

CERCETĂRI EXPERIMENTALE PRIVIND INFLUENȚAREA PRIN NIMODIPINĂ A MODIFICĂRILOR NEURO-PSIHICE PRODUSE DE ISCHEMIA CEREBRALĂ

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

REZUMAT

În acest studiu am urmărit influențarea prin nimodipină a modificărilor neuropsihice produse de ischemia cerebrală.

Am constatat că nimodipina a normalizat deficitul neurologic, că nu a avut efect asupra hipermotilității post-ischemice, a determinat o tendință în normalizarea procesului de învățare și memorizare și s-a dovedit a fi ineficace în ceea ce privește retenția mnezică.

Cuvinte cheie: nimodipină, ischemie cerebrală, activitate neuro-psihică.

ABSTRACT

Influence of nimodipine on the neuro-psychical alterations induced by cerebral ischaemia

In this study we investigated the influence of nimodipine on the neuro-psychical alterations induced by cerebral ischaemia.

We concluded that nimodipine normalized the neurologic deficit, had no effect on post-ischaemic hypermotility, showed a tendency to normalize the learning and memorizing processes and had no effect on mnezic retention.

Key words: nimodipine, cerebral ischaemia, neuro-psychical activities.

În prezentul studiu am urmărit influențarea prin nimodipină a modificărilor neuro-psihice produse de ischemia cerebrală.

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.

Protocol experimental

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

Am utilizat nimodipina în soluție injectabilă (Bayer) administrată pe cale intraperitoneală.

Am căutat să administrăm substanța într-o modalitate cât mai apropiată de cea curativă, modalitate care ar putea sta la baza tratamentului unui accident vascular cerebral (AVC) în fază acută. Astfel am administrat nimodipina la 3 ore după ischemie, apoi de 2 ori pe zi în următoarele 3 zile. Tratamentele au fost realizate pe cale intraperitoneală în doză de 10 mg/kgc. Dozele au fost alese în conformitate cu datele din literatură. Martorii au fost injectați i.p. cu ser fiziologic.

Teste comportamentale utilizate

Studiile comportamentale au fost efectuate în vederea evaluării:

Deficitul neurologic

Explorarea funcțiilor senzo-motorii la șobolani constă în analizarea reflexelor și răspunsurilor comportamentale următoare: reflexul de apucare, reflexul de plasare în spațiu

vizual, pierderea contactului cu o suprafață, reflexul de redresare, testele de echilibru pe plan înclinat și pe bară orizontală, motilitatea spontană. Reflexele și răspunsurile comportamentale obținute în urma testelor sunt evaluate separat, iar suma cotațiilor parțiale dă scorul neurologic global al animalelor care este egal cu 18 la un șobolan normal neischemiat. Deficitul neurologic a fost exprimat prin media \pm ES a scorului neurologic global.

Acesta a fost evaluat la 3, 24, 48, 72 de ore și respectiv la 7 zile după ischemie. În ziua producerii ischemiei, tratamentul a fost efectuat chiar după examenul neurologic. În zilele următoare a fost realizat la 5 ore după prima administrare și cu 3 ore înainte de cea de-a doua administrare. Un scor de 0 a fost atribuit animalelor moarte în timpul săptămânii de observare.

Pentru nimodipină, loturile au fost astfel constituite:

- Lotul 1: martori neischemiați netratați (n = 10)
- Lotul 2: martori neischemiați tratați cu nimodipină 10 mg/kg (n = 10)
- Lotul 3: martori ischemiați netratați (n = 13)
- Lotul 4: martori ischemiați tratați cu nimodipină 10 mg/kgc (n = 12)

Activități motorii

În cursul acestui studiu am urmărit capacitatea de exploatare a animalelor în „open-field” clasic, test care permite cuantificarea activității motorii a fiecărui animal. Activitatea motorie a fost estimată prin media \pm ES a numărului carourilor traversate în 6 minute în „open-field” clasic. Această evaluare a fost realizată la 24 de ore și respectiv 48 de ore după ischemie. Atât în prima cât și în a 2-a zi, înregistrarea s-a efectuat la 5 ore după prima administrare a tratamentului din ziua respectivă. Cea de a doua administrare a fost efectuată la sfârșitul testării animalelor în „open-field”. În paralel, a fost măsurat și timpul la latență în secunde (media \pm ES).

