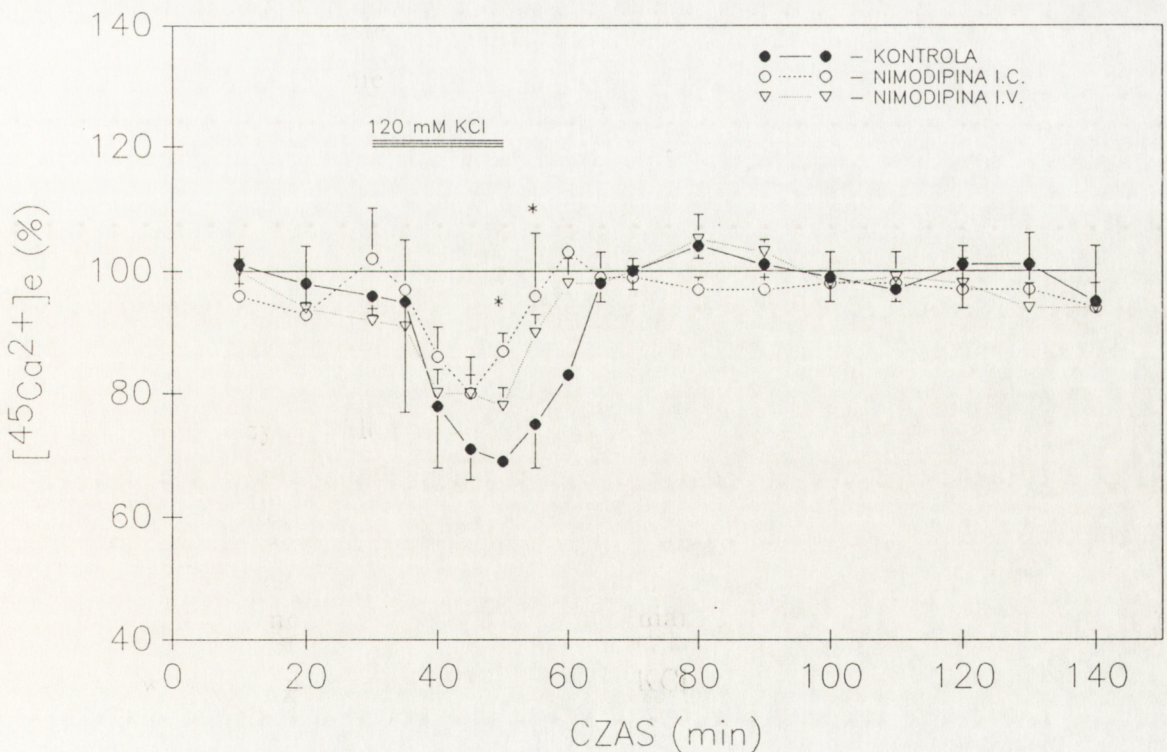
4.4.1. Zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia pod wpływem podawania przez sondę dializacyjną 120 mM KCl

Podawanie do hipokampa przez 20 minut 120 mM KCl powodowało niewielki, ok. 25% spadek zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} (Rys. 17). Obniżenie rozpoczyna się już w piątej minucie i utrzymuje się do końca podawania KCl. Powrót radioaktywności do poziomu wyjściowego następował bardzo szybko – w 10 minut po zakończeniu podawania KCl stężenie Ca^{2+} osiągało wartość

wyjściową i utrzymywało się na tym poziomie przez dalsze 70 minut, tj. do końca doświadczenia.

4.4.2. Wpływ nimodipiny i MK-801 na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane przez podawanie 120 mM KCl

Pobudzenie wnikania zewnątrzkomórkowego wapnia do neuronów przez 120 mM KCl może być związane z depolaryzacją prowadzącą zarówno do bezpośredniej aktywacji różnego typu zależnych od potencjału kanałów wapniowych, jak też z uwalnianiem w tych warunkach endogennych neurotransmitterów pobudzających i aktywacją sprzężonych z nimi kanałów

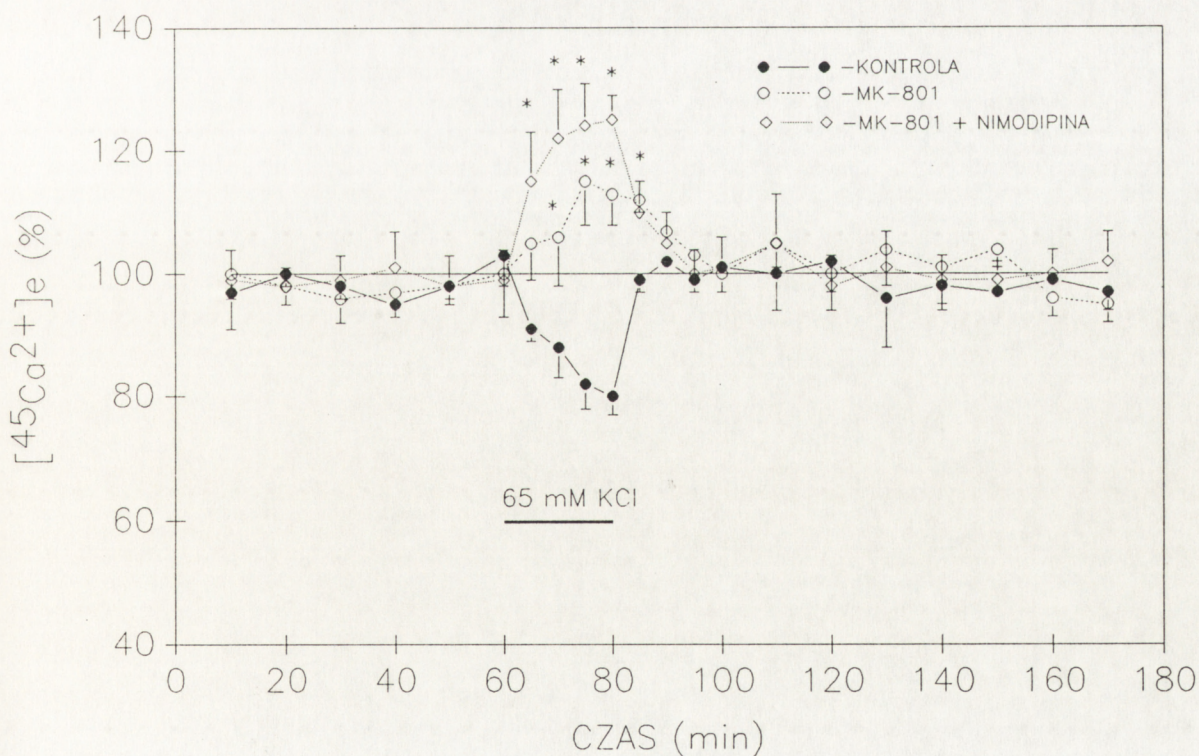


Rys. 17.

Wpływ nimodipiny podawanej dożylnie oraz do sondy dializacyjnej na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołane podaniem 120 mM KCl. KCl podawane było przez sondę dializacyjną w 20 min. pulsie. Dane są średnią z 3 doświadczeń \pm SEM. * - różnice statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

jonowych. Dla rozróżnienia tych mechanizmów zastosowano nimodipinę jak i MK-801, niekompetycyjny inhibitor receptorów NMDA, oddziałujący na miejsce wiązania fencyklidyny (PCP) w kanale jonowym. Stwierdzono, że dożylne i miejscowe podawanie nimodipiny nieznacznie tylko hamowało spadek stężenia Ca^{2+} w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa wywołany przez podawanie 120 mM KCl (Rys. 17).

W doświadczeniach w których stosowano 65 mM KCl podawanie MK-801 powodowało wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia do 115% wartości kontrolnej. Efekt ten był wzmagany do 130% w obecności 10 uM nimodipiny podawanej miejscowo do sondy dializacyjnej (Rys. 18).

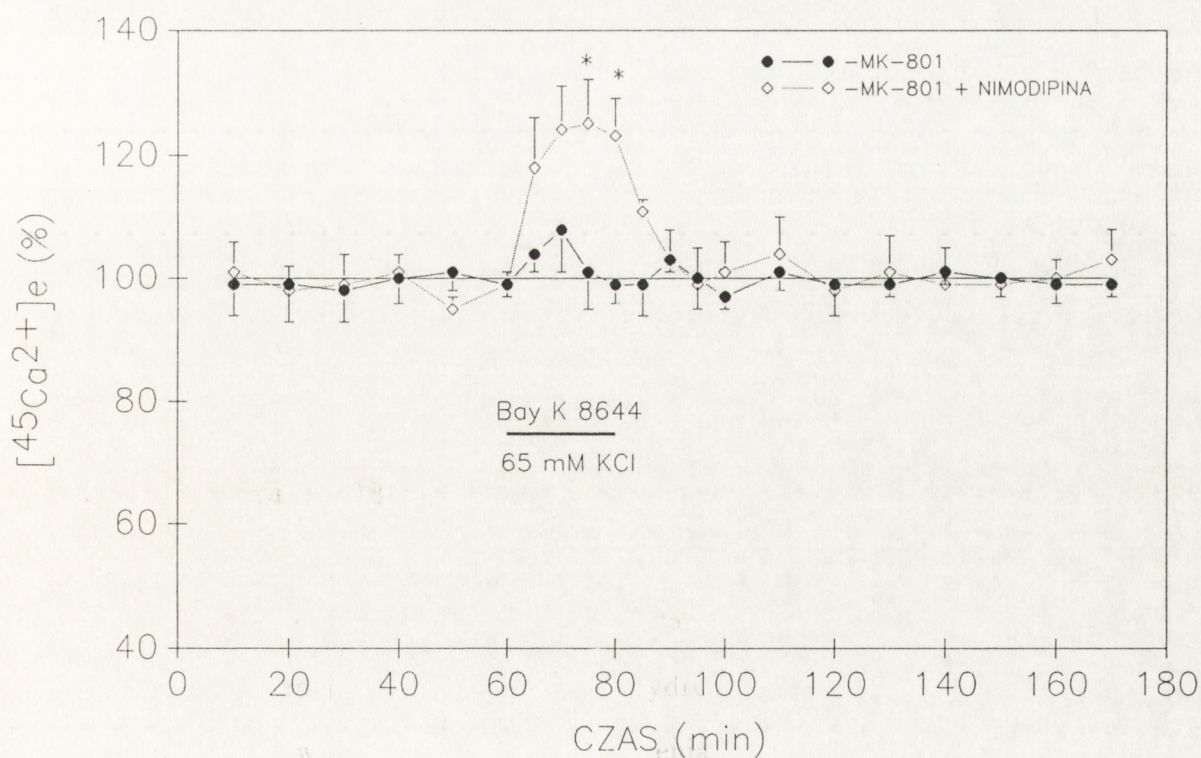


Rys. 18.

Wpływ 10 uM MK-801 oraz 10 uM nimodipiny na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia zachodzące pod wpływem 65 mM KCl. MK-801 oraz nimodipina podawane były przez sondę dializacyjną przez okres całego doświadczenia. Dane są średnią z 3 doświadczeń \pm SEM. * – różnice statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

4.4.3. Spadek stężenia wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa wywołany przez Bay K 8644

W celu dokładniejszego zbadania możliwości udziału aktywacji zależnych od potencjału, wrażliwych na dihydropirydyny, kanałów wapniowych L w obniżeniu zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie, dla maksymalnej ich aktywacji podawano 10 uM Bay K 8644 – agonistę kanałów wrażliwych na dihydropirydyny. Ponieważ działanie tego agonisty polega na zahamowaniu autoinhibicji kanałów poprzednio zaktywowanych przez depolaryzację, dla dokonania depolaryzacji, równoległe z Bay K 8644 podawano w płynie dializacyjnym 65 mM KCl. W doświadczeniach tych zastosowano 10 uM



Rys. 19.

Wpływ 10 uM MK-801 oraz 10 uM nimodipiny na spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia wywołany przez podanie Bay K 8644 w obecności 65 mM KCl. MK-801 oraz nimodipina podawane były przez sondę dializacyjną w sposób ciągły w czasie całego doświadczenia. Bay K 8644 oraz KCl podane były przez sondę dializacyjną w 20 min. pulsie. Dane są średnią z 3 doświadczeń \pm SEM. * – różnice statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

MK-801 w celu zablokowania kanałów NMDA. W czasie podawania Bay K 8644 wraz z 65 mM KCl nie zaobserwowano spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia (Rys. 19). Natomiast po dodaniu do powyższego układu 10 uM nimodipiny, która wypiera Bay K 8644 ze wspólnych miejsc wiążących i znosi w ten sposób efekt tego agonisty, obserwowano wzrost stężenia wapnia do 125%. Tak więc obserwowana w tych układach doświadczalnych ok. 20% różnica między zewnętrznym poziomem jonów wapnia przy podawaniu 65 mM KCl, MK-801 i Bay K 8644 w obecności i przy braku nimodipiny reprezentuje efekt Bay K 8644, wyrażający maksymalny udział kanałów L w zmianach stężenia jonów wapnia w hipokampie królika.

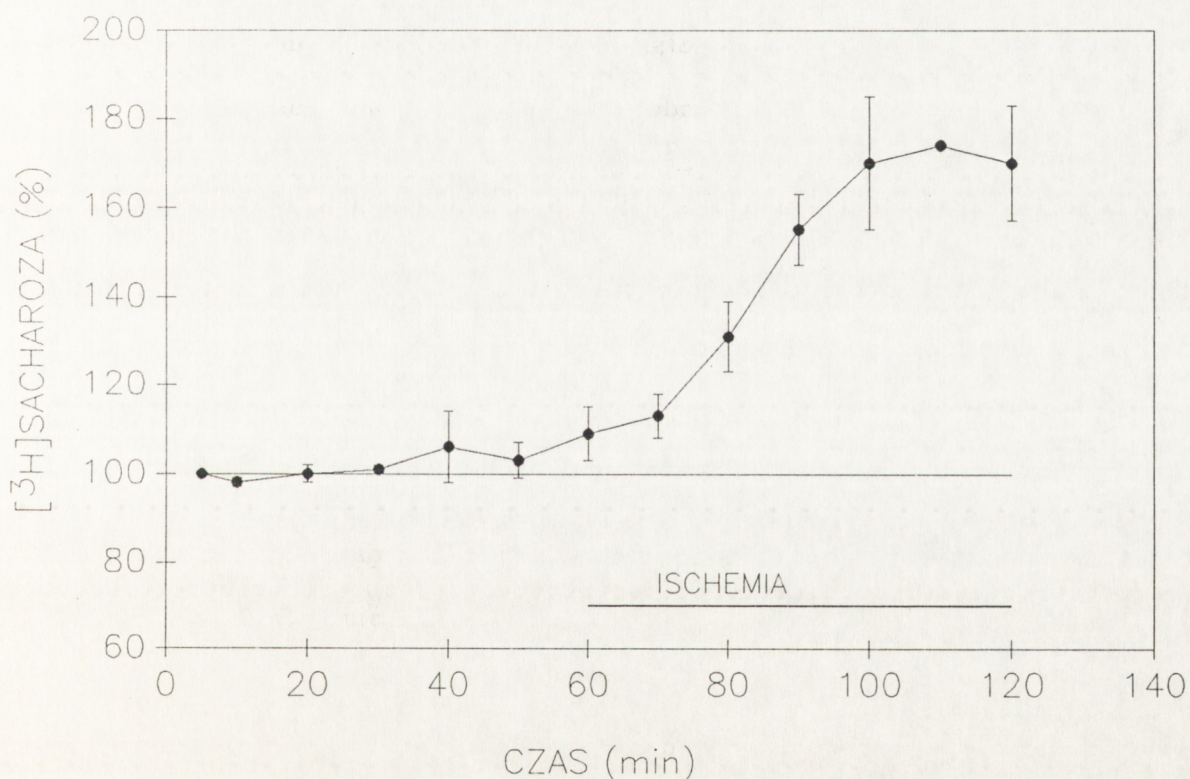
4.5. Zmiany objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej w hipokampie królika pod wpływem niedokrwienia mózgowia

Wiadomo, że wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia potasu obserwowany w niedokrwieniu prowadzi do obrzęku komórek. Obrzęk komórek i zwężenie przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa może prowadzić do zatężenia w przestrzeni zewnętrznej tych substancji, które nie zostały przemieszczone do wnętrza komórek. Może to dotyczyć także jonów wapnia, gdy kanały wapniowe nie zostały jeszcze w dostatecznym stopniu zaktywowane lub ich aktywność uległa zahamowaniu przez odpowiednie blokery. Efekt ten stanowi najbardziej prawdopodobne wytłumaczenie mechanizmu wzrostu stężenia wapnia w hipokampie w początkowym okresie niedokrwienia.

Aby ocenić ilościowo wywołane przez niedokrwienie zmniejszenie objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej w hipokampie jako marker zastosowano [^{14}C]sacharozę, której stężenie mierzono w próbkach perfuzatu, oceniając zmiany stężeń, a więc i objętości przestrzeni sacharozowej w hipokampie.

