

CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND INFLUENȚAREA PRIN BUTANDIOL A CAPACITĂȚII DE EXPLORARE A ANIMALELOR SUPUSE UNEI ISCHEMII CEREBRALE

Isabel Cristescu*, B. Voiculescu**, L. Podoleanu**

REZUMAT

În acest studiu am urmărit influențarea prin butandiol a capacității de explorare a animalelor supuse unei ischemii cerebrale, efectul benefic al butandioliului rezultând din utilizarea preferențială a corpurilor cetonice ca sursă de energie, ceea ce limitează glicoliza anaerobă și în consecință formarea lactatului.

Am observat o tendință în reducerea hipermotilității post-ischemice și o eficacitate a acestui produs în ameliorarea tulburărilor capacității de explorare a animalelor ischemiate.

Cuvinte cheie: Butandiol, ischemie cerebrală

În prezentul studiu am urmărit influențarea prin butandiol a capacității de explorare a animalelor supuse unei ischemii cerebrale.

Modelul de ischemie cerebrală utilizat a fost descris pentru prima dată de către Nemoto în 1977 și constă în metoda strangulării. Aceasta se realizează cu ajutorul unui manșon pneumatic aplicat în jurul gâtului animalului urmărind reproducerea unei ischemii cerebrale globale tranzitorii la șobolani având o durată de 30 de minute.

1,3 butandioliul este un dimer etanolic lichid având următoarea formulă chimică: $\text{CH}_3\text{-CHOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$. Acest compus este transformat în organism în β -hidroxibutirat datorită acțiunii unei alcooldehidrogenaze și unei aldehyd-dehidrogenaze (Kirsch și D'Alecy, 1984).

Se știe că oxidarea β -hidroxibutiratului este crescută în caz de hipoxie și că **adiția corpurilor cetonice induce o mai mare toleranță în lipsa oxigenului.**

Efectul benefic al 1,3 butandioliului rezultă din utilizarea preferențială a corpurilor cetonice ca sursă de energie, ceea ce limitează glicoliza anaerobă și în consecință, formarea lactatului (Kirsch și D'Alecy, 1983). După acești autori, se înregistrează o acumulare mai mare de lactat în cazul șoarecilor supuși hipoxiei. Marie și coll. (1987) au obținut rezultate similare în cazul șobolanilor supuși modelului celor „4 vase”. Aceștia arată că tratamentul minimizează pierderea de compuși adenilici fosforilați și mărește încărcarea energetică.

Lundy și coll. arată că tratamentul cu 1,3 butandiol prelungeste timpul de supraviețuire (1984) și diminuează deficitul neurologic (1985) al șobolanilor supuși hipoxiei. După Combs și D'Alecy (1987), butandioliul reduce leziunile striatale și corticale consecutive unei ischemii de 30 de minute, fără a avea însă nici un efect asupra leziunilor hipocampice.

ABSTRACT

The influence of butonadiol of the exploring capacity of animals undergoing cerebral ischaemia

In this study we investigated the influence of butandiol of the exploring capacity of the animals undergoing cerebral ischaemia, the positive effect of butandiol being due to the preferential use of ketonic bodies as a source of energy, which limits anaerobic glycolysis and thus diminishes lactate production.

We notice a tendency to diminishing post-ischaemic hypermotility, also the efficiency of this product in the amelioration on the disturbances of the exploring capacity of the ischaemiated animals.

Key words: Butandiol, cerebral ischaemia.

Protocol experimental

Studiile au fost realizate pe șobolani Wistar, masculi, cu greutatea de aproximativ 250 g, supuși unei ischemii cerebrale globale de 30 de minute prin metoda strangulării.

Am utilizat butandiol în soluție injectabilă administrată pe cale intraperitoneală.

Animalele tratate au primit cu 30 de minute înaintea ischemiei 25 mmoli/kg de 1,3 butandiol (Prolabo) într-un volum de 0,9 ml/100 g pe cale i.p. Produsul a fost diluat în prealabil în apă distilată la 1/4. Animalele netratate au primit un volum echivalent de apă distilată.

Doza a fost aleasă în funcție de datele din literatură, care arată că la aceste doze nu se produce o modificare a presiunii arteriale preischemice.