* 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

Efectivele loturilor au fost următoarele:	
Lotul 1: martori	n=10
Lotul 2: martori tratați	n=10
Lotul 3: ischemiați netratați:	
- 24 de ore după ischemie	n=13
- 48 de ore după ischemie	n=13
Lotul 4: ischemiați tratați:	
- 24 ore după ischemie	n=12
- 48 de ore după ischemie	n=12

Componența loturilor a fost:		
Lotul 1	martori	10
Lotul 2	martori tratați	10
Lotul 3	martori ischemiați netratați	12
Lotul 4	martori ischemiați tratați	12

În toate cele 4 studii rezultate au fost prelucrate statistic utilizând testul student și testul ANOVA cu 1 sau 2 factori de varianță.

Capacitate de învățare

Aceasta a fost evaluată prin testul evitării condiționate active și prin testul evitării condiționate pasive („black and white box“). În cazul testului evitării condiționate active, secvențele sunt repetate până când animalul evită electroșocul printr-o săritură pe pereții laterali ai cutiei de plexiglas. Dacă numărul ședințelor este mai mare de 30, am considerat că achiziția învățării nu se poate realiza. Capacitatea de învățare a fost estimată prin media \pm ES a numărului de cicluri necesare instalării unei evitări condiționate active la 7 zile după producerea unei ischemii cerebrale. În ceea ce privește evitarea condiționată pasivă, experiențele au fost desfășurate în a 6-a și respectiv în a 7-a zi de la producerea ischemiei. În cursul acestui test am înregistrat timpul necesar animalului pentru trecerea din compartimentul luminos în compartimentul întunecat.

Efectivele loturilor au fost:		
Lotul 1	martori	10
Lotul 2	martori tratați	10
Lotul 3	martori ischemiați netratați	13
Lotul 4	martori ischemiați tratați	12

Retenția mnezică

Aceasta a fost evaluată cu ajutorul testului evitării condiționate pasive („black and white box“) și exprimată prin media \pm ES a timpului de latență în secunde. Au fost efectuate 2 înregistrări: una în a 6-a zi și alta în a 7-a zi de la producerea ischemiei.

Rezultate

1. Deficitul neurologic

Rezultatele sunt regrupate în **tabelul I și în figura 1**. Constatăm că **nimodipina nu influențează reflexele senso-motorii la animalul normal**. Astfel în cazul grupurilor animalelor tratate neischemiate, scorul neurologic global rămâne 18 la fel ca cel al animalelor martori neischemiați.

În cazul animalelor ischemiate, putem spune că **nimodipina exercită un efect favorabil accelerând recuperarea post-ischemică**. Astfel, efectul nimodipinei se manifestă în mod semnificativ statistic încă de la 24 de ore după ischemie. Recuperarea neurologică se poate apropia de normal după cea de-a 7-a zi de la ischemie (deci după administrarea celor 7 doze de nimodipină), SNG = $17,2 \pm 0,3$. În cazul loturilor tratate cu nimodipina nu a fost constatată nici o mortalitate.

2. Activitatea exploratorie

„Open-field“ clasic

Rezultatele sunt reprezentate în **tabelul II și în figura 2**.

Nimodipina nu a modificat semnificativ motilitatea spontană și timpul de latență la animalul normal neischemiat.

În cazul șobolanilor martori ischemiați, **hipermotilitatea post-ischemică** descrisă în capitolele anterioare a fost

Tabelul I Influențarea prin nimodipină a SNG (media \pm ES) în timpul săptămânii post-ischemice. Nimodipina a fost administrată în doză de 10 mg/kgc i.p. la 3 ore după o ischemie de 30 minute apoi de 2 ori pe zi în următoarele 3 zile.

Timp după ischemie	3 ORE	24 ORE	48 ORE	72 ORE	7 ZILE
Ischemiați (n=13)	⁰⁰ 1,8 \pm 0,5	⁰⁰ 6,4 \pm 0,8	⁰⁰ 8,9 \pm 0,8	⁰⁰ 11,5 \pm 1,0	⁰⁰ 12,9 \pm 1,3
Ischemiați tratați (n=12)	⁰⁰ 2,8 \pm 0,9	⁰⁰ * 9,8 \pm 1,0	⁰⁰ ** 14,0 \pm 0,7	⁰ ** 15,7 \pm 0,6	⁰⁰ ** 17,2 \pm 0,3

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$: comparație între șobolanii ischemiați tratați și cei ischemiați netratați;

