

# Utjecaj blokatora kalcijских kanala, kolinomimetika i nootropika na sposobnost učenja u hipoksiji izloženih životinja

---

Mršić-Pelčić, Jasenka

Doctoral thesis / Disertacija

1995

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:404908>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
Medicinski fakultet

Jasenka Mršić

**UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA ,  
KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA NA  
SPOSOBNOST UČENJA U HIPOKSIJI  
IZLOŽENIH ŽIVOTINJA**

doktorska disertacija

SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJ E K A



930024907

Rijeka, 1995.

## I AUTOR

Ime i prezime	JASENKA MRŠIĆ
Datum i mjesto rođenja	24. lipnja 1962. u Rijeci
Naziv fakulteta, odnosno organizacije za postdiplomski studij i datum završene nastave II i III stupnja	Medicinski fakultet u Rijeci 1986. Medicinski fakultet u Rijeci 1992.
Sadašnje zaposlenje	asistent Medicinskog fakulteta u Rijeci

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

Naslov rada	UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA NA SPOSOBNOST UČENJA U HIPOKSIJI IZLOŽENIH ŽIVOTINJA
Broj stranica, slika, tabela, bibliografskih podataka	128 str. 38 SL., 3 TAB., 237 ref.
Ustanova i mjesto gdje je disertacija izrađena	Medicinski fakultet u Rijeci
Znanstvena disciplina	Medicina
Mentori	prof.dr.sc. Ante Simonić, doc.dr.sc. Gordana Župan,
Fakultet na kojem je disertacija obranjena	Medicinski fakultet u Rijeci

## III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme	2. svibnja 1993.
Datum predaje rada	1. veljače 1995.
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen	4. svibnja 1995.
Sastav povjerenstva koje disertaciju ocijenilo	prof.dr.sc. Severin Milohanić prof.dr.sc. Ante Simonić, doc.dr.sc. Gordana Župan i prof.dr.sc. Juraj Geber
Datum obrane disertacije	24. svibnja 1995.
Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija obranjena	i s t i
Datum promocije	

**UDK 615.015.23:616.89-008.464:546.41**

**Rad je učinjen na Zavodu za farmakologiju, Zavodu za kemiju i biokemiju, te Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci.**

**Voditelji: prof.dr. Ante Simonić i doc.dr. Gordana Župan**

**Rad ima 129 strana, 41 sliku i tri tablice.**



Zahvaljujem prof.dr.Anti Simoniću i doc.dr.Gordani Župan na pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem i svim članovima Zavoda za farmakologiju, Zavoda za kemiju i biokemiju, te Zavoda za histologiju i embriologiju koji su sudjelovali u izradi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem Miloradu Ljubačevu, laborantu Zavoda za farmakologiju, na neprocjenjivoj tehničkoj pomoći.

SAŽETAK

U ovoj doktorskoj disertaciji proučavan je utjecaj različitih blokatora kalcijevih kanala, kolinomimetika i nootropika na sposobnost učenja i pamćenja u intaktnih štakora i štakora u kojih je kognitivni deficit uvjetovan hipoksijom. Također su ispitivani učinci blokatora kalcijevih kanala na razinu slobodne arahidonske kiseline u mozgu hipoksičnih štakora, te na integritet stanica CA<sub>1</sub> regije hipokampusa u hipoksično-ishemičnim uvjetima.

Spoznajne aktivnosti eksperimentalnih životinja ispitivane su u pokusu pasivnog izbjegavanja kazne. Životinje su izbjegavale kaznu pod utjecajem različitih doza blokatora kalcijevih kanala (ifenprodila, MK-801, nimodipina, nikardipina), kolinomimetika (kolina, fizostigmina, tetrahidroaminoakridina (THA), arekolina), nootropika (piracetama, oksiracetama) te njihovih kombinacija. Dio životinja bio je izložen uvjetima kontrolirane hipoksije neposredno nakon treninga. Test retencije učinjen je u svih eksperimentalnih životinja 24 sata nakon testa stjecanja znanja. U oba navrata mjereno je vrijeme izbjegavanja kazne (udara električne struje) u odnosu na cjelokupno trajanje pokusa.

Korišteni blokatori kalcijevih kanala (ifenprodil, nimodipin, nikardipin), kolinomimetici (fizostigmin, THA, arekolin) te piracetam ne utječu na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u intaktnih životinja. MK-801 u dozama od 0,1 i 0,3 mg/kg smanjuje, a kolin i oksiracetam u dozi od 50 mg/kg popravljaju sposobnost učenja u intaktnih životinja.

Pronađeno je također da hipoksija značajno smanjuje sposobnost učenja u štakora. Testirani blokatori kalcijevih kanala (ifenprodil, nimodipin, nikardipin), kolinomimetici i nootropici popravljaju sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u svim testiranim dozama u štakora u kojih je spoznajni deficit uvjetovan hipoksijom. Suprotno navedenom, MK-801 ne utječe na sposobnost učenja u hipoksičnih životinja. Injiciranje kombinacija ispitivanih

spособnost učenja u hipoksičnih životinja. Injiciranje kombinacija ispitivanih blokatora kalcijских kanala, kolinomimetika i nootropika ne pojačava spoznajne aktivnosti u intaktnih odnosno hipoksičnih životinja.

U životinja izloženih hipoksiji, osim kognitivnog deficita, dokazan je i porast razine ukupnih masnih kiselina te slobodne arahidonske kiseline mozga.

Pronađeno je da nimodipin spriječava porast razine slobodne arahidonske kiseline. Učinak ispitivane tvari dozno je ovisan. Nasuprot tome, nikardipin ne utječe na razinu spomenute kiseline u mozgu hipoksičnih štakora.

Ishemija mozga uzrokovana "četverožilnom okluzijom" (obostranim podvezivanjem vertebralnih i zajedničkih karotidnih arterija) manifestira se promjenom gustoće, strukture i integriteta piramidnih stanica CA<sub>1</sub> regije hipokampusa. Nimodipin značajno reducira spomenuta neuronalna oštećenja.

Dobiveni rezultati mogli bi doprinijeti razumijevanju procesa učenja i pamćenja te traženju lijekova u terapiji spoznajnih poremećaja uvjetovanih hipoksijom/ishemijom stanica središnjeg živčevlja. Važnost prikazanih rezultata proističe iz činjenice da je učestalost navedenih poremećaja u neprestanom porastu, a da farmakoterapija ovih oboljenja ne zadovoljava.

SUMMARY



In this PhD thesis were analysed the influence of a various calcium channel blockers, cholinomimetic drugs and nootropics on the learning ability in intact and hypoxia-exposed rats. Also, the effects of calcium channel blockers on the brain free arachidonic acid level in hypoxic animals were studied as well as the influence of calcium channel blockers on the integrity of the hippocampal neurons of the CA<sub>1</sub> region in ischemic conditions.

Cognitive activities in experimental animals were studied in the passive avoidance task. The animals were trained in the passive avoidance task under the influence of a various doses of calcium channel blockers (ifenprodil, MK-801, nimodipine, nicardipine); cholinomimetic drugs (choline, physostigmine, tetrahydroaminoacridine (THA), arecoline); nootropics (piracetam and oxiracetam) and their combinations. A part of animals has been exposed to the controlled hypoxic conditions immediately after the training procedure. Retention test was performed in all experimental animals 24 hours later. The avoidance time related to the total testing time has been measured.

The calcium channel blockers (ifenprodil, nimodipine, nicardipine), cholinomimetic drugs (physostigmine, THA, arecoline) and piracetam do not influence on the learning ability in the intact rats. MK-801 (0,1 and 0,3 mg/kg) impairs and choline and oxiracetam (50 mg/kg) improve the ability of the passive avoidance of intact rats.

It was found that hypoxia strongly impairs the learning ability in rats. In the animals in which cognitive deficit was caused by hypoxia, injection of the calcium channel blockers (ifenprodil, nimodipine, nicardipine), cholinomimetic drugs and nootropic drugs significantly improve the passive avoidance in all tested doses. MK-801 doesn't improve the learning ability task in hypoxic animals. It has been found that the combinations of tested drugs do not improve passive avoidance ability in intact and hypoxic animals.

The rise of the brain free fatty acids and free arachidonic acid level is evident in hypoxic animals.

It has been found that nimodipine prevent the brain free arachidonic acid accumulation in dose dependent manner. On the contrary, nicardipine fails to prevent the brain free arachidonic acid rise in hypoxic animals.

Ischemia was caused by four vessel occlusion (bilateral ligation of both vertebral and common carotid arteries). It was manifested with disturbances of the neuronal density, structure and integrity of the CA<sub>1</sub> pyramidal cells in the hippocampus. Nimodipine significantly reduced the neuronal damage caused by ischemia.

The results of this PhD thesis could contribute to the understanding of memory processes and to the research for drugs useful in therapy of cognitive deficits caused by hypoxic/ischemic damage of the central nervous system. The importance of the results presented is in the fact that the frequency of the memory disturbances is in increase and that an efficient therapy of this disease has not existed yet.



# KAZALO

## 1. UVOD

1.1. POREMEĆAJI PAMĆENJA .....	1
1.2. OSNOVNA KONCEPCIJA PROCESA PAMĆENJA .....	3
1.2.1. SINAPTIČKI MODEL MEMORIJE .....	5
1.2.1.1. Početak sinaptičke plastičnosti .....	6
1.2.1.1.1. Uloga ekscitatornih neurotransmitora .....	6
1.2.1.1.2. Uloga iona kalcija .....	10
1.2.1.2. Pojačanje i iskazivanje sinaptičke plastičnosti .....	11
1.2.1.3. Uloga kolinergičke neurotransmisije .....	14
1.3. CEREBRALNA HIPOKSIJA I ISHEMIJA .....	17
1.3.1. POREMEĆAJ NEUROTRANSMISIJE .....	20
1.3.1.1. Neurotoksičnost glutamata .....	20
1.3.1.1.1. Početak neurotoksičnosti .....	22
1.3.1.1.2. Pojačanje i iskazivanje neurotoksičnosti .....	23
1.3.1.1.2.1. Uloga arahidonske kiseline .....	24
1.3.1.2. Poremećaj aktivnosti kolinergičke neurotransmisije .....	25
1.3.2. POREMEĆAJ CEREBRALNE CIRKULACIJE .....	26
1.3.3. POREMEĆAJ ENERGETSKOG METABOLIZMA .....	26
1.3.4. POREMEĆAJ IONSKE HOMEOSTAZE .....	28
1.3.5. POREMEĆAJ SINTEZE PROTEINA .....	28
1.4. FARMAKOTERAPIJA POREMEĆAJA PAMĆENJA .....	29
1.4.1. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA .....	30
1.4.1.1. Blokatori NMDA receptora .....	30
1.4.1.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala .....	33
1.4.2. KOLINOMIMETICI .....	37
1.4.2.1. Prekursori Ach .....	38
1.4.2.2. Inhibitori AChE .....	39
1.4.2.3. Agonisti muskarinskih receptora .....	41
1.4.3. NOOTROPICI .....	43
1.4.4. GANGLIOZIDI .....	46



1. 5. OBRAZLOŽENJE TEME .....	46
2. MATERIЈAL I METODE RADA	
2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE.....	48
2.2. POKUS PASIVNOG IZBJEGAVANJA KAZNE .....	48
2.3. HIPOKSIЈA .....	49
2.4. ISHEMIЈA .....	50
2.5. BIOKEMIЈSKA ISPITIVANJA .....	51
2.5.1. Ekstrakcija lipida .....	51
2.5.2. Kromatografske metode .....	51
2.5.2.1. Tankoslojna kromatografija .....	51
2.5.2.2. Plinska kromatografija .....	52
2.5.3. Metiliranje masnih kiselina .....	52
2.6. HISTOLOŠKA ISPITIVANJA .....	53
2.7. TVARI .....	53
2.8. PRIKAZ REZULTATA I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	55
3. REZULTATI	
3.1. PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U INTAKTNIH ŠTAKORA .....	56
3.1.1. KONTROLNE SKUPINE .....	56
3.1.2. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA .....	57
3.1.2.1. Blokatori NMDA receptora .....	57
3.1.2.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala .....	59
3.1.3. KOLINOMIMETICI .....	60
3.1.4. NOOTROPICI .....	62
3.1.5. KOMBINACIЈE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA .....	63
3.1.5.1. Nimodipin i ifenprodil .....	63
3.1.5.2. Nimodipin i arekolin .....	64
3.1.5.3. Nimodipin i oksiracetam .....	65
3.1.5.4. Oksiracetam i kolin .....	66
3.1.5.5. Oksiracetam i THA .....	67
3.1.5.6. Oksiracetam i arekolin .....	68

<b>3.2. PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U ŠTAKORA IZLOŽENIH HIPOKSIJI</b> .....	69
3.2.1. KONTROLNE SKUPINE .....	69
3.2.2. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA .....	71
3.2.2.1. Blokatori NMDA receptora .....	71
3.2.2.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala .....	72
3.2.3. KOLINOMIMETICI .....	73
3.2.4. NOOTROPICI .....	75
3.2.5. KOMBINACIJE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA .....	76
3.2.5.1. Nimodipin i ifenprodil .....	76
3.2.5.2. Nimodipin i arekolin .....	77
3.2.5.3. Nimodipin i oksiracetam .....	78
3.2.5.4. Oksiracetam i kolin .....	79
3.2.5.5. Oksiracetam i THA .....	80
3.2.5.6. Oksiracetam i arekolin .....	81
<b>3.3. BIOKEMIJSKI REZULTATI</b> .....	82
3.3.1. UTJECAJ HIPOKSIJE NA RAZINU UKUPNIH SLOBODNIH MASNIH KISELINA MOZGA TE SLOBODNE ARAHIDONSKE KISELINE U ŠTAKORA .....	82
3.3.2. UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA NA RAZINU SLOBODNE ARAHIDONSKE KISELINE U MOZGU ŠTAKORA IZLOŽENIH HIPOKSIJI .....	84
3.3.2.1. Kontrolne skupine .....	84
3.3.2.2. Utjecaj nimodipina na razinu slobodne arahidonske kiseline mozga u štakora izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije .....	85
3.3.2.3. Utjecaj nikardipina na razinu slobodne arahidonske kiseline mozga u štakora izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije .....	87
<b>3.4. HISTOLOŠKI REZULTATI</b> .....	88
<b>4. RASPRAVA</b>	
4.1. UTJECAJ HIPOKSIJE NA PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U ŠTAKORA .....	93



4.2. UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA NA PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U INTAKTNIH ŠTAKORA .....	95
4.2.1. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA .....	95
4.2.1.1. Blokatori NMDA receptora .....	95
4.2.1.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala.....	96
4.2.2. KOLINOMIMETICI I NOOTROPICI .....	97
4.2.3. KOMBINACIJE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA .....	98
4.3. UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA NA PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U ŠTAKORA U KOJIH JE SPOZNAJNI DEFICIT UVJETOVAN HIPOKSIJOM.....	99
4.3.1. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA .....	99
4.3.1.1. Blokatori NMDA kanala.....	99
4.3.1.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala.....	101
4.3.2. KOLINOMIMETICI .....	104
4.3.3. NOOTROPICI .....	106
4.3.4. KOMBINACIJE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA .....	107
4.4. RAZINA UKUPNIH MASNIH KISELINA I SLOBODNE ARAHIDONSKE KISELINE U MOZGU ŠTAKORA IZLOŽENIH HIPOKSIJI .....	108
4.5. SELEKTIVNA VULNERABILNOST PIRAMIDNIH STANICA CA1 REGIJE HIPOKAMPUSA .....	110
5. ZAKLJUČAK .....	113
6. LITERATURA.....	114

ŽIVOTOPIS



## 1.1. POREMEĆAJI PAMĆENJA

Poremećaji pamćenja predstavljaju značajan socijalno-medicinski,etički i ekonomski problem.Uzroci su brojni,a kliničke smetnje koje prate takva stanja izuzetno su dramatične i najčešće ireverzibilne.Premda je klasifikacija poremećaja pamćenja nezahvalna iz niza razloga,najšire prihvaćena je podjela na funkcionalne i organske (79).

Funkcionalni poremećaji pamćenja karakterizirani su odsustvom neuropatoloških nalaza koji bi ih mogli objasniti.U njih je uključena tzv.benigna zaboravljivost,široko rasprostranjena u osoba srednje ili starije životne dobi.Iskazuje se privremenim,prolaznim zaboravljanjem npr. imena osoba ili mjesta.Funkcionalni poremećaji pamćenja prisutni su i u nizu psihijatrijskih bolesti.Kao simptom najčešće se javljaju u sindromu depresije kada se uz pojačano sijećanje na neugodne sadržaje manifestiraju i poremećaji kratkotrajnog pamćenja (7).Poremećaji pamćenja u shizofreniji iskazuju se kao smetnje kratkotrajnog i dugotrajnog pamćenja.Smatra se da su uzrokovane nesposobnošću bolesnika da djelotvorno organiziraju primljene informacije. Slično shizofreniji,poremećaji su pamćenja prisutni i u autistične djece (79).U disocijativnim stanjima svijesti kao što su psihogena amnezija,fuga,stanja depersonalizacije ili višestruke ličnosti, poremećaji pamćenja su djelomični ili potpuni tijekom određenog vremenskog perioda.Prolazni su te ovisni o rješavanju anksioznosti ili provocirajuće situacije.Funkcionalne smetnje pamćenja nalazimo i u drugim disocijativnim stanjima (npr. hipnoza,Ganserov sindrom itd.), te nakon elektrokonvulzivne terapije (79). I velik broj lijekova može djelovati na procese pamćenja.Nažalost,daleko je veći broj lijekova koji mogu ometati normalno pamćenje nego onih koji ga mogu poboljšati.Poznato je naime, da se



poremećaji pamćenja mogu pojaviti kao nuspojava u terapiji izonijazidom; anksioliticima benzodiazepinskog reda npr. triazolam, lorazepam, flunitrazepam, alprazolam, diazepam; litijem; antidepresivima npr. amitriptilin, maprotilin; fenotiazinskim antipsihoticima; antiepilepticima npr. karbamazepin; kardi tonicima npr. digoksin; beta blokatorima npr. propranolol, atenolol, metoprolol; antihipertenzivima npr. metildopa; antiulkusnim lijekovima npr. cimetidin, ranitidin; lijekovima protiv bolesti mišićno koštanog sustava npr. indometacin, diklofenak, sulindak, naproksen; te kortikosteroidima i hipoglikemicima npr. inzulin, sulfonilurea (220).

Organski poremećaji pamćenja se manifestiraju u brojnim bolestima gdje mogu biti samo dijelom kliničke slike. Najčešći uzrok ovih poremećaja je akutno trovanje alkoholom kada se javlja amnezija za kraći ili duži vremenski period opijenosti. Poremećaj pamćenja evidentan je i tijekom ovisnosti o alkoholu kada se manifestira kao organski psihosindrom s nizom drugih simptoma i znakova poremećaja središnjeg i perifernog živčanog sustava (79). Organski poremećaji pamćenja predstavljaju dio posttraumatskog sindroma. Tako npr. prisustvo retrogradne amnezije potvrđuje dijagnozu potresa mozga (163). Sekundarna demencija može biti uzrokovana primarnim ili metastatskim moždanim tumorima. Smetnje pamćenja, pa čak i demencija, mogu se javiti kod pseudotumora mozga (206). Najčešći uzroci globalnog intelektualnog propadanja odnosno sindroma demencije jesu primarna neuronalna degeneracija i cerebrovaskularna bolest (79, 134, 160). Smatra se da je Alzheimerova bolest najčešći oblik primarnih demencija. Cerebrovaskularna bolest najčešći je uzrok sekundarnih demencija. Manifestira se prolaznom globalnom demencijom trajanja od nekoliko sati, a obično nije praćena drugim neurološkim smetnjama. Rijede se nalazi amnezija s gubitkom kratkotrajnog pamćenja uslijed ishemije lokalizirane u hipokampalnim strukturama. Poremećaj protoka krvi kroz arterije bazilarnog prstena karakteriziran je također smetnjama pamćenja i/ili amnezijom (206). Sliku demencije uzrokuju i

višestruki moždani infarkti. Spomenuta stanja moguće je klinički razlikovati od Alzheimerove bolesti na osnovu tijeka bolesti i bolje sačuvane kritičnosti i osobina ličnosti. Prisutni su i rizični faktori cerebrovaskularne bolesti kao što su povišeni krvni tlak, diabetes itd. I neke druge bolesti u kojima su prisutni poremećaji pamćenja mogu imitirati sliku Alzheimerove bolesti. To su hipotireoidizam, manjak B12 vitamina i hiperkalcemija. Određena stanja intoksiciranosti i promijenjenog metabolizma mogu uzrokovati smetenost. To se prvenstveno odnosi na plućne i urinarne infekcije, srčani infarkt, porfiriju itd. Upalne bolesti središnjeg živčevlja (SŽ), posebno encefalitis, također uzrokuju poremećaje pamćenja, često s nepotpunim oporavkom (206).

Farmakoterapija poremećaja pamćenja ne zadovoljava. Djelomično je razlog tome brojnost i raznovrsnost poremećaja pamćenja, ali i nedovoljno poznavanje osnovnih fizioloških i patofizioloških mehanizama uključenih u spomenute procese.

## 1.2. OSNOVNA KONCEPCIJA PROCESA PAMĆENJA

Pamćenje je proces pohranjivanja informacija u SŽ. Živa bića svoj opstanak duguju i sposobnosti primanja informacija. Dva su osnovna izvora informacija: genom i okolina, u kojoj organizam živi i koja mu određuje ponašanje. Genetska informacija je instrukcija potrebna za reprodukciju organizma koji će naličiti roditeljima, a zapisana je u kromosomima. Dok su hereditarne informacije nužne za održavanje kontinuiteta života i razvoj organizma, stečene informacije (potaknute vanjskim podražajima) osiguravaju mu adaptaciju na okolinu (122,166).