Teste comportamentale utilizate

Studiile comportamentale au fost efectuate în vederea evaluării **activității motorii în „open-field” clasic și în „open-field” modificat.**

În cursul testării în „open-field” clasic am urmărit capacitatea de explorare a animalelor, test care permite cuantificarea activității motorii a fiecărui animal. Activitatea motorie a fost estimată prin media \pm S a numărului carourilor traversate în 6 minute. În același timp am evaluat și timpul de latență în secunde estimat prin media \pm ES. Aceste evaluări au fost realizate la 24 de ore și respectiv 48 de ore după ischemie. În cursul testării în „open-field” modificat am introdus în interiorul compartimentului „open-field-ului” 3 cuburi pentru a spori capacitatea de vigilență a animalelor. În cadrul acestui test am înregistrat timp de 6 minute următorii parametri pentru fiecare animal: timpul de latență, numărul de carouri traversate, numărul de redresări față de

*Dr. Isabel Cristescu - asistent universitar, Catedra de farmacologie UMF Carol Davila, București

**Dr. Bogdan Voiculescu - șef lucrări, Catedra de anatomie UMF București; Dr. Lucian Podoleanu - șef lucrări, Catedra de anatomie UMF București

perete și numărul de vizite față de obiecte.

Efectivele loturilor pentru activitatea motorie în „open-field“ clasic au fost următoarele:

La 24 ore Lotul 1: n = 9 La 48 ore Lotul 1: n = 9
 Lotul 2: n = 10 Lotul 2: n = 9
 Lotul 3: n = 10 Lotul 3: n = 9
 Lotul 4: n = 9 Lotul 4: n = 9

- pentru activitatea motorie în „open-field“ modificat efectivele loturilor au fost:

Lotul 1: n = 10
 Lotul 2: n = 10

Lotul 3: n = 13
 Lotul 4: n = 12

Rezultate

„Open-field“ clasic

Rezultatele activității exploratorii (numărul de carouri traversate și timpul de latență în secunde) sunt reprezentate în tabelul I și în figura 1.

Tabelul I - Influențarea prin 1,3 butandioli a numărului de carouri traversate în 6 minute (media ±ES) și a timpului de latență în secunde (media ±ES) în open field clasic înregistrate după 24 și 48 ore de la recircularea carotidiană

	24 ORE		48 ORE	
	Număr de carouri	Timp de latență	Număr de carouri	Timp de latență
Martori netratați (n= 9)	77,2 ± 25,3	138,8 ± 55,4	60,2 ± 21,0	143,9 ± 55,7
Martori tratați (n=10)	59,8 ± 16,2	98,7 ± 44,2	32,5 ± 15,6	148,0 ± 48,0
Ischemiați netratați (n=10 la 24 ore) (n= 8 la 48 ore)	488,0 ± 49,3	19,1 ± 3,4	388,1 ± 107,3	15,9 ± 4,2
Ischemiați tratați (n=9)	353,2 ± 71,4	60,8 ± 14,8	185,9 ± 73,6	162,6 ± 50,7

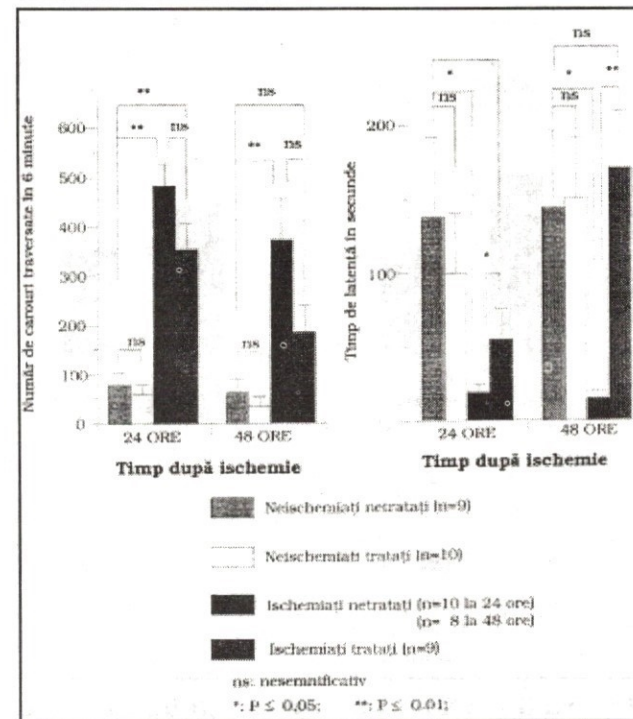


Fig. 1 - Influențarea prin 1,3 butandioli a mediei (±ES) numărului de carouri traversate în 6 minute (figura din dreapta) în „open-field“ clasic după 24 și 48 de ore de la recircularea carotidiană

Numărul de carouri traversate de martorii netratați este de 77,2 ± 25,3. **Butandioli nu a modificat motilitatea animalelor**, ele traversând 59,8 ± 16,2 carouri.