⁰: $p \leq 0,05$; ⁰⁰: $p \leq 0,01$: comparație între martori și șobolanii ischemiați tratați sau nu;

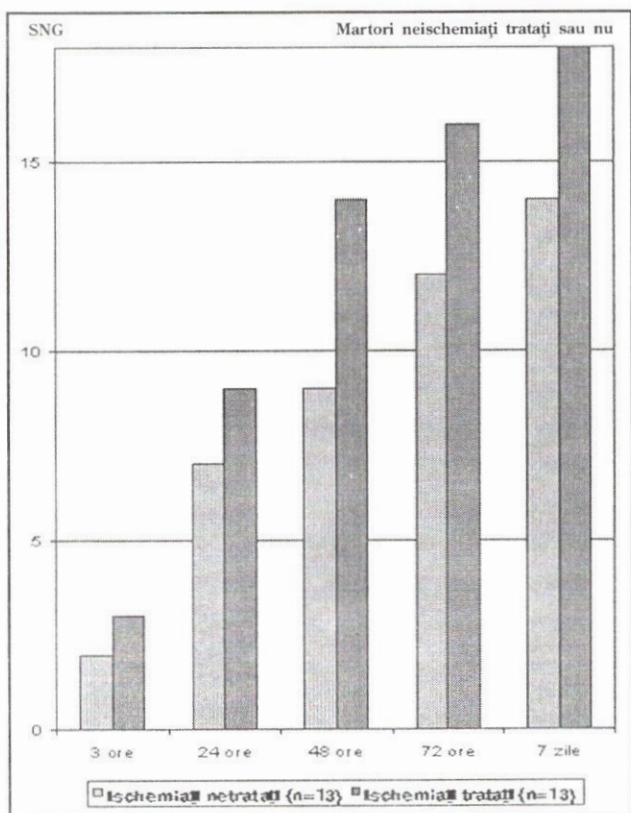
(n): număr inițial de animale pe lot.

Tabelul II: Influențarea prin nimodipină a motilității exprimată prin numărul de carouri traversate în 6 minute (media \pm ES) și a timpului de latență (secunde) în open field clasic, înregistrate la 24 ore și 48 ore după ischemie. Nimodipina a fost administrată pe cale i.p. 10 mg/kg la 3 ore după o ischemie de 30 minute și apoi de 2 ori pe zi în următoarele 3 zile

	24 ORE		48 ORE	
	Număr de carouri	Timp de latență	Număr de carouri	Timp de latență
Martori netrațați (n=10)	73.9 \pm 27.0	118.9 \pm 52.7	46.2 \pm 15.1	139.0 \pm 49.9
Martori tratați (n=10)	53.8 \pm 22.2	196.1 \pm 54.7	32.8 \pm 11.9	169.8 \pm 50.7
Ischemiați netrațați (n=13)	283.8 \pm 41.8	31.8 \pm 6.0	298.1 \pm 56.0	39.3 \pm 9.0
Ischemiați tratați (n=12)	349.6 \pm 62.8	54.4 \pm 28.3	318.9 \pm 69.5	77.5 \pm 38.3

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ns= ne semnificativ;

(n): număr de animale pe lot.



Nimodipina a fost administrată i.p. în doză de 10 mg/kgc la 3 ore după ischemie și apoi de 2 ori pe zi în cursul celor 3 zile următoare. Animalele neischemiate tratate sau nu au un SNG = 18

Figura 1: Influențarea prin nimodipină a SNG (media \pm ES) în timpul săptămânii post-ischemice