Prvi stupanj obrade primljenog podražaja nazivamo osjetnim pamćenjem (senzoričkom memorijom). Naime, stimulusi primljeni iz okoline putom osjetnih organa formiraju percepcijske kombinacije. Ako su izolirani i povremeni, nikada



neće ići dalje od stadija kratkotrajnog pamćenja (engl. "short term memory" STM) ili neposrednog, primarnog pamćenja. Informacija može biti ili prizvana u svijest ili izgubljena u vrlo kratkom vremenskom periodu od 20-40 sekundi. Kratkotrajno pamćenje je sustav ograničenog kapaciteta kojem se informacija zadržava aktivnošću pažnje i/ili ponavljanim ulaskom podražaja koji sadrži odgovarajuću informaciju. Ona u kratkotrajnom pamćenju biva ili zamijenjena drugim nadolazećim podražajima ili izgubljena uslijed raspada tijekom vrlo kratkog vremenskog perioda. Smatra se da kratkotrajno pamćenje odgovara radnom pamćenju (engl. "working memory") Shiffrina i Schneidera (14) čija je osnovna uloga aktivna kontrola razmišljanja, rješavanje problema i dio općeg procesa upamćivanja. Ako je dovoljno motivacije, pažnje i ponovljenih podražaja, oni se integriraju s već postojećim informacijama i pohranjuju u "pool" dugotrajne memorije. Dugotrajno pamćenje (engl. "long term memory"-LTM) označava stalno ili barem dugotrajno pohranjivanje informacija i naučenog materijala. Koriste se i drugi termini kao sekundarna memorija, odgođeno pamćenje itd. Ovako pohranjene informacije mogu biti ponovo prizvane da bi omogućile adekvatno prosuđivanje problema, odlučivanje i ponašanje. Konstantnom povratnom informacijom nervni je sustav informiran o rezultatima ponašanja što dozvoljava neprekidnu adaptaciju prema okolnostima. Cjeloukupni opisani mehanizam pod utjecajem je emocionalnih faktora kao i hereditarnih elemenata (35,121,206). Potrebno je da protekne izvjestan vremenski period između percepcije i uskladištenja informacija u SŽ. Upravo tijekom ovog perioda moguće je primjenom hipoksičko/ishemičkog oštećenja, traume, konvulzija itd. uzrokovati retrogradnu amneziju u eksperimentalnih životinja. Nakon faze pohranjivanja znanja memorija postaje mnogo trajnija i stabilnija. Stoga razlikujemo nekoliko faza u procesu učenja: stjecanje (engl. "acquisition") novog znanja, održavanje i pohranjivanje (engl. "storage", "retention", "consolidation"), te prizivanje (engl. "retrieval") u svijest znanja koje je već prije bilo usvojeno. O



zaboravljanju govorimo kada su prisutne smetnje priziva ranije upamćene informacije nakon što je protekao određeni period konsolidacije (30).

Nakon postignute konsolidacije stabilna faza pamćenja izvanredno je otporna na promjene. To upućuje na postojanje strukturnih promjena živčanih stanica što se smatra odgovornim za formiranje i održavanje dugotrajnog pamćenja.

### 1.2.1. Sinaptički model memorije

Koncept o postojanju specifične "molekule memorije" kao biokemijske osnove za pohranu informacija (engrama memorije) uglavnom je napušten. Većina znanstvenika sklonija je pretpostavci da se informacija pohranjuje u mozgu u obliku dugotrajne strukturne i/ili biokemijske promjene sinaptičke aktivnosti. Spomenuta ideja, čiji su osnovni koncept prvi iznijeli Cajal i Rasmussen još 1894. godine, a proširili i nadopunili Hebb i sur. 1949. (14), od centralne je važnosti u opisu plastičnosti sinaptičke transmisije u SŽ-u kao fiziološke baze za pohranu informacija. Naime, Cajal i sur. pretpostavili su da mreža neurona ne postoji u citoplazmatskom kontinuitetu, već da međusobno komunicira pomoću specijaliziranih veza koje je Sherrington nazvao sinapse. Nadalje, Hebb i Konorski su ustanovili da postoji pravilo po kojem je sinaptička povezanost dviju stanica to jača što su one same aktivnije. Prve su takve sinapse identificirane u mozgu sisavaca u hipokampusu, kortikalnoj strukturi neophodnoj u procesu stvaranja memorije u čovjeka (235). Dokazano je da visokofrekventna stimulacija monosinaptičkih ekscitacijskih putova u hipokampusu ima za posljedicu iznenađan, jak porast sinaptičke transmisije (35,66,115). Ovaj učinak, prvi put detaljno opisan 1973., smatra se osnovom dugotrajne sinaptičke potencijacije (engl. "long term potentiation"-LTP) koja je temelj dugotrajne memorije. Posljednjih desetak godina intenzivirana su ispitivanja modela sinaptičke potencijacije. Na temelju spomenutih istraživanja

učinjeni su značajni pomaci u rasvjetljavanju faktora i mehanizama koji prethode njenom početku (indukciji), pojačavanju (amplifikaciji) te iskazivanju (ekspresiji).

#### 1.2.1.1. Početak sinaptičke plastičnosti

##### 1.2.1.1.1. Uloga ekscitatornog neurotransmitora glutamata

Smatra se da početak (indukcija) LTP, odnosno procesa pamćenja, započinje stimulacijom različitih glutaminergičkih receptora (124) (Tablica 1). To se dominantno odnosi na AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propionat) receptore (u slučaju niskofrekventne sinaptičke transmisije) i NMDA (N-metil-D-aspartat) receptore (u slučaju visokofrekventne sinaptičke transmisije).

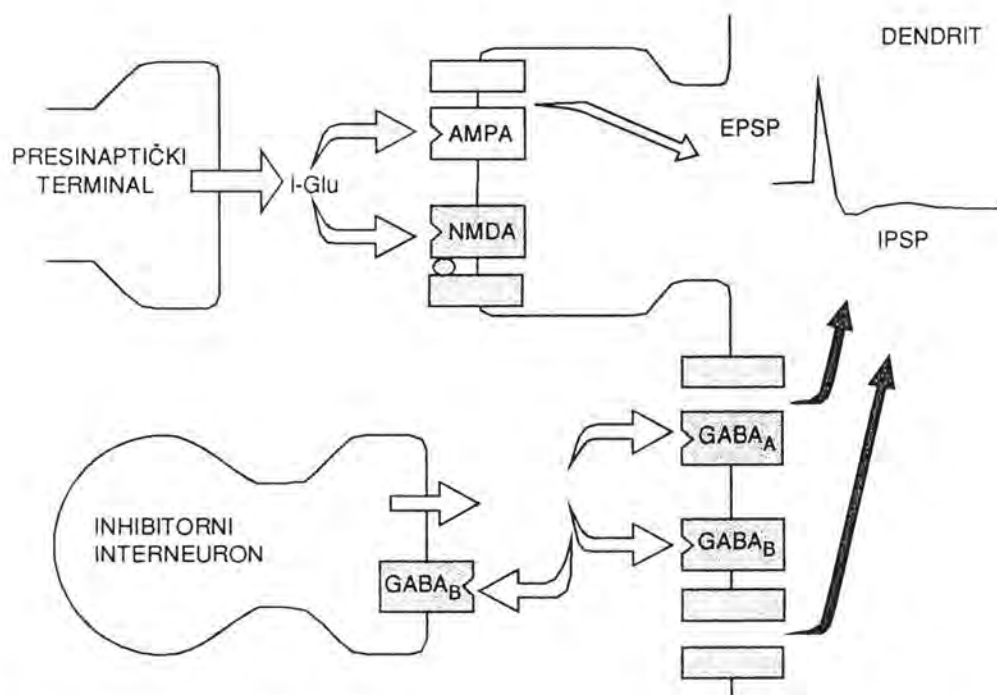
RECEPTORI	AGONISTI
- NMDA	NMDA, ibotemat, kvinolinat,
- ne-NMDA:	
- METABOTROPNI	ACPD, AP4
- AMPA	AMPA, kviskvalat
- KAINATNI	kainat, domoat, akromelat

**Tablica 1. Podjela glutaminergičkih receptora i pripadajućih agonista. ACPD, trans-1-amino-ciklopentil-1,3-dikarboksilat; AP4, 2-amino-4-fosfonobutirat.**

#### a) niskofrekventna sinaptička transmisija



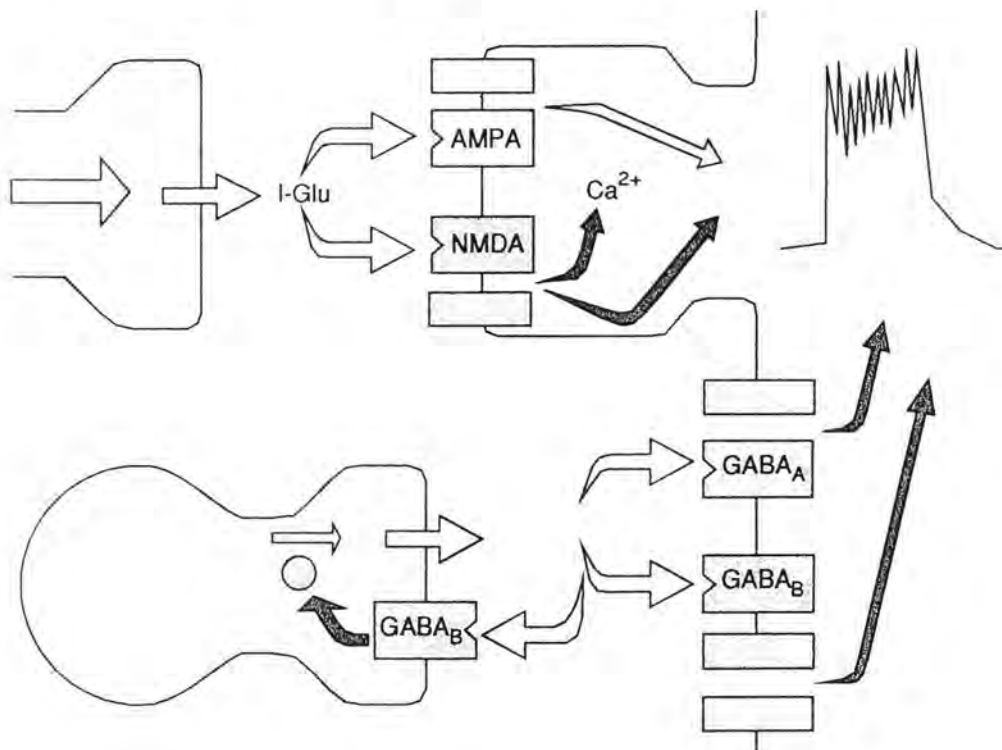
Dokazano je da jedan jedini niskofrekventni podražaj u području Schafferovih kolaterala (koje povezuju CA<sub>1</sub> i CA<sub>3</sub> regiju hipokampusa) pokreće ekscitacijski postsinaptički potencijal (EPSP) iniciran dominantno otpuštanjem neurotransmitora l-glutamata (l-Glu). On se veže za ionotropni, glutaminergički receptor ne-NMDA tipa odnosno AMPA receptor (Slika 1). Dokazano je da se spomenuti EPSP može blokirati specifičnim antagonistima za AMPA receptore kao što je 6-ciano-7-nitrokvinoxalin, 2,3-dion (CNQX). Stimulacija Schafferovih kolaterala aktivira također i inhibitorne interneurone gama-amino maslačne kiseline (engl. "gama-amino butiric acid" - GABA). To dovodi do pojave inhibitorynog postsinaptičkog potencijala (IPSP) koji je potaknut aktivacijom GABA<sub>A</sub> receptora. Dokazano je također da nastali IPSP može pojačati i aktivacija GABA<sub>B</sub> receptora (Slika 1). NMDA receptori u ovom slučaju ne sudjeluju u stvaranju sinaptičkog odgovora. Naime, neuron je izrazito hiperpolariziran uslijed IPSP što potencira blok NMDA receptora ionima magnezija (Mg<sup>2+</sup>) (5,14,34,123).



Sl.1. Niskofrekventna sinaptička transmisija: uloga AMPA receptora u indukciji LTP.

## b) visokofrekventna sinaptička transmisija

Uloga NMDA receptora u procesu sinaptičke potencijacije radikalno se mijenja u slučaju visokofrekventne tetaničke stimulacije. Ona održava neuron u depolariziranom stanju (Slika 2). Posljedično, smanjuje se blokada NMDA kanala ionima  $Mg^{2+}$ . To omogućava vezivanje I-Glu i aktivaciju NMDA receptora. Više faktora može pridonijeti održavanju depolarizacije za vrijeme tetaničke stimulacije, uključujući i nastanak AMPA-receptorski posredovanog EPSP. Bitan mehanizam jest i depresija GABA-sinaptičke inhibicije (Slika 2). Taj aktivni proces je posredovan putem  $GABA_B$  autoreceptora. Spomenuta redukcija inhibicije doprinosi depolarizaciji i dodatno reducira stupanj  $Mg^{2+}$  bloka (5,14,53). Ovako izazvana sinaptička transmisija je dugotrajna. Značaj opisanih procesa je u tome što se gotovo jednake promjene sinaptičke aktivnosti neurona pojavljuju u hipokampusu tijekom učenja.



Sl.2. Visokofrekventna sinaptička transmisija: uloga NMDA receptora u indukciji LTP.

Dokazano je da se indukcija LTP može prevenirati različitim NMDA antagonistima (Tablica 2), uključujući one koji djeluju na razini NMDA receptora (npr. APV); NMDA kanala (MK-801), alosteričkog glicinskog mjesta (HA-966) ili poliaminskog veznog mjesta (ifenprodil) (126).

	<u>Ekscitatorni aminokiselinski receptori</u>	
	NMDA	ne-NMDA
<u>Specifični antagonisti</u>		
-NMDA receptor	APV, CPP, CGS-19775	CNQX, DNQX
-NMDA kanal:	MK-801, PCP, ketamin	
-glicinsko vezno mjesto	HA-966	
-poliaminsko vezno mjesto	ifenprodil	
<u>Nespecifični antagonisti</u>	DGG	DGG
	kinurenat	kinurenat

**Tablica 2. Specifični i nespecifični antagonisti ekscitatornih aminokiselinskih receptora. APV, (d-2-amino-5-fosfonovalerat); CPP, (2-karbo-ksipiperazin-4-propil-1-fosfonat); HA-966, (1-hidroksi-3-amino-pirolidon-2); MK-801, (5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo-ciklohepten-5,10-imin); PCP, (fenciklidin); CNQX, (6-nitro,7-cianokvinoksalin-2,3-dion); DNQX, (6,7-dinitro-kvinoksalin-2,3-dion); DGG, (c-d-glutamilglicin).**

Zanimljiva je uloga i metabotropnog glutaminergičkog (mGlu) receptora, obzirom na činjenicu da njegovi specifični antagonisti AP4 i 2-amino-3-fosfonobutirat (AP3) reduciraju trajanje LTP. Druga indikacija za



pretpostavku da bi ovi receptori mogli biti uključeni u generiranje LTP, proizlazi iz nalaza da ACPD, specifični agonist mGlu receptora, povećava tetanički induciranu potencijaciju što povećava odgovore hipokampalnih neurona prema NMDA receptorima (53,126,128).

#### 1.2.1.1.2. Uloga iona kalcija

U brojnim je studijama pronađeno da se indukcija LTP može blokirati intracelularnom injekcijom kalcijeva ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kelata što ukazuje na ulogu  $\text{Ca}^{2+}$  signala u procesu indukcije sinaptičke potencijacije (14,69). Obzirom da su NMDA kanali propusni za  $\text{Ca}^{2+}$  smatra se da otvaranje spomenutih kanala i njihova propusnost za vrijeme tetaničke stimulacije, osigurava signal neophodan za indukciju LTP upravo utokom  $\text{Ca}^{2+}$ . Postoje također indikacije da je utok  $\text{Ca}^{2+}$  kroz NMDA kanale pojačan otpuštanjem istog iona iz intracelularnih rezervi. Naime, kalcijaska struja, udružena sa sinaptičkom aktivacijom NMDA receptora, bitno je reducirana u prisutnosti rianodina ili tapsigargina, tvari koje inhibiraju otpuštanje intracelularnog kalcija ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ). Dokazano je da i dandrolen (djeluje preko rianodinskih receptora) inhibira indukciju LTP (53,69). Čini se također da su i inositol 1,4,5 trifosfat ( $\text{IP}_3$ ), koji nastaje kao rezultat aktivacije mGlu receptora, kao i ekstracelularni kalcij ( $\text{Ca}^{2+}_e$ ), koji prolazi kroz NMDA kanale, uključeni u otpuštanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz intracelularnih rezervi (14). Štoviše, depolarizacija nastala aktivacijom NMDA receptora potiče otvaranje voltažno ovisnih kalcijevih (VOK) kanala koji predstavljaju značajan put utoka  $\text{Ca}^{2+}_e$  u intracelularni prostor. Iako je jasno da je  $\text{Ca}^{2+}$  neophodan faktor u procesu indukcije sinaptičke potencijacije, nejasno je ipak da li je porast koncentracije postsinaptičkog kalcija dovoljan stimulus za indukciju LTP. Na temelju raspoloživih dokaza, smatra se da je  $\text{Ca}^{2+}_e$ , koji prolazi kroz NMDA kanale, neophodan za osiguranje kratkotrajnog signala bitnog za indukciju LTP, te da je taj signal vrlo vjerojatno pojačan otpuštanjem  $\text{Ca}^{2+}$  iz intracelularnih rezervi.

### 1.2.1.2. Pojačanje i iskazivanje sinaptičke plastičnosti

Smatra se da pojačanje (amplifikacija) sinaptičkog odgovora nakon perioda indukcije može biti posljedica:

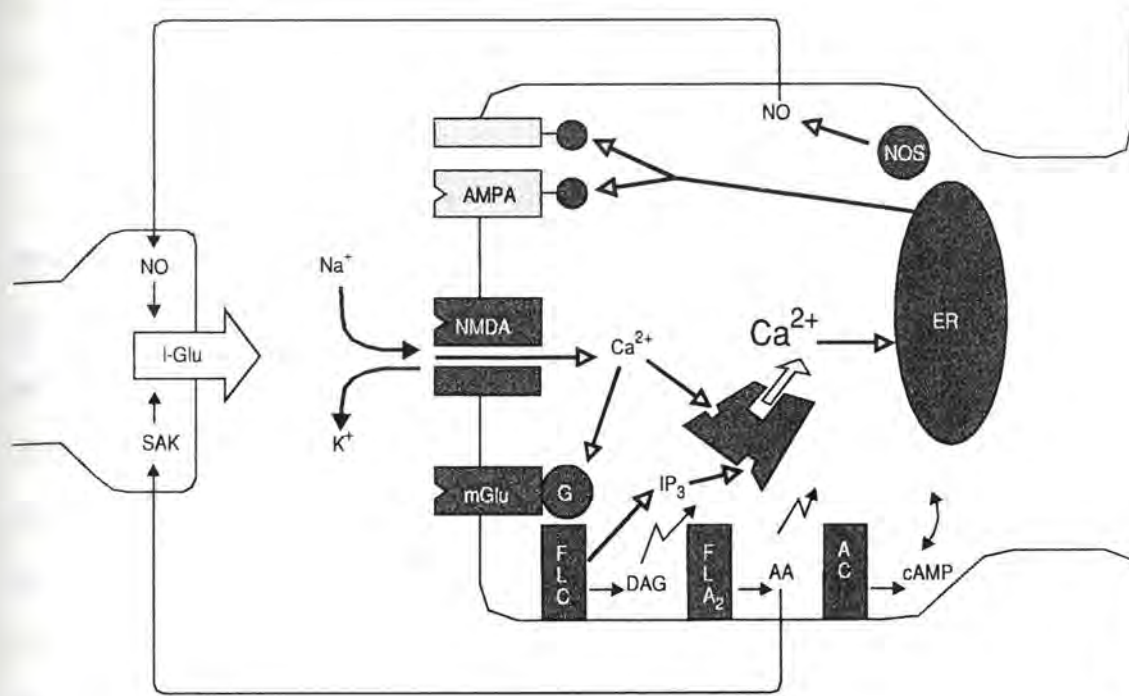
- a) presinaptičkih promjena koje rezultiraju povećanjem količine otpuštenog I-Glu po podražaju,
- b) postsinaptičkih promjena, kao što je povećanje broja receptora ili mijenjanje njihovih funkcionalnih osobitosti,
- c) ekstrasinaptičkih promjena, kao npr. redukcija preuzimanja I-Glu pomoću glia stanica što dovodi do povećanja raspoloživosti neurotransmitora prema receptorima, te
- d) morfoloških promjena trnastih nastavaka dendrita (14,18,31).

Od spomenutih najznačajniju ulogu imaju postsinaptički i presinaptički mehanizmi.

#### a) postsinaptičko pojačavanje

Osnovu postsinaptičke amplifikacije čini aktivacija mGlu receptora (Slika 3). Spomenuti receptori putom G proteina aktiviraju 1.) fosfolipazu C (FLC), koja katalizira nastanak  $IP_3$  i 1,2-diacilglicerola (DAG); 2.) fosfolipazu  $A_2$  ( $FLA_2$ ) uz posljedičnu produkciju slobodne arahidonske kiseline (SAK) te 3.) adenilat ciklazu (AC) čijom razgradnjom nastaje ciklički 3,5 adenozinmonifosfat (cAMP). Inicijalni kalcijski signal pojačava se i otpuštanjem  $Ca^{2+}$  s  $Ca^{2+}/IP_3$  osjetljivih intracelularnih organela (dominantno endoplazmatskog retikuluma, ER). Tako pojačani signal u suradnji s aktivatorima protein kinaza (PK) (cik-cak strelice), dovodi do fosforilacije strukturnih proteina, uključujući vjerojatno i AMPA i NMDA receptore što dodatno povećava njihovu propusnost za  $Ca^{2+}$  (31,54).





**Sl.3. Uloga I-Glu u aktivaciji niza presinaptičkih i postsinaptičkih mehanizama uključenih u procese formiranja LTP-a. NO, dušički oksidul; NOS, dušički oksidul sintetaza; mGlu, metabotropni glutamerni receptori; G, protein G; FLC, fosfolipaza C; IP<sub>3</sub>, inozitol 1,4,5-trifosfat; DAG, 1,2-diacilglicerol; FLA<sub>2</sub>, fosfolipaza A<sub>2</sub>; SAK, slobodna arahidonska kiselina; AC, adenilat ciklaza; ER, endoplazmatski retikulum.**

### b) presinaptičko pojačavanje

Čini se da postoje intercelularni signali koji se otpuštaju s postsinaptičkog mjesta indukcije te potenciraju na određeni način porast otpuštanja neurotransmitora s presinaptičkog terminala. Ulogu tzv. retrogradnih glasnika, po nekima imaju proteinske molekule (54,98). Dokaz za to je značajan porast sadržaja proteina u hipokampalnom perfuzatu koji prati LTP.

Retrogradni glasnik je moguće i SAK mozga (Slika 3). Spomenuta nezasićena masna kiselina zadovoljava nekoliko kriterija za ulogu retrogradnog glasnika:

a) otpušta se iz kulture neurona u ekstracelularni medij aktivacijom NMDA receptora,



b) nakon indukcije LTP postoji porast postsinaptičke raspoloživosti SAK, te  
c) inhibitori  $FLA_2$  enzima koji oslobađa SAK iz fosfolipida, blokiraju indukciju LTP (28,53).

Potencijalno mjesto djelovanja SAK uključuje ne samo presinaptički završetak, gdje stimulira otpuštanje I-Glu, nego i glia stanice gdje inhibira preuzimanje I-Glu, te postsinaptičke stanice gdje npr. pojačava učinak stimulacije NMDA receptora.

Treća mogućnost je dušički oksidul (NO) (14,54). I on se kao i SAK otpušta iz kulture neurona, izložene escitotoksinu, N-metil-D-aspartatu. Postoje kontroverzni podaci o ulozi NO, od dokaza da ne utječe na indukciju LTP, do činjenice da se inhibitorima NO sintetaze može postići blok LTP.

