

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, ROMAN GADAMSKI

WPLYW PROSTACYKLINY PGI<sub>2</sub> I INDOMETACYN  
NA NIEDOKRWIENNE USZKODZENIE SEKTORA CA<sub>1</sub>  
ROGU AMONA U CHOMIKÓW MONGOLSKICH

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Obustronne krótkotrwałe (5—7,5 min) podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych prowadzi u chomików mongolskich do wybiórczego uszkodzenia neuronów piramidowych rogu Amona, ujawniającego się z kilkudniowym opóźnieniem w stosunku do incydentu niedokrwienego (Suzuki i wsp. 1983a). W poprzednich badaniach wykazano, że zjawisku temu zapobiega lub je skutecznie ogranicza podanie indometacyny, stanowiącej znany inhibitor cyklooksygenazy, enzymu katalizującego syntezę prostaglandyn różnych klas (Mossakowski, Gadamski 1985). Prostaglandynom, a przynajmniej niektórym ich grupom, gromadzącym się w ośrodkowym układzie nerwowym, w następstwie jego niedokrwienia (Gaudet i wsp. 1980; Moskowicz, Coughlin 1981; Iannotti i wsp. 1981; Bhakoo i wsp. 1982) przypisuje się działanie uszkadzające tkankę nerwową na drodze ich wpływu na układ naczyniowy mózgu oraz bezpośredniego efektu destabilizującego błony komórkowe, a także sprzyjania powstawaniu zakrzepów naczyniowych. W tych warunkach zastosowanie indometacyny ograniczającej syntezę prostaglandyn może wywierać skuteczny wpływ osłaniający tkankę nerwową. Na istnienie takiego jej oddziaływania wskazują liczne doświadczenia w przypadku niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego (Furlow, Hallenbeck 1978; Moskowicz, Coughlin 1981; Bhakoo i wsp. 1982; Kärögström i wsp. 1983; Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984).

Z drugiej strony wykazano, że podobny efekt osłaniający wywiera prostacyklina PGI<sub>2</sub> zastosowana w zespołach niedokrwienych mózgu zarówno u ludzi (Gryglewski i wsp. 1983), jak i u zwierząt doświadczalnych (Gaudet, Levin 1979; Hallenbeck, Furlow 1979; Hallenbeck i wsp. 1980; Iannotti i wsp. 1981; Nokolov i wsp. 1982; Awad i wsp. 1983;



Pluta 1986). Źródłem korzystnego działania prostacykliny w tych warunkach doszukuje się w jej wpływie wazodylatacyjnym (Dusting i wsp. 1979; Boullin i wsp. 1979; Jarman i wsp. 1979; Abdel-Halim i wsp. 1980) oraz antyagregacyjnym (Moncada i wsp. 1976; Gryglewski i wsp. 1978). Równocześnie szereg autorów zwraca uwagę na jej bezpośredni wpływ cytoprotekcyjny zarówno w stosunku do tkanki nerwowej, jak i szeregu innych narządów i tkanek (Ogletree i wsp. 1979; Lefer i wsp. 1979; Araki, Lefer 1980; Stachura, Kałuża 1982; Renkawek i wsp. 1986a). Awad i wsp. (1983) z kolei podkreślają jej korzystne oddziaływanie na mechanizmy bariery krew—mózg.

Skloniło to do podjęcia próby oceny wpływu prostacykliny  $\text{PGI}_2$  na rozwój niedokrwiennych uszkodzeń neuronów sektora  $\text{CA}_1$  rogu Amona, rozwijających się w następstwie krótkotrwałego podwiązania tętnic szyjnych u chomika mongolskiego. Krótki okres półtrwania prostacykliny sugerował równoległe zastosowanie jej syntetycznego analogu, pozbawionego tej niekorzystnej właściwości. Spostrzeżenia dotyczące zależności działania indometacyny od sposobu jej podawania podyktowały dodatkową serię doświadczeń z jej zastosowaniem.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na chomikach mongolskich (*Meriones unguiculatus*), dorosłych samicach, o masie ciała około 75 g. Niedokrwienie mózgu wywoływano w narkozie wziewnej (2% narkotan w układzie otwartym w mieszaninie gazowej składającej się z 70% azotu i 30% tlenu) przez obustronne zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych przy użyciu klipsów Heifetza na okres 7,5 min. Po zabiegu zwierzęta pozostawiano w warunkach hodowlanych na okres 5 dni.

Badania obejmowały 3 grupy doświadczalne różniące się między sobą zastosowanym środkiem osłaniającym.

Grupę I stanowiło 14 zwierząt, którym podawano prostacyklinę  $\text{PGI}_2$  (Welcome Research Laboratories, UK) w dawce 2 mg/kg/min w postaci ciąglego wlewu do żyły dostopowej przy użyciu pompy infuzyjnej f-my ZAD „Medipan”. Zróżnicowanie czasu stosowania wlewu w stosunku do niedokrwienia mózgu, przy stałej dawce i łącznym czasie trwania wlewu, było podstawą do wydzielenia dwóch podgrup doświadczalnych. W podgrupie A, obejmującej 8 zwierząt, stosowanie leku rozpoczynano w 3 min przed zaciśnięciem tętnic szyjnych prowadząc je przez okres niedokrwienia i przez 30 min po jego zakończeniu. W podgrupie B (6 zwierząt) dożylny wlew leku zaczynano po upływie 1 godz. od uwolnienia tętnic szyjnych, a okres jego trwania podobnie jak poprzednio wynosił 40 min. Pełna podana dawka leku przypadająca na 1 zwierzę wynosiła 6  $\mu\text{g}$ . Zawarta ona była w 1,9 ml buforu TRIS o pH 9,0. Dla zapewnienia trwałości  $\text{PGI}_2$ , jej roztwór końcowy przygotowywany z roztworu wyjścio-