4.5.1. Wpływ niedokrwienia na przestrzeń sacharozową w hipokampie królika

Niedokrwienie mózgu królika spowodowane zatrzymaniem pracy serca powodowało wzrost stężenia [^3H]sacharozy w próbkach dializatu po 10 min. o ok. 30% w porównaniu do wypływu kontrolnego (Rys. 20). Stężenie to do końca doświadczenia stale rosło osiągając po 40 min. ok. 180% poziomu kontrolnego.



Rys. 20.

Zmiany stężenia [^3H]sacharozy w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa królika zachodzące pod wpływem całkowitego, nieodwracalnego niedokrwienia mózgowia. Wyniki wyrażono w procentach wartości kontrolnych. Dane są średnią z 3 doświadczeń \pm SEM

4.6. Zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg zachodzące pod wpływem niedokrwienia mózgowia

Komórki endotelium w kapilarach mózgu tworzą specyficzny system regulujący przepływ substancji pomiędzy krwią i mózgiem, określany jako czynnościowa bariera krew – mózg. Niedokrwienie mózgu powoduje nieprawidłowości w funkcjonowaniu bariery krew – mózg, wyrażające się wzrostem jej przepuszczalności dla różnych substancji. Efekt ten, o niejasnym mechanizmie, jest sam w sobie ważnym elementem poischemicznej patologii mózgu, ponadto może on służyć jako użyteczny wskaźnik udziału zaburzeń mikrokrążenia w patogenezie uszkodzeń. Uznano, że pomiar przepuszczalności bariery oraz wpływ na nią stosowanych w tej pracy blokerów kanałów wapniowych i receptorów NMDA może przyczynić się zarówno do poznania mechanizmu zaburzenia funkcji bariery jak i do różnicowania między działaniem blokerów (zwłaszcza nimodipiny) na naczynia i bezpośrednio na komórki mózgu.

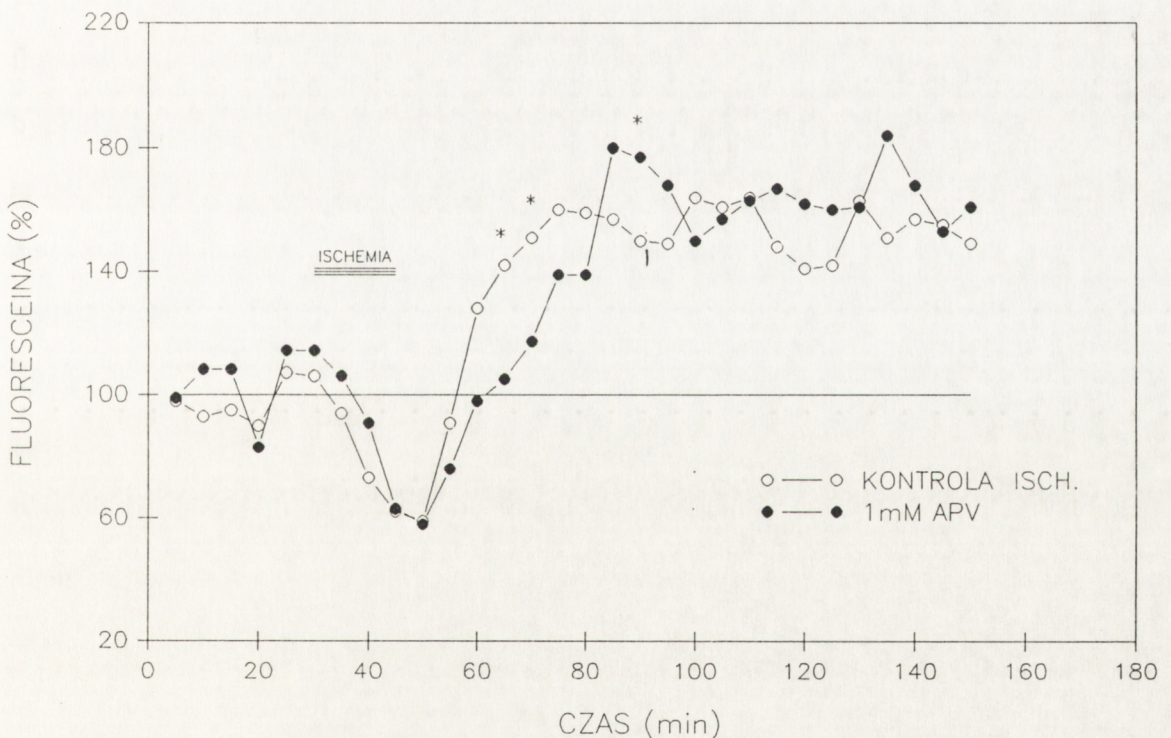
4.6.1. Zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg wywołane przez 15 minutowe całkowite niedokrwienie mózgowia

Stężenie fluoresceiny w próbkach dializatu było przyjmowane za miernik przepuszczalności bariery krew – mózg dla tego znacznika, wstrzykiwanego dożylnie przed doświadczeniem. Pomiarzy stężenia fluoresceiny w próbkach dializatu wykazały, iż niedokrwienie mózgu wywołuje zmiany przepuszczalności bariery o charakterze dwufazowym. W czasie niedokrwienia obserwowano spadek stężenia fluoresceiny w dializacie do ok. 60% poziomu kontrolnego, po czym po przywróceniu krążenia następował wzrost, który w 30 min. po niedokrwieniu osiągał wartość wyższą o 50–60% od wartości kontrolnej (Rys. 21). Do końca

doświadczenia, tj. 70 min. po niedokrwieniu, obserwowano podwyższone stężenie fluoresceiny w próbkach dializatu, wahające się w granicach 140–160% kontroli.

4.6.2. Wpływ APV na zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg wywołane przez niedokrwienie mózgowia

Podawanie do hipokampa 1 mM APV w płynie dializacyjnym nie miało wpływu na zmiany stężenia fluoresceiny w próbkach dializatu wywołane przez 15 min. całkowite niedokrwienie mózgowia (Rys. 21).



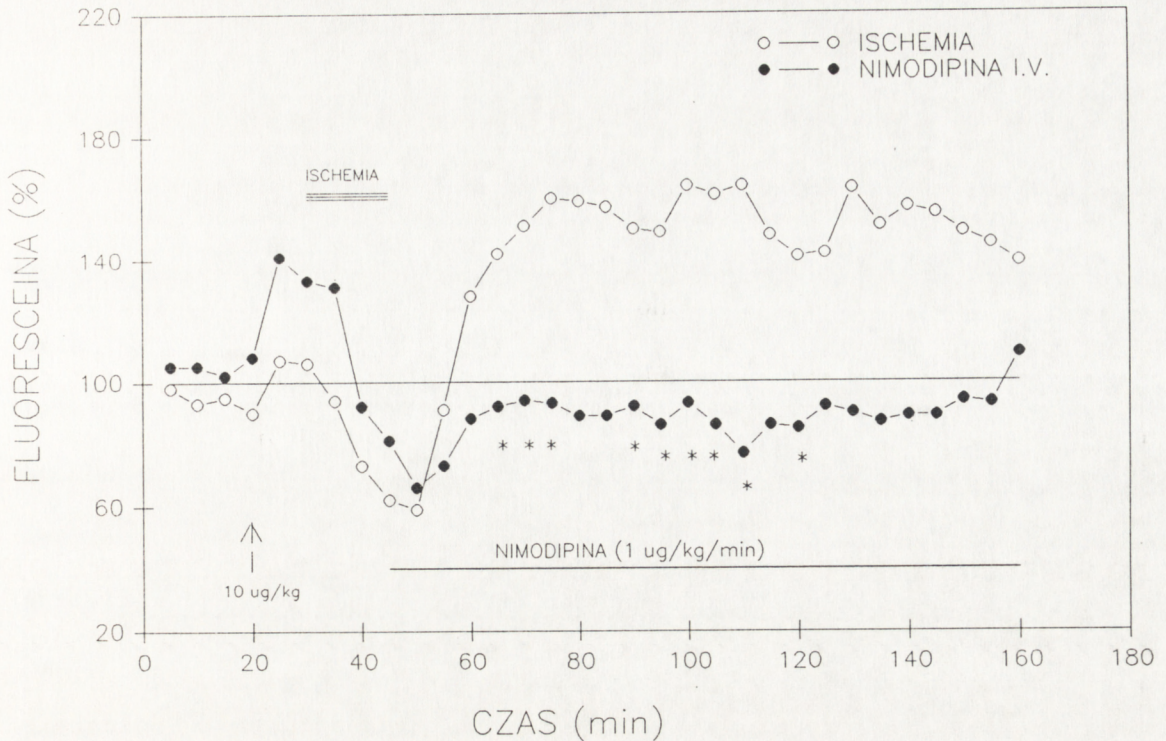
Rys. 21.

Zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg dla fluoresceiny wywołane 15 min. całkowitym niedokrwieniem mózgowia oraz wpływ 1 mM APV. Fluoresceina podawana była dożylnie w postaci 1% roztworu w 0.9% NaCl w dawce 10 mg/kg, na godzinę przed niedokrwieniem. Wyniki wyrażono w procentach intensywności fluorescencji mierzonej na 30 min. przed niedokrwieniem. Dane są średnią z 4 doświadczeń. SEM = \pm 18. * – różnice statystycznie znamienne ($p < 0.05$).

Obserwowany przebieg zmian stężenia fluoresceiny w doświadczeniach w których podawano APV przed, w czasie i po niedokrwieniu nie różnił się w sposób znaczący od doświadczeń w których niedokrwieniu mózgu nie towarzyszyło podawanie 1 mM APV.

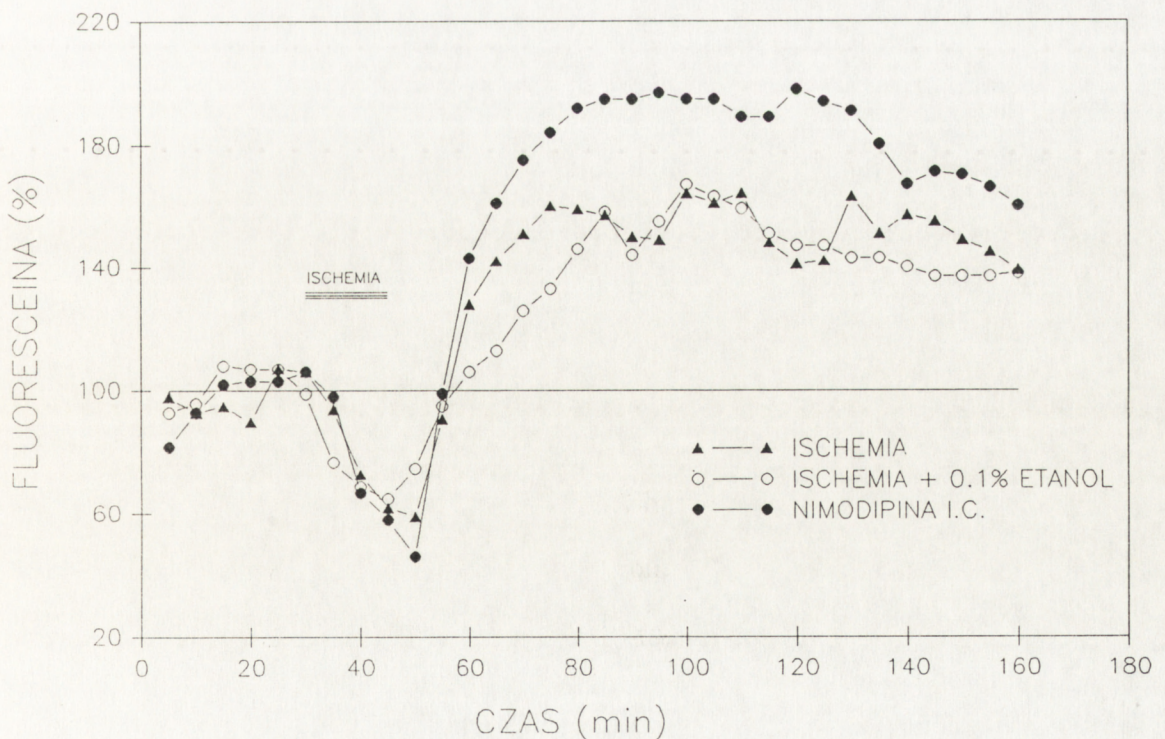
4.6.3. Wpływ nimodipiny na zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg wywołane przez całkowite niedokrwienie mózgowia

Podawanie nimodipiny w postaci jednorazowej iniekcji dożylniej na 15 min. przed niedokrwieniem powodowało krótkotrwały wzrost stężenia fluoresceiny w dializacie do ok. 140% kontroli. Następnie nimodipina podawana była drogą ciągłej infuzji od 10 minuty niedokrwienia. W tych doświadczeniach, po spadku stężenia fluoresceiny w czasie samego niedokrwienia o ok. 40% w stosunku do poziomu kontrolnego, w czasie przywrócenia krążenia po niedokrwieniu nie obserwowano wzmożonego przenikania fluoresceiny do dializatu. Stężenie fluoresceiny w próbkach dializatu utrzymywało się do końca doświadczenia w granicach 80–90% wartości kontrolnych (Rys. 22). W przeciwieństwie do tego silnego działania nimodipiny podawanej systemowo, podawanie nimodipiny bezpośrednio do hipokampa nie zmniejszało wzrostu przepuszczalności bariery krew – mózg wywołanego przez niedokrwienie, a nawet je zwiększało (Rys. 23).



Rys. 22.

Wpływ nimodipiny podawanej dożylnie na zmiany przepuszczalności bariery krew - mózg dla fluoresceiny zachodzące pod wpływem 15 min. niedokrwienia mózgowia. Wyniki wyrażono w procentach wartości wyjściowych. Dane są średnią z 4 doświadczeń. SEM = \pm 24. * - różnice statystycznie znamienne ($p < 0.05$).



Rys. 23.

Wpływ 10 μ M nimodipiny podawanej przez sondę dializacyjną na zmiany przepuszczalności bariery krew - mózg dla fluoresceiny wywołane 15 min całkowitym niedokrwieniem mózgowia. Dane są średnią z 4 doświadczeń. SEM = \pm 18. Różnice między średnimi są statystycznie nieznamienne ($p > 0.05$).

5. DYSKUSJA

Badania przeprowadzone w tej pracy dostarczyły wielu danych dotyczących wpływu niedokrwienia oraz podawania egzogennych substancji na zachowanie się zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie oraz informacji uzupełniających dotyczących zmian stężeń pobudzających aminokwasów, przepuszczalności bariery krew-mózg oraz objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa. Ze względu na specyficzne cechy metod użytych w tej pracy i konieczność pośredniego wnioskowania w oparciu o różnorodne wyniki badań, dyskusja znaczenia biologicznego zaobserwowanych efektów musi być poprzedzona krytyczną oceną stosowanej metodologii. Dotyczy to zarówno oceny rzetelności i przydatności poszczególnych metod jak i zagadnienia czy metody te są adekwatne do założonego celu pracy.

Informacje dotyczące zaburzeń funkcji i uszkodzeń mózgu w wyniku niedokrwienia pochodzą głównie z materiału zwierzęcego. Danych na temat specyficznej wrażliwości neuronów na niedokrwienie dostarczyły doświadczenia modelujące tzw. globalną ischemię, polegające na czasowym zatrzymaniu dopływu krwi do mózgowia i umożliwiające następnie przywrócenie krążenia. Wśród metod stosowanych w tych badaniach wymienić można zaciśnięcie tętnic domózgowych przy użyciu specjalnego nadmuchiwanego mankietu na szyi zwierzęcia (Boyd i Connolly, 1962; Lowry i wsp., 1964), podniesienie ciśnienia wewnątrzczaszkowego powyżej mózgowego ciśnienia perfuzyjnego przez dokomorową infuzję sztucznego płynu mózgowo - rdzeniowego (Neely i Youmans, 1963), zatrzymanie czynności serca (Kawakami i Hossman, 1977), oraz zakładanie zacisków na naczynia doprowadzające krew do mózgu (Hossman i Zimmermann, 1974; Boulu i wsp., 1981).

Zastosowana w tej pracy metoda wewnątrzkatłkowego zamknięcia naczyń doprowadzających krew do mózgowia z równoczesnym obniżeniem ciśnienia

tętniczego została opracowana i opisana przez Plutę (1982). Ten sposób wywoływania pełnego, odwracalnego niedokrwienia u królika różni się niektórymi szczegółami od modelu opisanego przez Hossmannna (Hossman i Zimmermann, 1974). Główna różnica polega na utrzymywaniu normalnego ciśnienia w okresie recyrkulacji, podczas gdy Hossmann stosował hipertensję. Istotnym mankamentem tej metody jest fakt, iż zwierzęta muszą być sztucznie wentylowane i przeżywają tylko kilka godzin po niedokrwieniu. Nie było to jednak przeszkodą w doświadczeniach prezentowanych w tej pracy, których głównym celem było zbadanie zmian zachodzących w czasie niedokrwienia i w krótkim okresie po przywróceniu krążenia (2–3 godz.).