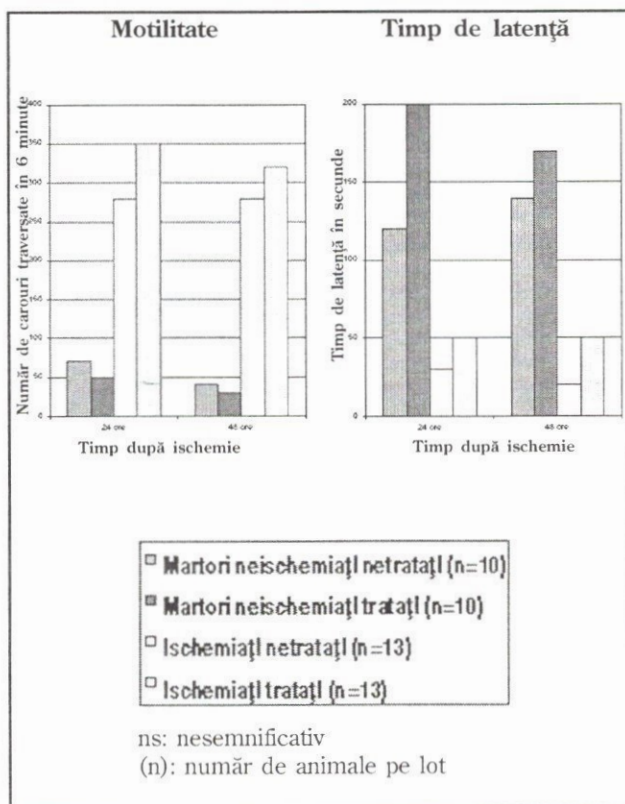


Figura 2: Influențarea prin nimodipina a motilității exprimată prin numărul de carouri traversate în 6 minute (media \pm ES) și a timpului de latență în secunde (media \pm ES) în open field clasic la 24 și 48 de ore după ischemie

regăsită și în cazul acestui studiu, atât după 24 de ore cât și după 48 de ore.

Prin administrarea nimodipinei nu s-a înregistrat o diminuare a hipermotilității care să fie semnificativă în cazul animalelor ischemiate.

3. Învățarea și memoria

Evitarea condiționată activă

Rezultatele obținute în urma acestui test sunt regrupate în **tabelul III și în figura 3.**

În cazul animalului normal, neischemiat, **nimodipina nu a perturbat capacitatea animalului de învățare în urma evitărilor active repetate.**

În toate experiențele noastre, capacitatea de învățare a șobolanului ischemiat a fost perturbată, ceea ce confirmă rezultatele descrise în capitolele precedente.

În cazul nimodipinei administrate în cazul șobolanilor ischemiați, ea determină o reducere cu aproximativ 32% a deficitului de învățare, ceea ce este destul de aproape de semnificația statistică.

Pe de altă parte, performanțele animalelor ischemiate tratate rămân încă semnificativ diferite față de cele obținute de șobolanii normali neischemiați.

Evitarea condiționată pasivă

Rezultatele obținute sunt reprezentate în **tabelul IV și în figura 4.**

Acestea arată că, încă de la prima lor introducere în interiorul incintei, animalele tuturor loturilor (neischemiate netratate, neischemiate tratate, ischemiate netratate și ischemiate tratate) trec din comportamentul luminos către compartimentul întunecat fără a exista o diferență semnificativă statistic în cazul nimodipinei.

Examinarea timpului de latență de trecere în

comportamentul întunecat efectuată în a 7-a zi (adică la 24 de ore de la aplicarea unui șoc electric nociceptiv), arată că nimodipina **nu este capabilă să se opună amneziei post-ischemice (timpul de latență nu diferă semnificativ la lotul martor ischemiat față de lotul ischemiat tratat).**

Discuții

Nimodipina administrată în doză de 10 mg/kg la 3 ore după o ischemie de 30 de minute, iar apoi de 2 ori pe zi în următoarele 3 zile, **este capabilă să reducă semnificativ deficitul neurologic** provocat la șobolan printr-o ischemie de 30 de minute. Acest efect conduce chiar la o apropiere de normalitate a SNG a șobolanilor ischemiați la 7 zile după o ischemie cerebrală.

Rezultatele obținute *via-a-vis* de hipermotilitatea post-ichemică în „open-field” clasic nu coroborează cu datele obținute după examenul neurologic în ceea ce privește nimodipina. **Ea nu modifică semnificativ hipermotilitatea nici după 24 de ore, nici după 48 de ore după ischemie.** Prin „open-field” se știe că putem să apreciem pe de o parte capacitatea animalului de a explora un mediu nou cu care vine în contact, iar pe de altă parte activitatea motorie a animalului. Dacă înlăturăm factorul stres al animalului (cu cât animalul este mai stresat, cu atât el nu va explora) există substanțe sedative care scad capacitatea de exploatare și substanțe excitante ale SNC care cresc activitatea și capacitatea de explorare.

În urma testelor efectuate, la aceste doze, nimodipina nu are nici efect sedativ și nici un efect excitant la nivelul SNC.