wego przetrzymywany był na lodzie, podobnie lodem obłożona była strzykawka pompy infuzyjnej przez cały czas trwania wlewu. W celu przeciwdziałania efektowi hipotensyjnemu prostacykliny, stwierdzone-  
mu w badaniach Pluty (1985), jej wlew poprzedzano na 5 min dootrzew-  
nową iniekcją Isuprelu w dawce 0,1 mg na zwierzę. Postępowanie to nie  
uchroniło jednak przed wysoką śmiertelnością zwierząt. W podgrupie A  
padły 4 zwierzęta z ogólnej liczby 8. Padały one zazwyczaj w 3—4 min  
niedokrwienia. W podgrupie B na 6 zwierząt padło tylko jedno, co mieści  
się w granicach przeciętnej doświadczenia.

Grupę II stanowiło 15 zwierząt, którym zamiast prostacykliny PGI<sub>2</sub>  
podawano jej syntetyczny analog — Iloprost (Schering AG West Ger-  
many), wyróżniający się przedłużonym okresem połowicznego rozpadu.  
W zależności od czasu podania leku w stosunku do niedokrwienia móz-  
gu wyróżniono 3 podgrupy doświadczalne po 5 zwierząt każda.

W podgrupie A Iloprost podawano bezpośrednio przed zaciśnięciem  
tętnic szyjnych wspólnych, w podgrupie B w 15 min po uwolnieniu za-  
cisku, a w podgrupie C po upływie 1 godz. od zakończenia niedokrwie-  
nia. W każdej podgrupie dawka leku, podawanego w iniekcji do żyły  
dostopowej, wynosiła 200 µg/kg masy ciała. Spośród 15 zwierząt tej  
grupy 1 padło w okresie niedokrwienia.

Grupa III obejmowała 8 zwierząt, które w różnym czasie po niedo-  
krwieniu otrzymywały dootrzewnowo iniekcję indometacyny (Merck-  
-Sharp and Dohme Res. Lab., USA) w dawce 8,0 mg/kg masy ciała.  
Sposób przygotowania leku opisano w poprzedniej pracy (Mossakowski,  
Gadamski 1985). W grupie tej również wydzielono 2 podgrupy, po 4 zwie-  
rzęta w każdej. W podgrupie A lek podawano jednorazowo po upływie  
1 godz. od zdjęcia zacisku z naczyń tętniczych, podczas gdy w podgru-  
pię B zastosowano jego uzupełniające podanie po 5 godz. od zakończenia  
niedokrwienia.

Grupę kontrolną stanowiło 7 chomików mongolskich, u których w spo-  
sób identyczny jak w grupach doświadczalnych wywoływano 7,5 min  
niedokrwienie mózgu bez żadnej osłony lekowej. Otrzymywały one na-  
tomiasz podobnie jak zwierzęta grupy I i III, odpowiednio dootrzewnową  
iniekcję płynu Krebsa-Ringera lub dożylny wlew buforu TRIS o pH 0,9,  
wychłodzonego na lodzie. Jedno zwierzę z grupy kontrolnej padło w cza-  
sie niedokrwienia mózgu.

Grupę odniesienia stanowiły 3 zwierzęta nie poddane żadnym zabie-  
gom doświadczalnym.

Zwierzęta grup doświadczalnych i kontrolnej usypiano po upływie  
5 dni od niedokrwienia przy zastosowaniu przezsercowej perfuzji 10%  
roztworem zbuforowanej formaliny. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszki  
pozostawiano na okres 5 dni w roztworze perfuzyjnym. Następnie kro-  
jono je w płaszczyźnie czołowej na bloki grubości 5 mm. Blok tkankowy  
zawierający w pełni rozwinięty hipokamp grzbietowy przeprowadzano



w sposób rutynowy do parafiny. Skrawki parafinowe o wystandaryzowanej grubości 10  $\mu\text{m}$  barwiono według metody Klüvera-Barrery.