Charakter i dynamika zaburzeń czynności bioelektrycznej kory i hipokampa królika obserwowanych w tym modelu (Pluta i wsp., 1988), zbliżone były do zaburzeń opisanych przez innych autorów w różnych doświadczalnych modelach całkowitego zatrzymania dopływu krwi do mózgowia (Sainio, 1972; Kolata, 1979). Opisany we wcześniejszych pracach (Pluta i wsp., 1988; Pluta, 1986) szybki zanik aktywności bioelektrycznej kory i hipokampa, jak również zanik pracy ośrodków naczynioruchowych oraz spłaszczenie krzywej klirensu ^{133}Xe w czasie niedokrwienia, potwierdzają całkowitość niedokrwienia mózgowia osiągniętego przy użyciu tej metody (Pluta, 1982).

Powrót czynności mózgowia po niedokrwieniu oceniany był na podstawie ponownego pojawienia się czynności bioelektrycznej kory i hipokampa, oraz powrotu czynności ośrodków naczynioruchowych (Pluta, 1986). Pierwsze oznaki powrotu czynności bioelektrycznej kory i hipokampa były obserwowane w 30 – 50 min. po niedokrwieniu (Pluta i wsp., 1988). W czasie 3 godzinnej obserwacji zapisu po przywróceniu krążenia, mimo iż stwierdzano powrót ciągłej aktywności bioelektrycznej zarówno w korze jak i w hipokampie, nie dochodziło do pełnej normalizacji zapisu EEG. Może to wskazywać na wczesne uszkodzenia neuronów powstałe w wyniku przebytego 15 min. niedokrwienia. Mechanizm

wczesnych zmian zachodzących w komórkach nerwowych po całkowitym niedokrwieniu mózgowia ma charakter złożony i liczne jego szczegóły nie zostały w pełni wyjaśnione. Do takich zagadnień należy rola zaburzeń homeostazy wapnia w mechanizmie wczesnych poischemicznych uszkodzeń neuronów.

Wybór hipokampa jako obiektu badań podyktowny był szczególną wrażliwością tej struktury na niedokrwienie i faktem, iż w obszarze CA1 hipokampa można obserwować efekt dojrzewania poischemicznego uszkodzenia neuronów. Ze względu na swe duże wymiary, hipokamp, obok prążkowiec, jest najłatwiej dostępną do dializy strukturą mózgu. Poprzednie badania wykazały, że znaczne obniżenia zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia po podaniu agonistów receptora kwasu glutaminowego są łatwo oznaczalne metodą dializy.

Głównym motywem podjęcia tych badań była potrzeba lepszego poznania mechanizmów patologicznego, masowego przemieszczenia jonów wapnia do neuronów hipokampa w czasie i po niedokrwieniu. Zastosowane w tej pracy metody dają możliwość jednoczesnej rejestracji szeregu wskaźników fizjologicznych, co umożliwi bardziej kompleksowy wgląd w dynamikę zmian zachodzących w homeostazie wapnia i niektórych innych procesach w hipokampie w czasie i po niedokrwieniu. To podejście daje możliwość wykrycia powiązań między tymi procesami w patomechanizmie niedokrwienych uszkodzeń mózgu.

Stosowane w tej pracy metody oparte są na różnorodnym wykorzystaniu techniki mikrodializy hipokampa królika i badaniu składu próbek dializatu, reprezentatywnych dla płynu zewnątrzkomórkowego tej okolicy mózgu. Próby opracowania metody umożliwiającej ciągłe pobieranie i badanie próbek płynu mózgowo – rdzeniowego lub podawanie reagentów do ośrodkowego układu nerwowego w sposób możliwie bezurazowy i pozwalający na ciągłe monitorowanie zmian w mózgu żywego zwierzęcia podejmowane były już 20 – 30 lat temu. MacIntosh i Oborin (1953) stosowali metodę przemywania powierzchni wybranych okolic kory mózgu sztucznym płynem mózgowo – rdzeniowym przy użyciu tzw.

cortical cups i w ten sposób zbierali uwolnione substancje. Gaddum (1961) opisał metodę implantacji do wybranej okolicy mózgu dwóch koncentrycznych kaniul (pull-push caniuła) przez które podawane i pobierane były płyny. Idea badania płynu zewnątrzkomórkowego mózgu drogą dializy zaproponowana została w latach 60 – tych przez Bito (Bito i wsp., 1966), większość problemów technicznych rozwiązana została przez Delgado (Delgado i wsp., 1972), a w latach następnych udoskonalona przez Ungerstedta (Ungerstedt i wsp., 1982). Metoda dializy – perfuzji hipokampa zastosowana w tej pracy jest wynikiem dalszej modyfikacji wcześniejszych propozycji wprowadzonych przez Hambergera (Hamberger i wsp., 1985). Metoda dializy – perfuzji pozwala na obserwację składu płynu zewnątrzkomórkowego mózgu w małych próbkach dializatu uzyskiwanych w dowolnie wybranych odstępach czasu, umożliwia również podawanie środków farmakologicznych bezpośrednio do mózgu z jednoczesną obserwacją wywołanych przez nie efektów. Jest to metoda niewątpliwie inwazyjna, wywołująca w momencie implantacji sondy dializacyjnej uszkodzenie badanej tkanki. W obserwacjach histologicznych tkanek mózgu znajdujących się w sąsiedztwie sondy dializacyjnej stwierdzono w ciągu pierwszych 2 dni obecność pojedynczych nacieków krwinek i pojawianie się pojedynczych monocytów w okolicach sondy dializacyjnej. Zmiany te szybko wyrównywały się (Pluta i wsp., 1988). Otaczająca sondę tkanka (obszar o szer. ok. 50 um) wykazywała nieznaczny obrzęk przez pierwsze 2 dni, ale neurony w tym obszarze w większości pozostawały nietknięte (Lehmann i wsp., 1985). Należy podkreślić, że obszar dializowany był znacznie większy. W badaniach mających wykazać jak duży może być zasięg penetracji przez związki podawane przez sondę dializacyjną stwierdzono, że np. glutamina i glukoza radioaktywne, obserwowane były w odległości do 500 um, natomiast leucyna w odległości 100–200 um od sondy (Hamberger i wsp., 1983). Niewątpliwą zaletą metody dializy – perfuzji w porównaniu z poprzednio stosowanymi metodami jest fakt oddzielenia środowiska dializacyjnego od tkanki błoną

półprzepuszczalną. W związku z tym nie dochodzi do napływu płynu do mózgu, objętości próbek mogą być łatwo i precyzyjnie odmierzone, praktycznie nie ma penetracji białka do dializatu, a więc nie potrzeba dodatkowych metod oczyszczających.

Perfuzja zaimplantowanych sond dializacyjnych pozwala na określenie stężenia różnych składników płynu zewnątrzkomórkowego omywającego sondę, takich jak jony (w przypadku tej pracy jony Ca^{2+}) czy neurotransmitery, poprzez analizę stężenia tych substancji w próbkach dializatu. Pomiar bezwzględnych stężeń jonów, w tym Ca^{2+} w płynie zewnątrzkomórkowym są zwykle przeprowadzane przy użyciu odpowiednich mikroelektrod jonoselektywnych. Niestety, metody bezpośredniego pomiaru zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie za pomocą mikroelektrod jonoselektywnych nie są dostępne w kraju, nie mogą one ponadto sprostać potrzebom wynikającym z celu tej pracy. W naszych badaniach postanowiono więc zastosować metodę pośrednią z użyciem dializy hipokampa, poprzednio opublikowaną i sprawdzoną w praktyce (Łazarewicz i wsp., 1986a).

Eksperymenty przeprowadzane *in vitro* w celu wytestowania warunków i wydajności dializy dla określonego typu sondy (Łazarewicz i wsp., 1986a), wykazały, że stężenie jonów Ca^{2+} w dializacie było proporcjonalne do zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w środowisku otaczającym sondę. Przy stałej szybkości przepływu (2.5 ul/min) i długości rurki dializacyjnej (10 mm) oraz stałej temperaturze, wydajność dializy była determinowana przez przepuszczalność błony dla jonów Ca^{2+} . Stwierdzono, że stężenie Ca^{2+} w dializacie wynosiło ok. 19% stężenia znajdującego się w płynie otaczającym sondę. Dane te można było następnie zastosować do bezwzględnych pomiarów stężenia Ca^{2+} . Określenie stężenia Ca^{2+} mierzonego za pomocą elektrody wapniowej w próbach o objętości 25 ul umożliwiło wyliczenie realnego stężenia wapnia w płynie zewnątrzkomórkowym hipokampa w sąsiedztwie sondy dializacyjnej, zgodnie z

zasadą $Ca^{2+}_{zew} = Ca^{2+}_{dial} * 5.25$ (19% wydajności). Podobnie jak metody bezpośredniego pomiaru zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie za pomocą mikroelektrody jonoselektywnej, także metoda oceny stężenia Ca^{2+}_{zew} poprzez pomiar stężenia wapnia całkowitego w dializacie nie znalazła zastosowania w tych badaniach. W prezentowanej pracy, przy użyciu dializy – perfuzji, została zastosowana pośrednia metoda rejestracji względnych zmian stężenia jonów Ca^{2+} w porównaniu do stanu wyjściowego, po uprzednim wyznaczeniu endogennej puli wapnia w badanej okolicy mózgu izotopem ^{45}Ca . Wykazano, że zestawienie tak uzyskanych wyników z pomiarami za pomocą elektrody wapniowej daje porównywalne rezultaty (Łazarewicz i wsp., 1986a).

Jak już wspomniano, metoda pomiaru z zastosowaniem radioaktywnego Ca^{2+} , mimo odczytu ilościowego, daje jedynie relatywne zmiany stężenia Ca^{2+} w procentach względem poziomu kontrolnego. Interpretacja wzrostu radioaktywności ^{45}Ca w dializacie wykrytego przy użyciu tej metody wymagałaby dodatkowych zabiegów różnicujących między rzeczywistym wzrostem stężenia wapnia wynikającym ze zmniejszenia objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa, a zwiększonym uwalnianiem do przestrzeni zewnątrzkomórkowej radioaktywnego wapnia z przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Pomiar radioaktywności nie pozwala także na zróżnicowanie pomiędzy wapniem całkowitym i zjonizowanym. Zawartość wapnia niezjonizowanego w perfuzacie jest jednak najprawdopodobniej znikoma, gdyż białka z którymi wapń mógłby być związany w bardzo małym stopniu przenikają przez używaną w tych doświadczeniach błonę dializacyjną. Świadczy o tym zgodność wyników porównawczych pomiarów przeprowadzonych przy użyciu metody radioaktywnej i elektrody jonowej (Łazarewicz i wsp., 1986a).

Wyniki pomiarów zmian zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} przy zastosowaniu metody z ^{45}Ca mają specyficzne cechy, wynikające częściowo z ograniczeń metodycznych. Obserwowane zmiany stężeń Ca^{2+} są

mniej i wolniej od rejestrowanych bezpośrednio przy użyciu elektrody wapniowej. Zależy to głównie od ogromnej różnicy w wielkości obszarów będących obiektem badań w obu metodach. Zmiany stężenia Ca^{2+} w dializacie są wypadkową zmian stężeń zachodzących w całym obszarze tkanki będącej obiektem badania przez sondę dializacyjną. Przy długości sondy ok. 10 mm i średnicy 0.16 mm, powierzchnia dyfuzji wynosi ok. 10 mm^2 , podczas gdy elektroda jonowa o średnicy zazwyczaj 1 – 2.5 μm daje pomiary z nieporównywalnie mniejszej powierzchni kontaktu z tkanką. Mimo pewnych niedoskonałości, stosowana w tej pracy metoda pośredniego pomiaru zmian stężeń wapnia w hipokampie, z użyciem dializy i izotopu ^{45}Ca jest sprawdzona w praktyce, była bowiem z powodzeniem stosowana w wielu pracach (Łazarewicz i wsp., 1986a, Łazarewicz i wsp., 1986b). Ma ona niezastąpioną dla tych badań zaletę, jaką jest dokładna zgodność miejsca pomiaru zmian zewnątrzkomórkowych stężeń wapnia z obszarem poddanym działaniu związków farmakologicznie czynnych podanych do środowiska dializacyjnego. Umożliwia ona, poza badaniem zmian stężeń wapnia, wykonywanie pomiarów stężeń aminokwasów oraz przepuszczalności bariery krew – mózg dla wstrzykniętego dożylnie markera. Te zastosowania metody dializy hipokampa mają własną specyfikę wymagającą odrębnej dyskusji.

Metoda dializy – perfuzji hipokampa stosowana była, podobnie jak w prezentowanej pracy, do pomiaru zewnątrzkomórkowych stężeń neurotransmiterów aminokwasowych przez Benveniste i wsp. (1984), Hambergera i wsp. (1983) i innych autorów. Hamberger przeprowadził badania *in vitro* w celu bliższego określenia zasad dializy aminokwasów. Eksperymenty wykazały, że przy szybkości przepływu płynu 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ oraz długości sondy dializacyjnej 10 mm, a więc w warunkach jakie były stosowane i w tej pracy, wydajność dializy dla aminokwasów wynosiła średnio ok. 40%. Duża szybkość dyfuzji aminokwasów przez błonę umożliwia wierne dostosowanie się stężeń aminokwasów w dializacie do zmian zachodzących w stężeniu aminokwasów na zewnątrz sondy, co potwierdzają

pomiary stężeń aminokwasów w dializacie pochodzącym z zaimplantowanej sondy dializacyjnej (Lehmann i wsp., 1983).

Podnoszone były zastrzeżenia, że obraz stężenia aminokwasów w badanej przestrzeni zewnątrzkomórkowej może być zaburzony przez wyciekanie aminokwasów ze zniszczonych komórek w sąsiedztwie sondy. Dyfuzję aminokwasów przez błonę półprzepuszczalną mogłoby też zaburzyć obrastanie jej przez astroglej w wyniku gliozy. Ponieważ przytaczane wcześniej badania mikroskopowe wykazały bardzo niewielką ilość uszkodzonych komórek, wpływ ich na obserwowane zmiany stężenia aminokwasów w 24 godz. po implantacji nie mógł być znaczący (Pluta i wsp., 1988). Skuteczne pomiary stężenia aminokwasów metodą dializy przez szereg dni, nawet do 4 tygodni dowiodły, że w pierwszych dniach po implantacji nie dochodzi do obrastania sondy dializacyjnej przez komórki gleju, co potwierdzają badania morfologiczne (Hamberger i wsp., 1985). Ponieważ pomiary stężenia aminokwasów prezentowane w tej pracy dokonywane były w 24 godziny po implantacji, ten czynnik, jako mogący zaburzyć obraz zmian, może być pominięty.

Benveniste i wsp. (1984) stosując metodę dializy – perfuzji hipokampa w pomiarach zmian stężenia Glu i Asp w czasie niedokrwienia mózgu szczura, rozpatrywali możliwość wpływu na stężenie aminokwasów uszkodzenia bariery krew – mózg, zachodzącego zarówno w czasie implantacji sondy jak i w wyniku ischemii. Wykazali oni przy użyciu metody autoradiograficznej, że zarówno stan bariery krew – mózg, jak i wartość wymiany w rejonach sąsiadujących z sondą dializacyjną wkrótce po implantacji, mieściły się w normalnych wielkościach opisywanych wcześniej (Benveniste i wsp., 1984). Podobne dane uzyskał też Tossman (Tosmann i wsp., 1984) przy pomocy innej metody wykrywania uszkodzeń bariery. Ponadto, zdaniem Benveniste i wsp. (1984), wobec stosunkowo niewielkich różnic stężeń aminokwasów we krwi i przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu, zmiany stężeń niektórych aminokwasów obserwowane w dializacie po

ischemii nie dają się wyjaśnić penetracją tych aminokwasów przez barierę krew – mózg. Oznacza to, że stężenia aminokwasów mierzone w dializacie odzwierciedlają ich stężenia zewnątrzkomórkowe w sąsiedztwie sondy dializacyjnej.

W tej pracy do pomiaru zmian przepuszczalności bariery krew – mózg adaptowano sposób opisany wcześniej przez Gulatiego i wsp. (1982), dla badania bariery krew – płyn mózgowo-rdzeniowy. Metoda ta w sposób zadowalający pozwala ilościowo śledzić dynamikę wczesnych zmian przepuszczalności bariery krew – mózg dla stosowanego w tej pracy znacznika – fluoresceiny. Oddzielnych badań, wykraczających poza ramy tej pracy, wymagałoby stwierdzenie, czy wzrost stężenia fluoresceiny w dializacie odzwierciedla przenikanie wolnej fluoresceiny z krwi przez barierę krew – mózg, czy też do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przechodzi kompleks białko – fluoresceina, z którego fluoresceina dysocjuje i dostaje się do sondy dializacyjnej.