Alternativna mogućnost u kontroli aktivnosti postsinaptičke neurotransmisije je promjena aktivnosti ekstracelularnih iona, npr. iona kalija ( $K^+$ ). On se otpušta s postsinaptičke stanice za vrijeme tetaničke stimulacije, u stupnju koji djelomično ovisi o aktivnosti NMDA receptora. To može osigurati signal do presinaptičkog terminala kroz interakciju sa presinaptičkim mGlu receptorom. Smatra se naime da je vezivanje tih receptora i FLC snažno potencirano s ekstracelularnim  $K^+$  (14).

Cilj opisanih biokemijskih kaskadnih reakcija pokrenutih utokom  $Ca^{2+}$  kroz NMDA i VOK kanale jeste trajni porast sinaptičke efikasnosti kao osnove dugotrajne memorije.

U ovom poglavlju su opisane celularne i molekularne osnove LTP u hipokampusu, povezane s aktivnošću ekscitatornog neurotransmitora kao što je I-Glu. Međutim, vrlo je teško tako složen proces kao što je pamćenje pripisati aktivnosti samo jednog neurotransmitorskog sustava. Naime, poznato je da postoje brojne međusobne interakcije različitih prijenosnika živčanih podražaja u središnjem živčevlju (221). U spomenutom kontekstu, uloga kolinergičke neurotransmisije je od izuzetnog značaja.

### 1.2.1.3. Uloga kolinergičkog neurotransmitorskog sustava

Još 1966.g. su Deutsch i sur. (50) pretpostavili da se promjene aktivnosti kolinergičkog neurotransmitorskog sustava manifestiraju poremećajem sposobnosti učenja i pamćenja. Štoviše, učinili su niz eksperimenata kako bi dokazali da su kolinergičke sinapse direktno uključene u proces učenja te da su upravo one specifične "sinapse memorije". U skladu s tim postavkama, posljednjih dvadesetak godina, intenzivno se proučava uloga kolinergičke neurotransmisije i centralne kolinergičke sinapse u procesima učenja i pohranjivanja znanja (9,43,50). Većina dosadašnjih saznanja temelji se na brojnim farmakološkim ispitivanjima koja su nedvojbeno pokazala da promjena tonusa kolinergičke neurotransmisije može prouzročiti poremećaj spoznajnih procesa i memorije, te da amnestički odnosno anti-amnestički učinak može biti posljedica aplikacije kolinergičkih antagonista odnosno agonista (29,50). Budući da specifični kolinergički neurotoksin ne poznajemo, pretežit broj istraživanja temelji se na elektrolitičkim i/ili ekscitotoksičnim lezijama centralnih kolinergičkih jezgara. Naročit interes je usmjeren prema kolinergičkim septo-hipokampalnim putovima, te nucleus basalis Maynerti (NBM)-kortikalnim putovima. Uloga hipokampusa u procesu pohranjivanja znanja je poznata. Zna se također da je spomenuta struktura bogato kolinergički inervirana upravo preko septo-hipokampalnih putova. Stoga, neuralna funkcija ovih struktura direktno ovisi o ušćuваноj aktivnosti kolinergičke neurotransmisije (137,149). Gray i McNaughton (76) su pokazali da lezija bilo septuma bilo hipokampusa značajno smanjuje sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u eksperimentalnih životinja. Također je ustanovljeno da lezije spomenutih struktura dovode do značajnih poremećaja ponašanja u smislu promjene emocionalnog odgovora, gubitka inhibitornih impulsa u ponašanju, poremećaja konsolidacije memorije, voljnog kretanja itd. U novije vrijeme interes je dominantno usmjeren ka ispitivanju uloge NBM-kortikalnih putova u spoznajnim procesima. Tako su npr. neuropatološka istraživanja u



bolesnika s demencijom Alzheimerova tipa pokazala da je kolinergička hipofunkcija u humanom neokorteksu odgovorna za poremećaje memorije i spoznaje (43,150). Naime, u korteksu i u hipokampusu pacijenata umrlih od Alzheimerove bolesti dokazan je značajan gubitak presinaptičkih kolinergičkih markera. Spomenuti deficit centralne kolinergičke inervacije vidljiv je, ali u smanjenom opsegu, i tijekom starenja što može biti jedno od mogućih objašnjenja spoznajnog deficita koji prati takva stanja (10). S ciljem što bližeg sagledavanja ovih relacija, učinjene su studije na različitim animalnim modelima u smislu ekscitotoksičnih lezija septo-hipokampalnih odnosno kortikalnih neurona, te su praćene promjene sposobnosti učenja i pamćenja. Ustanovljeno je da lezija i septo-hipokampalnih putova kao i bilateralna lezija NBM izravno remeti spoznajne aktivnosti, poglavito prostornu memoriju (engl. "spatial memory"). Promjene ponašanja uslijed lezija spomenutih struktura nisu identične, što vodi pretpostavci o njihovim različitim funkcionalnim ulogama u procesu memorije. Tako je Dunet (49) usporedio učinke lezije NBM sa lezijama fimbria-forniksa (F-F) u štakora. Zaključio je da lezije F-F, koje uključuju kolinergičke aferencije prema hipokampusu, uzrokuju deficit STM, dok lezije kortikalnih kolinergičkih projekcija uzrokuju oštećenja LTM. Postoje međutim i druge komparativne studije s posve suprotnim interpretacijama dobivenih rezultata (29), tako da do danas još nisu usaglašeni stavovi o ulozi spomenutih kolinergičkih struktura u različitim tipovima memorije.

Neurokemijske studije su pokazale da nakon učenja postoje značajne promjene aktivnosti acetilkolin transferaze, razine acetil kolina (ACh) te porast  $\text{Na}^+$ -ovisnog kolinskog preuzimanja u hipokampusu. Međutim, relativno je malo podataka u svezi stanja aktivnosti kortikalnih kolinergičkih završetaka, a još manje komparativnih studija o stanju aktivnosti septo-hipokampalnih i NBM-kortikalnih neurona tijekom učenja. Wenk i sur. (222) su usporedili veličinu preuzimanja kolina u hipokampusu i korteksu nakon izlaganja životinja različitim eksperimentalnim zadacima (učenju). Rezultati su pokazali



postojanje dugotrajnog porasta hipokampalne kolinergičke aktivnosti koja je simultano praćena s blagim padom aktivnosti kolinergičkih kortikalnih neurona. Nasuprot tome, Touman i sur. (213) su pronašli značajnu kolinergičku aktivnost i u hipokampusu i korteksu, s tom razlikom da je kortikalna aktivnost perzistirala duže vrijeme (3 sata) u odnosu na hipokampalnu, te da se vratila na normalu u obje regije unutar 24 sata.

Značajna uloga NMDA receptora u indukciji LTP prvi put je dokazana upravo u području CA<sub>1</sub> regije hipokampusa (31). Gustoća NMDA receptora ekstremno je visoka u CA<sub>1</sub> regiji, dok je značajno niža u CA<sub>3</sub> regiji i girus dentatus-u, a vrlo niska u stratum lucidum-u (gdje dominiraju kainatni receptori). Pokazalo se da intracerebroventrikularna (i.c.v.) aplikacija NMDA agonista selektivno smanjuje sposobnost izvođenja prostorne memorije. Zanimljivo je da je taj isti model učenja izrazito osjetljiv na lezije hipokampusa općenito (76), a osobito na poremećaj septo-hipokampalne kolinergičke ravnoteže. Stoga se smatra da mjesta sinaptičkih završetaka septo-hipokampalnih kolinergičkih putova koincidiraju s NMDA receptorskim bazenom na dendritima piramidnih stanica. To ukazuje na moguću funkcionalnu interakciju između muskarinskih (M) i NMDA receptora u indukciji i/ili održavanju LTP-a u CA<sub>1</sub> regiji hipokampusa.

U tom kontekstu postavlja se pitanje funkcionalnog značenja sinaptičke potencijacije u različitim tipovima memorije (kratkotrajna odnosno dugotrajna memorija). Poznato je da je promjenama pod utjecajem različitih amnestičkih faktora podložna upravo fleksibilna, kratkotrajna memorija. Nadalje, hipotezi koja pretpostavlja dugotrajan engram, ne ide u prilog činjenici da LTP nema neograničeno trajanje te da prethodno naučeno nije pogođeno ablacijom hipokampusa. Tako u biti LTP fenomen u hipokampusu pretstavlja samo manifestaciju privremenog stanja, prije transfera u (najvjerojatnije) kortikalnu regiju i pohrane u formi tzv. "dugotrajnog engrama". Osim toga, još uvijek nije direktno i jasno pokazano da učenje samo po sebi inducira LTP. Ipak, Jaffard i Jenett (96) su dokazali postojanje dugotrajnog pojačanja sinaptičke aktivnosti

u CA<sub>1</sub> regiji miša nakon eksperimenata učenja. Vremenski, taj fenomen korespondirao je s promjenama u aktivnosti septo-hipokampalnog kolinergičkog neurona. Štoviše, porast septo-hipokampalne kolinergičke aktivnosti "in vivo", uzrokuje posljedični porast ekscitabilnosti CA<sub>1</sub> piramidnih stanica u miševa. Na temelju navedenih saznanja pretpostavlja se da su hipokampalne kolinergičke sinapse značajne za kontrolu privremene aktivnosti piramidnih stanica. Pretpostavlja se da septo-hipokampalni kolinergički mehanizmi imaju značajnu ulogu u razvoju i/ili supresiji ponašanjem induciranih procesa LTP. Po toj shemi, svi testirani tipovi memorije induciraju aktivaciju ascendentnih kolinergičkih putova. To osigurava val depolarizacije potreban za razvoj procesa dugotrajne potencijacije kao supstrata dugotrajne pohrane informacija. Alternativno, kontinuirani kolinergički signal osigurava mehanizme "održavanja" putem postsinaptičkih sekundarnih glasnika, dominantno utokom kalcijevih iona, izmjenom fosfoinozitida i sl. Ova faza održavanja korespondira s faziom konsolidacije, za vrijeme koje se memorija transferira u mnogo stabilniji (kortikalni) oblik.

### 1.3. CEREBRALNA HIPOKSIJA I ISHEMIJA

Cerebralne stanice su postmitotičke. One naime, ne posjeduju sposobnost razmnožavanja (189). Stoga su oštećenja mozga bez obzira na podrijetlo, karakterizirana trajnim promjenama i rezultiraju neurološkim ispadima. Budući da ishemija i hipoksija predstavljaju vrlo čest patofiziološki uzrok moždanog oštećenja, predmet su intenzivnog eksperimentalnog istraživanja. Ishemija je karakterizirana značajnom redukcijom ili kompletnom blokadom protoka krvi. Hipoksija je stanje praćeno sniženom razinom kisika u arterijskoj krvi. Za vrijeme hipoksije krv i dalje cirkulira mozgom i može ukloniti



nakupljene metabolite. Međutim, kao sistemski inzult, pogađa i kardiovaskularne funkcije te izaziva sekundarnu ishemiju. Stoga su spomenuta stanja i posljedične patofiziološke promjene međusobno usko povezane (32).

Obzirom na visoku metaboličku aktivnost te vrlo niske "rezerve" kisika i visokoenergetskih fosfata i karbohidrata mozak je vrlo osjetljiv na hipoksično/ishemična oštećenja. Dokazano je naime, da već unutar nekoliko minuta od razvoja snažnog hipoksično-ishemičnog oštećenja započinje selektivna degeneracija određene populacije neurona, uključujući piramidne stanice CA<sub>1</sub> regije hipokampusa, mediodstriatalne i neokortikalne neurone (slojevi 3,5 i 6), te cerebelarne Purkinjeove neurone. Selektivnu vulnerabilnost određenih moždanih neurona uslijed hipoksično/ishemičnog oštećenja prvi put su opisali Vogt i Vogt još 1937. godine (183). Prema njihovom mišljenju, koje su mnogi kasnije prihvatili i dopunili, osnov navedenog oštećenja čini energetski kolaps stanice nastao uslijed poremećene cirkulacije i smanjene opskrbe kisikom. Međutim, spomenuta ideja da je cirkulatorni kolaps i pad energetske produkcije direktno odgovoran za smrt neurona u kontradikciji je s novijim istraživanjima. Naime, Hossman i Zimmermann (93) su dokazali da, ukoliko postoje optimalni uvjeti za oporavak, većina neurona može "preživjeti" period kompletne ishemije uz vrlo niske vrijednosti fosfokreatina i adenzin trifosfata (ATP), u trajanju od čak 30-60 min. Štoviše, pokazano je da farmakološka redukcija cerebralnog metabolizma barbituratima nema značajnije neuroprotektivno djelovanje u eksperimentalnoj odnosno kliničkoj ishemiji. Noviji dokazi sugeriraju da je tzv. "parenhimatozni" pristup tumačenja patofizioloških mehanizama i ispitivanje mogućeg farmakoterapijskog djelovanja znatno cjelovitiji od dosadašnjeg "cerebrovaskularnog" pristupa. Naime, uz uvažavanje značenja poremećaja cerebralne cirkulacije i energetskog metabolizma u oštećenju neurona, spomenuti pristup se bazira dominantno na praćenju promjena ekscitatornih sinaptičkih mehanizama mozga.

Patogenetsku vezu hipoksičnog neuronalnog oštećenja, sa sinaptičkom transmisijom su intenzivno istraživali Kass i Lipton (100), te Rothman (184). Oni su ustanovili da povećanje razine ekstracelularnih iona  $Mg^{2+}$  smanjuje vulnerabilnost hipokampalnih neurona prema anoksičnom oštećenju "in vitro". Pažnja je zatim usmjerena na I-Glu posredovanu sinaptičku transmisiju. Dokazano je da antagonisti I-Glu (poglavito NMDA tipa) reduciraju oštećenje stanice u "in vitro" (171,172) i "in vivo" (127,180) modelima cerebralne hipoksije i ishemije, hipoglikemije, prolongiranih epileptičkih napada te mehaničkih trauma (128,147,161). Štoviše, hipoteza da je neurotoksičnost I-Glu temelj patogeneze hipoksično/ishemičnog neuronalnog oštećenja, povezala je dvije prethodne postavke: a) ideju Van Harrevalda i Hansena (84) da su elektrofiziološke promjene koje prate hipoksiju slične onima u širećoj neuronalnoj depresiji (engl. "spreading depression"), fenomenu koji je vrlo vjerojatno posredovan stimulacijom NMDA receptora, te b) ideju Kirina (104) i Pulsinellija (169) da je selektivno neuronalno oštećenje nakon hipoksičko-ishemičnog inzulta aktivan proces koji postaje evidentan tek nakon odgode od 48-72 sata. Nadalje, pretpostavka da je neurotoksičnost I-Glu posredovana utokom  $Ca^{2+}_e$  u stanicu i formiranjem slobodnih radikala, upotpunjuje prethodna saznanja o uključenosti  $Ca^{2+}$  i slobodnih radikala u patogenezu hipoksičnog oštećenja neurona (64,70). Poznato je također da različiti neurotransmitorski sustavi, pored onih posredovanih aktivnošću I-Glu, mogu dodatno doprinjeti hipoksičnom oštećenju (182). Tako npr. stimulacija adenzinskih  $A_1$  receptora reducira hipoksično oštećenje neurona "in vitro" i "in vivo" (17,114) dok adenzinski antagonisti povećavaju oštećenje. Dokazan je također i pad kolinergične neurotransmisije u hipoksičkom mozgu (191). Utvrđeno je i da toksične lezije lokus ceruleusa pogoršavaju hipokampalno i kortikalno oštećenje mozga, dok administracija smjese adrenalina i noradrenalina poboljšava stanje (154).



### 1.3.1. POREMEĆAJ NEUROTRANSMISIJE

Na temelju brojnih istraživanja, može se zaključiti da je poremećaj homeostaze različitih neurotransmitorskih sustava vrlo bitan faktor u patogenezi neuronalnog (hipokampalnog) oštećenja. Trenutno, dominirajući koncept hipoksično/ishemične lezije predstavlja "ekscitotoksična" hipoteza koja se dominantno odnosi na oštećenje CA<sub>1</sub> regije hipokampusa, uzrokovano ekscitacijskim neurotransmitorom tj. l-Glu. Međutim, hipokampalni neuroni su povezani međusobno i s drugim dijelovima mozga lancem ekscitacijskih sinapsi. Npr. granularne stanice girus dentatusa primaju podražaj s entorinalnog korteksa, a one same pak šalju ekscitatorne aksone (engl. "mossy fibres") prema CA<sub>3</sub> regiji hipokampusa. CA<sub>3</sub> neuroni odašilju pak svoje aksone (Schafferove kolaterale) do CA<sub>1</sub> neurona. Tako se u stvari vulnerabilni CA<sub>1</sub> neuroni nalaze na kraju trisinaptičkog lanca ekscitatornih sinapsi. Dodatne aferentne veze preme hipokampusu uključuju komisuralne niti i subkortikalne projekcije koje povezuju i druge neurotransmitorske sustave, dominantno kolinergički (2,3).

#### 1.3.1.1. Neurotoksičnost glutamata

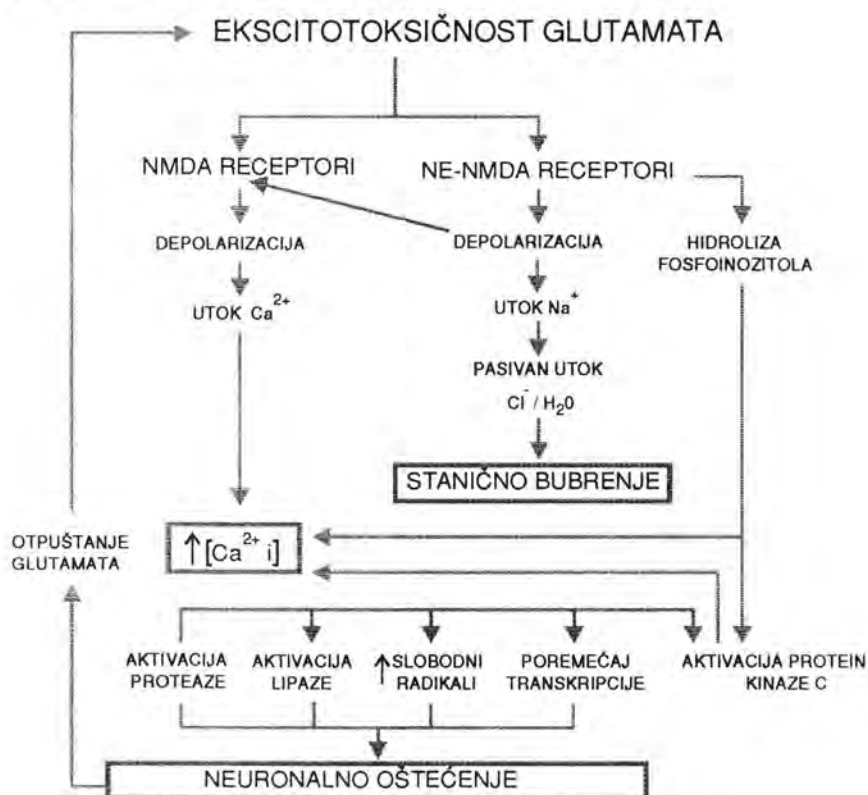
Originalna verzija hipoteze o hipoksično/ishemičnom neuronalnom oštećenju (poglavito u području hipokampusa) koju su formulirali Olney i sur. (148) bazira se na slijedećim postavkama: a) povećanoj razini ekstracelularnog l-Glu za vrijeme hipoksično-ishemičnog inzulta; b) visokoj koncentraciji NMDA receptora u području vulnerabilne CA<sub>1</sub> regije hipokampusa; c) pojačanom izbijanju CA<sub>1</sub> neurona 7-10 sati nakon ishemije, te d) protektivnom učinku kompetitivnih i ne-kompetitivnih NMDA antagonista u području CA<sub>1</sub> regije hipokampusa nakon akutne hipoksije ili ishemije. Tako je u "in vitro" eksperimentima redukcija CA<sub>1</sub> oštećenja postignuta korištenjem antagonista



kao što su: APV, CPP, CGS 19755, dekstrorfan, ketamin, kinurenička kiselina, MK-801, PCP, riluzol, ifenprodil itd. (195,208). Dokazano je da se razina l-Glu vraća na fiziološke vrijednosti unutar 30 min nakon hipoksično/ishemične lezije (82). Međutim, hiperaktivnost uz posljedično funkcionalno oštećenje bilježi se tek nekoliko sati kasnije, dok morfološke promjene postaju u cijelosti manifestne tek nekoliko dana (7 dana) po ishemičnom oštećenju (104). Rader i Lankors (171,172) su dokazali postojanje dva glavna puta ekscitotoksičnosti l-Glu u hipoksičnim uvjetima (Slika 5):

1) akutno "bubrenje" (engl. "swelling") neurona uslijed depolarizacijom uvjetovanog utoka  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i vode. Spomenuti proces odvija se putem aktivacije ionotropnih, ne-NMDA receptora (kainatni i AMPA receptori). Proces je reverzibilan ukoliko se ekscitotoksin ukloni iz medija;

2) odgođenu neuronalnu dezintegraciju uvjetovanu masivnim influksom  $\text{Ca}^{2+}_e$ , dominantno putem aktivacije ionotropnog NMDA receptor-kanal kompleksa. Spomenuti proces može pokrenuti niz biokemijskih reakcija koje vode daljnjoj neuronalnoj dezintegraciji.



Sl.4. Shematski prikaz mehanizama neurotoksičnosti glutamata

Prema analogiji zbivanja tijekom LTP, neurotoksičnost I-Glu i promjene koje se posljedično zbivaju mogu se također podijeliti u nekoliko faza: početak te pojačavanje i iskazivanje.

#### 1.3.1.1.1. Početak neurotoksičnosti

Osim stimulacije spomenutih ionotropnih ne-NMDA i NMDA receptora, I-Glu aktivira i mGluR (53,86). To ima za posljedicu aktivaciju PLC i hidrolizu fosfatidilinozitol 4,5 bifosfata ( $PIP_2$ ) u sekundarne glasnike:  $IP_3$  i diacilglicerol (DAG) (47,118), koji dodatno povećavaju propusnost membrane za  $Ca^{2+}$ . Na taj način, uslijed pretjerane stimulacije bilo ionotropnih, bilo metabotropnih Glu receptora, dolazi do intracelularnog gomilanja  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $H_2O$ ,  $IP_3$  i DAG kao i smanjenja razine  $K^+$ . Iako su sve ove promjene potencijalno letalne za stanicu, dokazano je da gotovo svi kortikalni neuroni "osuđeni" na smrt nakon pretjerane aktivacije I-Glu, mogu biti "spašeni" 20-minutnom inkubacijom u otopini bez  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  (124,138,189). Vjerojatno se tim tretmanom postiže povrat  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  u ekstracelularni prostor, prije manifestiranja ireverzibilnih toksičnih oštećenja. Zaključeno je stoga da su rane, akutne postishemične promjene uglavnom reverzibilne i neselektivne tj. zahvaćaju  $CA_1$  regiju jednako kao i  $CA_2/CA_3$  neurone hipokampusa. Međutim, dokazano je da u populaciji selektivno osjetljivih neurona reverzibilna promjena može biti transformirana u ireverzibilnu (53,139,183).