În cazul animalelor ischemiate, **după 24 de ore observăm o hipermotilitate marcată** (488 ± 49,3 carouri traversate, cu P ≤ 0,01). **Administărând 1,3 butandioli se observă o reducere a acestei motilități**, nesemnificativă statistic (353,2 ± 71,4). Cu toate acestea, valoarea rămâne la un nivel ridicat și semnificativ statistic (P ≤ 0,01) în raport cu martorii.

Nici în cazul înregistrărilor după 48 ore, 1,3 butandioli nu modifică motilitatea animalelor. În cazul martorilor netratați și a celor tratați am înregistrat o valoare de 60,2 ± 21 și respectiv de 32,5 ± 15,6 carouri traversate.

În cazul animalelor ischemiate se observă o ușoară scădere a motilității (nesemnificativă statistic) în raport cu pasajul precedent.

Animalele ischemiate netratate traversează 388,1 ± 107,5 carouri și rămân mult mai active față de martori (P ≤ 0,01).

Nu se observă o diferență semnificativă statistic între martorii neischemiați (60,2 ± 21,0) și ischemiați tratați (185,9 ± 73,6).

1,3 butandioli tinde să reducă hipermotilitatea post-ischemică, nesemnificativ statistic însă față de animalele ischemiate netratate.

Trebuie să mai precizăm că în cazul animalelor ischemiate netratate în cursul primei zile post-ischemice, 2 dintre ele au prezentat un asemenea deficit motor încât au fost incapabile să se deplaseze. La 48 de ore, 4 din 12 animale au prezentat acest simptom. Din această cauză, animalele acestea n-au

putut fi supuse testării. Acest tip de deficit motor nu s-a observat în cazul animalelor tratate.

Timpul de latență în cazul șobolanilor ischemiați netratați este mult diminuat în raport cu cel al martorilor absoluți atât după 24 de ore ($P \leq 0,05$) cât și după 48 de ore ($P \leq 0,05$). **Tratamentul a crescut semnificativ timpul de latență al șobolanilor ischemiați atât după a 24 oră ($P \leq 0,05$) cât și după a 48 oră ($P \leq 0,01$).**

Timpul de latență al șobolanilor ischemiați netratați este de $19,1 \pm 3,4$ secunde în timpul primului pasaj, în timp ce în cazul celor tratați este de $60,8 \pm 14,8$ secunde. La 48 de ore,

timpul de latență în cazul animalelor ischemiate netratate și respectiv tratate este de $15,9 \pm 4,2$ și $162,6 \pm 50,7$ secunde.

Putem deci să spunem că nu rezultă nici o diferență între martorii neischemiați netratați și șobolanii ischemiați tratați atât la 24 cât și la 48 de ore.

Open field modificat

Rezultatele studiului comportamentului de explorare realizate la 48 de ore după ischemie sunt prezentate în **tabelul II** și în **figurile 2 și 3**.

Tabelul II - Influențarea prin administrarea de 1,3 butandiol a timpului de latență, a numărului de carouri traversate, a numărului de vizite față de obiecte și a numărului de redresări față de perete (media \pm ES) în „open-field“ modificat (perioada de observare de 6 minute) la 48 ore după ischemie

	Timp de latență (secunde)	Număr de carouri	Număr de vizite	Redresări față de perete
Martori (n=15)	$33,4 \pm 6,4$	$94,5 \pm 19,2$	$15,1 \pm 2,8$	$12,7 \pm 2,3$
Ischemiați (n=11)	$114,6 \pm 39,2$	$182,1 \pm 71,7$	$2,7 \pm 1,2$	$6,6 \pm 2,4$
Ischemiați tratați (n=14)	$45,2 \pm 10,0$	$155,6 \pm 36,6$	$7,9 \pm 1,9$	$8,4 \pm 2,3$