Stosowanie dializy – perfuzji jako metody badawczej umożliwia zarazem podawanie związków farmakologicznie czynnych przez sondę dializacyjną wprost do badanej okolicy mózgu. Sposób ten był z powodzeniem wykorzystywany przez wielu badaczy. Wywołanie depolaryzacji w neuronach znajdujących się w sąsiedztwie sondy przez zastosowanie środowiska dializacyjnego o podwyższonym stężeniu KCl jest metodą efektywną i wcześniej już stosowaną (Łazarewicz i wsp., 1986a), podobnie jak podawanie tą samą metodą agonistów oraz antagonistów receptorów kwasu glutaminowego – NMDA, KA i APV (Lehamnn i wsp., 1983; Lehmann i wsp., 1985). Wydajność dializy czyli stopień przenikania przez błonę dializacyjną zarówno NMDA, KA jak i APV jest zbliżony do wartości określonych dla aminokwasów i mieści się w przedziale 35 – 40% (Lehmann i wsp., 1983). Wydajność dializy dla nimodipiny zawartej w medium perfuzyjnym określono na ok. 30% (Salińska, dane nie opublikowane). Natomiast systemowe podawanie nimodipiny dostosowane było dawką do zaleceń producenta (Bayer, RFN) i stężeń stosowanych przez innych autorów.

Zasadniczą dla realizacji założeń tej pracy była metoda pomiarów zmian zewnątrzkomórkowych stężeń wapnia w hipokampie. Została ona uznana za odpowiadającą celom pracy. Stosowane jednocześnie metody dynamicznej, ilościowej oceny zmian stężeń aminokwasów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa, przepuszczalności bariery krew – mózg oraz objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej zostały użyte dla uzyskania dodatkowych informacji niezbędnych dla interpretacji wyników. Oceniając adekwatność użytych metod należy jednak uwzględnić kwestię dopuszczalności wnioskowania na podstawie zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie o mechanizmach prowadzących do tych zmian, a zwłaszcza o aktywności odpowiednich kanałów wapniowych.

Stosowana w tej pracy metoda badania zmian zewnątrzkomórkowych stężeń wapnia w hipokampie ma liczne, dyskutowane wcześniej, ograniczenia, w tym dużą inercję i małą rozdzielczość przestrzenną uniemożliwiającą rejestrację szybko przebiegających przemieszczeń jonów w mikroskopijnych przedziałach przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu. Można więc się zastanawiać, czy wyniki uzyskane tą metodą uprawniają do wnioskowania na temat przepływów jonów wapnia przez szybko (w ciągu milisekund) aktywujące się zależne od potencjału lub stymulowane przez agonistów kanały wapniowe. Należy pamiętać, że przedmiotem analizy były zmiany stężeń wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej będące wypadkową szeregu czynników. Na wartość tą ma decydujący wpływ aktywność wszystkich mechanizmów napływu wapnia do komórek i uwalniania go do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wpływają także na nią zmiany w objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Za pomocą narzędzi farmakologicznych można jednak pokusić się o ocenę udziału tych poszczególnych procesów w mechanizmie zmian stężeń zewnątrzkomórkowego wapnia. Heinemann i wsp. (1988) oraz inni z powodzeniem stosowali jednak pomiary zmian stężeń wapnia w skrawkach hipokampa jako wskaźnika aktywności różnych kanałów wapniowych. Wyższością

badania przedstawionych w tej pracy jest zastosowanie tych metod *in vivo* z uwzględnieniem w dyskusji zmian objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

Przedstawione w tej pracy wyniki dotyczące zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie mózgu królika w czasie i po całkowitym niedokrwieniu, świadczące o przemieszczeniu jonów wapnia do wnętrza neuronów, są jakościowo zbliżone do wyników uzyskanych przy użyciu mikroelektrody wrażliwej na wapń (Łazarewicz i wsp., 1986a).

W pierwszej fazie niedokrwienia obserwowany był ok. 10% wzrost poziomu ^{45}Ca w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zgodne jest to z wynikami uzyskanymi przy użyciu mikroelektrody wapniowej przez Suzuki i wsp. (1985), Hansena i Zeuthena (1981) oraz Harrisa i wsp. (1981). Zjawisko to tłumaczone jest jako wynik gwałtownego zmniejszenia objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej na skutek przemieszczenia się wody do komórek nerwowych i ich obrzęku w pierwszej fazie niedokrwienia, przed aktywacją kanałów wapniowych.

Na podstawie prezentowanych w tej pracy badań zmian przestrzeni zewnątrzkomórkowej, gdzie jako znacznika użyto sacharozy znakowanej izotopem węgla ^{14}C , możemy ocenić, że objętość przestrzeni zewnątrzkomórkowej zmniejsza się w początkowych minutach niedokrwienia o ok. 30%. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wynikami Hansena i Olsena (1980), którzy przeprowadzili podobne badania używając choliny jako znacznika zmian objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Zakładając, że zmiany stężenia tego związku w płynie pozakomórkowym są odbiciem zmian objętości fazy wodnej, badacze ci stwierdzili, że objętość przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu może się zmniejszyć do 80% wartości początkowej już w ciągu kilku sekund we wstępnej fazie przeddepolarizacyjnej ischemii, a następnie do 50% w czasie anoksyjnej depolaryzacji.

Mechanizm tego zjawiska wyjaśniany jest zachodzącymi w czasie ischemii zaburzeniami kompartmentacji jonów jednowartościowych i wody w

neuronach i przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu. W warunkach normalnych ciśnienie osmotyczne anionów nieprzepuszczalnych przez błonę komórkową jest równoważone przez zależną od energii aktywność pompy sodowej usuwającej jony Na^+ . Gdy ten mechanizm zawodzi, komórki pęcznieją, ponieważ woda podąża za jonami Na^+ i Cl^- do wnętrza komórek. Stwierdzenie znacznego spadku zewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ i Cl^- w czasie niedokrwienia potwierdza działanie tego mechanizmu (Hansen, 1979). Obserwowane przez Hansena i Olsena (1980) pęcznienie neuronów w fazie przeddepolaryzacyjnej ischemii, w której zmiany stężenia Na^+ i Cl^- są małe, może być ponadto spowodowane nagromadzeniem się w komórkach metabolitów beztlenowych. Ponieważ w tej pracy stosowana była pośrednia metoda badania zmian zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia z użyciem ^{45}Ca , nie można wykluczyć, że obserwowany przez nas wzrost poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa w pierwszych minutach niedokrwienia może być dodatkowo potęgowany przez mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego, wypływ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ z mitochondriów i przez wymianę $\text{Ca}^{2+} - ^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Łazarewicz i wsp., 1978; Siesjo i Wieloch, 1985a; Siesjo i Wieloch, 1985b).

Po tym początkowym wzroście stężenia wapnia następował spadek jego zawartości w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, którego maksimum obserwowano już po przywróceniu krążenia. Następnie powoli (w ciągu 45 min.) postępowała normalizacja zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Obserwowany w doświadczeniach prezentowanych w tej pracy spadek zewnątrzkomórkowego wapnia nie był tak duży jak w doświadczeniach innych autorów (Hansen i Mutch, 1984), gdzie notowano obniżenie nawet o 90%. Jest to niewątpliwie wynikiem stosowania innych metod pomiaru stężenia wapnia oraz ograniczeń używanej w tej pracy metody, które omówione zostały w poprzednim rozdziale. Jednakże Hagberg i wsp. (1984) stosując również metodę dializy – perfuzji do badania zmian stężenia jonów wapnia pod wpływem niedokrwienia i mierząc stężenia wapnia w próbkach

przy użyciu mikroelektrody wrażliwej na jony wapnia, uzyskał wyniki zgodne z prezentowanymi w tej pracy.

Suzuki i wsp. (1985), używając mikroelektrody wapniowej także obserwowali, że do maksymalnego spadku stężenia jonów Ca^{2+} w przestrzeni zewnątrzkomórkowej kory i hipokampa mózgu chomika mongolskiego dochodzi w czasie recyrkulacji, w 5 min. po 5 minutowej ischemii, a powrót do poziomu kontrolnego zabierał ok. 20 min. Siesjo i Wieloch (1985 a i b) podawali, że powrót stężenia jonów Ca^{2+} do wartości kontrolnych w korze mózgu szczura następował po ok. 30 min. od przywrócenia krążenia. Nie jest jasne, czy opóźniona normalizacja zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} jest spowodowana powolnym przywracaniem normalnego metabolizmu, a zwłaszcza potencjału energetycznego komórek, czy jest odbiciem przedłużonej aktywacji mechanizmów wnikania Ca^{2+} do neuronów, czy też jest objawem przedłużonej ischemizacji tkanki, spowodowanej niepełnym przywróceniem mikrokrążenia, mimo zdjęcia zacisków z tętnic doprowadzających krew do mózgu. Najprawdopodobniej wszystkie wymienione czynniki mogą odgrywać w tym zjawisku pewną rolę. Znaczenie przywrócenia krążenia mózgowego po niedokrwieniu będzie przedmiotem dalszej dyskusji.

Porównanie parametrów badanych w tej pracy w czasie i po niedokrwieniu mózgu wskazuje na zbieżność w czasie pomiędzy zmianami zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} i pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych – glutaminianu i asparaginianu. Maksymalny wzrost stężenia Glu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa obserwowany był niemal w tym samym czasie co maksymalny spadek stężenia $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Powolne obniżanie się zewnątrzkomórkowego stężenia Glu również zbiegało się w czasie z tendencją do normalizacji stężeń $^{45}\text{Ca}^{2+}$, powrót do normy obu zmiennych przypadał na 45 min. po przywróceniu krążenia.

Zbieżność zmian w czasie niekonieczne musi wskazywać na wzajemne powiązanie tych dwóch czynników. W tych doświadczeniach obserwowano opisane wcześniej (Pluta i wsp., 1988) zależności czasowe pomiędzy normalizacją poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ i aminokwasów pobudzających a powrotem aktywności bioelektrycznej mózgu, co świadczy o podobnej dynamice różnych procesów zachodzących w mózgu w okresie poischemicznym. Jednakże fakt, że podwyższone zewnątrzkomórkowe stężenie Glu koresponduje ze zmniejszonym zewnątrzkomórkowym stężeniem Ca^{2+} może sugerować, że spowodowany przez niedokrwienie napływ Ca^{2+} do komórek mózgu może być przyczynowo związany z pobudzeniem receptorów kwasu glutaminowego (Hagberg i wsp., 1985; Łazarewicz i wsp., 1986b). Z drugiej strony nie można zapominać, że uwalnianie neurotransmiterów, w tym także aminokwasów pobudzających jest zjawiskiem zależnym od jonów Ca^{2+} .

Obserwowane w tej pracy nieco opóźnione pojawienie się piku wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia Glu i Asp już po niedokrwieniu oraz przedłużone podwyższenie tych stężeń jeszcze jakiś czas po przywróceniu krążenia opisane były po raz pierwszy przez Benveniste i wsp. (1984), a następnie przez Hagberga i wsp. (1985). Wiązali oni to zjawisko z powolną aktywacją mechanizmów usuwających nadmiar aminokwasów pobudzających z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Pobieranie zwrotne aminokwasów do zakończeń nerwowych i astrogleju, może w początkowym okresie niedokrwienia kompensować nadmierne ich uwalnianie wywołane przez depolaryzację. Proces ten ulega jednak szybko zahamowaniu w wyniku zaburzeń energetycznych i jonowych w czasie kompletnej anoksji/ischemii. Poischemiczna normalizacja stężeń pobudzających aminokwasów byłaby uzależniona od normalizacji metabolizmu astrogleju i neuronów.

Natura wywołanego przez ischamię wzrostu stężenia aminokwasów w przestrzeni zewnątrzkomórkowej była przedmiotem licznych dyskusji. Jak omówiono wcześniej, przenikanie ich przez barierę krew – mózg jest mało

prawdopodobne, powszechnie przyjmuje się więc, iż obserwowane w czasie niedokrwienia podwyższenie poziomu neuroprzekazników aminokwasowych w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest wynikiem uwalniania ich z komórek mózgu, w tym z zakończeń nerwowych. Ze względu na fakt istnienia w zakończeniach nerwowych dwóch pul Glu – neurotransmitterowej, składającej się z glutaminianu nagromadzonego w pęcherzykach synaptycznych, której uwalnianie zależne jest od energii i związane jest z depolaryzacją i napływem jonów Ca^{2+} , oraz cytoplazmatycznej – metabolicznej, mogącej się uwalniać bez udziału jonów Ca^{2+} i zużycia energii, powstała kwestia sporna, na temat udziału obu tych pul w obserwowanym w niedokrwieniu zjawisku przemieszczenia Glu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Hagberg i wsp. (1985) twierdzili, że tak znacznego wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia glutaminianu nie można tłumaczyć wyłącznie aktywacją uwalniania neurotransmitterowej puli Glu wywołaną przez depolaryzację. Wskazali oni na rolę zaburzeń mechanizmów usuwających nadmiar Glu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz na możliwość wycieku Glu z puli cytoplazmatycznej do przedziału zewnątrzkomórkowego. Ich zdaniem w warunkach anoksji normalny mechanizm pobierania Glu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy na zasadzie symportu z jonami Na^+ może działać w kierunku odwrotnym. Również Sanchez-Prieto i Gonzales (1988) twierdzili, że Glu uwalniany jest głównie w sposób niezależny od jonów wapnia, podczas gdy uwalnianie zależne od jonów wapnia zahamowane jest brakiem ATP. Udział astrogleju w uwalnianiu kwasu glutaminowego w czasie ischemii nie jest jasny. Wykazano jednak, że wywołane przez niedokrwienie uwalnianie Glu jest zależne od jonów wapnia. Benveniste i wsp. (1984) stwierdzili przy użyciu mikroperfuzji mózgu *in vivo*, że podwyższone uwalnianie Glu z hipokampa szczura pod wpływem niedokrwienia było całkowicie zależne od obecności jonów Ca^{2+} . Na tej podstawie można było uważać, że uwolniony Glu pochodzi z puli neurotransmitterowej (Drejer i wsp., 1985), a więc nie związanej z glijem. Ten

wniosek poparty został stwierdzeniem, że stymulowane przez jony K^+ uwalnianie Glu z astrocytów nie jest zależne od jonów wapnia i nie wzrasta w warunkach ischemicznych (Siesjo i Wieloch, 1985b).

Obecnie przyjmuje się, że aminokwasy pobudzające uwalniane pod wpływem niedokrwienia w początkowym okresie pochodzą głównie z puli neuroprzekaznikowej uwalnianej w sposób zależny od depolaryzacji i napływu jonów Ca^{2+} . Następnie dołącza się mechanizm niespecyficznego uwalniania Glu cytoplazmatycznego z puli metabolicznej, spowodowanego ischemicznymi zaburzeniami równowagi jonowej. Zmiany te pogłębiane są upośledzeniem wychwytu zwrotnego glutaminianu. Redukcja podwyższonego stężenia Glu i Asp w przestrzeni zewnątrzkomórkowej po przywróceniu krążenia wiązana jest ze zwrotnym ich pobieraniem oraz z usuwaniem ich drogą krwioobiegu (Hagberg i wsp., 1985), stąd między innymi tak duże znaczenie całkowitej reperfuzji po niedokrwieniu.

Znaczenie patofizjologiczne podwyższonego stężenia aminokwasów pobudzających w przestrzeni zewnątrzkomórkowej mózgu w niedokrwieniu, ściśle związane jest z ich działaniem ekscytotoksycznym. Ekscytotoksyczność związana jest z nadmierną aktywacją receptorów glutamatergicznych, a co za tym idzie z aktywacją sprzężonych z nimi kanałów wapniowych oraz z zależną od depolaryzacji aktywacją kanałów wapniowych regulowanych przez potencjał. Badania prezentowane w tej pracy zmierzały do wyjaśnienia udziału w napływie jonów Ca^{2+} do neuronów hipokampa, zachodzącym w czasie niedokrwienia, kanałów wapniowych zależnych od potencjału komórki oraz kanałów wapniowych bezpośrednio sprzężonych z receptorami kwasu glutaminowego.

W badaniach zastosowano nimodipinę – pochodną dihydropirydyny – ogólnie uważaną za specyficznego blokera jednej z podklas kanałów wapniowych zależnych od potencjału (kanałów L), celem stwierdzenia stopnia udziału tych kanałów w ischemicznym napływie jonów wapniowych do komórek nerwowych.

Stwierdzono znaczną różnicę efektów nimodipiny stosowanej systemowo i podawanej lokalnie, bezpośrednio do hipokampa przez sondę dializacyjną, na wywołany przez niedokrwienie spadek zewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} . Działanie nimodipiny przy jej stosowaniu lokalnym ograniczało się do niewielkiego zmniejszenia tego spadku w porównaniu z doświadczeniami kontrolnymi, w których w czasie niedokrwienia do dializy używano medium zawierające nośnik nimodipiny – 0.1% etanol. W przeciwieństwie do tego słabego efektu miejscowego, dożylne podawanie nimodipiny bardzo skutecznie zmniejszało wywołany przez ischemię spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie. Należy podkreślić, że normalizacja stężenia jonów wapnia po przywróceniu krążenia w obu przypadkach następowała szybciej niż w ischemii kontrolnej.