### 1.3.1.1.2. Pojačanje i iskazivanje neurotoksičnosti

U ovom periodu slijedi niz događanja koji povećavaju intenzitet početnog oštećenja i šire ekscitotoksični podražaj na druge neurone. Prvo, početni utok  $Ca^{2+}_e$  putem NMDA i mGlu receptora, znatno se povećava otvaranjem VOK kanala, dominantno L tipa (53,88). Nadalje, aktivnošću  $IP_3$  inducira se otpuštanje  $Ca^{2+}$  iz intracelularnih rezervi (88). Drugo, stimulacija glutaminičkih receptora i porast razine  $Ca^{2+}_i$  aktivira nekoliko enzimskih skupina, uključujući FKC, kalmodulinom regulirane enzime, odnosno kalpaine i fosfolipaze. Promjene aktivnosti spomenutih enzimskih sustava dovode do povećanog otpuštanja l-Glu (106,108), smanjenja preuzimanja (engl. "uptake") l-Glu (53,91), potencijacije postsinaptičkog odgovora (53,94), dodatnog povećanja protoka i propusnosti VOK kanala za ione  $Ca^{2+}$  te redukcije inhibitorne  $GABA_A$  receptorske funkcije (171,172,189). Treće, povećana neuronalna aktivnost, uz toničku depolarizaciju, akumulaciju  $Ca^{2+}$  i oštećenje stanične membrane uzrokuje i sekundaran utok endogenog l-Glu iz presinaptičkih rezervi te kontinuiranu stimulaciju glutaminičkih receptora (53,216). Postoje radovi koji potvrđuju da je i u ovoj fazi moguće antagonistima NMDA receptora reducirati neuronalno oštećenje i smrt stanice (53,171,172).

Stadij iskazivanja karakteriziraju završna zbivanja odgovorna za ireverzibilnu dezintegraciju stanice, najvjerojatnije posredovanu izrazitim porastom  $Ca^{2+}_i$  (218,219). To dodatno aktivira brojne enzime, uključujući lipolitičke (lipaze i fosfolipaze) i proteolitičke (kalpaine i druge kalcij ovisne proteaze). Aktivacijom lipolitičkih enzima, otpušta se SAK iz fosfolipida neuronalne membrane. Ona pokreće kaskadnu aktivnost koja posljedično dovodi do sinteze prostaglandina, leukotriena i tromboksana. Kaskadna aktivnost SAK potencira također formaciju slobodnih radikala i lipidnih hidroperoksida. Ovi posljednji inhibiraju reacidaciju fosfolipida neuronalne membrane. Spomenuta je inhibicija bitan mehanizam, jer peroksidativni procesi doprinose ireverzibilnom

oštećenju i smrti neurona. Osim toga, aktivacija proteolitičkih enzima, uzrokuje raspad stanične arhitekture i izrazita stanična oštećenja (178). Dokazano je naime, da izlaganje hipokampalnih neurona ekscitotoksinu (npr. NMDA) uzrokuje degradaciju spektrina i MAP<sub>2</sub> proteina. Aktivacija citosolne proteaze, npr. kalpaina, inducira konverziju ksantindehidrogenaze do ksantinoksidaze i time doprinosi produkciji slobodnih radikala (53,120,141). Aktivacijom FKCB, katalizira se fosforilacija brojnih proteina sinaptičke membrane, čime se dodatno remeti otpuštanje neurotransmitora, razina aktivnosti Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> izmjenične pumpe te regulacija otvaranja i zatvaranja kalcijevih kanala (NMDA i VOK tipa) (53,189).

Zaključno, pretjerana stimulacija ekscitatornih receptora I-Glu u fazi ekspresije, uzrokuje 1) masivan utok Ca<sup>2+</sup><sub>e</sub>, dominantno putem NMDA i VOK kanala, te 2) akumulaciju SAK, slobodnih radikala i lipidnih peroksida koji nastaju kao rezultat degradacije fosfolipida neuronalne membrane.

#### 1.3.1.1.2.1. Uloga arahidonske kiseline u neuronalnom oštećenju

Porast koncentracije Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> uvjetuje aktivaciju FLA<sub>2</sub> i FLC, razgradnju membranskih fosfolipida te posljedično navedenom otpuštanje slobodnih masnih kiselina (SMK), poglavito SAK (23). U fiziološkim uvjetima membranski se fosfolipidi obnavljaju serijom energetski ovisnih procesa. Na taj način fiziološka razina fosfolipida stanične membrane ostaje nepromijenjena, a intracelularna se koncentracija SMK održava niskom. U hipoksičnom živčanom tkivu energetske rezerve su osiromašene, pa se razina membranskih fosfolipida smanjuje, a koncentracija SMK raste. Obje promjene također su uključene u proces ireverzibilnog oštećenja stanica. Naime, gubitak membranskih fosfolipida remeti ravnotežu između membranskih proteina i preostalih lipida uz drastično povećanje membranske permeabilnosti (osobito za Ca<sup>2+</sup>). Farber i sur. (52) smatraju da upravo porast Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> onemogućava



oporavak poremećenih mitohondrijskih funkcija stanice. Povišene vrijednosti SMK primarno oštećuju strukturu stanične membrane, a dodatni potencirajući toksični faktor je i akumulacija njihovih metabolita u stanici. Tako je npr. arahidonska kiselina prekursor niza eikosanoida (prostaglandina, tromboksana i leukotriena) od kojih svaki doprinosi celularnom oštećenju stanice.

#### 1.3.1.2. Poremećaj aktivnosti kolinergičke neurotransmisije

U brojnim "in vivo" i "in vitro" pokusima dokazano je da različite vrste hipoksije (histotoksična, anemička, hipoksična) reduciraju kolinergički metabolizam, smanjujući otpuštanje ACh iz presinaptičkih završetaka (26). U uvjetima jake hipoksije i anoksije presinaptičko otpuštanje ACh smanjeno je za 87%, a sinteza navedenog neurotransmitora za 77%, dominantno u području hipokampusa (50,68). Naime, dokazano je da hipoksija reducira sintezu i otpuštanje ACh u regijama u kojih je spomenuti proces ovisan o  $Ca^{2+}$  (71), a to se poglavito odnosi na hipokampalnu formaciju. Obzirom na ulogu hipokampusa u spoznajnim procesima, jasno je da je inhibicija kolinergičke aktivnosti praćena promjenama ponašanja i poremećajem sposobnosti učenja i pamćenja. S druge strane, dokazano je da hipoksija nema utjecaja na sintezu i/ili otpuštanje ACh u onim regijama u kojima spomenuti proces ne ovisi o  $Ca^{2+}$  kao što je npr. septalna formacija. Dokaz o značenju homeostaze  $Ca^{2+}$  u procesima sinteze i otpuštanja ACh pružili su Gibson i sur. (71). Oni su redukcijom koncentracije  $Ca^{2+}_e$  s 1.3 na 0.1 mM značajno smanjili učinke hipoksije na otpuštanje ACh. Naime, hipoksija smanjuje presinaptičko preuzimanje  $Ca^{2+}$  (50,159). Smatra se da to paralelno vodi redukciji otpuštanja ACh (50,142). Ukoliko se "in vitro" stimulira presinaptičko preuzimanje  $Ca^{2+}$  npr. 4-aminopiridinom, hipoksijom uvjetovani deficit otpuštanja ACh bitno je smanjen. Štoviše, "in vitro" administracija 4-aminopiridina popravljiva hipoksijom uvjetovan poremećaj sinteze ACh i poremećaje ponašanja.

### 1.3.2. POREMEĆAJ CEREBRALNE CIRKULACIJE

U većini eksperimentalnih modela cerebralne hipoksije/ishemije zabilježeno je smanjenje cerebrovaskularnog protoka za 5-10% u odnosu na kontrolne vrijednosti (204). Interesantno je da je krvni protok najinsuficijentniji u području CA<sub>1</sub> regije dorzalnog hipokampusa. Spomenuti podatak u skladu je s činjenicom da je kapilarna mreža, a time i vaskularizacija, najslabija upravo u području spomenute regije hipokampusa, za razliku od CA<sub>3</sub> regije ili pak girus dentatusa. Rani postishemični period karakteriziran je ponovnom, kratkotrajnom uspostavom cirkulacije (recirkulacijom) i posljedičnom hiperemijom. Uslijed nastale vazodilatacije vrijednosti krvnog protoka su znano iznad kontrolnih (170). Međutim, ubrzo nakon hiperemične faze, razina krvnog protoka smanjuje se ispod kontrolnih vrijednosti, uz posljedični razvoj odgođene postishemične hipoperfuzije. Jedan od mogućih razloga jest postishemična disregulacija tonusa glatkih mišića krvnih žila, uz posljedičnu vazokonstrikciju (212). Pravi uzrok nastale promjene nije u potpunosti jasan, premda je dokazano da nastala vazokonstrikcija nije posljedica aktivacije centralnog noradrenergičkog sustava (16). Dodatno, razvija se i perivaskularni edem koji uzrokuje lokalnu kompresiju, a stanice endotela formiraju mikrovile koji otežavaju perfuziju. U fazi hipoperfuzije metaboličke potrebe tkiva su povećane (postishemički hipermetabolizam), dok je adekvatna opskrbljenost još uvijek nedostatna. Razlog tomu jest vjerojatno disproporcija u oporavku energetskeg metabolizma i krvnog optoka moždanog tkiva u hipoksično/ishemičnim uvjetima (72).

### 1.3.3. POREMEĆAJ ENERGETSKOG METABOLIZMA MOZGA

Uslijed hipoksično/ishemičnih poremećaja smanjuje se aktivnost energijom bogatih metabolita ATP-a, adenzin difosfata (ADP-a), fosfokreatina i glukoze



uz posljedičnu akumulaciju laktata i razvoj acidoze (135). Nabrojene promjene događaju se dominantno u području međumozga, uključujući i hipokampus. Dokazano je da je i kratkotrajna, petminutna ishemija dovoljna za metabolički poremećaj u hipokampalnim rezovima (189). Po oporavku cirkulacije energetska aktivnost se ponovno uspostavlja. Ipak, treba proteći određeni vremenski period prije nego li se uspostavi fiziološka razina metaboličke aktivnosti, što znači da je u ranom postishemičnom periodu prisutna relativna energetska insuficijencija (189). U području CA<sub>1</sub> regije hipokampusa, nakon globalne cerebralne ishemije (uzrokovane četverožilnom okluzijom - engl. "four vessel occlusion"), bilježi se sekundarni pad hipokampalnog metabolizma u periodu 24-48 sati nakon recirkulacije, uz odgođenu neuronalnu smrt (190). Mikrokemijska mjerenja energetskih metabolita u CA<sub>1</sub> i CA<sub>3</sub> regiji nakon petminutne ishemije u mongolskih glodavaca (engl. "gerbila"), pokazala su paralelni oporavak u obje regije unutar prvih 48 sati. Potom slijedi sekundarni pad razine fosfokreatinina i ATP-a u CA<sub>1</sub> regiji, paralelno s razvojem morfoloških manifestacija odgođenog neuronalnog oštećenja. Smatra se da za sekundarno smanjenje aktivnosti CA<sub>1</sub> neurona nije odgovoran ili bar ne isključivo poremećaj energetskog metabolizma (189). Metabolizam glukoze je naročito osjetljiv na hipoksično/ishemične poremećaje. Naime, ubrzo nakon ishemije povećava se metabolizam glukoze u hipokampusu štakora i "gerbila". Tako su koristeći visokorezolutne autoradiografske metode pronašli da nakon 10-minutne ishemije, a 30 minuta nakon perioda recirkulacije, perzistira povećan metabolizam glukoze u dendritičkom sloju CA<sub>1</sub> stanica (4, 192). Dodatno, smatra se da je bitan faktor i razina glukoze prije ishemičnog inzulta. Naime, dokazano je da preishemična hiperglikemija povećava razinu laktata u ishemičnom mozgu. Nastala acidoza potencira razvoj moždanog edema, te inhibira mitohondrijsku respiraciju. Dokazano je također da se nakon preishemične hiperglikemije neuronalno oštećenje širi sa CA<sub>1</sub> na CA<sub>3</sub> regiju hipokampusa (189).



#### 1.3.4. POREMEĆAJ IONSKE HOMEOSTAZE

U hipoksičnim uvjetima uslijed neadekvatnog oksidativnog metabolizma smanjuje se razina ATP. Poznato je da mozak nije sposoban zadovoljavati svoje energetske potrebe anaerobnim metabolizmom, odnosno osigurati dovoljne količine ATP glikolizom. Direktna posljedica spomenutog poremećaja je nesposobnost održavanja ionske homeostaze (92). Cerebralna anoksija već unutar 1-2 minute uzrokuje masivan izlaz  $K^+$  iz stanice, te ulaz  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  u stanicu. Spomenuta promjena praćena je izrazitim padom koncentracije  $Ca^{2+}$  u intersticijskoj tekućini (194). Ulaz  $Ca^{2+}$  u stanicu za vrijeme I nakon ishemije u svezi je s aktivacijom NMDA receptora i VOK kanala (dominantno L tipa). U posljednje vrijeme naročit interes je usmjeren na vremenski period kalcijskog utoka u stanicu u postishemičnom hipokampusu, tj. postavlja se pitanje da li utok  $Ca^{2+}_e$  prethodi odgođenom neuronalnom oštećenju (205). U većini studija je potvrđeno da  $Ca^{2+}_e$  ulazi u stanicu za vrijeme ili kratko nakon ishemije. U ranoj fazi recirkulacije razina  $Ca^{2+}_i$  se kratkotrajno normalizira, a potom slijedi sekundarni porast u području  $CA_1$  regije. Više studija je pokazalo da upravo sekundarni porast razine  $Ca^{2+}_i$  prethodi pojavi morfoloških promjena piramidnih stanica  $CA_1$  regije hipokampusa (194).

#### 1.3.5. POREMEĆAJ SINTEZE PROTEINA

Dokazano je da postoji generalna depresija proteinske sinteze tijekom i u ranim fazama nakon ishemije (143,151). Regionalne promjene sinteze proteina opisane su korištenjem "in vivo" aplikacije aminokiselina. Autoradiografski pad proteinske sinteze je vizualiziran u  $CA_1$  sektoru kasno nakon ishemije, kada su neuroni već nekrotični. Ispitivanja rane faze recirkulacije su pokazala da intra-ishemička supresija proteinske sinteze postoji u  $CA_1$  regiji "gerbila" i majmuna. Detaljne studije su pokazale da do obnavljanja

inkorporacije aminokiselina u hipokampusu "gerbila" dolazi unutar 12 sati po ishemiji u CA<sub>3</sub> regiji i girus dentatusu. U navedenom vremenskom periodu CA<sub>1</sub> neuroni ne mogu ponovno sintetizirati proteine (210). Zaključno, smanjenje sinteze proteina prethodi manifestaciji odgođene neuronalne smrti i stoga se smatra ključnim faktorom selektivne vulnerabilnosti navedenih stanica hipokampusa.

#### 1.4. FARMAKOTERAPIJA POREMEĆAJA PAMĆENJA

Sadašnje stanje i izbor lijekova koji stoje na raspolaganju za liječenje poremećaja pamćenja ne zadovoljava iz više razloga. Prvi jest nedovoljno poznavanje procesa uključenih u fiziologiju i patofiziologiju pamćenja, odnosno nerazumijevanje složenih biokemijskih mehanizama i promjena koje sudjeluju u njegovu formiranju. Zatim, za veliki broj postojećih lijekova ne postoje sigurni podaci o njihovoj djelotvornosti. Konačno, metodologija ispitivanja djelovanja lijekova na poremećaje pamćenja je nepotpuna. Razvojem boljih eksperimentalnih modela u pretkliničkoj psihofarmakologiji te sintezom velikog broja supstancija, nedvojbeno je napravljen napredak u razumijevanju procesa poremećaja pamćenja. Noviji pristup bazira se dominantno na istraživanju uloge tvari koje moduliraju aktivnost različitih neurotransmitorskih sustava (poglavito glutaminergičkog i kolinergičkog), te supstancija koje utječu na energetske status stanice npr. metaboličkih aktivatora (nootropika). Ispituje se i aktivnost drugih tvari te mogućnost transplantacije neurona i moždanog tkiva kao osnove razvoja djelotvornije terapije kognitivnih poremećaja. Za pretpostaviti je da će jedan ili više navedenih pristupa u budućnosti rezultirati klinički djelotvornijim rezultatima.



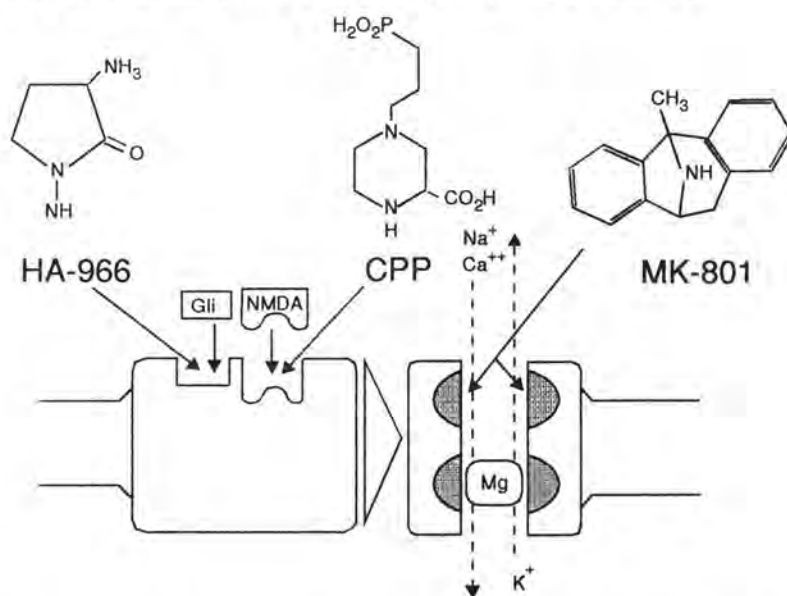
#### 1.4.1. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA

Činjenica da je koncentracija  $Ca^{2+}$ , značajna odrednica životno važnih funkcija stanice i organizma, te u skladu s tim i pretpostavka da je promjena homeostaze  $Ca^{2+}$  u pozadini brojnih patoloških stanja, intenzivirala je farmakološka istraživanja s ciljem pronalaska lijekova koji bi na različitim razinama mogli regulirati koncentraciju  $Ca^{2+}$  te antagonizirati njihove nepoželjne učinke. Suvremeni farmakoterapijski pristup bazira se na upotrebi lijekova koji blokiraju utok  $Ca^{2+}$  u stanice bilo putom aminokiselinskih receptora, dominantno NMDA tipa ili VOK kanala, dominantno L tipa.

##### 1.4.1.1. Blokatori NMDA receptora

Akutna mehanička ili biokemijska trauma uzrokuje neuronalnu degradaciju bilo trenutno (primarno oštećenje) ili nakon određenog vremenskog perioda (sekundarno oštećenje). Sekundarno oštećenje mnogo je opsežnije od primarnog i rezultira metaboličkim promjenama šireg područja od mjesta primarne lezije. Spomenuto oštećenje može se razviti i do osam dana po nastanku akutnog infarkta. Upravo spomenuti period "odgode" otvara mogućnost terapijske intervencije u smislu prevencije sekundarnog staničnog oštećenja i smrti (189). Uloga NMDA antagonista u terapiji nekih neuroloških poremećaja opsežno se ispituje, a dobiveni rezultati daju nadu u mogućnost njihove uspješne terapijske primjene. Ipak, zbog brojnih neželjenih učinaka, njihova terapijska upotreba još je daleko od idealne (127). Tako npr. kompetitivni NMDA antagonisti kao 2-amino-7-fosfonoheptanoat (APH), CPP ili APV direktno blokiraju vezivanje l-Glu (Slika 5). Oni su međutim vrlo polarne molekule te stoga slabo prolaze krvno-moždanu barijeru (164). S druge strane postoje podaci da nekompetitivni NMDA antagonisti (ifenprodil, MK-801,

ketamin,dekstorfentan) preveniraju neuronalno oštećenje nakon npr. hipoksično/ishemičnog ili mehaničkog inzulta (111,112) (Slika 5).



**Sl.5. Prikaz mogućih mjesta farmakološke blokade NMDA receptora.**

*CPP blokira NMDA receptorsko mjesto;HA-966 blokira glicinsko vezno mjesto i reducira djelovanje NMDA;MK-801 se veže za PCP receptorsko mjesto unutar ionskog kanala i prevenira utok iona.*

Većina spomenutih tvari su međutim psihotomimetici i mogu uzrokovati shizofreniju, anksioznost,depresiju i narkolepsiju. Ifenprodil i MK 801 su nekompetitivni NMDA antagonisti,čija upotreba u liječenju hipoksično /ishemičnih oštećenja te epileptičkih izbijanja ohrabruje.Međutim, postoje podaci da akutna administracija MK-801 uslijed vezanja za fenciklidinsko (PCP) receptorsko mjesto potiče promjene ponašanja (tzv.fenciklidinski učinak) (38). Također,pronađeno je da u dozama neophodnim za ostvarenje neuroprotektivnog učinka,može povećati osjetljivost neurona u razvoju prema ekscitotoksički posredovanom cerebralnom oštećenju (37). Suprotno neuroprotektivnom učinku spomenute tvari, u slučaju aplikacije neposredno prije ili nakon intrastrijatalne injekcije NMDA u štakora starih 7 dana, administracija 24 sata prije injekcije NMDA,paradoksalno povećava NMDA posredovano moždano oštećenje.Dokazano je naime, da u spomenutom



slučaju akutna administracija MK 801 povećava broj NMDA receptora 30-50% u odnosu na kontrolne vrijednosti, te da taj učinak perzistira do 24 sata (40). Smatra se da povećan broj NMDA receptora može povećati osjetljivost prema oštećenju paralelno s opadanjem razine MK 801 u mozgu. Unatoč nabrojениh teškoća ipak su neki od spomenutih antagonista odobreni za kliničku upotrebu, kao npr. ketamin i dekstrometorfan (PCP receptorski ligandi), barbitolni derivati te  $Mg^{2+}$  (125,126). Prve tri navedene tvari smanjuju ekscitotoksično neuronalno oštećenje u zrelom kao i u nezrelom mozgu. Iako su manje potentne i imaju manju terapijsku širinu između neuroprotektivnih i toksičnih doza od drugih NMDA antagonista, ipak su u prednosti u terapijskoj praksi zbog svog brzog djelovanja. Interesantan terapijski izbor je i  $MgSO_4$ . Dokazano je da je  $Mg^{2+}$  efikasan u prevenciji hipoksično/ishemičnog i traumatskog oštećenja SŽ. Također, već se godinama koristi u terapiji eklampsije. Činjenica je da  $Mg^{2+}$  u fiziološkim uvjetima slabo prolazi krvno-moždanu barijeru. Međutim, njena permeabilnost je povećana u uvjetima hipoksije, epileptičkih napada i drugih neuroloških poremećaja.