ns = nesemnificativ; ** = $P \leq 0,01$; * = $P \leq 0,05$

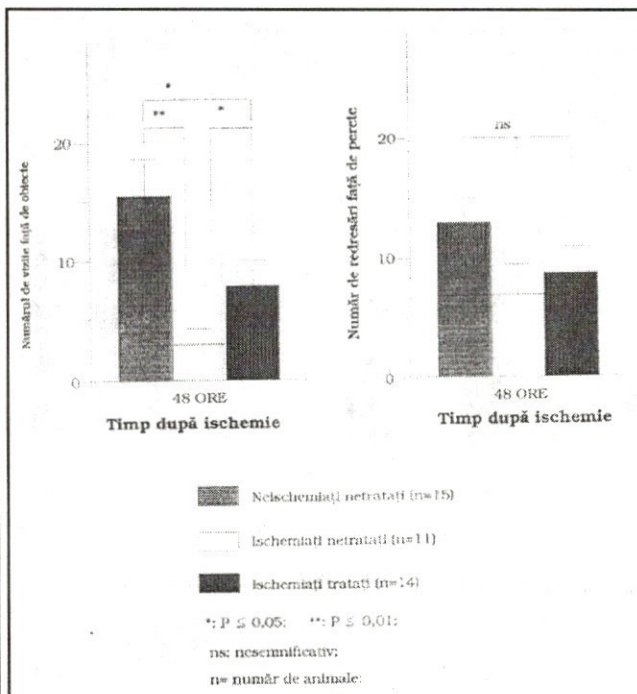
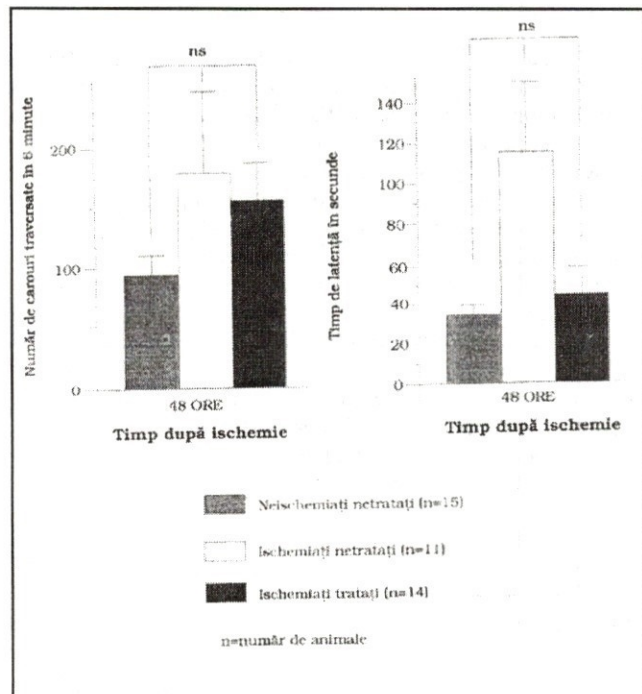


Figura 2 - Influențarea prin 1,3 butandiol a mediei (\pm ES) numărului de carouri traversate în 6 minute și a timpului de latență în secunde în „open-field“ modificat la 48 ore după ischemie

Figura 3 - Influențarea prin 1,3 butandiol a mediei (\pm ES) numărului de vizite față de obiecte și a numărului de redresări față de perete în „open-field“ modificat la 48 ore după ischemie

Administrarea de 1,3 butandioliol nemodificând comportamentul în „open-fieldul” clasic, în acest test nu am folosit animale neischemiate tratate.

„Open-field”-ul modificat presupune existența în interior a trei cuburi.

Numărul de carouri traversate de către martorii absoluți și animalele supuse ischemiei tratate sau netratate, nu diferă. Absența hipermotilității observate în cursul acestui test confirmă rezultatele descrise precedent.

Timpul de latență nu este crescut semnificativ, el fiind de $33,4 \pm 6,4$ secunde la martori în timp ce în cazul animalelor ischemiate netratate este de $114,6 \pm 39,2$. Valoarea obținută de animalele ischemiate tratate este apropiată de cea a martorilor neischemiați, situându-se în jurul valorii a 45,2 secunde. Așa cum am văzut însă în studiul precedent, acest parametru este puțin fiabil în măsura în care el variază considerabil de la o înregistrare la alta.

Putem să spunem că perturbarea comportamentului de explorare corespunde unei scăderi a numărului de vizite. Martorii efectuează $15,1 \pm 2,8$ vizite, în timp ce animalele ischemice numai $2,7 \pm 1,2$, ($P \leq 0,01$). **Tratarea animalelor ischemiate a indus o creștere a numărului de vizite ($7,9 \pm 1,9$), această valoare fiind semnificativ diferită de cea înregistrată de martori ($P \leq 0,05$) cât și față de animalele ischemiate netratate ($P \leq 0,05$).**

Numărul de redresări față de perete poate fi considerat a avea legătură cu starea de vigilență a animalelor.

Ischemia antrenează o scădere de aproximativ 50% care nu este semnificativă statistic ($6,6 \pm 2,4$ față de $12,7 \pm 2,3$). Tratatamentul cu butandioliol este ineficace.