Dostępne w literaturze doniesienia na temat wpływu blokerów kanałów wapniowych na homeostazę wapnia w mózgu w czasie niedokrwienia są sprzeczne. Hagberg i wsp. (1984) używając również techniki dializy-perfuzji hipokampa królika, połączonej z pomiarem całkowitego stężenia wapnia w dializacie zaobserwowali zmniejszenie przez verapamil spadku stężenia Ca^{2+}_e w całkowitym niedokrwieniu mózgu. Podobnie flunaryzyna – inny bloker kanałów wapniowych – wykazywała hamujące działanie na spadek stężenia Ca^{2+}_e w mózgu szczura poddanego hipoksji (Peters, 1986). Jednakże istnieją prace, w których autorzy nie potwierdzają hamującego działania blokerów kanałów wapniowych zależnych od depolaryzacji na przemieszczanie Ca^{2+} w mózgu w czasie ischemii. W pracach Harrisa i wsp. (1981) przeprowadzonych na mózgu kota, nimodipina nawet zwiększała spadek zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} pod wpływem niedokrwienia, a Hossmann i wsp. (1983) obserwowali brak efektu flunaryzyny na akumulację jonów Ca^{2+} w tkance mózgowej.

Mechanizm działania nimodipiny należy rozpatrywać kompleksowo. Jej znane blokujące działanie na kanały wapniowe zależne od depolaryzacji (typ L), mogłoby teoretycznie tłumaczyć zmniejszenie wywołanego przez niedokrwienie

spadku poziomu zewnątrzkomórkowego wapnia. Jednakże można oczekiwać, że efekt ten powinien ujawniać się najsilniej w doświadczeniach w których nimodipinę podawano lokalnie, co nie jest zgodne z uzyskanymi wynikami. Należy zaznaczyć, że odpowiednie eksperymenty *in vitro* wykazały znaczną przepuszczalność sondy dializacyjnej dla nimodipiny, ponadto w innych układach doświadczalnych wykazano zgodne z oczekiwaniami działanie miejscowo podanej nimodipiny. Nowe doniesienia o hamowaniu przez nimodipinę m. inn. kanałów zależnych od potencjału typu N dają podstawy do spekulacji, że działanie nimodipiny w niedokrwieniu można odnieść do bardziej złożonych mechanizmów (Takahashi i wsp., 1989). Zależne od potencjału kanały wapniowe określane jako kanały N zlokalizowane są głównie presynaptycznie i prawdopodobnie biorą udział w napływie wapnia stanowiącym sygnał do uwalniania neurotransmiterów. Są dane wskazujące na hamowanie uwalniania neurotransmiterów przez różne blokery kanałów wapnia. Biorąc jednak pod uwagę złożony mechanizm uwalniania glutaminianu w ischemii, w którym ważną rolę odgrywa napływ niezależny od zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , sądzić można, że hamowanie napływu jonów Ca^{2+} do neuronów przez blokery z grupy dihydropirydyn nie powinno w istotny sposób modyfikować wywołanego przez niedokrwienie wzmożonego uwalniania Glu i Asp do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Istotnie, w doświadczeniach *in vivo* nie obserwowaliśmy, aby nimodipina podawana dożylnie hamowała wywołany przez niedokrwienie wyrzut Glu i Asp (Łazarewicz i wsp., 1989).

Fakt, że nimodipina podawana dożylnie ma znacznie większy wpływ hamujący na spadek stężenia jonów Ca^{2+} w czasie niedokrwienia, niż podawana bezpośrednio do hipokampa, wydaje się wskazywać na głównie naczyniowy element oddziaływania nimodipiny. Nimodipina w stosowanych w tej pracy stężeniach preferencyjnie rozszerza naczynia mózgowe i jak wykazano poprawia przepływ krwi w okresie poischemicznym, co może przyspieszyć powrót do normy metabolizmu i

funkcji neuronów (Mabe i wsp., 1986). Uważa się także, że uniwersalne działanie protekcyjne innego blokera wapniowego – flunaryzyny zapobiegającego zaburzeniom wywołanym przez hipoksję mózgu jest związane z jej oddziaływaniem na poprawę krążenia mózgowego po ischemii (White i wsp., 1982).

Niedokrwienie powoduje depolaryzację błon komórek naczyń i napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza kapilarów powodując ich obkurczenie (Morel i Godfraind, 1989). Depolaryzacja włókien mięśniówki gładkiej ściany tętniczek mózgu i napływ wapnia, prowadzi do uogólnionego skurczu naczyń. Napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek powoduje również aktywację fosfolipazy A_2 , uwalnianie kwasu arachidonowego, a w momencie przywrócenia krążenia uwolnienie produktów metabolizmu kwasu arachidonowego o różnym działaniu na naczynia mózgowie (Marin, 1988). Te procesy mogą być elementami mechanizmu tzw. "no – reflow phenomenon" i upośledzenia krążenia mózgowego po niedokrwieniu. Podanie nimodipiny blokującej kanały L i ograniczającej napływ wapnia, może zabezpieczyć przed pojawieniem się tego efektu (Morel i Godfraind, 1989). Naczyniowe raczej niż neuronalne działanie nimodipiny postulowali również Mabe i wsp. (1986), którzy badali wpływ nimodipiny na wywołane przez niedokrwienie zaburzenia metabolizmu mózgu. Nie stwierdzili oni istotnych różnic zarówno w akumulacji wolnych kwasów tłuszczowych, jak i spadku stężenia ATP w czasie niedokrwienia przy którym podawano nimodipinę w porównaniu do kontroli. Całkowicie nie wykluczyli oni jednak bezpośredniego działania nimodipiny na neurony, sugerując, że może ona w pewnym stopniu hamować napływ jonów wapnia do komórek, powodując mniejsze zapotrzebowanie na ATP przy ich usuwaniu w okresie recyrkulacji. O możliwości częściowego, bezpośredniego hamowania przez nimodipinę napływu Ca^{2+} do neuronów kory mózgu świadczą też wyniki Greenberga i wsp. (1991). Najprawdopodobniej wpływ nimodipiny jest kombinacją oddziaływania na naczynia oraz działania na neurony.

Dodatkowym faktem przemawiającym za naczyniową predylekcją nimodipiny może być, zaobserwowane w tej pracy, jej działanie na wywołane przez niedokrwienie zmiany przepuszczalności bariery krew-mózg. W prezentowanej pracy podawanie nimodipiny dożylnie rozdzielone było na dwa etapy: jednorazową iniekcję na 15 min. przed niedokrwieniem oraz ciągłą infuzję począwszy od 10 min. niedokrwienia. Efekty nimodipiny w obu sytuacjach były odmienne. Podanie nimodipiny w postaci jednorazowej iniekcji w celu wstępnej protekcji wywoływało krótkotrwały wzrost przenikania fluoresceiny, znacznika przepuszczalności bariery, do dializatu. Mechanizm tego efektu jest obecnie trudny do wytłumaczenia, jednakże Hollerhage i wsp. (1988) zwracają uwagę, iż w niektórych przypadkach protekcyjne podanie nimodipiny może powodować krótkotrwałe zaburzenie autoregulacji bariery krew-mózg, co jest zgodne z naszą obserwacją, i zaleca ostrożność w stosowaniu jej jako środka zabezpieczającego. Z drugiej strony Forsman i wsp. (1986) donoszą, że nimodipina w warunkach prawidłowych nie wywiera wpływu na krążenie mózgowe, a jej pozytywne działanie objawia się wyłącznie w warunkach ischemicznych oraz opisują wpływ nimodipiny na rozszerzenie naczyń tylko w rejonach objętych ischemią. Podawanie nimodipiny dożylnie, rozpoczynane w 10 min. niedokrwienia, dało efekt w postaci obniżenia przenikania fluoresceiny do dializatu do poziomu nawet nieznacznie niższego niż wartości kontrolne, podczas gdy w doświadczeniach w których podczas niedokrwienia nie podawano żadnych środków farmakologicznych, poziom fluoresceiny po przywróceniu krążenia wzrastał do ok. 160% wartości kontrolnych. Jest to zgodne z wynikami Hollerhage i wsp. (1988). Podawanie nimodipiny lokalnie, bezpośrednio do hipokampa przez sondę dializacyjną nie miało istotnego wpływu na zmiany przepuszczalności bariery krew-mózg wywołane przez niedokrwienie.

Wiadomo, że wzrost przepuszczalności bariery krew - mózg w wypadku niedokrwienia ma charakter dwufazowy (Kuroiwa i wsp., 1985). Pierwsza

faza obserwowana jest krótko po przywróceniu krążenia i jej mechanizm bywa wiązany z występowaniem reaktywnej hyperemii połączonej z rozszerzeniem naczyń, z kwasicą oraz z utratą zdolności autoregulacji przez naczynia. Druga faza, która jest obserwowana nieco później, ma być, zdaniem niektórych autorów związana z uszkodzeniem parenchymy mózgu (Klatzo, 1987). Dla prezentowanej pracy, w której badano wczesne zmiany po niedokrwieniu, bardziej interesująca jest pierwsza faza wzrostu przepuszczalności bariery krew – mózg. Zaburzenia autoregulacji mogą być wtórnie spowodowane ischemicznymi zmianami zachodzącymi w komórkach naczyń krwionośnych mózgu. Można przypuszczać, że jony potasu przemieszczone z neuronów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w czasie niedokrwienia mogą depolaryzować komórki naczyń włosowatych mózgu i aktywować ich zależne od potencjału, wrażliwe na dihydropirydyny, kanały wapniowe. Jeśli napływ wapnia do kapilar mózgu prowadzi, poza ich skurczem, co udowodnili Morel i Godfreind (1989), także do wzrostu przepuszczalności bariery, to zablokowanie przez nimodipinę kanałów wapniowych mogło prowadzić nie tylko do rozszerzenia kapilar (Morel i Godfreind, 1989), ale także do usztywnienia naczyń i zablokowania przepuszczalności.

Należy dodać, że podawanie bezpośrednio przez sondę dializacyjną do hipokampa APV, blokera kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami aminokwasów pobudzających wrażliwych na NMDA, blokującego wnikanie wapnia do neuronów w czasie niedokrwienia, także nie miało istotnego wpływu na obserwowane w ischemii zmiany przepuszczalności bariery krew – mózg. Jest to wynik zrozumiały, pamiętając o neuronalnej lokalizacji receptorów NMDA. Z drugiej strony ten wynik mógłby przemawiać za brakiem pośredniego wpływu stymulacji receptorów kwasu glutaminowego zlokalizowanych w neuronach mózgu na funkcję kapilar mózgu po ischemii. Teoretycznie, uwalnianie K^+ z pobudzonych neuronów może bowiem depolaryzować znajdujące się w pobliżu komórki kapilary. Możliwe jest jednak wyjaśnienie efektu nimodipiny inne, niż przez hamowanie

kanałów L w kapilarach. W niektórych pracach zwraca się uwagę na możliwy negatywny wpływ kalmoduliny na przepuszczalność bariery krew – mózg w warunkach patologicznych (Marin, 1988). Hamowanie działania kalmoduliny, które jest jednym z ubocznych efektów dihydropirydyn (Thayer i Fairhurst, 1983), mogłoby więc tłumaczyć obserwowane w tej pracy działanie nimodipiny na barierę krew – mózg.

Bez względu na mechanizm tego efektu, wydaje się, że wykazany przez nas po raz pierwszy (Łazarewicz i wsp., 1989) ochronny wpływ nimodipiny na barierę krew – mózg po niedokrwieniu należy do najistotniejszych oddziaływań tego blokera kanałów wapniowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Negatywne wyniki doświadczeń z miejscowym wpływem nimodipiny na przepuszczalność bariery krew – mózg po niedokrwieniu, w zestawieniu z silnym działaniem nimodipiny podawanej obwodowo, mogą przemawiać za tym, że systemowe działanie nimodipiny na naczynia krwionośne, a zwłaszcza na naczynia mózgu jest czynnikiem mającym największe znaczenie w protekcyjnym działaniu w czasie niedokrwienia. Konsekwencją tego stwierdzenia jest wniosek, iż działanie nimodipiny zmniejszające wywołane przez niedokrwienie zaburzenia zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie ma w głównej mierze charakter pośredni. Tym niemniej stwierdzone zostało także, słabo wyrażone, hamujące działanie lokalnie podawanej nimodipiny na wywołany przez niedokrwienie spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie. Efekt ten można przypisać hamującemu działaniu nimodipiny na zależne od potencjału, wrażliwe na dihydropirydyny kanały wapniowe L w neuronach. Na podstawie dotychczas omawianych wyników tej pracy można sugerować, że ten nieznaczny hamujący wpływ nimodipiny podawanej lokalnie odzwierciedla niewielki tylko udział wrażliwych na nimodipinę zależnych od potencjału kanałów wapniowych w wywołanym przez niedokrwienie przemieszczeniu wapnia do neuronów hipokampa.

Fakt nadmiernego uwalniania pobudzających neurotransmiterów aminokwasowych, głównie Glu i Asp w czasie niedokrwienia mózgu, wzrostu ich stężeń w przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz zwiększonej stymulacji przez nie receptorów i związanych z nimi kanałów jonowych jest elementem szybko rozwijającej się w latach osiemdziesiątych ekscytotoksycznej teorii uszkodzenia komórek mózgowych. Zgodnie z tą hipotezą, w napływie jonów Ca^{2+} do neuronów w wyniku niedokrwienia mózgu mogą brać udział przede wszystkim kanały sprzężone z receptorami glutamatergicznymi, natomiast dyskutowany wcześniej udział kanałów zależnych od potencjału miałby charakter ograniczony i wtórny. Prezentowane w niniejszej pracy wyniki doświadczeń, w których zwierzęciu poddanemu ischemii podawano lokalnie do hipokampa – APV, specyficzny, kompetycyjny bloker receptorów aminokwasów pobudzających wrażliwych na NMDA, są potwierdzeniem tego poglądu. W doświadczeniach tych obserwowano znaczne ograniczenie spadku zewnątrzkomórkowego stężenia $^{45}\text{Ca}^{2+}$, które, w tym wypadku, osiągało 90% wartości kontrolnych. Dla porównania, w doświadczeniach w których nie stosowano żadnych środków farmakologicznych obserwowano spadek do 73% wartości kontrolnych. Znaczne ograniczenie wpływu niedokrwienia na zewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w hipokampie przez APV podawany w infuzji obserwowali także Benveniste i wsp. (1988). Z kolei Greenberg i wsp. (1991) wykazali, że niekompetycyjny antagonist receptorów NMDA, MK-801 w 50% znosi wywołany przez niedokrwienie wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w korze.

Simon i wsp.(1984) w swoich pionierskich pracach po raz pierwszy stwierdzili, że farmakologiczna blokada receptorów NMDA w hipokampie szczura przez AP7, podawany lokalnie, spowodowała ograniczenie wywołanego przez niedokrwienie uszkodzenia neuronów w porównaniu z hipokampem do którego wstrzyknięto bufor. Podawanie systemowe AP7 zabezpieczało przed neuropatologicznymi zmianami wywołanymi u chomika mongolskiego przez

obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych (Boast i wsp., 1987). W ostatnich latach pojawiło się wiele mniej lub bardziej kontrowersyjnych doniesień na temat protekcyjnego działania antagonistów receptorów NMDA w niedokrwieniu, krytycznie omawianych w pracy Buchana (1990). W naszych badaniach obserwowaliśmy zmniejszenie wczesnych zaburzeń obrazu morfologicznego hipokampa po niedokrwieniu, ograniczone do okolicy sondy dializacyjnej przez którą podawano APV, oraz znacznie szybszy powrót aktywności elektrycznej w hipokampie (Salińska i wsp., 1991).

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy, w których w czasie niedokrwienia podawano zwierzętom APV, świadczą o pierwotnym i znaczącym udziale receptorów glutamatergicznych, specyficznych dla NMDA w wywołanym przez niedokrwienie przemieszczeniu jonów Ca^{2+} do wnętrza neuronów hipokampa. Wyniki te potwierdzają zarazem wniosek, że receptory NMDA i związane z nimi kanały wapniowe odgrywają ważną rolę w poniedokrwiennym uszkodzeniu neuronów. Nie ma jednak wątpliwości, że niedokrwienie mózgu i pobudzenie receptorów NMDA może prowadzić nie tylko do aktywacji kanałów NMDA, ale także różnego typu innych mechanizmów wnikania wapnia do neuronów. Mimo wykazania pierwotnej i złożonej roli receptorów kwasu glutaminowego wrażliwych na NMDA, wyniki doświadczeń ischemicznych nie dały więc jednoznacznej odpowiedzi na szereg kwestii szczegółowych, dotyczących roli poszczególnych typów naturalnych jonoforów wapniowych w wywołanym przez niedokrwienie przemieszczeniu wapnia do neuronów. Dlatego też w tej pracy wykonano badania, umożliwiające przybliżoną ocenę stopnia udziału różnego typu kanałów wapniowych w napływie jonów Ca^{2+} do neuronów hipokampa pod wpływem depolaryzacji i działania agonistów receptorów pobudzających neurotransmitterów aminokwasowych. W tym celu podawano zwierzętom bezpośrednio do hipokampa, przez sondę dializacyjną roztwór KCl w stężeniach

depolaryzujących oraz agonistów receptorów glutamatergicznych – NMDA i kwas kainowy.