Kronična terapijska upotreba antagonista NMDA receptora, naročito tijekom razvoja (npr. epilepsije dječje dobi) značajno je ograničena. Naime, kronična administracija PCP izaziva značajne promjene ponašanja u djece. PCP momentalno prolazi placentarnu barijeru, a secernira se i majčinih mlijekom. Više je dokaza da fetalno izlaganje PCP može izazvati ozbiljne razvojne neurološke promjene. Potvrđena je i njegova teratogenost (126,167). Na taj način povećana koncentracija i perzistiranje PCP i njegovih analoga u nezrelom mozgu značajno pogađa kasniji razvoj SŽ. Za sada nije jasno da li kompetitivni NMDA antagonisti i glicinski receptorski antagonisti imaju iste karakteristike.

Redukcija ekscitotoksičnog oštećenja može biti izvršena i presinaptičkim smanjenjem otpuštanja l-Glu. Pozitivni učinci u tom smislu postignuti su aplikacijom adenozijskih ( $A_1$ ) receptor agonista, indirektnom inhibicijom

sinteze l-Glu pomoću metionin sulfoksimina ili hipotermijskim djelovanjem (124,234).

Zaključno, antagoniziranje aktivnosti NMDA receptora korištenjem bilo koje spomenute farmakološke strategije osigurava u svakom slučaju racionalan terapijski pristup u smislu ograničenja ekscitotoksičnog oštećenja SŽ. Postoje različite kliničke situacije (cerebrovaskularna bolest, vertebrobasilarna insuficijencija, ishemični moždani udar, epilepsija, trauma i sl.) u kojima se nabrojani antagonisti mogu koristiti u ograničavanju akutnog cerebralnog oštećenja. Ipak, rizik kronične upotrebe ovih lijekova, pogotovo u djetinjstvu značajno ograničava njihovu potencijalnu iskoristivost.

#### 1.4.1.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala

Na temelju dosadašnjih saznanja jasno je da povećan utok iona  $Ca^{2+}$  u stanicu putem specifičnih ionskih kanala, predstavlja glavni patofiziološki supstrat neuronalnog oštećenja. Iako je poznato da su VOK kanali samo jedan od mogućih putova ulaska iona  $Ca^{2+}$  u stanicu, pokazalo se da se njihovom blokadom značajno smanjuje stupanj staničnog oštećenja. Veliki interes za izvanredne terapijske potencijale blokatora VOK kanala rezultirao je sintezom brojnih lijekova (Tablica 3). Stoga danas postoji više desetina različitih lijekova navedene skupine.



---

GRUPA I SPECIFICNI BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA

---

A) Selektivni blokatori L-tipa

1. Fenilalkilamini : verapamil, anipamil, D888 (desmetiloksiverapamil), D600 (galopamil), ranipamil, tiapamil, AQ-A-39 (falipamil)
2. Dihidropiridini : nifedipin, nimodipin, nikardipin, nitrendipin, amlodipin, felodipin, flordipin, LY-198561, mesudipin, PN200-110 (isradipin), PY108-068 (dazodipin), nileidipin, nilvadipin, nizoldipin, (PP-1466) rioldipin, riozidin
3. Benzotiazepini : diltiazem

B) Neselektivni blokatori L-tipa

1. Difenilpiperazini : cinarizin, flunarizin, lidoflazin
2. Prenilamin derivati : fendilin, terodilin
3. Ostali : bepridil, karoverin, etafenonperhelitilin, piprofurool, KB-944, MD260355

---

GRUPA II NESPECIFICNI BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA

---

- A) Tvari koje u sličnim koncentracijama djeluju i na kalcijске kanale, kao i na brze kanale za natrij : bepridil, lidoflazin, tiapamil
- B) Tvari koje utječu na aktivnost kalcijških kanala, ali im je primarno mjesto djelovanja na razini: natrijskih kanala (lokalni anestetici, fenitoin) ; katekolaminskih receptora (fenotiazini, derivati johinbina) ; benzodiazepinskih receptora (diazepam, flurazepam) ; opijatnih receptora (loperamid)...

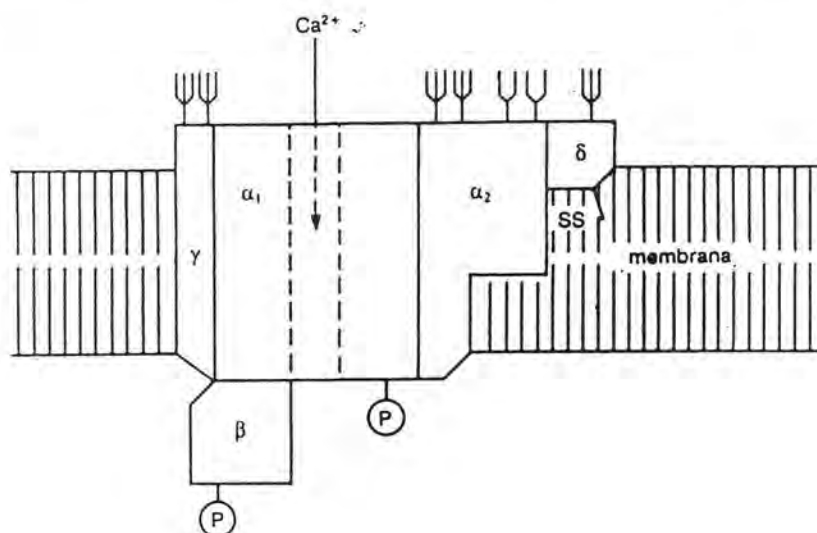
---

**Tablica 3. Specifični i nespecifični blokatori voltažno ovisnih kalcijških kanala**

Izgleda da većina ostvaruje neuroprotektivno djelovanje blokadom L tipa, te da su bez učinka na T, N i P tip VOK kanala.

Najpotentniji i najefikasniji blokatori L tipa VOK kanala su lijekovi iz skupine dihidropiridinskih derivata (DHP) (npr. nimodipin, nikardipin, nifedipin, itd.) (175). Štoviše, budući da su L kanali do danas identificirani kao jedini od kalcijških kanala voltažno-ovisnog tipa koji reagiraju na DHP lijekove, u literaturi ih često nazivaju dihidropiridinskim kanalima. Dokazano je da se radi o peptidu (165 kDa) koji sadrži najmanje četiri receptorska mjesta, međusobno odvojena, ali sposobna za alosteričku interakciju. Radi se o receptorima za fenilalkilamine i bepridil, benzotiazepine, neuroleptike difenilpiperazinske serije (flunarizin npr.) i konačno 1,4 DHP. Receptorsko mjesto za DHP lijekove ( $\alpha_1$  podjedinica) djeluje kao voltažni senzor, te je njegova aktivnost strogo voltažno ovisna. Dokazano je naime da blokatori kalcijških kanala djeluju

selektivnije na depolariziranu u odnosu na polariziranu membranu (214). To im ujedno olakšava vezivanje u brojnim patološkim situacijama (Slika 6).



**Sl.6. Shematski prikaz organizacije receptorskih mjesta ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ ) voltažno ovisnih kanala za kalcij ( $Ca^{2+}$ ). $\alpha_1$  podjedinica sadrži receptorsko mjesto za vezanje DHP blokatora.**

Upotreba blokatora kalcijских kanala DHP skupine u terapiji različitih kardiovaskularnih oboljenja (poglavito angine pektoris, arterijske hipertenzije te različitih srčanih disritmija) odavno je prihvaćena, a mehanizam njihova djelovanja kao i neželjeni učinci dobro su poznati. Međutim, upotreba DHP kalcijских antagonista u neurologiji, otvara novo područje interesa, karakterizirano mnogobrojnim nejasnoćama i spekulacijama s bazično-eksperimentalne te s praktično-terapijske točke gledanja. Klinička ispitivanja vršena posljednjih nekoliko godina usmjerena su na liječenje oboljenja kao što su ishemična odnosno hipoksična stanja koja se razvijaju tijekom cerebrovaskularne (CVB) bolesti (224,225) ili nastaju kao posljedica arterijskog spazma tijekom spontane subarahnoidalne hemoragije (SSH), prolazne hipoksije tijekom vertebrobazilarne insuficijencije te vaskularna glavobolja migrenskog tipa.

U većem broju studija koje su učinjene tijekom posljednjih desetak godina o učincima kalcijских blokatora u liječenju ishemičnog moždanog udara, opisuje



se pozitivno djelovanje ovih lijekova na tijek i ishod neurološkog deficita. Uočeno je da je stanje poremećene svijesti znatno kraće, te da se neurološki deficit popravlja mnogo ranije i kompletnije u bolesnika s cerebralnim inzultom koji su primali blokatore kalcijevih kanala. Smrtnost oboljelih kojima je ordiniran npr. nimodipin bila je značajno manja u usporedbi s onima koji su primali placebo (109,224).

Treba spomenuti i dugotrajna ispitivanja (koja su još u tijeku) o utjecaju spomenutih lijekova na procese cerebralne ateroskleroze. Preliminarni rezultati ukazuju da je u bolesnika tretiranih verapamilom i nimodipinom proces ateroskleroze napredovao znatno sporije (107,152).

Arterijski spazam u toku SSH česta je pojava. Spazmom mogu biti zahvaćene velike ili male cerebralne arterije, a posljedica u najvećem broju slučajeva jeste ishemija odnosno hipoksija odgovarajućeg dijela mozga. Postojanje spazma, posebno većih arterija s konsekvativnom ishemijom odnosno hipoksijom pogoršava kliničku sliku i konačnu prognozu bolesti. U eksperimentima je dokazano da kalcijevski antagonisti, poglavito nimodipin i nikardipin, sprečavaju razvoj arterijskog spazma. Također je pronađeno da višetjedna aplikacija diltiazema, znatno smanjuje arterijski spazam te poboljšava oporavak bolesnika (85,209).

Kalcijevski antagonisti mogu se primijeniti i u liječenju vertebrobazilarne insuficijencije. Hofferbarth i sur. su na temelju eksperimentalnih i kliničkih iskustava objavili da nimodipin i flunarizin popravljaju kliničku sliku i skraćuju vrijeme trajanja nistagmusa (173).

Upotreba nimodipina, nifedipina i verapamila u liječenju vaskularnih glavobolja migrenskog tipa (klasična migrena i "cluster" glavobolja) pokazuje dobre rezultate. Spomenuti lijekovi smanjuju učestalost te težinu migrenoznog napada. Upotreba nifedipina praćena je brojnim sporednim učincima (posturalna hipotenzija, prekordijalne senzacije itd.) u velikom broju (75%) ispitanika. Cinarizin i flunarizin pokazali su dobre rezultate kod dugotrajnog liječenja klasičnih glavobolja i tzv. "mixed headache" (224).

Neki kalcijски antagonisti imaju i značajno antikonvulzivno djelovanje. DHP antagonisti sprečavaju konvulzije inducirane ishemiјom, bikukulinom, pentazolom i elektrošokom u eksperimentalnih životinja. U skladu s navedenim jeste i nalaz po kojem DHP agonist, Bay K 8644, provocira nastajanje konvulzija. Budući da su u prevenciji epileptičkog napada najbolji rezultati postignuti pretretmanom s DHP blokatorima, smatra se da je ključni momenat u nastajanju napada povećan utok  $Ca^{2+}_e$  kroz L tip VOK kanala. Osim navedenih i fenilalkilamini (verapamil) i benzotiazepini (diltiazem) mogu prevenirati napad epilepsije (173).

Posljednjih godina sve češće se eksperimentira s upotrebom nekih kalcijских antagonista u liječenju shizofrenije, manije i tardivne diskinezije. Najbolji rezultati postignuti su u liječenju shizofrenije i to verapamilom koji utječe na metabolizam dopamina u središnjem živčevlju (173).

Akutna ili kronična administracija etanola remeti funkcionalnu aktivnost kalcijских kanala i povećava broj i gustoću DHP receptora u kortikalnoj membrani štakora. Iz navedenog proizlazi i ideja o mogućoj upotrebi antagonista kalcija DHP skupine u liječenju alkoholizma (46).

Poznato je da je kalcij uključen u procese fiziološkog odgovora na bolne (nociceptivne) podražaje. Naime, i.c.v. injekcija kalcija izaziva hiperalgeziju i antagonizira učinke morfina. U skladu s navedenim jeste nalaz po kojem diltiazem, flunarizin i nikardipin preveniraju opisane učinke te povećavaju morfinску analgeziju u eksperimentalnih životinja.

Upotreba VOK kanala u liječenju spomenutih poremećaja, iako obećava, još uvijek zahtijeva brojna dodatna eksperimentalna i klinička istraživanja (236).

#### 1.4.2. KOLINOMIMETICI

Činjenica da kolinergički neurotransmitorski sustav ima značajnu ulogu u spoznajnim procesima te da hipoksičko/ishemičko oštećenje izrazito smanjuje



sintezu i otpuštanje ACh iz presinaptičkih završetaka, a time i raspoloživost ACh u sinaptičkoj pukotini, odnosno na postsinaptičkim receptorima, otvorila je mogućnost upotrebe različitih kolinomimetika u terapiji poremećaja učenja i pamćenja.

#### 1.4.2.1. Prekursori ACh

Lecitin i kolin, metabolički prethodnici ACh, prirodni su sastojci hrane. Lecitin je diester fosforne kiseline s glicerolom i kolinom. Hidrolizom u jetri i mozgu iz njega nastaje kolin koji može poslužiti za sintezu fosfolipida odnosno fosfatidilkolina. U kolinergičkom neuronu iz kolina i acetilkoenzima A pod utjecajem acetilkolin-transferaze (CAT) nastaje ACh. U brojnim studijama pokazano je da davanje kolina uvjetuje poboljšanje spoznajnih aktivnosti, percepcije vizuelnih i slušnih podražaja, te pohranjivanja dugotrajne memorije. U skladu s navedenim jesu i rezultati Brennana i sur. (19) koji su opisali smanjenje sposobnosti izvršavanja postavljenih zadataka u miševa nakon 6-tjedne dijeta siromašne kolinom. Međutim, postoje eksperimentalni rezultati koji su u suprotnosti s prije iznesenim. Tako su npr. Ferris i sur. objavili negativne rezultate nakon kroničnog davanja kolina u skupini starijih osoba s laganim kognitivnim ispadima (55). Mohs i Davis smatraju da su učinci egzogeno unesenog kolina kratkotrajni i traju samo dok se ne obnove endogene rezerve kolina koje su prethodno ispražnjene (131). Dokazano je da se pomoću nekih lijekova može olakšati transmembranski utok  $Ca^{2+}$ , npr. 4-AP, a time i povećati iskoristivost egzogeno datih prekursora.

U novijim istraživanjima sve češće se u zamjenu za kolin koristi lecitin koji se postupno uvodi u terapiju tardivne diskinezije i Tourettovog sindroma. Jope i sur. su proučavali kinetiku lecitina u zdravih dobrovoljaca. Pronašli su da oralna doza od 15 g lecitina/70 kg tjelesne mase povisuje razinu koncentracije kolina u plazmi ispitanika tijekom duže vremena u odnosu na aplikaciju

jednake doze kolina. Povišenje koncentracije kolina zamijećeno je već sat vremena nakon tretmana lecitinom, a maksimum koncentracije postignut je nakon 3-4 sata (99,155). Hirsch i Wurtman su nakon ingestije lecitina opazili povišenje razine kolina u krvi i mozgu, odnosno porast koncentracije ACh u mozgu štakora (89). Jope je, nakon akutnog i kroničnog peroralnog tretmana lecitinom, pronašao porast koncentracije kolina u plazmi, hipokampusu, strijatumu i korteksu štakora. Nije zamjetio promjene koncentracije ACh u navedenim strukturama. Smatra se da je prednost terapije prekursorima ACh u odnosu na ostale kolinomimetike ostvarivanje fazične aktivnosti kolinergičkih stanica nalik onoj u fiziološkim uvjetima (99).

#### 1.4.2.2. Inhibitori acetilkolin-esteraze

Reverzibilni inhibitori acetil kolin esterase (AChEI) (fizostigmin, galantamin, (THA)) usporavaju katabolizam ACh te time povećavaju njegovu koncentraciju u SŽ odnosno na razini neuralnih sinapsi. Postoje podaci da aplikacija pojedinačnih doza AChEI povećava razinu ACh u različitim regijama SŽ za 18-105% (237). Daleko najveći broj eksperimentalnih studija u kojima je ispitivana djelotvornost spomenutih tvari učinjen je u modelu demencije Alzheimerova tipa (DAT), a dobiveni rezultati su često kontroverzni. Tako su Davids i Mohs uzrokovali signifikantno, ali prolazno poboljšanje nekih spoznajnih aktivnosti za vrijeme i nakon i.v. infuzije fizostigmina u pacijenata s teškim oblikom DAT (237). Suprotno navedenom, Ashford i sur. (6) te Cain i sur. (22) nisu uspjeli antagonizirati spoznajni deficit u bolesnika s DAT fizostigminom. Takodjer, Tobe i sur. (211) su opisali antiamnestički učinak fizostigmina u dozi od 0,1 mg/kg u demenciji izazvanoj skopolaminom. Nadalje, pronašli su da spomenuta tvar "popravlja" električnu aktivnost mozga (EEG) i zaustavlja smanjenje razine ACh nakon ishemije, hipoksije te aplikacije skopolamina. Utvrđeno je takodjer da fizostigmin u dozama od 0,1 i 0,3 mg/kg



intraperitonealno (i.p.) popravlja sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u modelu amnezije izazvane elektrošokom u štakora (211).

Postoje podaci o pozitivnim učincima THA u terapiji blažih oblika DAT, uz napomenu da nije uočeno definitivno i trajno poboljšanje kognitivnih aktivnosti. Riekkinen i sur. su opisali pozitivne učinke akutne aplikacije THA na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u štakora s NBM lezijom i to u dozi od 3 mg/kg. Manja doza (1 mg/kg) pokazala se nedostatnom za poboljšanje kolinergičke aktivnosti, dok je aplikacija veće doze (5 mg/kg) dovela do izrazitog poremećaja motoričke koordinacije, a što je značajno utjecalo na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne (137,177,222). Nasuprot akutne aplikacije, pokazalo se da kronični tretman (10 dana) značajno popravlja učinke THA na pasivno izbjegavanje kazne, čak i u većim dozama (5 mg/kg). Obzirom na poznatu činjenicu o modifikaciji aktivnosti I-Glu, smatra se da bi spomenuti lijekovi mogli imati značajne učinke u smislu popravljavanja kognitivnih ispada u hipoksično-ishemičnim stanjima (237). Naime, THA se pokazao učinkovit u terapiji Alzheimerove bolesti, ali i hipoksično/ishemičnog oštećenja upravo moduliranjem aktivnosti tj. vezivanja I-Glu za NMDA receptorsko mjesto (177).

Na temelju iznesenih podataka može se zaključiti da administracija prekursora ACh ili AChEI, povećava razinu ACh u mozgu, te posljedično stimulira kolinergičku neurotransmisiju. Međutim, takvom terapijom postižu se stimulirajući učinci svih kolinergičkih neurona u mozgu, ali i na periferiji uz nepredvidljive farmakološke posljedice. Upravo to, uz kratkoću djelovanja, može objasniti relativno ograničene terapijske uspjehe postignute s npr. lecitinom ili fizostigminom u terapiji DAT ili hipoksično/ishemičnih poremećaja (237).

### 1.4.2.3. Agonisti muskarinskih receptora

Poznato je da su različita patološka stanja kao npr. degenerativne promjene tipa DAT, hipoksično/ishemična oštećenja, epileptički napadi, trauma itd., praćeni gubitkom kolinergičkih nervnih završetaka. Posljedično dolazi do pada kolinergičke neurotransmisije i to dominantno u području korteksa i hipokampusa. Terapijski pristup u liječenju navedenih stanja usmjeren je stoga na aktivnost kolinergičke sinapse te pojačanje kolinergičke neurotransmisije. Principijelno, kolinergička neurotransmisija može biti stimulirana indirektno putem GABA. GABA ostvaruje inhibitornu ulogu na razini kolinergičkog neurona putem GABA receptora, lociranih pre ili postsinaptički na kolinergičkom neuronu. Teoretski, moguće terapijsko djelovanje baziralo bi se na inhibiciji GABA<sub>A</sub> receptora (110). Međutim, aktivnost kolinergičke neurotransmisije u SŽ u hipoksično/ishemičnim stanjima može se pojačati i direktnom stimulacijom muskarinskih (M) kolinergičkih receptora, koji su dominantni kolinergički receptori neokorteksa (110). Na temelju dosadašnjih studija učinjena je podjela spomenutih receptora na : a) presinaptičke muskarinske receptore M<sub>2</sub> podtipa; b) postsinaptičke muskarinske receptore M<sub>1</sub> podtipa te c) m<sub>3</sub> i m<sub>4</sub> muskarinske receptore. M<sub>2</sub> receptori se nalaze dominantno na kolinergičkim nervnim završecima u različitim moždanim regijama. Smatra se da imaju ulogu autoreceptora tj. da reguliraju otpuštanje ACh. U različitim patološkim situacijama kao što su degenerativna oboljenja tipa DAT, hipoksično/ishemična stanja, epileptički napadi i sl. smanjuje se gustoća upravo M<sub>2</sub> podtipa receptora. Nasuprot tome, čini se da postsinaptički M<sub>1</sub> receptori nisu pogodjeni spomenutim gubitkom kolinergičkih nervnih završetaka te da je njihov integritet i funkcionalna aktivnost uglavnom očuvana u različitim patološkim situacijama. Stoga je primarni terapijski interes usmjeren na direktnu stimulaciju M<sub>1</sub> receptora. Budući da parcijalni agonisti M<sub>1</sub> receptora imaju manje predispozicije za razvoj desenzibilizacije spomenutih receptora od čistih agonista, u terapijskom smislu oni su mnogo



zanimljiviji. Smatra se da bi antagonisti presinaptičkih  $M_2$  receptora mogli eventualno biti korisni u ranim stadijima degenerativnih oštećenja, a naročito je zanimljiva kao mogućnost kombinacija  $M_1$  agonista i  $M_2$  antagonista (110). Obzirom da je hiperaktivnost centralnih glutaminergičkih neurona jedan od primarnih uzroka degenerativnih promjena i oštećenja kolinergičkog neurona, jasno je da i antagonisti glutaminergičkih receptora (dominantno NMDA i K/Q receptora) koji se nalaze na kolinergičkom neuronu imaju neuroprotektivno značenje (24). Ipak, treba voditi računa o slijedećem: fiziološka funkcija centralnog kolinergičkog neurona ovisi i o stimulaciji glutaminergičkog neurona. Stoga treba voditi računa da se antagonistima glutaminergičkih receptora ne reducira ili u potpunosti ne ukloni fiziološki ekscitatorni poticaj kolinergičkog neurona. Posljedično, u cilju održavanja aktivnosti  $M_1$  receptora, a sprečavanja ekscitotoksičnog učinka glutamata, noviji terapijski aspekti baziraju se na kombinaciji NMDA antagonista i  $M_1$  agonista (110).