În consecință, un pretratament cu 1,3 butandioliol ameliorează semnificativ comportamentul de explorare. Nu a fost observat nici un efect în ceea ce privește starea de vigilență.

Discuții

Studiile noastre farmacologice arată că un **pretratament cu 1,3 butandioliol** (25 mmoli/kg) reduce deficitul neurologic produs de o ischemie cerebrală globală de 30 de minute începând cu a 48-a oră de la ischemie. Mai mult, funcțiile sensomotorii vor fi practic normalizate după 7 zile de la recirculare.

Acest **efect benefic al 1,3 butandioliolului asupra stării neurologice** a animalelor a fost deja evidențiat de Lundy și col., care descrie o diminuare a mortalității și o ameliorare a deficitului neurologic într-un model de ischemie la șobolan (clamparea carotidei + atmosferă hipoxică timp de 30 de minute). Alți autori arată că 1,3 butandioliol întârzie chiar dispariția activității electrice corticale. În cazul acestui model, nu putem să încredințăm 1,3 butandioliolului un efect protector cardiac.

Utilizarea modelului „celor 4 vase” are avantajul de a „scoate din joc” componența cardiacă (Marie și col., 1987).

În afară de această ameliorare neurologică, am observat o **tendință în diminuarea hipermotilității post-ischemice** („open-field” clasic) și în plus, în mod particular și o

recuperare a capacității de explorare („open-field” modificat). În acest ultim caz, la 48 de ore după ischemie, animalele tratate vizitează în special obiectele plasate în „open-field” față de martorii ischemiați.

Ar fi fost interesant de studiat dacă un pretratament cu 1,3 butandioliol este capabil să protejeze anumite regiuni ale creierului, considerate sensibile la ischemie (corex, striat sau hipocamp).

Pe plan metodologic, utilizarea 1,3 butandioliolului, cu ajutorul testului „open-field” modificat, a permis o cuantificare mult mai selectivă a capacității de explorare (independent de motricitate), putând spune chiar că recuperarea după ischemie se poate traduce prin normalizarea vizitelor față de obiecte. Am ales acest test, deoarece hipermotilitatea din „open-field-ul” clasic este un criteriu destul de puțin fiabil de selecție al agenților presupuși anti-ischemici, în măsura în care, o diminuare a hipermotilității se poate traduce fie printr-o recuperare, fie printr-o agravare a stării animalelor.

În concluzie, un pretratament cu 1,3 butandioliol (25 mmoli/kg) s-a dovedit a fi eficace față de tulburarea capacității de explorare. A fost observată chiar o tendință în reducerea hipermotilității. Din punct de vedere metodologic, utilizarea 1,3 butandioliolului ne-a permis să introducem un alt test „open-field” modificat pentru o cuantificare selectivă a tulburărilor capacității de explorare.

BIBLIOGRAFIE

1. **Boulu R.G.:** Models d'ischemie cérébrale expérimentale: critères d'efficacité des médicaments, *Circ. Metabol. Cerveau* 1987, 4, 217 - 229
2. **Kirsch J.R., D'Alecy L.G.:** Effect of altered availability of energy - binding substrates upon survival from hypoxia in mice, *Stroke*, 1979, 10, 288 - 291
3. **Kirsch J.R., D'Alecy L.G., Mongroo P.B.:** Butanediol induced ketosis increases tolerance to hypoxia in the mouse, *Stroke*, 1980, 11, 506 - 513
4. **Kirsch J.R., D'Alecy L.G.:** Role of tissue lactate and substrate availability in 1, 3 - butanediol - enhanced hypoxia survival in the mouse, *Stroke*, 1983, 14, 971 - 976
5. **Kirsch J.R., D'Alecy L.G.:** Hypoxia induced preferential ketone utilization by rat brain slices, *Stroke*, 1984, 15, 319 - 323
6. **Kogure K., Busto R., Scheinberg P., Reinmuth O.M.:** Energy metabolites and water content in brain during the early stage of development of cerebral infarction, *Brain*, 1974, 97, 103 - 104
7. **Tate R.T., Mehlman M.A., Tobin R.B.:** Metabolic rate of 1,3 butanediol in the rat conversion to beta-hydroxybutyrate, *J. Nutr.*, 1971, 101, 1719 - 1726
8. **Volpe B.T., Pulsinell W.A., Tribuna J., Davis H.P.:** Behavioural performance of rats following transient forebrain ischemia, *Stroke* 1984, 15, 558 - 562
9. **Zola-Morgan S., Squire L.R., Amaral D.G.:** Human amnesia and medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus, *J. Neurosci.*, 1986, 6, 2950 - 2967