Podawanie specyficznego agonisty receptorów glutamatergicznych – NMDA przez okres 20 minut powodowało szybki, głęboki spadek stężenia wapnia w hipokampie, który przy 2.5 mM stężeniu NMDA dwukrotnie przewyższał efekt niedokrwienia. Wyniki podobne do naszych, uzyskanych w doświadczeniach *in vivo*, uzyskali także inni autorzy w odmiennych układach doświadczalnych, zwłaszcza na skrawkach hipokampa *in vitro* (Andine i wsp., 1988). Marciani i wsp. (1982) stwierdzili, że pobudzenie receptorów NMDA w skrawkach hipokampa szczura wywoływało spadek zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} podobny do obserwowanego w niedokrwieniu.

Za specyficznością obserwowanego w tej pracy efektu NMDA przemawia jego zależność od stężenia agonisty oraz wrażliwość na substancje będące wybiórczymi antagonistami receptorów wrażliwych na NMDA – APV i MK 801. W badaniach innych autorów ketamina, która jest niekompetycyjnym antagonistą receptorów NMDA o działaniu zbliżonym do PCP, w modelu stymulacji elektrycznej neuronów mogącym symulować niektóre aspekty ischemicznego pobudzenia neuronów, hamowała spadek zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} (Andine i wsp., 1988).

Wszystkie przytoczone dane wskazują na to, że stymulacja receptorów kwasu glutaminowego wrażliwych na NMDA w hipokampie prowadzić może do zaburzeń homeostazy wapnia zbliżonych do obserwowanych w czasie niedokrwienia, a przy tym znacznie je przewyższających. Czy jednak kanały jonowe sprzężone z receptorami NMDA są jedynymi jonoforami wapniowymi aktywowanymi w warunkach nadmiernego pobudzenia receptorów NMDA? Siesjo i Bengtsson (1989) sugerują, że napływ jonów Ca^{2+} do neuronów wywołany przez aktywację receptorów NMDA podnosi jego stężenie wewnątrzkomórkowe do pewnego poziomu progowego, przy którym ulegają aktywacji nieselektywne

mechanizmy przepływu zarówno kationów (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+), jak i anionów (Cl^- , HCO_3^-). Rezultatem jest dodatkowy wypływ jonów K^+ , depolaryzacja i dalszy napływ jonów Ca^{2+} , Na^+ i Cl^- z osmotycznie niezbilansowaną wodą oraz wymiana $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ skierowana w stronę napływu Ca^{2+} do komórek. Do tych mechanizmów dołącza się też mobilizacja wapnia wewnątrzkomórkowego. Długotrwały wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w neuronach poddanych przewlekłemu lub powtarzanemu pobudzeniu wysokim stężeniem agonistów receptorów NMDA, utrzymujący się po usunięciu agonistów obserwowali także Manev i wsp. (1989, 1990) oraz Miller i wsp. (1990). W ten sposób stymulacja receptorów NMDA może pośrednio wywołać aktywację różnych, w tym także zależnych od potencjału kanałów wapniowych. Na ocenę, jaki jest udział kanałów wapniowych zależnych od potencjału w wywołanym przez stymulację receptorów NMDA napływie wapnia do neuronów, pozwoliły doświadczenia w których obok NMDA podawano zwierzętom nimodipinę. Podawanie nimodipiny dożylnie nie miało znamiennego wpływu na spadek poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w próbkach dializatu. Natomiast podawanie nimodipiny przez sondę dializacyjną, bezpośrednio do hipokampa spowodowało nieznaczne opóźnienie wywołanego przez NMDA spadku poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w próbkach dializatu i niewielkie zmniejszenie maksymalnego spadku w porównaniu z kontrolą zawierającą 0.1% etanol. Należy przy tym dodać, iż sam etanol działa blokująco na kanały sprzężone z receptorami NMDA (Dildy-Mayfield i wsp., 1991).

Jak podaje szereg autorów opierając się na wynikach doświadczeń elektrofizjologicznych, kanały jonowe sprzężone z receptorami aminokwasów pobudzających nie są wrażliwe na działanie blokerów z grupy dihydropirydyn. Wiadomo z literatury, że wywołane przez podawanie aminokwasów pobudzających pobieranie jonów Ca^{2+} do części dendrosomalnej neuronów jest niewrażliwe na nifedipinę (Riveros i Orrego, 1982), czy na nitredipinę (Kudo i Ogura, 1986). W niektórych pracach wcześniejsze podanie nimodipiny podwyższało raczej niż

obniżało toksyczność NMDA (Price i wsp., 1985). Można więc twierdzić, że blokery dihydropirydynowe mają niewielki wpływ na zmiany zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} wywołane przez aktywację kanałów sprzężonych z receptorami NMDA zarówno w doświadczeniach kontrolnych jak i w niedokrwieniu mózgu. Natomiast etanol w niewielkich stężeniach mających znaczenie farmakologiczne i toksykologiczne hamuje aktywność kanałów jonowych sprzężonych z receptorami aminokwasów pobudzających. Najsilniej blokowane są kanały związane z receptorami NMDA, a w mniejszym stopniu z receptorami KA i AMPA (Farooqui i Horrocks, 1991). Mechanizm w jaki etanol hamuje kanały jonowe sprzężone z receptorami NMDA nie jest dobrze poznany. Sugerowano, że działanie etanolu związane jest z upłynnieniem błon komórkowych, a kompleks receptor NMDA – kanał jonowy może być wrażliwy na zmiany płynności błon (Lovinger i wsp., 1989). Z drugiej strony etanol może oddziaływać na hydrofobowy rejon receptora NMDA lub białko regulujące jego działanie (Lovinger i wsp., 1989). Ostatnio szereg autorów donosi o możliwości oddziaływania etanolu na miejsce wiązania glicyny – pozytywnego modulatora działania receptora NMDA (Dildy-Mayfield i Leslie, 1991).

Nieznaczne zmniejszenie spadku zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} oraz przyspieszenie powrotu do poziomu kontrolnego obserwowane w prezentowanych w niniejszej pracy doświadczeniach kontrolnych, w których w czasie niedokrwienia podawano płyn KRB z 0.1% etanolem można więc wiązać z hamowaniem przez etanol receptora NMDA. Mac Millan (1988) badając EEG w czasie niedokrwienia przeprowadzanego na szczurach stwierdził, że podawanie przed niedokrwieniem umiarkowanych ilości etanolu powodowało przyspieszenie normalizacji zapisu EEG po niedokrwieniu. Dane te zgodne są z naszymi obserwacjami (Łazarewicz i wsp., 1989). Jest sprawą oczywistą, że przy interpretacji wyników doświadczeń w których związki farmakologicznie czynne rozpuszczone są w etanolu, należy uwzględnić hamujący wpływ alkoholu etylowego

na receptory NMDA. Obserwowane w prezentowanych w tej pracy doświadczeniach zmniejszenie spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia przez nimodipinę podawaną przez sondę dializacyjną w porównaniu do kontroli zawierającej 0.1% etanol może świadczyć o niewielkiej aktywacji pod wpływem depolaryzacji spowodowanej podaniem NMDA kanałów wapniowych zależnych od potencjału.

W celu przebadania dodatkowych mechanizmów wnikania jonów wapnia do neuronów pod wpływem stymulacji receptora NMDA podano amilorid – związek początkowo uważany za skutecznego inhibitora wymiany $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Schellenberg i wsp., 1983), który okazał się blokerem kanałów sodowych jednocześnie niespecyficznie hamującym wymianę sód – wapń. Obserwowane niewielkie zahamowanie spadku stężenia zewnątrzkomórkowego wapnia może sugerować, iż pod wpływem działania NMDA ulega zaburzeniu mechanizm wymiany sód – wapń i następuje odwrócenie kierunku wymiany. Jednakże, jak donosi wielu autorów, działanie amiloridu nie ogranicza się jedynie do hamowania wymiany sód – wapń. Biefeld i wsp. (1986) donoszą o zdolności amiloridu do blokowania kanałów wapniowych zależnych od potencjału, natomiast Manev i wsp. (1990) wykazali, że amilorid skutecznie blokuje kanały wapniowe sprzężone z receptorami kwasu glutaminowego. Nie jest więc wykluczone, że obserwowane hamujące działanie amiloridu na napływ wapnia pod wpływem stymulacji receptorów wrażliwych na NMDA jest wypadkową jego działania na więcej niż jeden mechanizm wnikania jonów Ca^{2+} do neuronów.

Obserwowany nadmierny wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego glutaminianu w hipokampie w czasie niedokrwienia może również powodować pobudzenie receptorów glutamatergicznych nie wrażliwych na NMDA, a pobudzanych przez kwas kainowy. Chociaż zgodnie ze starszymi wynikami badań elektrofizjologicznych, przyjmuje się, że receptory te związane są z kanałami jonowymi, przepuszczalnymi wyłącznie dla kationów jednowartościowych,

aktywacja tych kanałów może jednak pośrednio prowadzić do otwarcia kanałów wapniowych zależnych od depolaryzacji i przez zniesienie zależnego od potencjału bloku magnezowego ułatwiać aktywację kanałów sprzężonych z receptorami NMDA. Wywołana przez stymulację receptorów kwasu kainowego dekompartamentacja sodu oraz zaburzenia energetyczne mogą sprzyjać pobudzeniu napływu jonów wapnia do neuronów przez odwrócenie wymiany $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$. Do wyjaśnienia roli receptorów kwasu kainowego w obserwowanym spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika posłużyć mogą prezentowane w niniejszej pracy doświadczenia, w których zwierzętom podawano lokalnie, przez sondę dializacyjną 1 mM kwas kainowy. Podawanie 1 mM KA przez okres 20 minut wywoływało szybki spadek poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w próbkach dializatu, natomiast po zaprzestaniu podawania agonisty obserwowano powolny, ponad godzinny powrót do wartości kontrolnych. Efekt wywołany przez KA był hamowany przez DNQX, kompetycyjnego antagonistę receptorów nie-NMDA. Podobny efekt obserwowany był przez Korfa i Postema (1984) w badaniach przeprowadzanych na skrawkach mózgu, gdzie również stwierdzono wzmożenie przez KA napływu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ do neuronów w przeciągu 10 minut. Z kolei doświadczenia Heinemana na skrawkach hipokampa *in vitro* wykazały zróżnicowany wpływ kwasu kainowego na zewnątrzkomórkowe stężenia wapnia w różnych częściach hipokampa, wyrażający się niekiedy nawet wzrostem zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia.

Jak już wspomniano, mechanizm wpływu kwasu kainowego na homeostazę wapnia nie jest jasny. Wiadomo, że KA stymuluje uwalnianie Glu i Asp (Lehmann i Hansson, 1988; Johansen i Diemer, 1986) wzmagając pobudzenie receptorów glutamatergicznych, w tym receptorów NMDA. Spowodowany przez działanie KA przepływ jonów jednowartościowych i powstająca depolaryzacja mogłyby wywołać częściowe zniesienie naturalnego bloku magnezowego w kanałach wapniowych związanych z receptorami NMDA. Oba te zjawiska mogłyby poprzez

aktywację kanałów NMDA wtórnie przyczyniać się do obserwowanego spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia. Efekt taki, jeśli jest bezpośrednio zależny od stymulacji receptorów NMDA, powinien być hamowany przez podanie APV. W prezentowanych w tej pracy doświadczeniach nie zaobserwowano jednak hamującego wpływu APV na wywołany przez podawanie KA spadek poziomu zewnątrzkomórkowego $^{45}\text{Ca}^{2+}$, co sugeruje brak wtórnej aktywacji receptorów NMDA w tych warunkach doświadczalnych.

Innym mechanizmem mogącym sprzyjać przemieszczaniu wapnia do neuronów jest spowodowana przez KA depolaryzacja neuronów i aktywacja kanałów wapniowych zależnych od potencjału. Jak stwierdzono w tej pracy, podawanie obwodowe nimodipiny, blokera zależnych od potencjału kanałów wapniowych, nie hamowało wywołanego przez kwas kainowy spadku poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w próbkach perfuzatu. Natomiast nimodipina podawana bezpośrednio do hipokampa przez sondę dializacyjną zmniejszała spadek poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wywołany przez podawanie KA. Inhibicja ta obserwowana była w doświadczeniach w których kontrolę stanowił efekt KA na tle buforu z 0.1% etanolem. Trudne jest do wytłumaczenia, dlaczego w prezentowanych w tej pracy wynikach, etanol opóźniał powrót stężenia zewnątrzkomórkowego wapnia do poziomu wyjściowego. W większości prac autorzy donoszą o hamującym działaniu etanolu na kanały jonowe związane z receptorami KA (Lovinger i White, 1989; Gonzales, 1990). Jednakże uzyskane wyniki wskazują na możliwość niewielkiego udziału wrażliwych na dihydropirydyny kanałów wapniowych w mechanizmie wywołanego przez kwas kainowy napływu wapnia do neuronów hipokampa. Doświadczenia, w których obok KA podawano amilorid i jego pochodną 5-(N,N- dimetylo)amilorid, uważaną za związek o działaniu bardziej specyficznym na wymianę sód – wapń, a w których obserwowano skrócenie okresu spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, mogą wskazywać na ograniczony udział również tego mechanizmu w wywołanym przez kwas kainowy napływie wapnia. Należy jednak pamiętać o dyskutowanej

wcześniej niespecyficzności amiloridu i możliwości dodatkowego oddziaływania na kanały zależne od potencjału.

Wbrew wcześniejszym obserwacjom elektrofizjologicznym zapewniającymi o nieprzepuszczalności dla wapnia kanałów jonowych sprzężonych z receptorami kwasu kainowego, najnowsze dane wskazują na heterogenność receptorów KA w mózgu. Niektóre podtypy tych receptorów aktywują kanały o dużej przepuszczalności dla jonów wapnia (Ogura i wsp., 1992). Wydaje się więc, że obserwowany w tej pracy spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie spowodowany podawaniem kwasu kainowego można częściowo wyjaśnić aktywacją takich, przepuszczalnych dla wapnia kanałów jonowych. Pozostaje więc sprawą otwartą, jaki jest udział tego mechanizmu w wywołanym przez niedokrwienie napływie wapnia do komórek hipokampa, a także czy zjawisko to może zachodzić także w astrogleju, który jak wiadomo zawiera receptory KA (Lehmann i Hansson, 1988). Ostatnio wykazano, że podawanie specyficznych antagonistów receptorów nie-NMDA nawet po niedokrwieniu wywiera protekcyjne działanie, zapobiegając uszkodzeniu neuronów hipokampa (Sheardown i wsp., 1990). Nie jest jasne czy ochrona ta wiąże się z hamowaniem hipotetycznego, zależnego od receptorów nie-NMDA napływu wapnia do neuronów.

Wszystkie przeprowadzone w trakcie realizacji tej pracy doświadczenia z użyciem nimodipiny, mające na celu wykazanie stopnia udziału zależnych od depolaryzacji, wrażliwych na dihydropirydyny kanałów wapniowych w obserwowanych przemieszczeniach jonów wapnia w hipokampie w czasie ischemii i podczas podawania agonistów receptorów glutamatergicznych dały wynik wskazujący na ich niewielki udział w tych procesach. Może to świadczyć o niewielkiej, w porównaniu z kanałami NMDA, maksymalnej pojemności tego jonoforu wapniowego w hipokampie. Dla potwierdzenia tego wniosku konieczne było jednak stwierdzenie wpływu maksymalnej stymulacji zależnych od potencjału

kanałów wapniowych na zewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w hipokampie. Temu celowi służyły doświadczenia, w których podawano bezpośrednio do hipokampa przez sondę dializacyjną 120 mM KCl przez okres 20 minut. Jak wykazano wcześniej (Łazarewicz i wsp., 1986a), miejscowe podawanie KCl w płynie dializacyjnym prowadzi do zależnego od dawki obniżenia stężenia wapnia w hipokampie królika. Także w obecnych doświadczeniach podanie 120 mM KCl powodowało niewielkie w porównaniu z działaniem KA i NMDA, bo tylko 25%, obniżenie stężenia wapnia, które powracało do wartości kontrolnych już w 10 min. po zaprzestaniu podawania KCl. Nimodipina podawana obwodowo nie miała znaczącego wpływu na zmiany poziomu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wywołane przez podawanie 120 mM KCl. Miejscowe podawanie nimodipiny przez sondę dializacyjną powodowało nieznaczne tylko hamowanie spadku stężenia wapnia w hipokampie. Wyniki te nasunęły wątpliwości co do natury kanałów jonowych aktywowanych przez podawanie wysokich stężeń potasu. Co prawda brak wyraźnego wpływu nimodipiny można relatywizować w oparciu o dane Dunna (1988), który donosił, że hamowanie przez blokery z grupy dihydropirydyn zależy od stopnia depolaryzacji. W doświadczeniach przeprowadzanych na synaptosomach przy niewielkim stopniu depolaryzacji (podanie 10 – 25 mM KCl) pobieranie $^{45}\text{Ca}^{2+}$ było całkowicie hamowane przez nitredipinę. Przy całkowitej depolaryzacji wywołanej przez 150 mM KCl nitredipina w niewielkim tylko stopniu hamowała napływ wapnia do synaptosomów. Sugeruje to, iż przy relatywnie ujemnym potencjale kanały wapniowe zależne od potencjału aktywowane są w specyficzny sposób, natomiast przy całkowitej depolaryzacji uruchamiany jest dodatkowy, niewrażliwy na dihydropirydyny czynnik umożliwiający napływ jonów Ca^{2+} . Należy jednak zwrócić uwagę, że na skutek ograniczeń dyfuzji przez błonę półprzepuszczalną sondy oraz pobieranie zwrotne przez astroglę, rzeczywiste stężenie KCl w rejonie sondy dializacyjnej jest niewątpliwie znacznie mniejsze niż 120 mM.