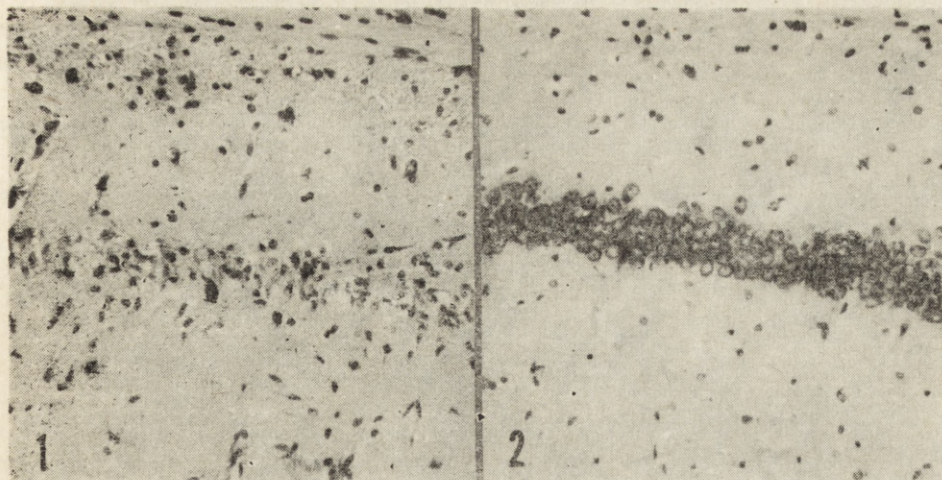
Dla ilościowej charakterystyki zmian w sektorze CA<sub>1</sub> rogu Amona wykonano analogicznie jak w poprzedniej pracy (Mossakowski, Gadamski 1985) badania morfometryczne. Przeprowadzono je za pomocą rutynowej siatki morfometrycznej w oparciu o obliczenie liczby komórek piramidowych w powtarzalnych 0,3 mm odcinkach sektora CA<sub>1</sub> na 5 kolejnych skrawkach. Uśrednioną liczbę neuronów przypadającą na pojedynczy 0,3 mm odcinek sektora CA<sub>1</sub> u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, wynoszącą  $44,7 \pm 2,5$  uznano za 100%. Do niej odnoszono zmiany ilościowe stwierdzone u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych. Znamienność statystyczną obliczano przy użyciu testu T dla średnich niezależnych. W oparciu o powyższe obliczenia wyodrębniono 3 kategorie obrazu morfologicznego sektora CA<sub>1</sub> u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych: niezmienny oraz całkowity lub częściowy ubytek komórek piramidowych. W przypadku pierwszym — liczba neuronów odpowiadała ich liczbie u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, w drugim — komórki piramidowe nie występowały w ogóle lub ich liczba nie przekraczała 2—5 na całym obszarze sektora CA<sub>1</sub>. Zróżnicowanie stopnia zmniejszenia liczby neuronów w grupie określonej jako „ubytek częściowy” wymagało dalszych uściśleń liczbowych. Wyodrębniono trzy stopnie ubytków: nieznaczny (I°), gdy uśredniona liczba komórek zachowanych w 0,3 mm odcinku sektora CA<sub>1</sub> wynosiła  $33,0 \pm 4,7$  (83,8%), umiarkowany (II°) i znaczny (III°), gdy zachowane neurony mieściły się odpowiednio w granicach  $23,6 \pm 4,1$  (52,7%) oraz  $15,7 \pm 4,3$  (35,2%). Różnice pomiędzy poszczególnymi stopniami wykazywały wysoką znamienność statystyczną.

## WYNIKI

### *Zwierzęta kontrolne*

Spśród 7 zwierząt kontrolnych, poddanych 7,5 min niedokrwieniu mózgu, przeżyło 6. W połowie przypadków, tj. u 3 zwierząt po 5 dniowym przeżyciu, stwierdzono całkowity zanik komórek piramidowych sektora CA<sub>1</sub>. Jego blaszka wypełniona była proliferującymi komórkami gleju gwiaździstego, wśród których widoczne były pojedyncze obkurczone, ciemne neurony (ryc. 1). W 1 przypadku obraz morfologiczny sektora CA<sub>1</sub> był całkowicie niezmienny (ryc. 2). Z dwóch przypadków zakwalifikowanych do grupy z ubytkami częściowymi, w 1 odpowiadały one pierwszemu, a w drugim — trzeciemu stopniowi zmian. Podsumowując 7,5 min niedokrwienie mózgu prowadziło w dwu trzecich przypadków do ciężkich uszkodzeń neuronów sektora CA<sub>1</sub>, w jednej trzeciej zmiany nie występowały lub miały nieznaczne nasilenie.





Ryc. 1. Zwierzę kontrolne. Całkowity zanik neuronów sektora CA<sub>1</sub>, z warstwowym rozplemem gleju gwiaździstego. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

Fig. 1. Control animal. Total neuronal loss of sector CA<sub>1</sub> neurons, with laminary glial proliferation. Cresyl violet. ×100

Ryc. 2. Zwierzę kontrolne. Niezmieniona populacja komórek nerwowych sektora CA<sub>1</sub>. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

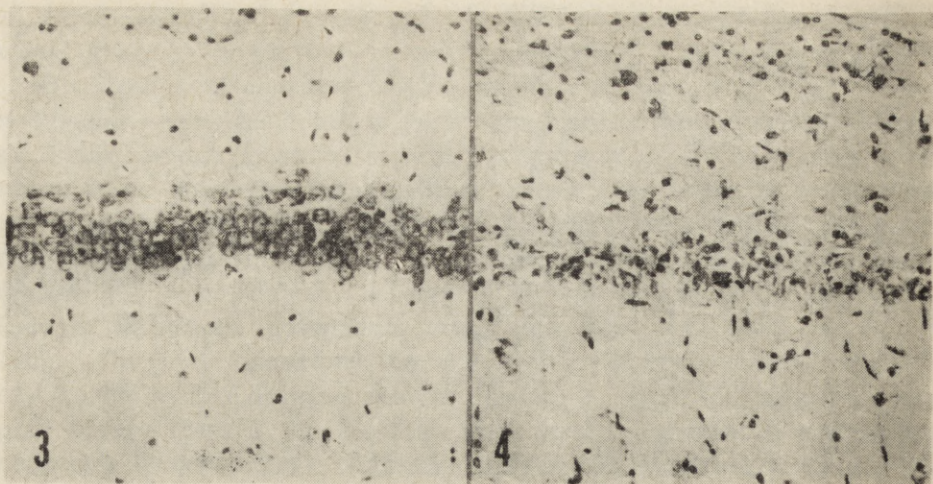
Fig. 2. Control animal. Unchanged neuronal population of sector CA<sub>1</sub>. Cresyl violet. ×100