Hipomotilitatea care apare consecutiv ischemiei poate fi explicată prin lezarea directă a structurilor implicate în această funcție. Astfel, funcția motorie ar putea fi influențată fie prin substanțele care ar avea un rol anxiolitic (deci ar produce o diminuare a capacității de explorare), fie prin substanțele

Tabelul III-IV: Influențarea prin nimodipină a performanțelor mnezice: capacitatea de învățare este evaluată prin numărul de cicluri (media ±ES) necesare instalării unei evitări condiționate active la 7 zile după ischemie. Retenția mnezică a fost evaluată prin timpul de latență în secunde (media ±ES) în testul evitării condiționate pasive practicat la 6 zile (achiziția testului) și la 7 zile (retenția) după ischemie. Nimodipina a fost administrată i.p. în doză de 10 mg/kgc la 3 ore după ischemie de 30 minute, iar apoi de 2 ori pe zi în următoarele 3 zile.

	Condiționare activă		Condiționare pasivă		
	Număr de cicluri condiționate a 7a zi		Timp de latență (secunde)		
			a 6a zi	a 7a zi	
Martori	13,0 ± 2,3 (n=10)	ns **	31,0 ± 13,2 (n=10)	255,5 ± 29,7	
Martori tratați	12,7 ± 3,2 (n=10)		42,3 ± 14,0 (n=10)	227,2 ± 38,2	
Ischemiați	28,2 ± 1,3 (n=13)		ns	8,1 ± 1,9 (n=12)	39,8 ± 23,9
Ischemiați tratați	23,4 ± 1,9 (n=12)			17,2 ± 5,6 (n=12)	108,0 ± 39,0

(n)= număr de animale pe lot;

*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ns: nescemnificativ.

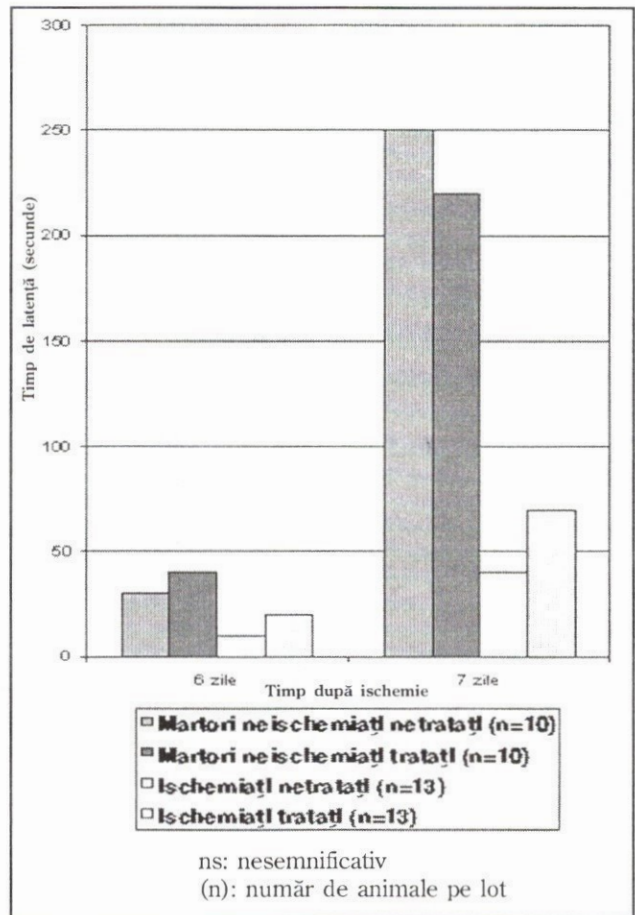
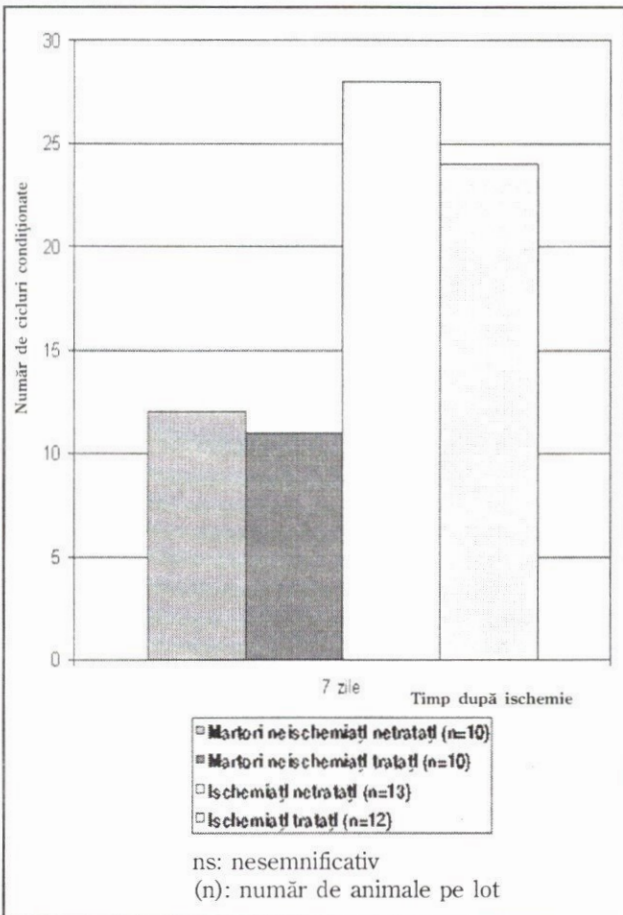