Dalsze eksperymenty wykazały, że bardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem braku wyraźnego wpływu nimodipiny może być spowodowane przez depolaryzację uwolnienie neuroprzekazników aminokwasowych z zakończeń presynaptycznych i wtórne pobudzenie receptorów oraz otwarcie sprzężonych z nimi kanałów niewrażliwych na nimodipinę. O udziale kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami NMDA w wywołanym przez KCl spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie świadczy całkowite zniesienie tego efektu, a nawet wzrost stężenia $^{45}\text{Ca}^{2+}$ powyżej poziomu wyjściowego wywołany przez MK-801. Równoczesne podanie MK-801 oraz nimodipiny powodowało dodatkowy wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia o ok. 10%. Te wyniki świadczą, iż napływ wapnia do komórek hipokampa wywołany przez wysokie stężenia potasu ma złożony mechanizm, polegający głównie na wtórnej aktywacji receptorów i kanałów NMDA przez endogenne glutaminiany uwalniane w tych warunkach. Efekt polegający na otwarciu zależnych od potencjału kanałów wrażliwych na dihydropirydyny ma natomiast o wiele mniejszy wpływ na zmiany stężeń wapnia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hipokampa.

Należy wyjaśnić, iż obserwowany wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia ponad wartości kontrolne jest w oczywisty sposób wynikiem stwierdzonego zmniejszenia objętości przestrzeni zewnątrzkomórkowej przy równoczesnym zablokowaniu głównych dróg napływu wapnia do komórek. Jak wiadomo, nadmierna depolaryzacja oraz związane z nią zaburzenia przepływu jonów wiążą się z pęcznieniem komórek i zmniejszeniem przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Pociąga to za sobą zmiany stężenia substancji znajdujących się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Stwierdzono (Salińska, dane nie opublikowane), że w opisanych powyżej warunkach doświadczalnych przestrzeń zewnątrzkomórkowa zmniejsza się do ok. 30%, co należy uwzględnić przy interpretacji wyników doświadczeń z zastosowaniem wysokich stężeń KCl.

Wobec ograniczonej skuteczności KCl jako czynnika depolaryzującego komórki hipokampa w naszych doświadczeniach, konieczne było dostarczenie dodatkowych danych dotyczących udziału kanałów L wrażliwych na dihydropirydyny w napływie wapnia do neuronów hipokampa w sytuacjach patologicznych. Celem uzyskania maksymalnej stymulacji tych kanałów zastosowano agonistę należącego do grupy dihydropirydyn – Bay K 8644. Ponieważ związek ten jest aktywny jedynie w warunkach niewielkiej depolaryzacji, która aktywuje kanały L i zwiększa jego powinowactwo do miejsc wiążących (Marin, 1988), podano go wraz z 65 mM KCl. Podanie w takim układzie 10 uM MK-801 całkowicie hamowało spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, natomiast dodatkowe podanie 10 uM nimodipiny prowadziło do podwyższenia stężenia $^{45}\text{Ca}^{2+}$ w hipokampie. Można przyjąć, że 20% różnica w stężeniu zewnętrznego wapnia w hipokampie w tym układzie doświadczalnym w obecności i nieobecności nimodipiny, jest miarą wpływu maksymalnej stymulacji zależnych od depolaryzacji, wrażliwych na dihydropirydyny kanałów wapniowych L, na zmiany stężenia wapnia w zewnątrzkomórkowej przestrzeni hipokampa. Efekt ten jest nieporównanie mniejszy od 65% obniżenia stężenia wapnia przez 5 mM NMDA. Świadczy to o stosunkowo niewielkim, w porównaniu z aktywacją receptorów NMDA wpływie nawet maksymalnej stymulacji kanałów L na napływ wapnia do komórek hipokampa. Porównując te wyniki z wynikami doświadczeń ischemicznych, w których stosowano nimodipinę i APV, stwierdzić można zgodność obserwowanych efektów ich działania na napływ wapnia do neuronów kanałami zależnymi od potencjału i sprzężonymi z receptorami aminokwasów pobudzających. Prezentowane w tej pracy obserwacje korespondują z wynikami otrzymanymi przez Greenberga i wsp. (1991). Stwierdzili oni, iż MK-801 hamuje o ponad 50% wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w korze kota poddanego niedokrwieniu, natomiast równoczesne podanie MK-801 i nimodipiny niemal całkowicie hamowało ten wzrost. Różnice w stopniu oddziaływania MK-801 i

nimodipiny między doświadczeniami Greenberga i wsp. a prezentowanymi w tej pracy wynikają z różnic w ilości receptorów NMDA w korze i hipokampie, z przewagą tej ostatniej struktury.

Oceniając ogólnie aktywność poszczególnych dyskusowanych w tej pracy mechanizmów wnikania wapnia do neuronów, a przede wszystkim kanałów wapniowych sprzężonych z receptorami NMDA i zależnych od potencjału wrażliwych na dihydropirydyny, kanałów L w obserwowanych zmianach zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie, należy stwierdzić znaczną przewagę wpływu aktywacji receptorów glutamatergicznych, wrażliwych na NMDA, nad wpływem pobudzenia kanałów wapniowych L. Choć w czasie niedokrwienia są warunki do uruchomienia wielu znanych dróg napływu wapnia, jednak ich udział w przemieszczeniu wapnia do neuronów nie jest jednakowy. Stwierdzono silne hamowanie spadku zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie w czasie niedokrwienia przez APV, kompetycyjnego antagonistę receptorów NMDA oraz silnie wyrażone obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie w czasie stymulacji receptorów NMDA. Efekty te kontrastują ze znacznie słabszą skutecznością nimodipiny jako blokera przemieszczeń Ca^{2+} w czasie niedokrwienia i stosunkowo niewielkim wpływem aktywacji kanałów wapniowych typu L na zewnątrzkomórkowe stężenia wapnia. Wyniki te świadczą o decydującym znaczeniu kanałów jonowych sprzężonych z receptorami NMDA w hipokampie w napływie wapnia do neuronów w warunkach patologii niedokrwiennej mózgu. Udział zależnych od depolaryzacji kanałów wapniowych w napływie wapnia do neuronów hipokampa w czasie niedokrwienia wydaje się być znacznie mniejszy. Mimo to bloker tych kanałów, nimodipina wywiera wpływ ochronny przed skutkami niedokrwienia, hamując aktywność tych kanałów i dzięki innym korzystnym mechanizmom jej działania na mózg. Wydaje się więc, że oba typy kanałów wapniowych mogą być rozpatrywane jako cele w

które mogą być wymierzone zabiegi terapeutyczne zmierzające do ograniczenia uszkodzeń mózgu wywołanych przez niedokrwienie.

ucz

cia

6. WNIOSKI

- Blokada farmakologiczna receptorów NMDA w hipokampie królika silnie hamuje wywołany przez całkowite niedokrwienie mózgowia spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia, podczas gdy miejscowo podawana nimodipina, bloker zależnych od potencjału kanałów L słabo hamowała ten efekt, a hamujący wpływ nimodipiny podawanej dożylnie można wiązać z innymi mechanizmami jej działania *in vivo*.
- Spadek zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika wywołany przez maksymalną stymulację receptorów NMDA znacznie przewyższa efekt wywołany przez maksymalne pobudzenie zależnych od potencjału kanałów L.
- Obniżenie zewnątrzkomórkowego stężenia wapnia w hipokampie królika wywołane przez stymulację receptorów NMDA jest głównie spowodowane aktywacją sprzężonych z nimi kanałów jonowych, podczas gdy podobne efekty zachodzące pod wpływem stymulacji receptorów kwasu kainowego lub depolaryzacji mają złożony mechanizm.
- Obserwacje te upoważniają do stwierdzenia, że w warunkach ekstremalnych, takich jak niedokrwienie mózgowia, prowadzących do maksymalnego pobudzenia różnorodnych endogennych jonoforów wapniowych, kanały jonowe sprzężone z receptorami NMDA stanowią główną drogę napływu wapnia do neuronów hipokampa. Udział zależnych od potencjału kanałów L jest w tej strukturze mózgu znacznie słabiej wyrażony.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abdel-Latif A.A. (1986) Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and generation of second messengers. *Pharmacol.Rev.* 38(3):227-272.
2. Alansen A.J. (1977) Extracellular potassium concentration in juvenile and adult rat brain cortex during anoxia. *Acta Physiol.Scand.* 99:412-420.
3. Ames A.III, Wright R.L., Kowada M., Thurston M.J., Majno G. (1968) Cerebral ischemia: II The no reflow phenomenon. *Am.J.Pathol.* 52:437-453.
4. Andine P., Jacobson J., Hagberg H. (1988) Calcium uptake evoked by electrical stimulation is enhanced postschemically and precedes delayed neuronal death in CA1 of rat hippocampus: Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *J.Cereb.Blood Flow Metabol.*8(6):799-807.
5. Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer N.H., (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J.Neurochem.* 43:1369-1374.
6. Benveniste H., Jorgensen M.B., Diemer N.H., Hansen A.J., (1988) Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia. *Acta Neurol.Scand.* 78:529-536.
7. Berdichevsky E., Riveris N., Sanchez-Armass S., Orrego F. (1983) Kainate, N-methyl-D-aspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro. *Neurosci. Lett.* 36:75-80.
8. Bes A. (1984) Cerebral ischemia - the clinical problem. W *Cerebral Ischemia*. Red. Bes A., Braquet P., Paoletti R., Sjesjo B.. Elsevier Publishers B.V., str. 1-5.

9. Biefeld D.R., Hadley R.W., Vassilev P.M., Hume J.R., (1986) Membrane electrical properties of vesicular $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors in single atrial myocytes. *Circulat.Res.* 59:381-389.
10. Bito L., Davson H., Levin E., Murray M., Snider M. (1966) The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain and blood plasma of the dog. *J.Neurochem.* 13:1057.
11. Blaustein M.P. (1974) The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol.Biochem.Pharmacol.* 70:35-82.
12. Boast C.A., Gerhardt S.C., Janak P. (1987) Systemic AP7 reduces ischemic brain damage in gerbils. *W Excitatory Amino Acids Transmission. Red. Hicks T.P., Lodge D., McLennan H., Liss New York, str. 249-252*
13. Boulu R.G., Guenian C., Plochine M., Sofeir M. (1981) Recovery from global cerebral ischemia in rabbit: influence of indomethacin. *Eur.Neurol.* 20:230-234.
14. Boyd R.J., Connolly J.E. (1962) Total cerebral ischemia in dog. *Arch.Surg.* 84:72-76.
15. Buchan A.M. (1990) Do NMDA antagonists protect against cerebral ischemia: are clinical trials warranted? *Cerebrovascular and Brain Metabol. Rev.* 2:1-26.
16. Canton H., Colpaert F., Lehman J. (1989) Polyamine activity of NMDA effector requires occupation by agonists of both glycine and NMDA sites. *W Abstracts 19th Annual Meeting Society for Neuroscience, str 326.*
17. Choi D.W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J.Neurosci.* 7:369-379.
18. Choi D.W. (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *TINS* 11:465-469,
19. Cotman C.W., Iversen L.L. (1987) Excitatory amino acids in the brain - focus on NMDA receptors". *TINS* 10:263-265.

20. Cotman C.W., Monaghan D.T., Ottersen O.P., Mathisen J.S., (1987) Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *TINS* 10:273-280.
21. Crumrine R.C., LaManna J.C. (1990) Protein kinase C activity in rat brain cortex. *J.Neurochem.* 55(3):826-831.
22. Delgado J.M.R., DeFerdis F.V., Roth R.H., Ryugo D.K., Mitruka B.M. (1972) Diallytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch.Int. Pharmacodyn.* 198:9-21.
23. Dildy-Mayfield J.E., Leslie S.W. (1991) Mechanism of inhibition of N-methyl-D-aspartate - stimulated increases in free intracellular Ca^{2+} concentration by ethanol. *J.Neurochem.* 56(5):1536-1543.
24. Domańska-Janik K., Zalewska T. (1992) Effect of brain ischemia on protein kinase C. *J.Neurochem.* 58:1432-1439.
25. Drejer J., Benveniste H., Diemar N.H., Schousboe A., (1985) Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *J.Neurochem.*
26. Dunn S.M. (1988) Multiple calcium channels in synaptosomes: Voltage dependence of 1,4-dihydropyridine binding and effects on function. *Biochemistry* 27:5275-5281.
27. Fagg G.E., Foster A.C. (1983) Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neurosci.* 9:701-719.
28. Farago A., Nishizuka Y. (1990) Protein kinase C in transmembrane signaling. *FEBS Lett.* 268(2):350-354.
29. Farooqui A.A., Horrocks L.A. (1991) Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res.Rev.* 16:171-191.
30. Fleckenstein A. (1985) A history of calcium antagonists. *Circ.Res.* 52:I-3 - I-16.

31. Fonnum F. (1984) Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42(1):1-11.
32. Forsman M., Fleisher J.E., Milde J., Steen P.A., Michenfelder J.D. (1986) The effects of nimodipine on cerebral blood flow and metabolism. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.* 6:763-767.
33. Gaddum J.H. (1961) Push - pull cannulae. *J. Physiol.* 155:1P-2P.
34. Goldberg N.D., Passoneau J.V., Lowry O.H. (1966) Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.* 241:3997-4003.
35. Gonzalez R. (1990) NMDA receptors excite alcohol researech. *TiPS* 11:137-139.
36. Greenberg J.H., Uematsu D., Avaki N. (1991) Changes in intracellular free calcium during cerebral ischemia and effects of nimodipine on calcium and histological damage. W Nimodipine: Pharmacological and clinical results in cerebral ischemia. Red. Scriabine A., Teasdale G.M., Tettenborn D., Young W., Springer-Verlag, str. 9-24.
37. Gulati A., Nath C., Shanker K., Dhevan K.N., Bhorgava K.P. (1982) Fluorescein spectrophotofluorometry: a sensitive quantitative method for evaluating the blood - brain barrier. *Pharmacol. Res. Commun.* 14:649-661.
38. Hagberg H., Lehmann A., Hamberger A. (1984) Inhibition by verapamil of ischemic Ca^{2+} uptake in the rabbit hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4:297-300.
39. Hagberg H., Lehmann A., Sandberg M., Nystrom B., Jacobson I., Hamberger A. (1985) Ischemia - induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 5:413-419.
40. Hamberger A., Berthold C.H., Jacobson I., Karlsson B., Lehmann A., Nystrom B., Sondberg M. (1985) In vivo brain dialysis of extracellular

neurotransmitter and putitative neurotransmitter amino acids. W In vivo perfusion and release of neuroactive substances: methods and strategies. Red. Bayon A., Drucker – Colin R., Academic Press, New York, str. 119–139.

41. Hamberger A., Berthold C.H., Karlsson B., Lehmann A., Nystrom B. (1983) Extracellular GABA, glutamate and glutamine in vivo perfusion–dialysis of the rabbit hippocampus. W Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system. Red. Hartz, Kramme, McGeer, Scousboe. New York, A.L.Liss Inc. str. 473–492.

42. Hamberger A., Jacobson I., Molin S-0., Nystrom B., Sandberg M., Ungerstedt U. (1982) Metabolic and transmitter compartments for glutamate. Neurotransmitter Interaction and Compartmentation. Red. Bradford HF. New York, Plenum Press, str. 359–378.

43. Hansen A.J. (1979) Brain extracellular ions in ischemia and spreading depression. Acta Physiol.Scand. suppl. 473:581.

44. Hansen A.J., Mutch W.A.C. (1984) Water and ion fluxes in cerebral ischemia. W Cerebral Ischemia. Red. Bes A., Braquet P., Paoletti R., Sjesjo B., Elsevier Science Pub., B.V., str. 121–130.

45. Hansen A.J., Olsen C.E. (1980) Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. Acta Physiol.Scand. 108:355–365.

46. Hansen A.J., Zeuthen T. (1981) Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. Acta Physiol.Scand. 113:437–445.

47. Harris R.J., Symon L., Branston N.M., Bayhanm M. (1981) Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. J.Cereb.Blood Flow Metabol. 1:203–209.

48. Heinemann U., Igelmund P., Jones R.S.G., Kohr G., Walther H. (1988) Effects of organic calcium–entry blockers on stimulus–induced changes in extracellular calcium concentration in area CA1 of rat hippocampal slices. W The

Calcium Channel: Structure, Function and Implications. Red. Morad M., Nayler W., Kazda S., Schramm M., Springer-Verlag, Berlin, str. 528-540

49. Hollerhage H.G., Goab M.R., Zumkeller M., Walter G.F., (1988) The influence of nimodipine on cerebral blood flow autoregulation and blood-brain barrier. *J. Neurosurg.* 69:919-922.