Arekolin je direktan stimulator muskarinskih kolinergičkih receptora, s niskim stupnjem selektivnosti za  $M_1$  receptore. U nekoliko radova proučavan je utjecaj arekolina na procese učenja u eksperimentalnih životinja. Christie i sur. pronašli su da arekolin signifikantno popravljaju kognitivne funkcije u pacijenata koji boluju od DAT, te da olakšava učenje u zdravih mladih osoba (27). Ridley i sur. su pronašli da arekolin antagonizira spoznajni deficit uvjetovan i.c.v. injekcijom hemikolina-3 u majmuna (176). Flood i sur. su poboljšali retenciju memorije opetovanim apliciranjem arekolina nakon učinjenog prvog treninga stjecanja znanja u miševa (237). Relativno niska selektivnost prema  $M_1$  receptorima, kratkotrajno djelovanje te brojni neželjeni kolinergički učinci, ne čine ga kvalitetnim terapijskim izborom u liječenju različitih patofizioloških stanja. Smatra se da su esteri arekolina zahvaljujući znatno selektivnijem djelovanju prema  $M_1$  receptorima te farmakokinetičkim osobinama, prihvatljiviji terapijski izbor od arekolina (110).

Pilokarpin se pokazao nedjelotvornim u terapiji kognitivnih poremećaja u različitim patološkim stanjima (237).

Prema podacima iz literature, oksotremorin može poboljšati kognitivne sposobnosti u majmuna. Ima dulji poluživot od arekolina i može se primjenjivati oralno. To ga čini pogodnim za liječenje DAT, mada za to ne postoji dovoljno podataka (110).

### 1.4.3. Nootropici

Nootropici su psihoaktivni lijekovi koji povoljno utječu na procese učenja i pamćenja. Naziv nootropici prvi je počeo koristiti Giurgea 1972. godine (73) da bi označio djelovanje piracetama. Piracetam je sintetiziran 1963. g. kao sintetska zamjena za GABA, koja prolazi krvno-moždanu barijeru. U SŽ piracetam povećava korištenje cirkulirajuće glukoze i stimulira sintezu ATP i lipida. Ubrzava proces glikolize te smanjuje koncentraciju kumuliranih laktata i podiže koncentraciju piruvata (75,207). Piracetam stimulira aktivnost adenilat kinaze i smanjuje oslobađanje prolina (65,237). Povećava koncentraciju glutamina i glutaminske kiseline, a smanjuje koncentraciju taurina u mozgu miševa. Postoje eksperimentalni rezultati koji ukazuju da piracetam potiče sintezu proteina u nervnim stanicama. U suprotnosti s navedenim jesu rezultati Nickolsona i Wolthiusa (140) koji ukazuju da piracetam ne potiče sintezu već sprečava razgradnju novostvorenih proteina pojačanjem utoka leucina u stanice SŽ. Piracetam smanjuje aktivnost lizozomskih enzima i kreatin-kinaze. Povećava otpornost živčanog tkiva prema hipoksiji i skraćuje posthipoksični oporavak živčanih stanica (65). Stimulira aktivnost fosfolipaze A<sub>2</sub> u neuronima i sinaptosomima, a mijenja i stupanj fluidnosti membrana moždanih stanica (201). Poznato je također da ne uzrokuje značajnu uzbuđenost nakon koje bi slijedila depresija, kao što čine psihostimulantne



tvori. Prvenstveno olakšava aktivnost metaboličkih procesa. Djeluje na korteks velikog mozga i na hipokampus bez utjecaja na retikularnu formaciju i limbički sustav. Piracetam ne utječe na spontanu motoričku aktivnost, nema sedativno ili katatoničko djelovanje, nije antidepresiv niti psihodisleptik. Obzirom da stimulira mentalne procese najbliži je po mehanizmu djelovanja psihostimulansima, ali se ubraja u izdvojenu kategoriju psihotropnih tvari (196).

Brojni su radovi koji ukazuju na stimulirajuće djelovanje piracetama na proces učenja. Navedena tvar stimulira stjecanje i konsolidaciju znanja, pojačava mogućnost vizuelno-motoričkog kapaciteta učenja, te brzinu odlučivanja, pojačava psihomotoričku aktivnost i olakšava asocijaciju ideja. Ubrzava prijenos impulsa kroz korpus kalozum te smanjuje amnestičko djelovanje elektrošoka (237).

Utjecaj piracetama na spoznajne aktivnosti ispitivan je na eksperimentalnim životinjama u nizu modela aktivnog i pasivnog izbjegavanja kazne. Pronađeno je npr. da piracetam stimulira pasivno izbjegavanje kazne (100mg/kg), otklanja amnestičko djelovanje elektrošoka i hipoksije (25,59) te stimulira prisjećanje starog znanja u štakora. Piracetam povećava spoznajne kapacitete u mladim i starih životinja, ali je učinak veći u starih.

Na osnovu novijih istraživanja pretpostavlja se da utječe na aktivnost pojedinih neurotransmitorskih sustava. Massoto i sur. su ispitivali učinke akutne i kronične aplikacije piracetama na funkciju GABA te aminergičkih sustava SŽ (56,119). Pronašli su da piracetam ne utječe na procese sinteze i oslobađanja GABA. Nakon petnaestodnevne aplikacije povećava stupanj oslobađanja noradrenalina (NA) te smanjuje podražljivost beta-adrenergičkih receptora cerebralnog korteksa. Massoto i sur. su pretpostavili da piracetam ostvaruje biološke učinke aktivacijom katekolaminergičkih mehanizama SŽ-a (119).

Rago i sur. su proučavali djelovanje piracetama na aktivnost dopamina (DA) u strijatumu. Pronašli su da navedeni nootropik povećava razinu metabolita, ali

da pri tom ne mijenja ukupan sadržaj DA. Autori su pretpostavili da piracetam povećava metabolički protok spomenutog neurotransmitora (174). S druge strane Nyback i sur. su dokazali da piracetam blokira katekolaminske receptore što pospješuje metabolički protok katekolamina (145,146).

Bering i Muller pokazali su da ovisno o dozi piracetam može imati afinitet prema glutaminičkim receptorima (12).

Piracetam facilitira aktivnost kolinergičkog neurotransmitskog sustava SŽ. Wurtman i sur. su pronašli da ovaj nootropik smanjuje razinu ACh u hipokampusu štakora (230). To znači da stimulira proces oslobađanja navedenog neurotransmitora. Spignoli i sur. su davanjem jedne doze piracetama od 300 mg/kg povećali korištenje ACh u hipokampusu štakora (201). Piercey i sur. su piracetamom antagonizirali amneziju uzrokovanu skopolaminom. Spomenuta tvar je također onemogućila smanjenje metabolizma glukoze nakon aplikacije navedenog antikolinergika u hipokampusu i cingulatnom korteksu štakora (136,162).

Oksiracetam je hidroksilirani derivat piracetama. Stimulira preuzimanje kolina (engl. "high affinity choline uptake"-HACU) u stanice hipokampusa, te prevenira skopolaminom uvjetovanu amneziju u miševa i štakora (237). Pretkliničke studije pokazale su da reducira amneziju i facilitira učenje u starih životinja. U terapiji poremećaja memorije u bolesnika s organskim moždanim sindromom djelotvorniji je od piracetama. Dokazano je također (215) da oksiracetam može inhibirati aktivnost fosfolipaza u štakora s cerebrovaskularnim lezijama nakon 14-tjednog tretmana. Paoli i sur. su pronašli da oksiracetam uspješno antagonizira kognitivni deficit uvjetovan NMDA antagonistom APV (153). Jedno od mogućih objašnjenja jest činjenica da je LTP u hipokampusu (čija se indukcija ostvaruje preko NMDA receptora) pojačan nakon aplikacije oksiracetama i njegova analoga aniracetama. S druge strane oksiracetamom je postignuta i aktivacija kolinergičke funkcije mozga. Budući da je aktivacija NMDA receptora bitna za LTP i procese učenja, nalaz da oksiracetam antagonizira amnestički učinak specifičnog NMDA antagonista upućuje na



pretpostavku po kojoj spomenuta tvar ostvaruje svoje protektivno djelovanje i preko modulacije NMDA receptora (157,158).

#### 1.4.4. GANGLIOZIDI

Gangliozidi, vrsta glikosfingolipida, koriste se u terapiji Alzheimerove bolesti i cerebralnih ishemičnih oštećenja. Mehanizam djelovanja je nepoznat, ali se smatra da oni preveniraju neurotoksičnost I-Glu i kainata, inhibiranjem nekontrolirane aktivacije glutaminičkih receptorskih mjesta. Dokazano je također da gangliozidi mogu produžiti život i funkciju oštećenih neurona inkorporacijom u strukturu njihove plazmatske membrane, te posljedično modulacijom homeostaze iona  $Ca^{2+}$ . Obzirom na njihov neurotrofički i neuritogeni karakter, oni također mogu potencirati aktivnost endogenih neurotrofičkih tvari kao npr. neuronalnih faktora rasta (engl. "nerve growth factor"- NGF) i na taj način olakšavati preživljavanje oštećenih neurona (125,126).

#### 1.5. Obrazloženje teme

Na temelju iznesenih podataka evidentno je 1) da su cerebralna hipoksija i ishemija integralni dio brojnih patoloških stanja; 2) da se spomenuta stanja vrlo često manifestiraju poremećajem kognitivnih sposobnosti; 3) da su karakterizirana i nizom patofizioloških i biokemijskih promjena (poremećajem razine i aktivnosti različitih neurotransmitorskih sustava, energetskim siromašenjem stanice, porastom razine SMK, posebno SAK itd); 4) da postoji selektivna vulnerabilnost određenih moždanih struktura, poglavito  $CA_1$  stanica

hipokampusa prema hipoksično-ishemičnom oštećenju; 5) te da sadašnje stanje u farmakoterapiji poremećaja pamćenja ne zadovoljava.

Stoga su ciljevi ove doktorske disertacije:

1. ispitati utjecaj hipoksije na pasivno izbjegavanje kazne u štakora,
2. istražiti učinke različitih blokatora kalcijevih kanala, direktnih i indirektnih kolinomimetika, te nootropika na sposobnost učenja i pamćenja u eksperimentalnih životinja,
3. utvrditi da li je blokatorima kalcijevih kanala moguće antagonizirati porast razine SMK i SAK u mozgu hipoksičnih štakora, te
4. ispitati eventualno neuroprotektivno djelovanje blokatora kalcijevih kanala na CA<sub>1</sub> piramidne stanice hipokampusa u hipoksično/ishemičnim uvjetima.



## 2. MATERIЈAL I METODE RADA

## 2.1. POKUSNE ŽIVOTINJE

Pokusi su učinjeni na Hannover-Wistar štakorima (leglo tvornice lijekova "LEK"), ženskog spola, tjelesne mase 250 g. Životinje su bile smještene u kavezima, po pet štakora u svakom. Hranjene su standardnom hranom za štakore i pile vodovodnu vodu ad libitum. Živjele su u uvjetima pravilnog izmjenjivanja perioda dvanaest satne svjetlosti i tame i pri stalnoj sobnoj temperaturi od  $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2. POKUS PASIVNOG IZBJEGAVANJA KAZNE

Kognitivne sposobnosti svih eksperimentalnih životinja testirane su u pokusu pasivnog izbjegavanja kazne. Korištena je modificirana metoda Jarvika i Koppa (97). Prvom treningu pasivnog izbjegavanja kazne prethodio je period adaptacije životinja novoj sredini, odnosno eksperimentalnom aparatu, podijeljenom pomičnim vratašcima na dva dijela (svijetli i tamni). Naime, deset sekundi nakon izlaganja štakora svijetlom odjeljku aparata, podizala bi se pomična vratašca, a štakor ulazio u tamni dio kaveza, u kojem bi boravio narednih deset sekundi. Neposredno nakon toga, tijekom prvog treninga, štakor je ponovo smještan u svijetli odjeljak, te je mjereno vrijeme potrebno da uđe u tamni dio kaveza. U tom momentu spuštana su vratašca, a životinja je primala tijekom dvije sekunde udar električne struje (napon 60V, frekvencija 50 Hz). Navedena trening procedura provedena je i drugog dana pokusa, u isto doba dana. U oba navrata mjereno je vrijeme latencije (zadržavanja) životinje u svijetlom dijelu aparata tijekom tri minute.



Životinje iz skupine kontrola 1 bile su intaktne,tj.nisu dobivale nikakvu tvar.Bile su izložene samo pokusu pasivnog izbjegavanja kazne tijekom dva uzastopna dana.

Ostale intaktne životinje trenirale su izbjegavanje kazne pod utjecajem otapala tj.propilen glikola i etanola (kontrola 2), odnosno destilirane vode (kontrola 3) ili različitih doza testiranih supstancija.

U skupini kontrola 1 bilo je 30, a u skupinama kontrola 2 i kontrola 3, odnosno skupinama tretiranim ispitivanim tvarima po 20 životinja.

### 2.3. HIPOKSIJA

Prvog dana pokusa pasivnog izbjegavanja kazne,a 60 sekundi nakon treninga,dio životinja bio je izložen uvjetima kontrolirane hipoksije.U tu svrhu,korišten je aparat po uzoru na podatke iz literature (73). Životinje su smještane,jedna po jedna,u hermetički zatvorenu posudu kroz koju je cirkulirala smjesa dušika i atmosferskog zraka.Navedenu smjesu pokretala je crpka (Rodent-respirator,Harvard Apparatus,Ugo Basile,Italia) s 75 radnih ciklusa u minuti,što je omogućavalo optimalnu izmjenu plinova od 2,2 l/min.Za otklanjanje ugljik dioksida iz zatvorenog sustava korišteno je natronsko vapno s indikatorom.Disanjem životinje u opisanom aparatu koncentracija kisika postupno se smanjivala do vrijednosti od 3,5 V%.Potom je održavana konstantnom,automatskim doziranim otpuštanjem čistog kisika iz posebnog spremnika.Životinje su izlagane stabilnim hipoksičnim uvjetima do gubitka refleksa podizanja (engl."righting reflex").Smatra se da su ga izgubile kada niti nakon trećeg pokušaja nisu u mogućnosti da se iz ležećeg položaja (na leđima) podignu na nožice. Spomenuti dio pokusa trajao je 25-30 minuta.

Životinje izložene hipoksiji neposredno iza treninga prvog dana pokusa,trenirale su pasivno izbjegavanje kazne i slijedećeg dana pokusa.

Dio životinja je odmah iza treninga bio izložen hipoksiji, bez pretretiranja bilo kakvom supstancijom (kontrola 4). Ostale hipoksične životinje trenirale su izbjegavanje kazne pod utjecajem otapala tj. propilen glikola i etanola (kontrola 5) odnosno destilirane vode (kontrola 6) ili različitih doza ispitivanih tvari.

U skupini kontrola 4 bilo je 30, a u skupinama kontrola 5 i kontrola 6 odnosno skupinama tretiranim korištenim tvarima po 20 životinja.

Dio životinja kontrole 1 odnosno dio hipoksičnih životinja dekapitiran je neposredno, 5, 15 ili 60 minuta po gubitku "righting" refleksa. Mozgovi su im vađeni, zaleđeni u tekućem dušiku te pohranjivani u hladnu komoru na temperaturu od  $-70^{\circ}\text{C}$  kako bi se spriječila aktivnost lipolitičkih enzima zabilježena na višim temperaturama.

Dijelu životinja iz skupine kontrola 5 aplicirano je otapalo (propilen glikol i etanol) prije izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije, a dekapitirane su 15 minuta po gubitku "righting" refleksa. Dio životinja kojima su injicirane različite doze (0,03; 0,1; 0,3 ili 1 mg/kg) nimodipina i nikardipina dekapitiran je 15 minuta po hipoksiji. Mozgovi su potom izvađeni, zaleđeni u tekućem dušiku, te držani u hladnoj komori do početka biokemijskih analiza.

## 2.4. ISHEMIJA

Difuzna ishemija mozga uvjetovana je četverožilnom okluzijom, modificiranom prema metodi Pulsinellia i Brierlyja (127). Naime, vertebralne arterije su trajno okludirane elektrokauterom na razini prvog cervikalnog kralješka. Sljedećeg dana je učinjena preparacija i podvezivanje obiju zajedničkih karotidnih arterija u trajanju od 20 minuta.

Dijelu životinja je prije podvezivanja karotida injicirano otapalo (propilen glikol i etanol) ili nimodipin (1 mg/kg).



## 2.5. BIOKEMIJSKA ISPITIVANJA

### 2.5.1. Ekstrakcija lipida

Metoda ekstrakcije radjena je modificiranom metodom po Folchu i sur. (58).Kao antioksidans u sva otapala dodavan je BHT ("butilirani hidroksitoluen" ili 2,6-di-tert-butil-p-krezol) u koncentraciji od 50-100 mg/l otapala. Zamrznuti mozgovi su izvagani i homogenizirani pomoću Unipan Type 302 homogenizatora kod 5000 o/min tijekom 5 minuta.Tučak homogenizatora oblagan je ledom kako bi se spriječilo zagrijavanje homogenizata.Dodavana je poznata količina nonadekanske kiseline (19:0) kao unutarnji standard.Nakon homogeniziranja lipidi su ekstrahirani mješanjem na magnetskoj mješalici sa smjesom kloroform:metanol (2:1,V/V) tri puta po 30 minuta.

Količina otapala za ekstrakciju tkiva uzeta je u omjeru:

otapalo:tkivo =20:1 V/g.

Dobiveni ekstrakti su filtrirani,spojeni i osušeni preko noći s  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidridom te upareni na rotacionom uparivaču do volumena od 1 ml.Ovako dobiveni ekstrakti predstavljaju ukupne lipide mozga.

### 2.5.2. Kromatografske metode

#### 2.5.2.1. Tankoslojna kromatografija

Za razdvajanje nepolarnih lipida korištena je tankoslojna preparativna kromatografija.Ona je izvodjena na standardnim staklenim pločama 20x20 cm na koje je "Desaga" aparatom nanašan silikagel G (13% gipsa) i aktiviran 30 minuta.

Nepolarni lipidi razvijeni su u smjesi petroletera, etera i octene kiseline u različitim omjerima.

Polarni lipidi ostaju na startu, a nepolarni lipidi putuju. Standardne supstancije za nepolarne lipide bile su: kolesterol, triacilglicerol, metil-stearat, palmitinska, stearinska i nonadekanska kiselina.

Nakon što su frakcije razdvojene, sastrugane su slobodne masne kiseline zajedno sa silikagelom. Eluirane su sa silikagela na koloni duljine 20 cm, 4x5 ml otopine kloroform:metanol (2:1, V/V). Eluat se sušio preko noći nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidridom i uparavao do suha na rotacionom uparivaču. Dobivena masa predstavlja slobodne masne kiseline mozga. Čistoća je provjeravana na analitičkoj ploči uz standarde. Ukoliko je bilo potrebno rađena je i rekromatografija.

Tankoslojna kromatografija radjena je na gotovim silikagel pločama 10x10 cm tvrtke "Merck" s oznakom DC Alurolle Silica gel 60 F<sub>254</sub>.

#### 2.5.2.2. Plinska kromatografija

Ispitivanja su vršena na plinskom kromatografu, Perkin-Elmer Model 8410, s FID detektorom na metalnoj koloni dužine 2 m, promjera 1/4. Kolona je punjena s 10% FFAP (free fatty acid phase) na kromosorbu W.HP. 80-100 mesh.

Obrada podataka vršena je metodom unutarnjeg standarda. Kromatogrami su tiskani pomoću Perkin Elmer pisača model GP-100 uz atenuaciju 32 i brzinu papira 2,5 mm/min.

#### 2.5.3. Metiliranje masnih kiselina

Metiliranje slobodnih masnih kiselina izvodjeno je bezvodnom metanolnom otopinom HCl spravljenom u omjeru metanol:HCl=8,3:1,7 (V/V).

Otopljeni uzorci u hermetički zatvorenim epruvetama stavljeni su na temperaturu od 120° C 30 min .



Nakon hladjenja otopine su miješane četiri puta s po 10 ml petroletera. Razdvajanje slojeva učinilo se lijevkom za odjeljivanje. Petroleterski dio ispiran je vodom, sušio se preko noći nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidridom i uparavao do suha. Dobivena masa predstavljala je metilne estere slobodnih masnih kiselina mozga i bila spremna za plinsko kromatografsku analizu.

## 2.6. HISTOLOŠKA ISPITIVANJA

Sedam dana po hipoksičnoj odnosno ishemičnoj leziji učinjena je transkardijalna perfuzija mozga štakora po metodi Wolfa i sur. (226) s 10% formalinom. Mozgovi su potom izvađeni, fiksirani u formalinu (postfiksacija), dehidrirani i uklopljeni u parafin. Koronalne sekcije, debljine 6  $\mu\text{m}$ , deparafinirane i bojane hematoksilinom i eozinom (HE). Histološka analiza je učinjena svjetlosnim mikroskopom. Praćena je a) gustoća piramidnih stanica  $\text{CA}_1$  regije hipokampusa tj. broj neurona/mm, te b) promjene strukture i morfoloških osobitosti spomenutih stanica.

## 2.7. TVARI

U pokusima su upotrebljavane slijedeće tvari i kombinacije:

1. Otopina propilen glikola i etanola u omjeru 1:1. Injicirana je životinjama kontrolnih skupina 2 i 5. Korištena je kao otapalo za ispitivane blokatore kalcijских kanala. Otopine su pripravane neposredno prije početka svakog pokusa.

2. Destilirana voda. Ubrizgavana je životinjama kontrolnih skupina 3 i 6. Korištena je kao otapalo za ispitivane kolinomimetike i nootropike. Otopine su pripremane neposredno prije početka svakog pokusa.
3. Antagonisti kalcija (nimodipin, nikardipin, ifenprodil) u dozama od 0,03;0,1;0,3 ili 1 mg/kg, te MK-801 u dozi od 0,03;0,1 ili 0,3 mg/kg samo prvog dana pokusa 30 minuta prije pokusa pasivnog izbjegavanja kazne.
4. Kolinomimetici:
  - a) kolin - korištena je doza od 100 mg/kg. Aplikiran je 30 minuta prije pokusa izbjegavanja kazne jednokratno ili tijekom deset dana.
  - b) fizostigmin salicilat - aplikiran je u dozama od 0,05;0,1 ili 0,2 mg/kg 30 minuta prije početka treninga
  - c) THA hidroklorid - injicirane su doze od 0,1;0,3 ili 1 mg/kg 60 minuta prije početka pokusa.
  - d) arekolin hidroklorid - aplikiran je u dozama od 0,1;0,3 ili 1 mg/kg, 10 minuta prije početka eksperimenta.
5. Nootropici:
  - a) piracetam - aplikiran je u dozama od 30;100 ili 300 mg/kg, 60 minuta prije početka pokusa.
  - b) oksiracetam - korištene doze su: 50;100 ili 300 mg/kg, a aplikiran je 60 minuta prije pokusa izbjegavanja kazne.