Figura 3: Influențarea prin nimodipină a capacității de învățare evaluată prin numărul de cicluri condiționate (media \pm ES) în testul evitării condiționate active.

Figura 4: Influențarea prin nimodipină a retenției mnezice evaluată prin timpul de latență în secunde (media \pm ES) în timpul testului evitării condiționate pasive la 7 zile după ischemie

care ar putea ameliora direct leziunile corticale și striate responsabile de generarea hipermotilității. Pe de altă parte, nici o scădere foarte pregnantă a acestei motilități nu este satisfăcătoare, deoarece ea s-ar putea traduce printr-o agravare a deficitului neurologic. Problema este deosebit de complicată și o oarecare eficiență a tratamentului ar însemna o reducere a acestei hipermotilități, fără ca ea să atingă valorile obținute de martori.

În ceea ce privește capacitatea de învățare, putem spune că nimodipina a exercitat o ușoară tendință în ameliorarea acestei funcții.

În acest test, animalele au fost supuse la 2 stimuli (cel sonor, premergător aplicării celui de-al doilea, cel nociceptiv). Stimulul dureros nu are o intensitate foarte mare (0,5 mA) pentru a se opune amneziei dobândite după ischemie. De aceea, animalelor ischemiate le trebuie un număr destul de mare de cicluri condiționate pentru ca într-un final să sară imediat după aplicarea stimulului sonor pe pereții laterali ai incintei. În literatura de specialitate se descriu efectele promneziante ale dihidropiridinelor. Am putea spune că la doza de 10 mg/kgc, nimodipina, prin efectul său promneziant, a determinat creșterea în același timp și a stării de anxietate a animalului: cu cât animalul își amintește mai bine suferința din ziua precedentă, el ar trebuie să fie mai anxios și deci fie să rămână imobil, fie să caute un nou mediu, cum ar fi pereții

laterali ai incintei. În literatura de specialitate se demonstrează că dihidropiridinele favorizează procesele de învățare și stocare a datelor în memorie (stimulează memoria de fixare), și nu procesele de evocare (capacitatea animalului de a face apel la datele stocate în memorie, mai precis, faza de rapel). Mai mult, unii autori arată că administrarea blocanților de calciu înaintea antrenamentelor de învățare are efect asupra învățării și memorizării, dar sunt complet ineficace când se administrează după antrenament (chiar dacă se administrează imediat). Pornind de la aceste afirmații am ales protocolul de administrare.

Pentru a elucida și mai bine problemele legate de suportul psihologic al efectelor psiho-comportamentale produse de nimodipină, am recurs la testul „black and white box”. Acesta pune animalul în condiții moderate de stres, participând de această dată:

- un mediu nou
- faptul că animalul explorează singur noul mediu
- gradul de iluminare al mediului

Lumina este considerată de șobolani ca fiind un factor stresant, deoarece ei trăiesc de obicei în semiobscuritate. De aceea, animalele caută să se refugieze în compartimentul întunecat. În acest caz, am căutat să impunem o evitare condiționată pasivă prin însăși prezența mediului puternic iluminat. Invariabil animalul din compartimentul iluminat va

trece în cel întunecat, după o anumită perioadă de timp. Latența cu care șobolanul găsește compartimentul întunecat este cu atât mai mică cu cât anxietatea sa este mai mare. Dacă animalul nu este anxios, el va rămâne mult mai mult în compartimentul luminos și va explora mai mult. Acest test decurge în 2 etape: faza inițială, de achiziție a testului efectuată la 6 zile după producerea ischemiei și cea de-a 2-a fază, de retenție mnezică sau de rapel, în care animalul este pus să-și amintească ceea ce „a învățat” cu o zi înainte.