### Zwierzęta doświadczalne

Grupa doświadczalna I. Z ogólnej liczby 9 zwierząt, które przeżyły 7,5 min niedokrwienie skojarzone z podawaniem prostacykliny PGI<sub>2</sub>, brak uszkodzeń neuronów sektora CA<sub>1</sub> stwierdzono w 5 przypadkach, a ich całkowity zanik w 4. Występowały tu jednak zasadnicze różnice między obydwoma podgrupami. W podgrupie A, w której podawanie prostacykliny rozpoczynano przed podwiązaniem tętnic szyjnych, z ogólnej liczby 8 zwierząt 4 padły w czasie niedokrwienia mózgu. Na tę właśnie podgrupę przypada również większość przypadków (3 na 4 zwierzęta) z całkowitym zanikiem komórek piramidowych sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona. W podgrupie B, w której dożylny wlew prostacykliny rozpoczynano po upływie 1 godz. od niedokrwienia, w czasie doświadczenia padło 1 zwierzę, a obraz neuropatologiczny sektora CA<sub>1</sub> przedstawiał całkowicie odwrotne proporcje zmian niż w podgrupie A. U 4 spośród 5 zwierząt nie stwierdzono w ogóle jego nieprawidłowości (ryc. 3), a tylko u 1 występował całkowity ubytek neuronów (ryc. 4).

Grupa doświadczalna II. Z ogólnej liczby 15 zwierząt w czasie doświadczenia padło 1. Spośród 14 zachowanych przy życiu tylko u 2 nie stwierdzono ubytków komórek piramidowych. Wśród pozostałych u 8 zmiany miały charakter ubytku całkowitego, a u 4 częściowego, mieszczącego się w grupie zmian umiarkowanych i znacznych. Jedynie





Ryc. 3. Zwierzę doświadczalne, grupa I. Nieuszkodzone komórki piramidowe sektora CA<sub>1</sub>. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

Fig. 3. Experimental animal, group I. Normally preserved sector CA<sub>1</sub> neurons. Cresyl violet. ×100

Ryc. 4. Zwierzę doświadczalne, grupa I. Całkowity zanik komórek piramidowych sektora CA<sub>1</sub>. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

Fig. 4. Experimental animal, group I. Neuronal loss in sector CA<sub>1</sub> of Ammon's horn. Cresyl violet. ×100

w podgrupie A, przy podaniu analogu prostacykliny w momencie zakończenia niedokrwienia, u 2 zwierząt stwierdzono pełne utrzymanie populacji komórek nerwowych sektora CA<sub>1</sub>. U pozostałych 3 występowały ubytki bądź całkowite, bądź częściowe, o znacznym nasileniu. W podgrupie B, w której lek stosowano w 15 min po zdjęciu zacisków z tętnic szyjnych, w żadnym przypadku nie występowały niezmiennione komórki piramidowe. U 2 zwierząt występował ich pełny zanik, a u 2 znacznego stopnia ubytki. W podgrupie C, przy podaniu Iloprostsu po upływie 1 godz. od niedokrwienia, aż u 4 zwierząt wystąpił całkowity zanik neuronów sektora CA<sub>1</sub>, a u 1 ubytki komórkowe umiarkowanego stopnia.

Grupa doświadczalna III. Z ogólnej liczby 8 zwierząt wszystkie przeżyły doświadczenie. Tylko w 1 przypadku stwierdzono całkowity zanik komórek nerwowych sektora CA<sub>1</sub>, a w 4 jego obraz morfologiczny nie różnił się od obserwowanego u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. W 3 przypadkach z częściowym zanikiem komórek nerwowych, w 1 miał on charakter nieznaczny, a w 2 umiarkowany. Stwierdzono przy tym wyraźne różnice obrazu morfologicznego w zależności od sposobu podawania indometacyny. W podgrupie A przy jednorazowej dawce leku mieściło się jedno zwierzę z całkowitym zanikiem komórek piramidowych oraz 2 z częściowym uszkodzeniem sektora CA<sub>1</sub>. Przy powtórny podaniu leku zastosowanym w podgrupie B u 3 zwierząt populacja nerwowa sektora CA<sub>1</sub> była całkowicie zachowa-



na, a u jednego chomika stwierdzone częściowe ubytki komórek miały charakter nieznaczny.

Zestawienie liczbowe uzyskanych wyników przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie liczbowe wyników uzyskanych w grupie kontrolnej i w grupach doświadczalnych

Table 1. Quantitative data of morphological results in untreated and treated animals

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt Number of animals	Brak zmian morfologicznych No morphological changes	Częściowy zanik neuronów Partial neuronal loss			Całkowity zanik neuronów Total neuronal loss
			I°	II°	III°	
Grupa kontrolna Control group	6	1	1	—	1	3
Grupa doświadczalna I Experimental group I	9	5	—	—	—	4
Podgrupa A Subgroup A	4	1	—	—	—	3
Podgrupa B Subgroup B	5	4	—	—	—	1
Grupa doświadczalna II Experimental group II	14	2	—	2	2	8
Podgrupa A Subgroup A	5	2	—	—	1	2
Podgrupa B Subgroup B	4	—	—	1	1	2
Podgrupa C Subgroup C	5	—	—	1	—	4
Grupa doświadczalna III Experimental group III	8	4	1	2	—	1
Podgrupa A Subgroup A	4	1	—	2	—	1
Podgrupa B Subgroup B	4	3	1	—	—	—

#### OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowany wpływ zastosowanych środków osłaniających na zjawisko dojrzewania procesu patologicznego po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu, wyrażające się opóźnionym wybiórczym uszkodzeniem neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona. Zwraca przy tym uwagę fakt, że zróżnicowanie to dotyczy nie tylko rodzaju leku, lecz również schematu jego podawania.