## 6. Kombinacije:

- a) nimodipina (1 mg/kg) s ifenprodilom (1 mg/kg) ili arekolinom (1 mg/kg) ili oksiracetamom (50 mg/kg). Arekolin je injiciran 10 minuta, nimodipin i ifenprodil 30 minuta, a oksiracetam 60 minuta prije početka pokusa.
- b) oksiracetama (50 mg/kg) s kolinom (100 mg/kg) ili arekolinom (1 mg/kg). Arekolin je administriran 10, kolin 30, a oksiracetam 60 minuta prije pokusa pasivnog izbjegavanja kazne.

Sve proučavane tvari ubrizgavane su i.p., u ukupnom volumenu od 1 ml/kg samo prvog dana pokusa pasivnog izbjegavanja kazne. Sve navedene doze odnose se na bazične supstancije, a ne na njihove soli.

## 2.8. PRIKAZ REZULTATA I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati izbjegavanja kazne prikazani su kao vrijeme koje je životinja provela u svijetlom odjeljku aparata, iskazano u postocima u odnosu na sveukupno vrijeme trajanja treninga (3 minute = 100%). Rezultati su obrađeni testom multiplih analiza varijanci na ponovljenim mjerenjima (MANOVA) i Duncanovim testom multiplih varijanci ( $p \leq 0,05$ ).

Razina SMK i SAK je prikazana u mg/g moždanog tkiva. Pod pojmom SMK podrazumijeva se zbroj pojedinačnih vrijednosti za slobodnu palmitinsku (16:0), stearinsku (18:0), oleinsku (18:1) i arahidonsku (20:4) kiselinu. Za statističku obradu podataka korištena je MANOVA i Duncanov test ( $p \leq 0,05$ ).

Analiza broja i gustoće piramidnih stanica CA<sub>1</sub> regije hipokampusa učinjena je Mann-Whitney U testom.

### 3. REZULTATI

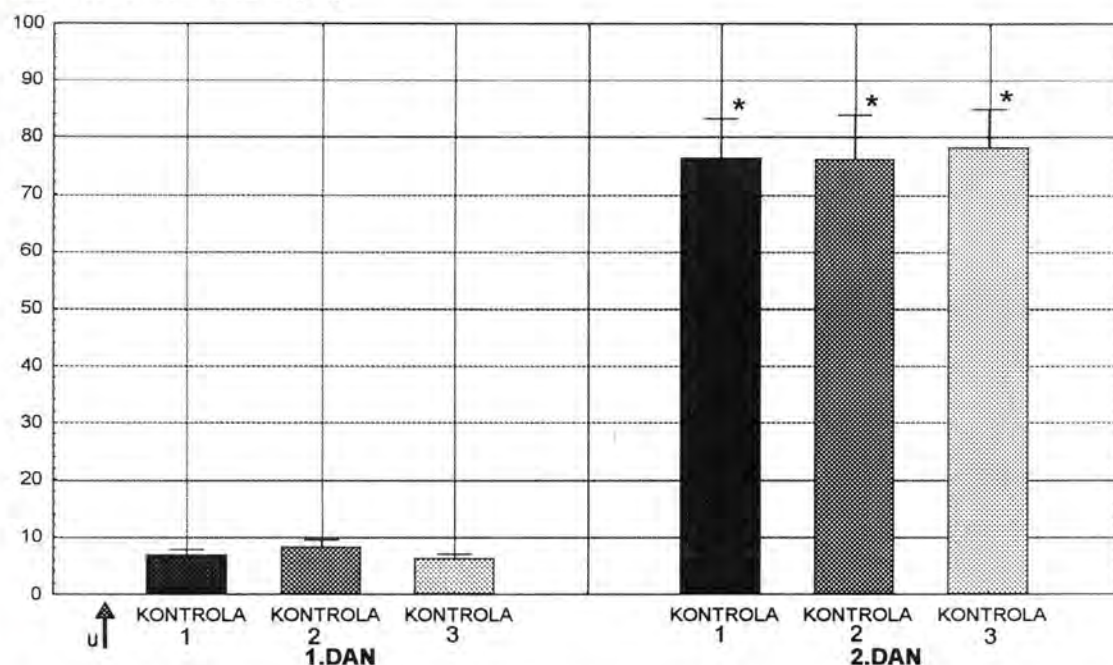


### 3.1. PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U INTAKTNIH ŠTAKORA

#### 3.1.1. KONTROLNE SKUPINE

Analiza varijanci pokazuje da pretretiranje eksperimentalnih životinja otapalom ne utječe na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne [ $F(2,134)=0,006; p \leq 0,99$ ]. Naime, iz rezultata prikazanih na slici 7. vidljivo je da ne postoji statistički značajna razlika u postocima izbjegnute kazne između životinja kontrolne skupine 1, te intaktnih životinja kontrolne skupine 2 i kontrolne skupine 3 prvog odnosno drugog dana pokusa. Evidentan je također statistički značajan porast vrijednosti izbjegnute kazne drugog dana u odnosu na prvi dan pokusa u životinja navedenih eksperimentalnih skupina [ $F(1,134)=262,2; p << 0,05$ ].

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)

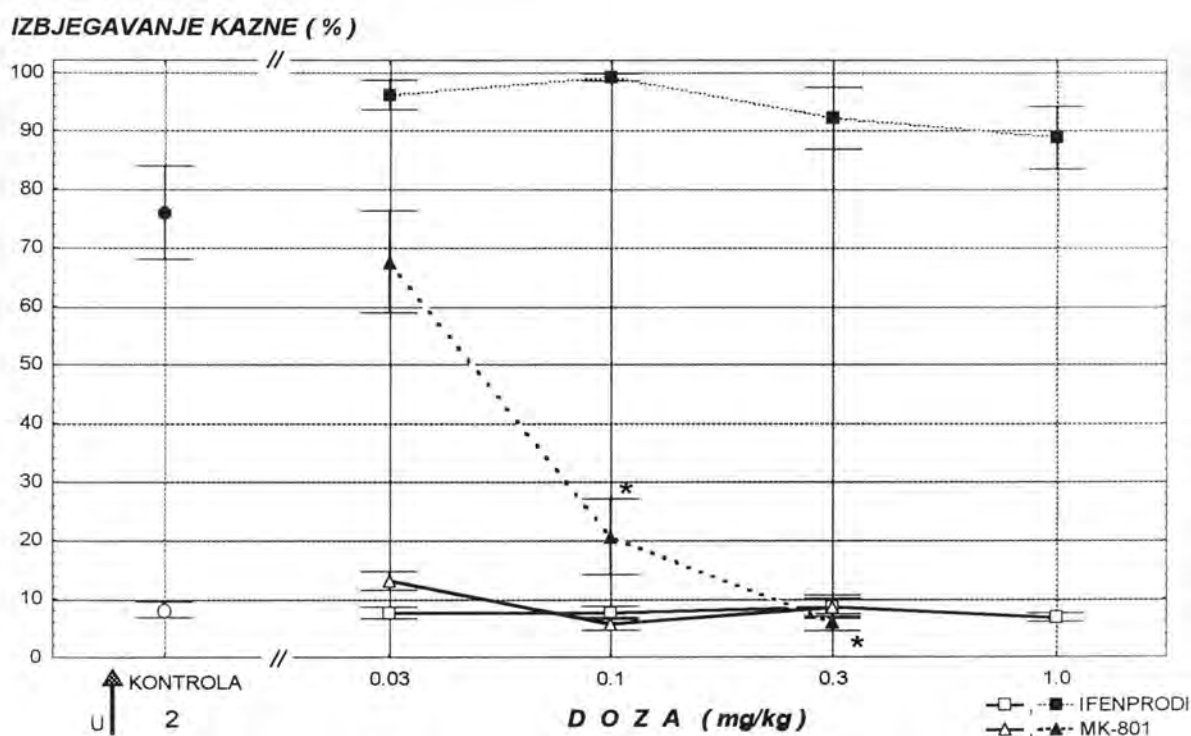


Sl.7. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolnih skupina 1,2 i 3. Na ovoj i slijedećim slikama strelica ( $\uparrow U$ ) označava ubrizgavanje ispitivanih tvari. Svaki stupac prikazuje prosječnu vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava statistički značajnu razliku prema prvom danu treninga ( $p \leq 0,05$ ).

Glede činjenice da su sve pokusne životinje (sve kontrolne i sve tretirane lijekovima) izbjegavale udar električne struje statistički značajno bolje drugog u odnosu na prvi dan pokusa, na narednim slikama uspoređivat će se sposobnost učenja u štakora koji su primali testirane lijekove ili tvari sa sposobnošću učenja kontrolnih skupina zasebno prvog odnosno drugog dana pokusa. Pri tome nećemo uspoređivati vrijednosti pasivnog izbjegavanja kazne drugog u odnosu na prvi dan treninga.

### 3.1.2. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA

#### 3.1.2.1. Blokatori NMDA receptora



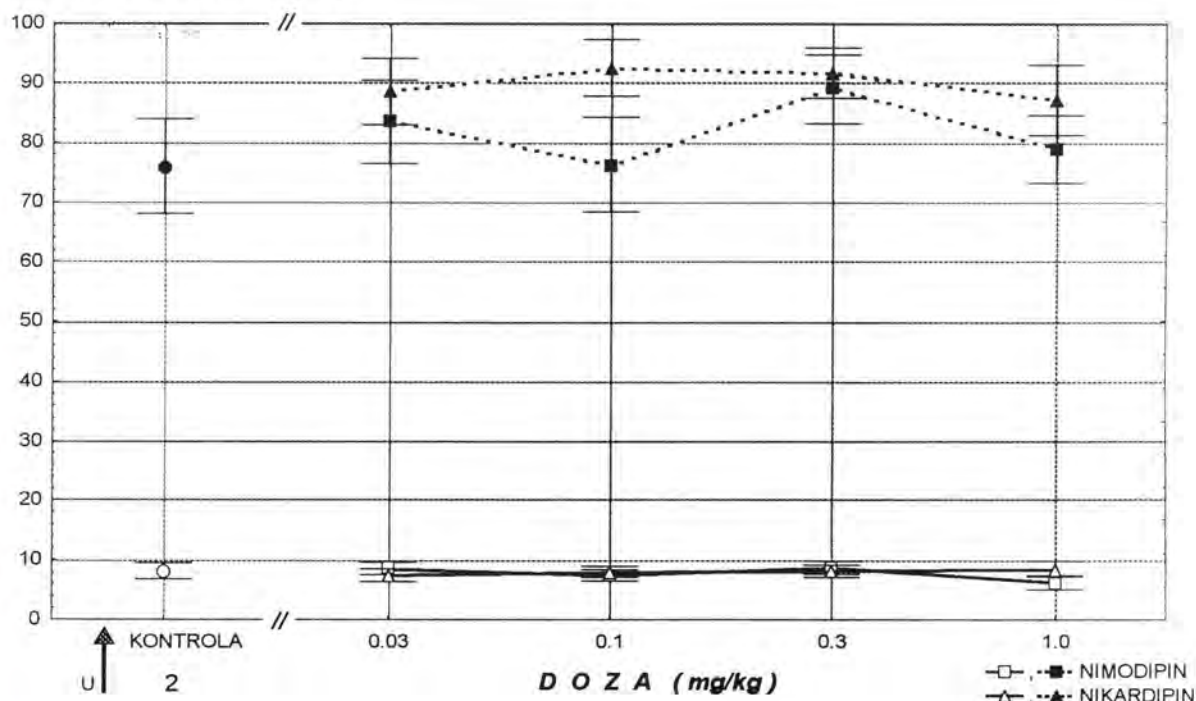
Sl.8. Na ovoj i slijedećim slikama prikazana je izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog (prazni simboli, npr.:  $\circ$ ,  $\square$ ,  $\triangle$ ) odnosno drugog (puni simboli, npr.:  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ) dana treninga. Prezentirane su vrijednosti u štakora kontrolne skupine 2 ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), te intaktnih životinja tretiranih različitim dozama ifenprodila odnosno MK-801. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g.\* označava drugog dana pokusa, statistički značajnu razliku prema skupini kontrola 2 ( $p \leq 0,05$ ).



Ubrizgavanje različitih doza (0,03;0,1;0,3 ili 1 mg/kg) ifenprodila ne utječe značajno na izbjegavanje kazne u intaktnih životinja niti prvog niti drugog dana pokusa (Slika 8). Naime, vrijednosti postotka izbjegnute kazne u životinja tretiranih spomenutom tvari ne razlikuju se značajno od vrijednosti u životinja kontrolne skupine 2 [ $F(1,95)=0,13$ ;  $p\leq 0,71$ ]. Nasuprot tome, analiza varijanci pokazala je značajan utjecaj tretmana s MK-801 [ $F(1,95)= 5,9$  ;  $p\leq 0,02$ ]. Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da drugog dana pokusa MK-801, apliciran u dozama od 0,1 i 0,3 mg/kg smanjuje sposobnost učenja u intaktnih životinja. Naime, vrijednosti izbjegavanja kazne u životinja spomenutih skupina statistički su značajno niže u odnosu na životinje kontrolne skupine 2 drugog dana pokusa ( $p\leq 0,0002$  i  $p\leq 0,0007$ ). Najniža korištena doza (0,03 mg/kg) ispitivanog NMDA blokatora ne mijenja sposobnost učenja ispitivanih životinja drugog dana pokusa, tj. ne postoji statistički značajna razlika u izbjegavanju kazne između životinja pretretiranih otapalom, odnosno spomenutom dozom MK-801 ( $p\leq 0,22$ ).

### 3.1.2.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



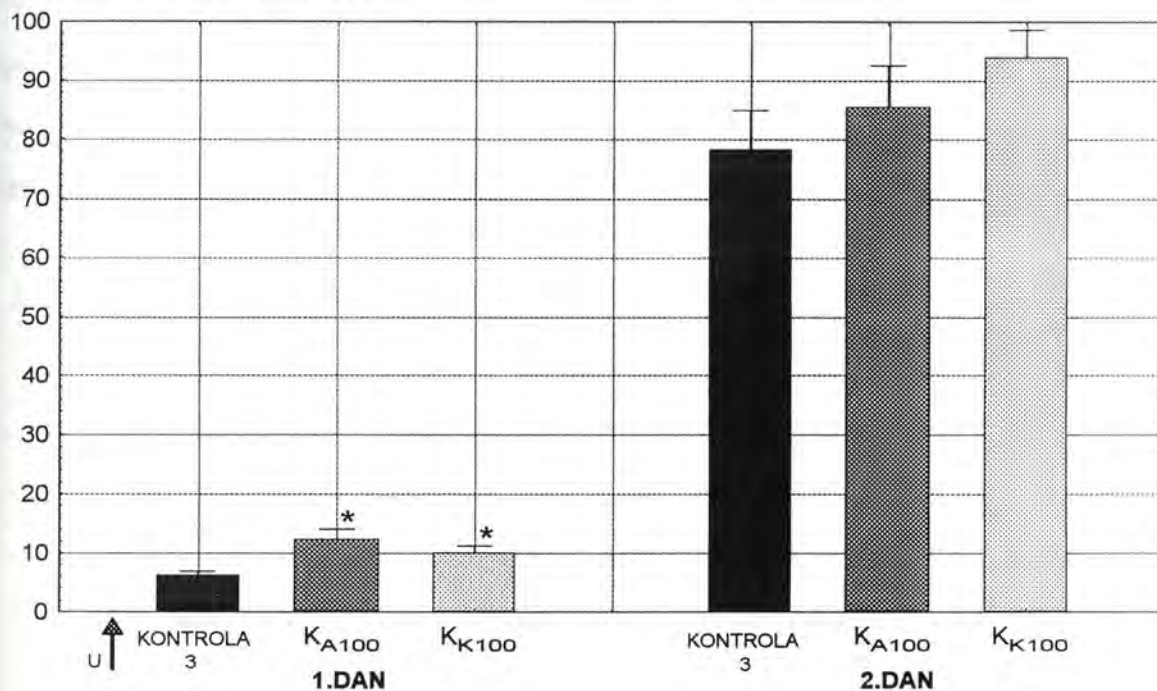
Sl. 9. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog (○, □, △) odnosno drugog (●, ■, ★) dana treninga u štakora kontrolne skupine 2 (○, ●), te intaktnih životinja tretiranih različitim dozama nimodipina i nikardipina. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost ± s.g.

Nimodipin i nikardipin ne utječu značajno na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u intaktnih životinja niti prvog niti drugog dana pokusa. Naime, vrijednosti postotka izbjegnute kazne u životinja pretretiranih različitim dozama (0,03; 0,1; 0,3 ili 1 mg/kg) nimodipina [ $F(4,190)=0,51; p \leq 0,73$ ] odnosno nikardipina [ $F(4,190)=1,26; p \leq 0,24$ ] ne razlikuju se bitno u odnosu na postotke izbjegavanja kazne kontrolnih životinja (Slika 9).



### 3.1.3. KOLINOMIMETICI

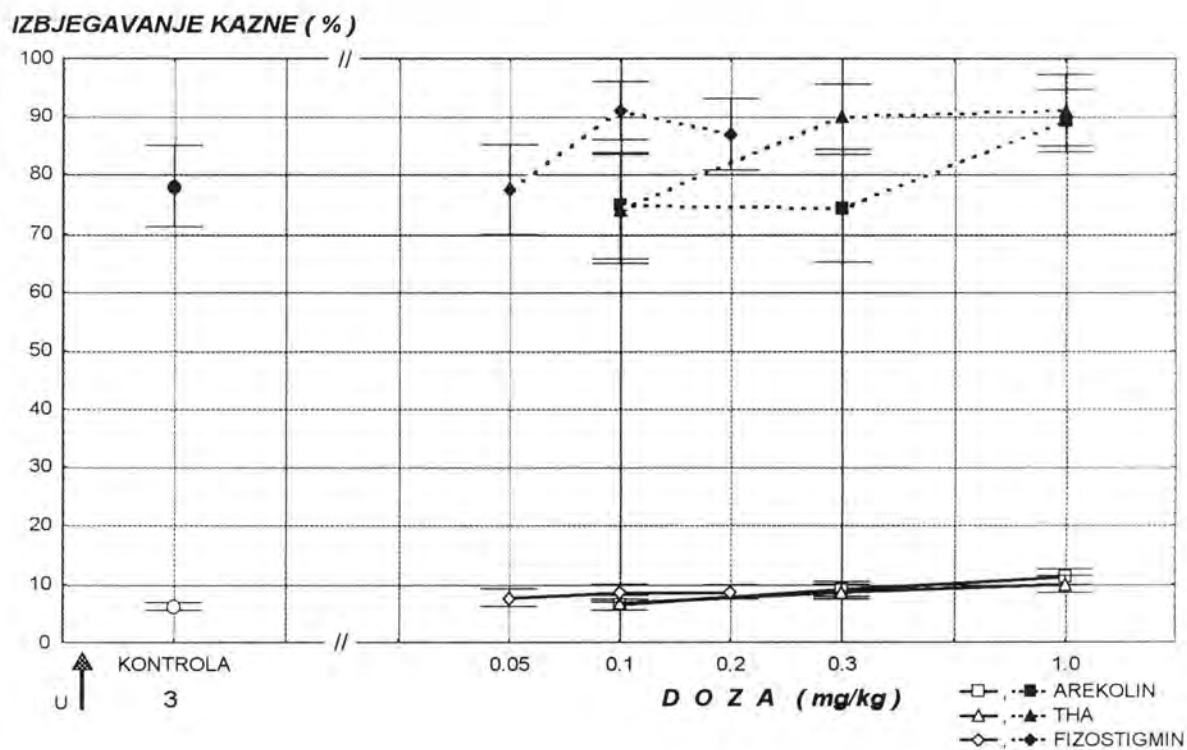
IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



**Sl.10. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 3, te intaktnih životinja nakon akutne ( $K_{A100}$ ) odnosno kronične ( $K_{K100}$ ) administracije 100 mg/kg kolina. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava prvog dana pokusa statistički značajnu razliku prema životinjama kontrolne skupine 3 ( $p \leq 0,05$ ).**

Analiza varijanci pokazala je da postoji značajan utjecaj tretmana kolinom prvog dana pokusa [ $F(1,57)=10,75; p \leq 0,002$ ]. Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da jednokratna ( $p \leq 0,001$ ) odnosno desetodnevna ( $p \leq 0,03$ ) aplikacija kolina statistički značajno popravlja sposobnost stjecanja znanja prvog dana pokusa u usporedbi s životinjama kontrolne skupine 3 (Slika 10).

Rezultati izbjegnute kazne u životinja pretretiranih različitim dozama (0,1;0,3 ili 1 mg/kg) arekolina ili THA, odnosno (0,05;0,1 ili 0,2 mg/kg) fizostigmina (Slika 11) pokazuju da testirane tvari ne utječu na kognitivne sposobnosti u intaktnih životinja niti prvog niti drugog dana pokusa. Naime, nema značajne razlike u vrijednostima postotka izbjegnute kazne između životinja kontrolne skupine 3 i eksperimentalnih životinja tretiranih navedenim kolinomimeticima [ $F(9,386)=0,8;p\leq 0,62$ ].

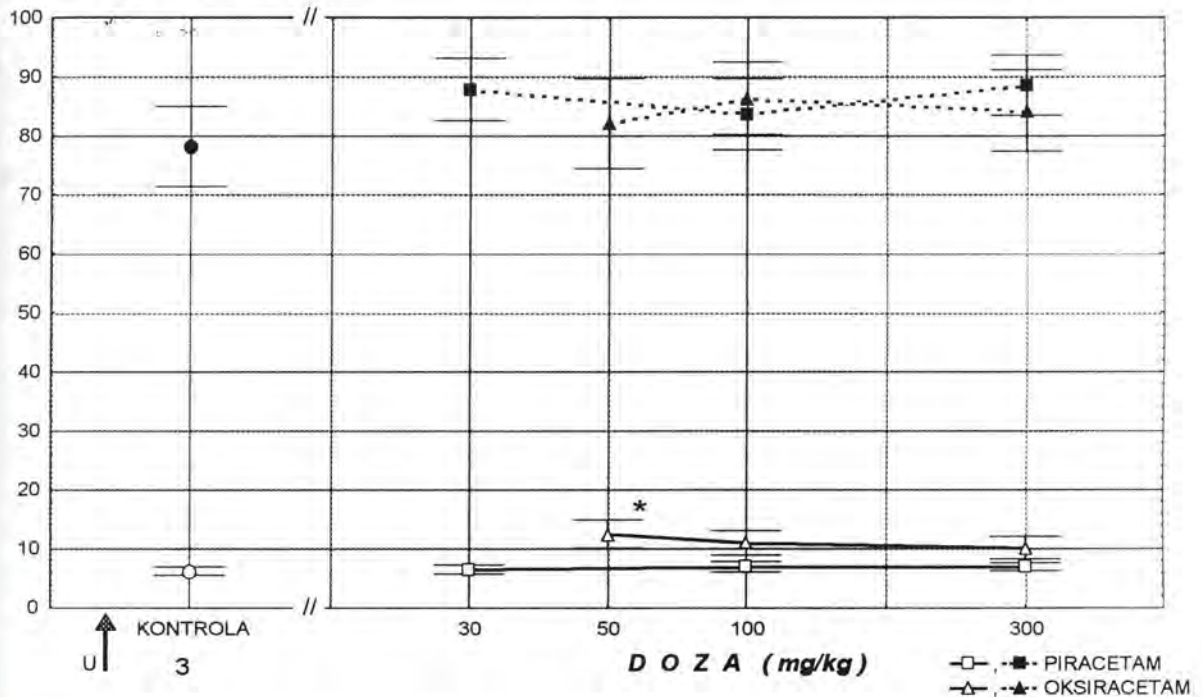


Sl.11. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog (○, ◇, □, △) odnosno drugog (●, ◆, ■, ▲) dana treninga u štakora kontrolne skupine 3 (○, ●), te intaktnih životinja tretiranih različitim dozama arekolina, THA ili fizostigmina. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost ± s.g.