50. Hossman K.A., Sahaki S., Zimmerman V. (1977) Cation activities in reversible ischemia of the cat brain. *Stroke* 8:77-81.

51. Hossman K.A., Zimmermann V. (1974) Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.* 81:59-74.

52. Hossmann K.A., Paschen W., Csiba L. (1983) Relationships between calcium accumulation and recovery of cat brain after prolonged cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metabol.* 3:346-353.

53. Johansen F.F., Diemer N.H. (1986) Influence of the plasma glucose level on brain damage after systemic kainic acid injection in the rat. *Acta Neuropath.* 71:46-54.

54. Jorgensen M.B, Diemer N.H. (1982) Selective neuron loss after cerebral ischemia in rat: possible role of transmitter glutamate. *Acta Neurol.Scand.* 66:536-546.

55. Kamp T.J., Miller R.J. (1987) Voltage - sensitive calcium channels and calcium antagonists. *ISI Atlas of Science: Pharmacology Vol.1:133-138.*

56. Kawakami S., Hossman K.A. (1977) Electrophysiological recovery after compression ischemia of the rat brain. *J.Neurol.* 217:31-42.

57. Kemp J.A., Foster A.C., Wong E.H.F. (1987) Non-competitive antagonists of excitatory amino acid receptors. *TINS* 10 (7):296-298.

58. Klatzo I. (1979) Cerebral oedema and ischemia. In *Recent advances in Neuropathol.* Red. Smith W.T., Cavanagh J.I., str. 27-39.

59. Klatzo I. (1987) Blood-brain barrier and ischemic brain oedema. *Z.Kardiol.* 76 sup.4, str 67-69.
60. Kolata R.I. (1979) Survival of rabbits after prolonged cerebral ischemia. *Stroke* 10:272.
61. Korf J., Postema F. (1984) Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J.Neurochem.* 43(4):1052-1060.
62. Kramer R.S., Sanders A.P., Lesage A.M., Woodhall B., Sealy W.C. (1968) The effect of profound hypothermia on preservation of cerebral ATP content during circulatory arrest. *J.Tharoc.Cardiovasc.Surg.* 56:699-709.
63. Kudo Y., Ogura A. (1986) Glutamate induced increase in intracellular Ca^{2+} concentration in isolated hippocampal neurons. *Br.J.Pharmacol.* 89:191-198.
64. Kuroiwa T., Ting P., Martinez H., Klatzo I. (1985) The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropath.* 68:122-129.
65. Lehmann A. (1987) Studies on excitotoxicity: with special reference to amino acids in epilepsy. University of Goteborg, Goteborg.
66. Lehmann A., Łazarewicz J.W., Zeisse M. (1985) N-methylaspartate - evoked liberation of taurine and phosphoethanolamine in vivo: site of release. *Neurochem.* 45:1172-1177.
67. Lehmann A., Hansson E. (1988) Kainate-induced stimulation of amino acid release from primary astroglial cultures of the rat hippocampus. *Neurochem.Int.* 13(4):557-561.
68. Lehmann A., Isacson H., Hamberger A. (1983) Effect of in vivo administration of kainic acid in the hippocampus. *J.Neurochem.* 40:1314-1320.
69. Lehmann A., Hagberg H., Nystrom B., Sondberg M., Hamberger A. (1985) In vivo regulation of extracellular taurine and other neuroactive amino acids in the rabbit hippocampus. W Taurine: Biological actions and clinical perspectives. Red. Oje S.S., Alan R., Liss Inc., New York.

70. Lemasters J.J., DiGuseppi J., Nieminen A.L., Herman B. (1987) Blebbing, free Ca^{2+} and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325:78-81.
71. Lindroth P., Mopper K. (1979) High - performance liquid chromatographic determination with o-phtaldialdehyde. *Anal.Chem.* 51:1667-1674.
72. Ljunggren B., Schutz H., Siesjo B.K. (1974) Changes in energy state and acid-base parameters of rat brain during complete compression ischemia. *Brain Res.* 73:277-289.
73. Lovinger D.M., White G., Weight F.F. (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243:1721-1724.
74. Lowry O.H., Passoneau J.V., Hasselberg F.X., Schulz D.W., (1964) Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J.Biol.Chem.* 239:18-30.
75. Lucas D.R., Newhouse J.P. (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Ann.Am.Ophtalmol.* 58:193-200.
76. Łazarewicz J.W., Majewska M.D., Wróblewski J.T. (1978) Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. W Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension. Red. Mossakowski M.J., Zelman I.B., Kroh H., *Pol.Med.Publ., Warszawa, str.* 79-86.
77. Łazarewicz J.W., Hagberg H., Hamberger A. (1986 a) Extracellular calcium in the hippocampus of unanesthetized rabbits monitored with dialysis - perfusion. *J.Neurosci.Methods* 15:317-328.
78. Łazarewicz J.W., Lehmann A., Hagberg H., Hamberger A., (1986 b) Effects of kainic acid on brain calcium fluxes studied in vivo and in vitro. *J.Neurochem.* 46:494-498.

79. Łazarewicz J.W., Pluta R., Salińska E., Puka M. (1989) Beneficial effects of nimodipine on metabolic and functional disturbances in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. *Stroke* 20:70-77.
80. Łazarewicz J.W., Wróblewski J.T., Costa E. (1990) N-methyl-aspartate - sensitive glutamate receptors induce calcium - mediate arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 55(6):1875-1881.
81. Mabe H., Nagai H., Takagi T., Umemura S., Ohno M. (1986) Effect of nimodipine on cerebral functional and metabolic recovery following ischemia in the rat brain. *Stroke* 17(3):501-505.
82. Mac Millan V. (1988) Influence of ethanol on the energy metabolism of ischemic and postischemic brain. *J.Cereb.Blood Flow Metabol.* 8:335-340.
83. MacIntosh F.C., Oborin P.E. (1953) Release of acetylcholine from cerebral cortex. *Proc. XIX Int. Congr. Physiol.*, str. 580-581.
84. Manev H., Bertolino M., DeErasquin G. (1990) Amiloride blocks glutamate-operated cation channels and protect neurons in culture from glutamate-induced death. *Neuropharm.* 29(12):1103-1110.
85. Manev H., Favaron M., Bertolino M., Brooker G., Guidotti A., Costa E. (1990) Importance of sustained protein kinase C translocation and destabilization of Ca^{2+} homeostasis in glutamate-induced neuronal death. *W Neurotoxicity of Excitatory Amino Acids. Red. Guidotti A., New York, Raven Press*, str. 63-78.
86. Manev H., Favaron M., Guidotti A., Costa E. (1989) Delayed increase of Ca^{2+} influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol.Pharmacol.* 36:106-112.
87. Marciani M.G., Louvel J., Heinemann U. (1982) Aspartate-induced changes in extracellular free calcium in "in vitro" hippocampal slices of cats. *Brain Res.* 238:272-277.

88. Marcum J.M., Dedman J.R., Brinkley B.R., Means A.R., (1978) Control of microtubule assembly–dissassembly by calcium dependent regulator protein. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 75:3771.
89. Marin J. (1988) Vascular effects of calcium antagonists. Uses in some cerebrovascular disorders. *Gen.Pharmac.* 19(3):295–306.
90. Meyer F.B. (1989) Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res.Rev.* 14:227–243.
91. Michenfelder J.D., Theye R.A. (1970) The effects of anesthesia and hypothermia on canine cerebral ATP and lactate during anoxia produced by decapitation. *Anesthesiology* 33:430–439.
92. Miller R.J., Abele A.E., Glaum S.R., Scholz K.P., Scholz W.K. (1990) Pharmacological aspects of NMDA mediated neuronal death in vitro. *W Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Ed. Krieglstein J., Oberpichler H., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, str. 227–238.
93. Morel N., Godfraind T. (1989) Pharmacological properties of voltage–dependent calcium channels in functional microvessels isolated from rat brain. *Naunyn–Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* 340:442–451.
94. Myers R.E. (1979) A unitary theory of causation of anoxic and hipoxic brain pathology. *Advance in Neurol.* 26:195–213.
95. Myers R.E. (1979) Lactic acid accumulation as cause of brain edema and cerebral necrosis resulting from oxygen deprivation. *W Advances in Perinatal Neurology*. Ed. Korobkin and K., Guilleminault G., Spectrum, N.Y., str. 85–114.
96. Neely W.A., Youmans J.R. (1963) Anoxia of canine brain without danger. *JAMA* 183:1085–1087.
97. Nicholson C. (1980) Measurement of extracellular ions in the brain. *Trends in Neurosci.* 3:216–218.
98. Nowycky M.C., Fox A.P., Tsien R.W. (1985) Three types of neuronal calcium currents with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440–443.

99. Ogura A., Nakazawa M., Kudo Y. (1992) Further evidence for calcium permeability of non-NMDA receptor channels in hippocampal neurons. *Neurosci.Res.* 12(5):606-616.
100. Olney J.W. (1969) Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with sodium glutamate. *Science* 164:719-721.
101. Olney J.W., Ho O.C., Rhee V. (1971) Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp.Brain Res.* 14: 61-76.
102. Olney J.W., Collins R.C., Sloviter R.S. (1986) Excitotoxic mechanism of epileptic brain damage. *Adv.Neurol.* 44:857-877.
103. Olney J.W. (1987) Neurotoxicity of excitatory amino acids. W Kainate as a tool in neurobiology. Red. McGeer E.G., Olney J.W., McGeer P.L., New York, Raven Press 1978, str. 95-121.
104. Peters T. (1986) Calcium in physiological and pathological cell function. *Eur.Neurol.* 25 supp.1:27-44.
105. Pluta R. (1982) Badanie możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska, str. 22-24.
106. Pluta R. (1986) The influence of prostacyclin on the recovery of bioelectric cerebral activity after complete ischemia. *Acta.Neurol.Scand.* 73:44-54.
107. Pluta R., Salińska E., Puka M., Stafiej A., Łazarewicz J.W. (1988) Early changes in extracellular amino acids and calcium concentrations in rabbit hippocampus following complete 15-min cerebral ischemia. *Resuscitation* 16:193-210.
108. Price M.T., Olney J.W., Samson L., Labruyere J. (1985) Calcium influx accompanies but does not cause excitotoxin-induced neuronal necrosis in retina. *Brain Res.Bull.* 14:369-376.

109. Riveros N., Orrego F. (1982) N-methyl-D-aspartate - activated calcium channels in rat brain cortex slices. Effect of calcium channel blockers and of inhibitory and depressant substances. *Neurosci.* 17:541-546.

110. Rothman S.M., Olney J.W. (1987) Excitotoxicity and the NMDA receptors. *TINS* 10:299-302.

111. Sainio K. (1972) Ischemic cerebral damage and EEG in the rabbit. Thesis, University of Helsinki, str. 75.

112. Salińska E., Pluta R., Puka M., Łazarewicz J.W. (1991) Blockade of N-methyl-D-aspartate - sensitive excitatory amino acid receptors with 2-amino-5-phosphonovalerate reduces ischemia-evoked calcium redistribution in rabbit hippocampus. *Exp.Neurol.* 112:89-94.

113. Sanchez-Prieto J., Gonzalez P. (1988) Occurrence of a large Ca^{2+} - independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptosomes). *J.Neurochem.* 50(4):1322-1324.

114. Schellenberg G.D., Anderson L., Swanson P.D. (1983) Inhibition of $Na^+ - Ca^{2+}$ exchange in rat brain by amiloride. *Molec. Pharmac.* 24:251-258.

115. Schlaepfer W.W., Zimmerman U.J.P., Micko S. (1981) Neurofilament proteolysis in rat peripheral nerve. Homologies with calcium activated proteolysis of other tissues. *Cell Calcium* 2:235.

116. Scott R.H., Pearson H.A., Dolphin A. (1991) Aspects of vertebrate neuronal voltage-activated calcium currents and their regulation. *Progress in Neurobiol.* 36:485-520.

117. Sheardown M.J., Hansen A.J., Eskesen K., Suzdak P., Diemer N.H., Honore T. (1990) Blockade of AMPA receptors in the CA1 region of the hippocampus prevents ischemia induced cell death. *W Pharmacology of Cerebral Ischemia*, Red. Krieglstein J., Oberpichler H., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Gmbh, Stuttgart, str. 245-253.

118. Siesjo B.K. (1978) Brain energy metabolism. MRC Cerebral Metabolism Group, Research Department University Hospital, Lund, Sweden; John Wiley And Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, str.454-456.

119. Siesjo B.K. (1981) Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J.Cerebr.Blood Flow Metabol.* 1:155-185.

120. Siesjo B.K., Bengtsson F. (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia. Hypoglycemia and spreading depression: A unifying hypothesis. *J.Cerebr.Blood Flow Metabol.* 9(7): 127-140.

121. Siesjo B.K., Ljunggren B. (1973) Cerebral energy reserves after prolonged hypoxia and ischemia. *Arch.Neurol.* 29:400-407.

122. Siesjo B.K., Wieloch T. (1985 a) Brain ischemia and cellular calcium homeostasis. W *Calcium Entry Blockers and Tissue Protection*. Red. Goldfrain T., Vanhoutte P.M., Govoni S., Paoletti R., Raven Press, N.Y., str. 139-149.

123. Siesjo B.K., Wieloch T. (1985 b) Molecular mechanism of ischemic brain damage: Ca^{2+} -related events. W *Cerebro-vascular Diseases*. Red. Plum E., Pulsinelli W., Raven Press, New York, str. 187-197.

124. Simon R.P., Swan J.H., Griffiths T., Meldrum B.S. (1984) Blocade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect agonist ischemic damage in the brain. *Science* 226:850-852.

125. Spielmeyer W. (1925) Zur Pathogenese ortlich electiven Gehirnerkrankungen. *Zeitsch. f. die Neurol. und Psychiat.* 9:756-776.

126. Stumpo R.J., Goldstein J.M., Britt M., Salama A.I. (1989) Polyamines enhance NMDA receptor function in Vitri and in vivo. W *Abstracts 19th Annual Meeting Society for Neuroscience*, str. 201.

127. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba Y., Wagner H. (1985) Microphysiology of selectively vulnerable neurons. W *Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage*. Red. Kogure K., Hossmann K.A., Siesjo B.K., Welsh F.A., Elsevier, Amsterdam, str. 59-68.

128. Suzuki R., Yamaguchi T., Ivino T., Ouzi F., Klatzo I., (1983) The effects of 5-minute ischemia in mongolian gerbils: I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropathol.* 60:207-216.
129. Takahashi K., Wakamori M., Akaike N. (1989) Hippocampal CA1 pyramidal cells of rats have four voltage-dependant calcium conductances. *Neurosci.Lett.* 104:229-234.
130. Thayer S.A., Fairhurst A.S. (1983) The interaction of dihydropyridine calcium channels blockers with calmodulin and calmodulin inhibitors. *Mob.Pharmacol.* 24:6-9.
131. Tossman U., Eriksson S., Devin A., Hagenfeldt L., Low D., Ungerstedt U. (1983) Brain amino acids measured by intracerebral dialysis in portocaval shunted animals. *J.Neurochem.* 14:1046-1051.
132. Tsien R.W., Hess P., McCleskey E.W., Rosenberg R.L., (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation and block. *Ann.Rev.Biophys. Biophys.Chem.* 16:265-290.
133. Ungerstedt U., Herrera - Marschitz M., Jungenns U., Stahle L., Tossman U., Zetterstrom T. (1982) Dopamine synaptic mechanisms reflected in studies combining behavioural recordings and brain dialysis. W Kohsaka M. i wsp. *Dopamine Research* 37:219-231.
134. van Harreveld A. (1970) A mechanism for fluid shifts specific for the central nervous system. *Top Probl. Psychiatry Neurol.* 10:62-70.
135. Vogt C., Vogt O. (1937) Sitz und Wesen der Krankheiten im lichte der topistischen Hirnforschung und des Varllerens der Tiere. *J. f. Psychol. u. Neurol.* 47:237-457.
136. Watkins J.C., Olverman H.J. (1987) Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *TINS* 10(7):265-272.

137. White B.C., Gadziński D.S., Hoehrer P.J., Krome C., Hoehner T., Trombley J.H. (1982) Effect of flunarizine on canine cerebral cortical blood flow and vascular resistance post cardiac arrest. *Ann. Emerg. Med.* 11:119-126.
138. Wieloch T., Siesjo B.K. (1982) Ischemic brain injury: The importance of calcium, lipolytic activity and free fatty acids. *Pathologie Biologie* 30:269-277.
139. Yamaguchi T., Klatzo I. (1984) Maturation of cell damage following transient ischemia in gerbil. *Cerebral Ischemia*, Elsevier Science Publishers B.V., str. 13-24.
140. Zanotto L., Heinemann U. (1983) Aspartate and glutamate induced reduction in extracellular free calcium and sodium concentration in area CA1 of in vitro hippocampal slices of rats. *Neurosci. Lett.* 35:79-84.