Najkorzystniejszy efekt uzyskano przy zastosowaniu indometacyny stanowiącej silny inhibitor cyklooksigenazy, uruchamiającej proces syntezy różnych klas prostaglandyn z gromadzącego się w tkance kwasu



arachidonowego (Abdel-Halim i wsp. 1978). W grupie tej na 8 zwierząt tylko u 1 wystąpił całkowity zanik komórek nerwowych sektora CA<sub>1</sub>, a zmiany obserwowane w 3 dalszych przypadkach mieściły się w kategoriach uszkodzeń nieznacznych i umiarkowanych. Zaznaczyła się tu również zależność efektu osłaniającego indometacyny od sposobu jej podawania. Najskuteczniejsze okazało się dwukrotne zastosowanie leku w odstępach pięciogodzinnych. Przy tym schemacie doświadczenia nieznaczne nieprawidłowości komórkowe wystąpiły tylko u 1 zwierzęcia z całej grupy. Fakt ten wydaje się zrozumiały w świetle 6-godzinnego okresu półtrwania leku. Podobną zależność stwierdzono w badaniach nad wpływem indometacyny na zaburzenia mikrokrążenia i dynamikę strukturalnych uszkodzeń tkanki nerwowej w następstwie niedokrwienia mózgu (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984). Porównanie obecnie przedstawionych wyników z danymi poprzednich badań (Mossakowski, Gadamski 1985) wskazuje, że w zastosowanym modelu doświadczalnym osłaniający wpływ indometacyny był skuteczniejszy przy jej opóźnionym podaniu po niedokrwieniu. Zastosowanie leku w pierwszej godzinie po przywróceniu krążenia mózgowego dawało bowiem efekt gorszy niż przy jego użyciu w trzeciej godzinie. Spostrzeżenie to, jakkolwiek bardziej obiecujące z punktu widzenia możliwych implikacji klinicznych, jest sprzeczne z obserwacjami innych autorów, którzy podkreślają konieczność podawania indometacyny w okresie poprzedzającym zatrzymanie krążenia mózgowego (Furlow, Hallenbeck 1978; Hallenbeck, Furlow 1979; Iannotti i wsp. 1981; Kärgröm i wsp. 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984). Wydaje się, że różnica ta może wynikać przede wszystkim z odmienności modeli doświadczalnych. Badania wymienionych wyżej autorów prowadzono w warunkach ciężkiego, długotrwałego niedokrwienia mózgu, charakteryzującego się szybko postępującymi uszkodzeniami tkankowymi rozwijającymi się w krótkim czasie po przywróceniu krążenia krwi. Dla uzyskania efektu osłaniającego leku niezbędne było osiągnięcie jego terapeutycznego stężenia już w momencie restytucji mózgowego przepływu krwi. W zastosowanym przez nas doświadczalnym niedokrwieniu mózgu, mieszczącym się w granicach odwracalności zmian tkankowych, wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> jest procesem powolnym, ujawniającym się po upływie 5 dni i poprzedzonym ich wzmożoną aktywnością bioelektryczną, która przypada w pierwszej dobie po niedokrwieniu (Suzuki i wsp. 1983b). W tych warunkach dla osiągnięcia efektu osłaniającego niezbędne wydaje się wydłużenie czasu działania podawanego leku. Mechanizm osłaniającego wpływu indometacyny w niedokrwieniu mózgu nie jest jednoznacznie wyjaśniony. Znaczna liczba autorów (Crochard i wsp. 1980; Iannotti i wsp. 1981; Bhakoo i wsp. 1982; Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984) postuluje jej działanie cytoprotekcyjne, związane z zapobieganiem



destabilizacji błon komórkowych, być może poprzez antagonistyczne oddziaływanie w stosunku do fosfolipazy A<sub>2</sub>, aktywizującej się w czasie niedokrwienia (Jesse, Franson 1979), lub ograniczenie przepuszczalności błon komórkowych dla jonów wapnia (Volpi i wsp. 1980). W szczególności ta ostatnia hipoteza zasługuje na uwagę w świetle nowych poglądów na mechanizm niedokrwiennych uszkodzeń komórek nerwowych. Według Klatzo (1985) w stosowanym przez nas modelu doświadczalnym uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> może być w większym stopniu następstwem ich poischemicznej hiperaktywności niż samego niedokrwienia. Koncepcja ta znajduje potwierdzenie w doświadczeniach wskazujących na osłaniającą rolę antagonistów A<sub>1</sub> receptorów glutaminianowych w stosunku do hipoksyjnych i niedokrwiennych uszkodzeń rogu Amona (Rothman 1984; Simon i wsp. 1984). Wiadomo zaś, że komórki hipokampa posiadają bogatą pobudzającą inercję glutaminergiczną, pochodzącą między innymi z kolaterali Schaffera. Wzmoczone wyładowania komórek nerwowych rogu Amona, obserwowane po restytucji krążenia mózgowego (Suzuki i wsp. 1983b), wiążą się ze wzmożonym napływem jonów wapnia (Meldrum 1981), prowadzącym do ich ciężkiego uszkodzenia. Przeciwdziałanie temu zjawisku przez indometacynę może być jednym z czynników ochraniających neurony.