Nimodipina nu a exercitat un efect favorabil. Putem explica aceasta prin faptul că și de această dată intensitatea stimulului (luminozitatea) a fost mult mai slabă decât șocul ischemic inițial la care au fost supuse animalele.

Deci putem spune că după o ischemie foarte severă, cum este cea din modelul pe care noi l-am obținut, ar putea exista șanse de recuperare neurologică în urma unui tratament corect aplicat și într-o anumită perioadă de timp, că ar putea chiar exista din nou șanse de recuperare ale vigilenței și explorării mediului, chiar o ușoară tendință la declanșarea unui proces de învățare, dar există destul de puține șanse în ameliorarea fazei de rapel a memoriei. Ceea ce ar fi interesant de studiat ar fi evaluarea printr-un pretratament cu doze mari de nimodipină a eficacității vis-a-vis de perturbările comportamentale ce pot apărea după o ischemie. Pe de altă parte am putea explica lipsa efectelor favorabile asupra proceselor mnezice post-ischemice ale nimodipinei prin supoziția că aceste substanțe nu ar influența leziunile din zona CA1 hipocampică. Faptul că rezultatele noastre au fost negative poate avea mai multe cauze. Pe de o parte, numărul de animale utilizate este prea scăzut pentru acest tip de experiențe dacă luăm în considerare heterogenitatea răspunsurilor individuale. De altfel, faptul că testul evitării pasive nu prevede decât un singur eseu, este probabil inadapabil acestui tip de patologie. Mai mult, acest test nu a fost utilizat decât în faza tardivă post-ischemică. Testele de memorizare au fost efectuate la 6, respectiv 7 zile după ischemie, adică la 4 zile după terminarea tratamentului. Încercări complementare punând în joc tratamente mult mai prelungite sau chiar testări mnezice mai precoce trebuie avute în vedere, ca și utilizarea altor teste mult mai performanțe, cum ar fi testul „Dellu” sau testul labirintului cu 8 brațe, teste ce s-au dovedit a fi eficiente în ameliorarea funcțiilor

cognitive. Datele din literatură arată că blocantele canalelor calciului au un efect benefic atât în ischemia focală cât și în cea globală printr-o protecție histologică la nivel cortico-striat datorită proprietăților lor vasodilatatorii deloc neglijabile. Această protecție corticală și striată ar putea fi legată de o neovascularizare a acestor 2 zone. Rezultatele obținute arată că nimodipina are o activitate anti-ischemică semnificativă în funcție de protocolul terapeutic adoptat, destul de apropiat de realitatea clinică, dar, a priori, destul de puțin favorabil pentru evidențierea unui efect protector.

În concluzie nimodipina a normalizat deficitul neurologic, nu a avut o influență asupra hipermotilității, a determinat o tendință în ameliorarea proceselor de învățare și s-a dovedit a fi ineficace în ceea ce privește retenția mnezică.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Alps B.J., Hass W.K.:** The potential beneficial effect of nicardipine in a rat model of transient forebrain ischemia. *Neurology*, 1987, 37, 809 - 814
2. **Dainbridge K.G., Celio M.R., Rogers J.H.:** Calcium binding in the nervous system, *Trends Neurosci.* 1992, nr. 15 (8), p. 303 - 308
3. **Boullin D.:** In Cerebral Vasospasm, Ed. Boullin, Wiley, 1980 (New York) 111 - 141
4. **Deshpande J., Sisjo B., Wieloch T.:** Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 1987, 7, 89 - 95
5. **Dienel G.A.:** Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain, *J. Neurochem.*, 1984, 43, 913 - 925
6. **Dudkin S.M., Polev P.V., Soldatov N.M.:** Calcium entry blockers and oxycetam have opposite effects on the density of dihydropyridine receptors in rat cerebral cortex, *Brain Res.* 1990, nr. 525 (2), p. 319 - 321
7. **Nicholson C., Bruggencate G.T., Steinberg R., Stockle H.:** Calcium, modulation in brain extracellular environment demonstrated with ion-selective micropipette, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 1287 - 1290
8. **Schwartz A.:** Molecular and cellular aspect of calcium channel antagonism., *Am. J. Cardiol.* 1992, nr. 70 (16), p. 61 - 71