Wyniki podawania prostacykliny PGI<sub>2</sub> okazały się mniej jednoznaczne. W grupie, w której jej infuzję rozpoczynano przed zatrzymaniem krążenia mózgowego, były one mniej korzystne niż w materiale kontrolnym. Wyrażało się to z jednej strony wysokim odsetkiem zwierząt, które padały w czasie doświadczenia, z drugiej zaś znaczną proporcją ciężkich uszkodzeń neuronów sektora CA<sub>1</sub> (w 3 przypadkach na ogólną liczbę 4 zwierząt — całkowity zanik komórek nerwowych). Przypominało to obserwacje Pluty (1986) w warunkach całkowitego niedokrwienia mózgu u królików, który niekorzystny efekt kliniczny wiązał ze znacznym hipotensyjnym działaniem prostacykliny PGI<sub>2</sub> (Armstrong i wsp. 1978; Fitzpatric i wsp. 1978). Za hipotezą tą przemawia fakt, iż dla zapewnienia przeżywalności zwierząt okazało się niezbędne i skuteczne podawanie środków podtrzymujących układowe ciśnienie krwi. Niekorzystny efekt stwierdzony w badaniach morfologicznych mógl w tych warunkach być wyrazem sumowania się wpływu hipoksji hipowolemicznej i miejscowego niedokrwienia, podobnie jak ma to miejsce w hipoksyjno-niedokrwienym modelu Levine'a (1960).

Przesunięcie infuzji prostacykliny na okres bezpośrednio po przywróceniu krążenia mózgowego pozwoliło na uzyskanie jej skutecznego efektu osłaniającego. Tylko u 1 zwierzęcia na 5 badanych stwierdzono całkowity zanik neuronów sektora CA<sub>1</sub>, u pozostałych był on w ogóle nie uszkodzony.

Mechanizm korzystnego działania prostacykliny PGI<sub>2</sub> w warunkach zastosowanego doświadczalnego modelu niedokrwienia mózgu, podobnie



jak w przypadku indometacyny, jest nie wyjaśniony. W rachubę wchodzić mogą wszystkie, wspomniane we wstępie, drogi jej oddziaływania. Wobec nie stwierdzenia w analogicznych warunkach doświadczalnych, a nawet w przypadku bardziej długotrwałego niedokrwienia mózgu, zmian zakrzepowych w naczyniach (Mossakowski, Gajkowska 1984), najmniej istotny wydaje się mechanizm jej działania antyagregacyjnego. Nie można natomiast pominąć jej funkcji wazoaktywnej. Podanie prostacykliny bezpośrednio po udrożnieniu tętnic szyjnych wewnętrznych, w okresie gwałtownie zwiększonego przepływu mózgowego (Kapuściński, Mossakowski 1983), mogło skutecznie chronić przed jego niekorzystnym wpływem na stan bariery krew—mózg, dzięki jej działaniu hipotensyjnemu. Nagły wzrost przepływu mózgowego po niedokrwieniu jest według Klatzo (1985) jednym z czynników odpowiedzialnych za uszkodzenia tkankowe mózgu. W przeciwdziałaniu mu można zapewne szukać korzystnego wpływu prostacykliny na mechanizmy barierowe (Awad i wsp. 1983). Należy również pamiętać, iż zaburzenia mikrokrążenia mózgowego w następstwie niedokrwienia są zjawiskiem utrzymującym się przez okres co najmniej kilkunastu godzin (Mossakowski 1978).

Powolny rozwój uszkodzeń strukturalnych oraz ich wybiórczy i topograficznie ograniczony charakter skłaniają do przypuszczenia, iż osłabiający efekt prostacykliny w stosowanych warunkach miał w pierwszej kolejności mechanizm cytoprotekcyjny, być może, podobnie jak w przypadku indometacyny, związany z jej przeciwdziałaniem transportowi wapnia przez błony cytoplazmatyczne (Volpi i wsp. 1980). Warto odnotować również fakt, iż Herbaczyńska-Cedro i Gordon-Majsak (1985) wykazały hamowanie procesów peroksydacyjnych w niedokrwieniu mięśnia sercowego. Udziału tego czynnika nie można również wykluczyć w niedokrwionym mózgu.

Całkowicie nieskuteczne natomiast okazało się stosowanie Illoprostu — syntetycznego analogu prostacykliny. Potwierdza to wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące braku jego wpływu na hipoksyjne uszkodzenia tkanki nerwowej w hodowli pozaustrojowej (Renkawek i wsp. 1986b), a także negatywne obserwacje kliniczne Pohla i wsp. (1985).

#### ВЛИЯНИЕ ПРОСТАЦИКЛИНА PGI<sub>2</sub> И ИНДОМЕТАЦИНА НА ИШЕМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕКТОРА СА<sub>1</sub> РОГА АМОНА У МОНГОЛЬСКИХ ХОМЯКОВ

##### Резюме

Оценено обволакивающее действие простациклина и индометацина на развитие выбранных селективных повреждений нейронов сектора СА<sub>1</sub> рога Амона, возникающих в результате кратковременной ишемии у монгольских хомяков.

Опытные животные в разное время по отношению к 7,5 минутной ишемии получали постоянную одиночную или двойную, в случае индометацина, дозу лекарства. У контроль-



ных животных вызывали идентичную ишемию мозга без употребления лекарств. Животных убивали в 5 дней после ишемии с помощью транскардиальной перфузии 10% формалина. Парафиновые срезы мозга стандартной толщины 10 мкм окрашивались мет. Клювер-Барреры. Степень повреждения нейронов сектора CA<sub>1</sub> оценилась морфометрическим путем, сравнивая полученные результаты с данными полученными у животных не поданных никаким экспериментальным процедурам.

Установлено, что как простациклин, так и индометацин оказывали обволакивающее действие. Зависело оно, однако, от времени подачи лекарства по отношению к ишемии мозга. Был он гораздо более выраженным при подаче простациклина в период поишемической реперфузии, а в случае индометацина — при его двукратной подаче после восстановления мозгового кровообращения. Синтетический аналог простациклина не оказывал цитопротекционного действия.

Выдвинуто предположение, что обволакивающий эффект как простациклина так и индометацина связан с их непосредственным цитопротективным действием, зависящим от ограничения доклеточного транспорта ионов кальция или же от противодействия свободно-радикальным реакциям.

#### INFLUENCE OF PROSTACYCLIN PGI<sub>2</sub> AND INDOMETHACIN ON ISCHEMIC DAMAGE OF CA<sub>1</sub> SECTOR OF AMMON'S HORN IN MONGOLIAN GERBILS.

##### Summary

Protective effect of prostacyclin PGI<sub>2</sub>, its synthetic analogue — Iloprost and indomethacin, a well known inhibitor of cyclooxygenase on the development of selective damage of Ammon's horn CA<sub>1</sub>, neurons, resulting from short-term forbrain ischemia in Mongolian gerbils was evaluated.

Animals were given constant, single or double in case of indomethacin dose of the drug in different periods of pre- and postischemic stage of the experiments. Control animals were subjected to identical brain ischemia without medication. Treated and nontreated animals were sacrificed 5 days after brain ischemia by transcardiac perfusion with 10% neutral formalin. Paraffin brain sections, 10 μm thick were stained according to Klüver's method. CA<sub>1</sub> sector lesions were evaluated morphometrically in reference to those obtained in animals not subjected to any experimental procedure.

It was stated that both prostacyclin PGI<sub>2</sub> and indomethacin exert protective effect strongly dependent upon the time of drug application in relation to the ischemic incident. The protective effect was stronger when prostacyclin was applied during early reperfusion stage, and indomethacin was given in double dose after release of carotid arteries. Synthetic prostacyclin analogue did not show any protective effect.

It is supposed that preventic effects of both prostacyclin and indomethacin may be connected with their direct cytoprotective action related either to inhibition of intracellular calcium transport or to counteraction of free radicals reactions.

##### PIŚMIENNICTWO

1. Abdel-Halim M. S., Lunden G., Ånggard E.: Prostaglandin profiles in nervous tissue and blood vessels of the brain of various animals. *Prostaglandins*, 1980, 10, 249—258.



2. Abdel-Halim M. S., Sjoquist B., Ånggard E.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis in rat brain. *Pharmacol. Toxicol.*, 1978, 43, 266—272.
3. Araki H., Lefer A. M.: Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am. J. Physiol.*, 1980, 238, H176—181.
4. Armstrong J. M., Lattimer N., Moncada S., Vane J. R.: Comparison of the vasodepressor effects of prostacyclin and 6-oxo-prostaglandin F<sub>1</sub> with those of prostaglandin E<sub>2</sub> in rats and rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, 1978, 62, 125—130.
5. Awad I., Little J. R., Skrinska V., Slugg R., Lesser R. P.: Modification of focal cerebral ischemia by prostacyclin and indomethacin. *J. Neurosurg.*, 1983, 58, 714—719.
6. Bhakoo K. K., Lascelles P. T., Crockard H. A., Avery S. F.: Brain prostaglandins and cerebral edema following temporary vascular occlusion in gerbils. *V. Intern. Conf. Prostaglandins. Florence, May 18—21.1982. Abstracts p. 706.*
7. Boullin D. J., Bunting S., Blaso W. P., Hunt T. M., Moncada S.: Response of human and baboon arteries to prostaglandin endoperoxides and biologically generated and synthetic prostacyclin; their relevance to arterial cerebral spasm in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1979, 7, 139—147.
8. Crockard H. A., Iannotti F., Hunstock A. H., Smith R. D., Harris R. J., Symon L.: Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in gerbil. *Stroke*, 1980, 11, 494—498.
9. Dusting G. J., Moncada S., Vane J. R.: Prostaglandins, their intermediates and precursors: Cardiovascular actions and regulatory roles in normal and abnormal circulatory systems. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 1979, 21, 405—430.
10. Fitzpatrick T. M., Alter I., Corey E. J., Ramwell P. W., Rose J. C., Kob P. A.: Cardiovascular responses to PGI<sub>2</sub> (prostacyclin) in the dog. *Circul. Res.*, 1978, 42, 192—194.
11. Furlow T. W., Hallenbeck J. M.: Indomethacin prevents impaired perfusion of the dog brain after global ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 591—594.
12. Gaudet R. J., Alam I., Levine L.: Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 653—658.
13. Gaudet R. J., Levine L.: Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 86, 393—401.
14. Gryglewski R. J., Nowak S., Kostka-Trąbka E., Kuśmiderski J., Dembińska-Kieć A., Bieroń K., Basista M., Błaszczuk B.: Treatment of ischemic stroke with prostacyclin. *Stroke*, 1983, 14, 197—202.
15. Gryglewski R. J., Szczeklik A., Nizankowski R.: Antiplatelet action of intravenous infusion of prostacyclin in man. *Thromb. Res.*, 1978, 13, 153—163.
16. Hallenbeck J. M., Furlow T. W. Jr.: Prostaglandin I<sub>2</sub> and indomethacin prevent impairment of postischemic brain reperfusion in the dog. *Stroke*, 1979, 10, 629—637.
17. Hallenbeck J. M., Lestch D. R., Dutka A. J., Greenbaum L. J., McKee A. E.: Prostaglandin I<sub>2</sub>, indomethacin and heparin promote postischemic neuronal recovery in dogs. *Ann. Neurol.*, 1980, 12, 145—156.
18. Herbaczyńska-Cedro K., Gordon-Majszak W.: Attenuation by prostacyclin of adrenaline-stimulated lipid peroxidation in the myocardium. 1985 (in press).
19. Iannotti F., Crockard A., Ladds S., Symon L.: Are prostaglandins involved in experimental cerebral ischemia in gerbils. *Stroke*, 1981, 12, 301—306.
20. Jarman D. A., Du Boulay G. H., Kendall B., Boullin D. J.: Response of baboon cerebral and extracerebral arteries to prostacyclin and prostaglandin endoperoxide *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1979, 42, 677—686.



21. Jesse R. L., Franson R. C.: Modulation of purified phospholipase A<sub>2</sub> activity from human platelets by calcium and indomethacin. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1979, 375, 467-470.
22. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observations after 30 min bilateral ligation of the common carotid artery. *Advances in the Biosciences*, 43. *Stroke: Animal Models*. Red. V. Stefanovich. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt 1983, pp. 63-82.
23. Kärgröm E., Smith M. L., Wallstedt L., Siesjö B.: Cyclo-oxygenase inhibition by indomethacin and recirculation following cerebral ischemia. *Acta physiol. Scand.*, 1983, 118, 193-201.
24. Klatzo I.: Some of the pathophysiological aspects of cerebral ischemia. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17-19 October 1985. *Abstr.* p. 16.
25. Lefer A. M., Sollott S. L., Galvin M. J.: Beneficial action of prostacyclin in traumatic shock. *Prostaglandins*, 1979, 17, 761-767.
26. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Path.*, 1960, 36, 1-17.
27. Meldrum B. S.: *Metabolic Disorders of the Nervous System*. Red. F. C. Rose. Pitman, London 1981, pp. 175-187.
28. Moncada S., Gryglewski R. J., Bunting S., Vane J. R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 1976, 263, 663-665.
29. Moskowitz M. A., Coughlin S. R.: Clinical application of prostaglandins and their inhibitors. *Stroke*, 1981, 12, 882-886.
30. Mossakowski M. J.: Cerebral circulatory disturbances in various types of hypoxic conditions. *W: Advances in Neurology* Red. J. Cervos-Navarro. Raven Press, New York 1978, 20, 161-171.
31. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ indometacyny na niedokrwienie uszkodzenia sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 493-506.
32. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 347-365.
33. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia mózgu u chomika mongolskiego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287-301.
34. Nokolov R., Nocolova M., Miyares C., Milanova A.: Antihypoxic effect of prostacyclin. *Math. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1982, 4, 211-219.
35. Ogletree M. L., Lefer A. M., Smith J. B., Nicolau K. C.: Studies on the protective effect of prostacyclin in acute myocardial ischemia. *Europ. J. Pharmacol.*, 1979, 56, 95-103.
36. Pluta R.: Influence of prostacyclin on the recovery of bioelectric cerebral activity after complete cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.*, 1986, 73, 44-54.
37. Pohl P., Vogl G., Gerstenbrand F., Aichner F.: Therapieerfahrungen mit Prostacyclin bei akuten ischämischen Insulten. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17-19 October 1985, *Abstr.* p. 17.
38. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: The effect of prostacyclin on morphological and enzymatic properties of CNS cultures exposed to anoxia. *Acta Neurol. Scand.*, 1986a, 73, 111-118.
39. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: The effect of a synthetic prostacyclin-analogue on morphological properties of CNS-cultures exposed to anoxia. *Neuropat. Pol.*, 1986b (in press).



40. Rothman S. M.: In hippocampal cell cultures blockade of synaptic activity by raising extracellular Mg<sup>++</sup> prevents cell death from hypoxia. *J. Neurol. Sci.*, 1984, 4, 1884—1891.
41. Simon R. P., Swan J. H., Griffiths T., Meldrum B. S.: Blockade of N-Methyl-d-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*, 1984, 226, 850—852.
42. Stachura J., Kaluża J.: Influence of prostaglandin E<sub>2</sub> on actinomycin C-induced degeneration of embryonal neuroectodermal tissue. *Prostaglandins*, 1982, 24, 433—439.
43. Suzuki R., Yamaguchi T., Kirino T., Orzi F., Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1983a, 60, 217—222.
44. Suzuki R., Yamaguchi T., Chou-Luh Li, Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in spontaneous activity in cerebral cortex and CA<sub>1</sub> sector of hippocampus. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1983b, 60, 217—222.
45. Volpi M., Naccache P. H., Shaafi R. J.: Arachidonate metabolite(s) increase permeability of plasma membrane of the neutrophil to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980, 92, 1221—1231.

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