### 3.1.4. NOOTROPICI

#### IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



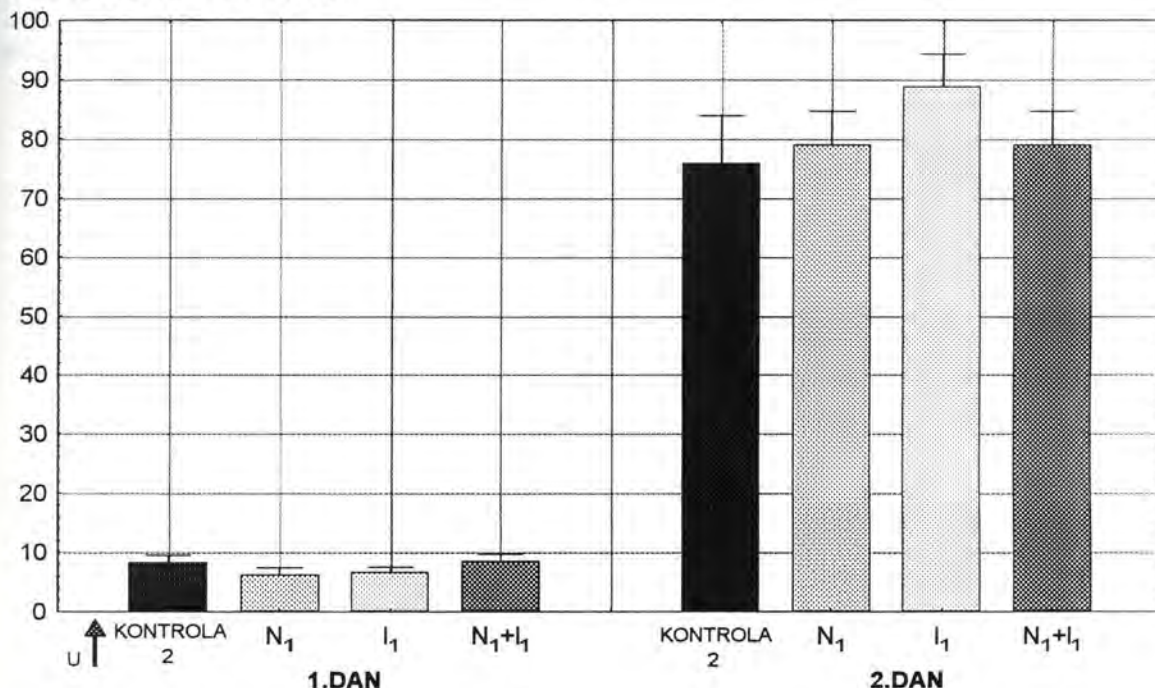
**Sl.12.** Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog ( $\square$ ,  $\triangle$ ) odnosno drugog ( $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ) dana treninga u štakora kontrolne skupine 3 ( $\square$ ,  $\bullet$ ), te intaktnih životinja tretiranih različitim dozama piracetama odnosno oksiracetama. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava prvog dana pokusa statistički značajnu razliku prema životinjama kontrolne skupine 3 ( $p \leq 0,05$ ).

Piracetam ne utječe značajno na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u intaktnih životinja prvog, odnosno drugog dana treninga (Slika 12). Naime, nije utvrđena razlika u rezultatima izbjegavanja kazne između životinja kontrolne skupine 3 i životinja pretretiranih navedenom supstancijom [ $F(1,133)=1,13; p \leq 0,29$ ]. Međutim, analiza varijanci pokazala je prvog dana pokusa postojanje značajnog učinka tretmana oksiracetamom [ $F(1,76)=5,24; p \leq 0,02$ ]. Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je, naime, da oksiracetam u dozi od 50 mg/kg statistički značajno popravlja sposobnost učenja u odnosu na kontrolne životinje ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 12).

### 3.1.5. KOMBINACIJE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA

#### 3.1.5.1. Nimodipin i ifenprodil

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



*Sl.13. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 2, te intaktnih životinja pretretiranih nimodipinom (1 mg/kg) (N<sub>1</sub>) ili ifenprodilom (1 mg/kg) (I<sub>1</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (N<sub>1</sub>+I<sub>1</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g.*

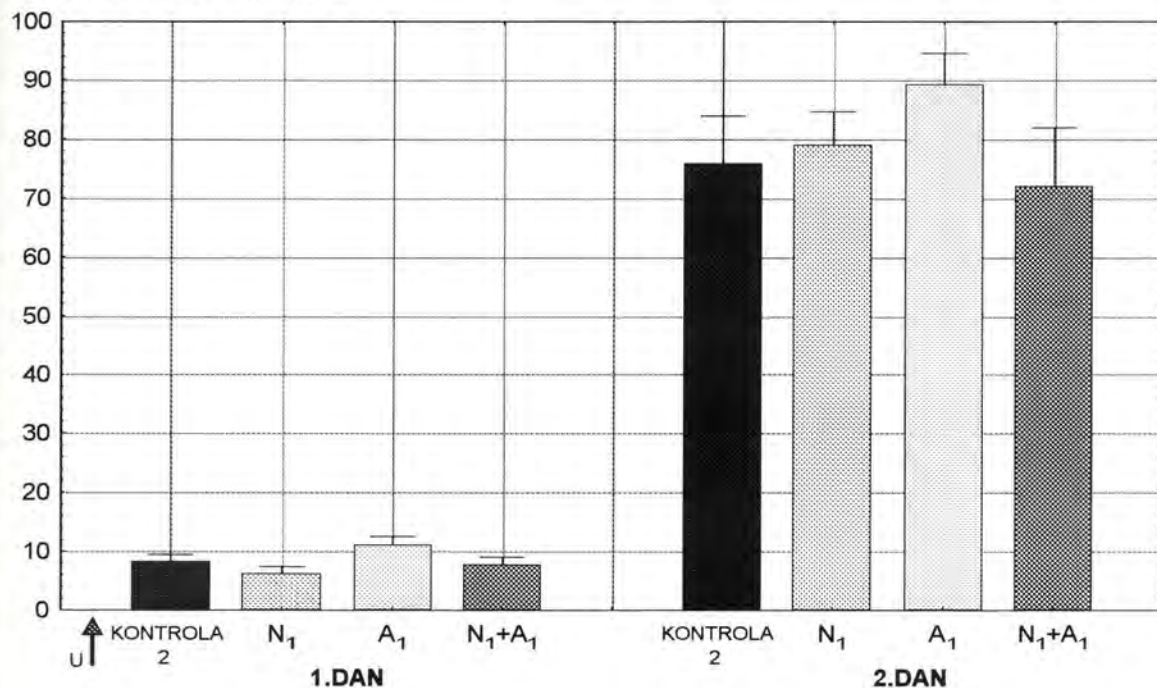
Ubrizgavanje kombinacije nimodipina (1,0 mg/kg) i ifenprodila (1,0 mg/kg) ne utječe na sposobnost učenja u intaktnih životinja tijekom prvog odnosno drugog eksperimentalnog dana. Naime, vrijednosti postotaka izbjegnute kazne životinja tretiranih spomenutom kombinacijom blokatora kalcijevih kanala ne razlikuju se značajno u odnosu na životinje pretretirane otapalom [ $F(1,76)=0,74; p \leq 0,39$ ]. Očito je također da prvog odnosno drugog dana treninga navedena kombinacija lijekova ne mijenja spoznajne aktivnosti



eksperimentalnih životinja u odnosu na životinje pretretirane samo nimodipinom ili samo ifenprodilom [ $F(3,152)=0,79;p\leq 0,5$ ] (Slika 13).

### 3.1.5.2. Nimodipin i arekolin

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



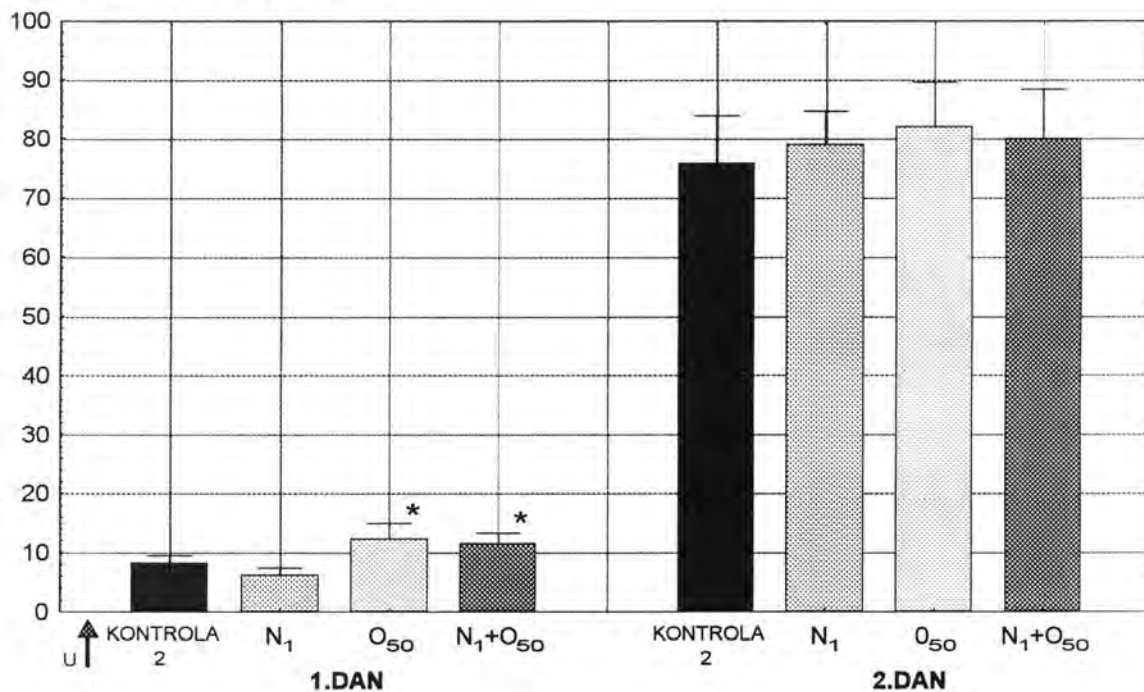
Sl.14. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 2, te intaktnih životinja pretretiranih nimodipinom (1 mg/kg)(N<sub>1</sub>) ili arekolinom (1 mg/kg) (A<sub>1</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (N<sub>1</sub>+A<sub>1</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g.

Dobiveni rezultat upućuje na zaključak da kombinacijom nimodipina i arekolina nije moguće pojačati spoznajne aktivnosti u intaktnih životinja. Naime, postoci izbjegavanja kazne dobiveni u životinja pretretiranih spomenutom kombinacijom tvari ne razlikuju se značajno u odnosu na vrijednosti dobivene u kontrolnih životinja niti prvog niti drugog dana pokusa. Nadalje, vidljivo je da navedenom kombinacijom lijekova nije moguće

poboljšati kognitivne sposobnosti u odnosu na životinje testirane svakom od pojedinih tvari ponaosob [F(3,152)=0,63;p≤0,6] (Slika 14).

### 3.1.5.3. Nimodipin i oksiracetam

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



Sl.15. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 2, te intaktnih životinja pretretiranih nimodipinom (1 mg/kg) (N<sub>1</sub>) ili oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (N<sub>1</sub>+O<sub>50</sub>) Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava statistički značajnu razliku prvog dana pokusa prema skupini kontrola 2 (p≤0,05).

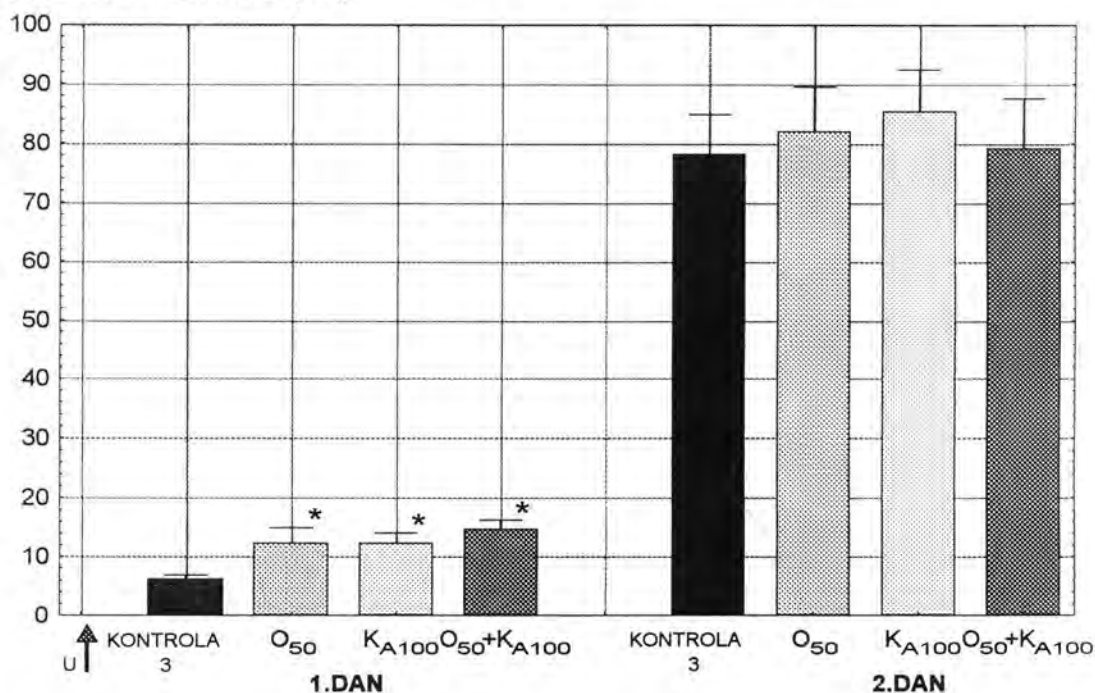
Analiza varijanci pokazala je postojanje značajnog učinka tretmana kombinacije nimodipina i oksiracetama na pasivno izbjegavanje kazne u intaktnih životinja. Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da životinje pretretirane navedenom kombinacijom lijekova, statistički značajno bolje uče u odnosu na kontrolne životinje prvog dana treninga [F(1,38)=5.2;p≤0,028]. Pronađeno je također da se navedene vrijednosti pasivnog izbjegavanja kazne ne razlikuju značajno u odnosu na vrijednosti



dobivene u životinja koje su pretretirane svakom od pojedinih tvari. Suprotno, ubrizgavanje ispitivane kombinacije lijekova ne mijenja značajno pasivno izbjegavanje kazne u intaktnih štakora drugog dana pokusa. Naime, postoci izbjegavanja kazne u štakora treniranih pod utjecajem kombinacije navedenih tvari ne razlikuju se značajno u odnosu na postotke izbjegnute kazne u životinja pretretiranih otapalom odnosno samim nimodipinom ili samim oksiracetamom (Slika 15).

### 3.1.5.4. Oksiracetam i kolin

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



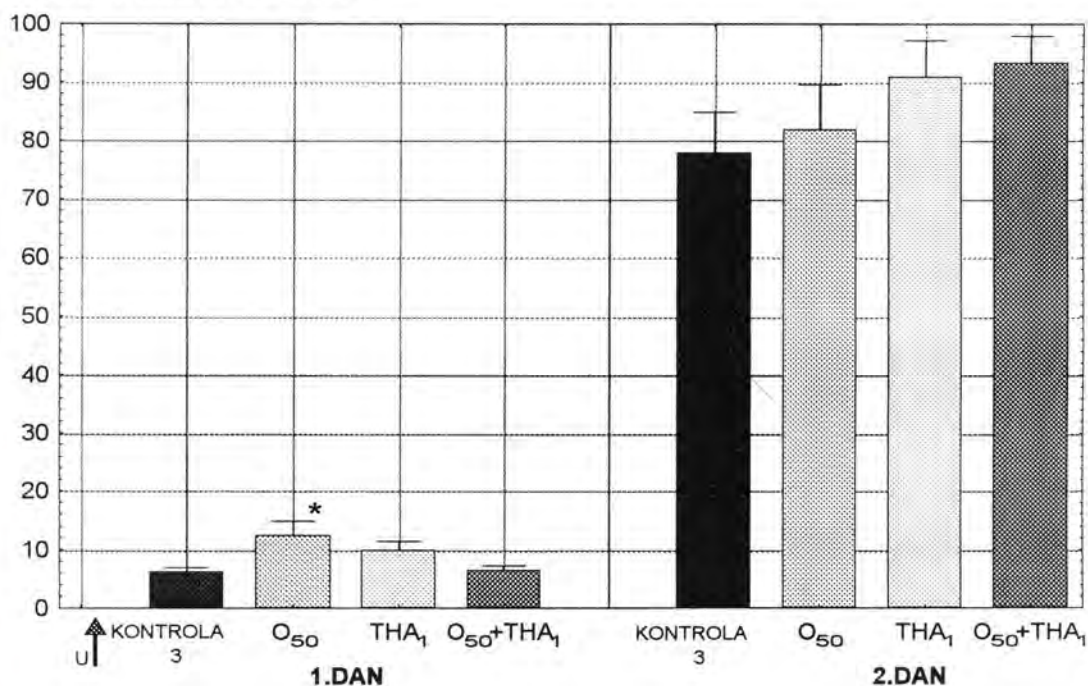
Sl.16. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 3, te intaktnih životinja pretretiranih oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) ili akutno administriranim kolinom (100 mg/kg) (K<sub>A100</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (O<sub>50</sub> + K<sub>A100</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava prvog dana pokusa statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 3 (p ≤ 0,05).

Analizom varijanci utvrđen je značajan utjecaj tretmana kombinacije oksiracetama i kolina na pasivno izbjegavanje kazne u intaktnih životinja

[ $F(1,38)=21,8;p\leq 0,00004$ ].Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da životinje pretretirane spomenutim tvarima, statistički značajno bolje uče u odnosu na kontrolne životinje prvog dana pokusa (Slika 16).Spomenuti učinak ne razlikuje se značajno od učinka aplikacije samo oksiracetama [ $F(1,57)=0,6;p\leq 0,44$ ] ili samo kolina [ $F(1,57)=0,72;p\leq 0,4$ ] prvog dana pokusa. Nadalje, postoji pasivnog izbjegavanja kazne u životinja pretretiranih kombinacijom oksiracetama i kolina drugog dana pokusa ne razlikuju se značajno u odnosu na postotke izbjegnute kazne intaktnih životinja kojima je injicirano otapalo,odnosno ispitivane tvari pojedinačno [ $F(3,152)=0,24;p\leq 0,87$ ].

### 3.1.5.5. Oksiracetam i THA

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



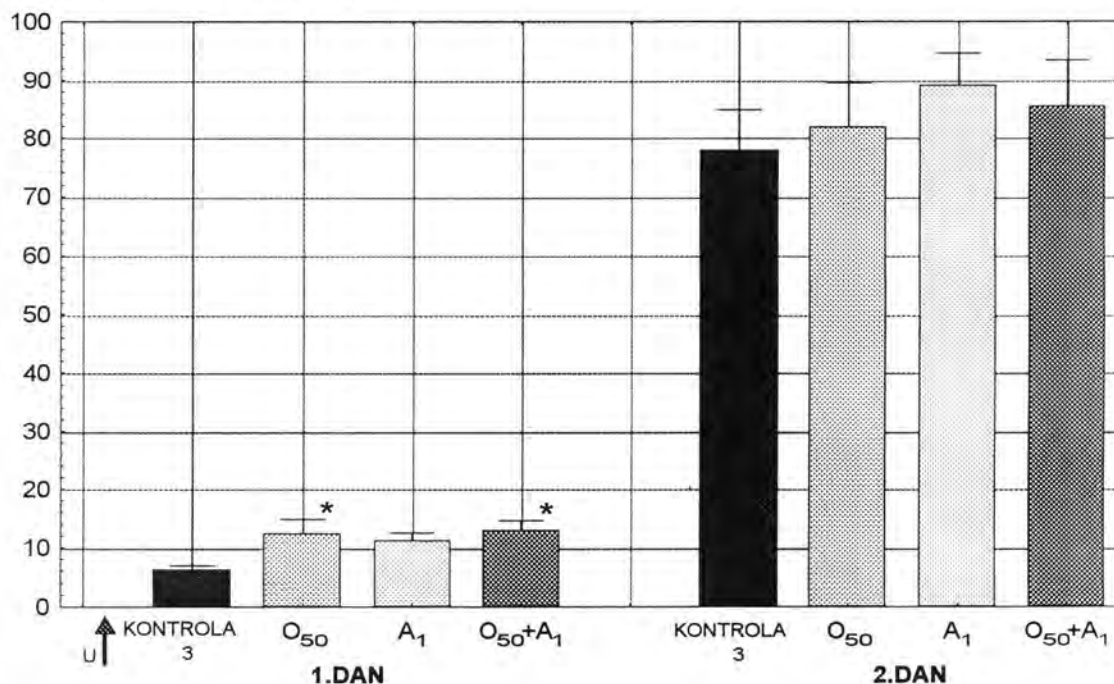
Sl.17. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 3, te intaktnih životinja pretretiranih oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) i THA (1 mg/kg) (THA<sub>1</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (O<sub>50</sub>+THA<sub>1</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava prvog dana pokusa statistički značajnu razliku prema skupini kontrola 3 ( $p\leq 0,05$ ).



Vrijednosti postotka izbjegnute kazne u životinja kojima je aplicirana kombinacija oksiracetama i THA pokazuju da ne postoji značajnija razlika u izvršavanju postavljenih zadataka između životinja spomenute skupine i kontrolnih životinja niti prvog niti drugog dana pokusa [F(1,38)=3,0;p≤0,09]. Također, navedena kombinacija nije se pokazala učinkovitijom u odnosu na aplikaciju samo oksiracetama ili samo THA [F(3,76)=1,34;p≤0,27] (Slika 17).

### 3.1.5.6. Oksiracetam i arekolin

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



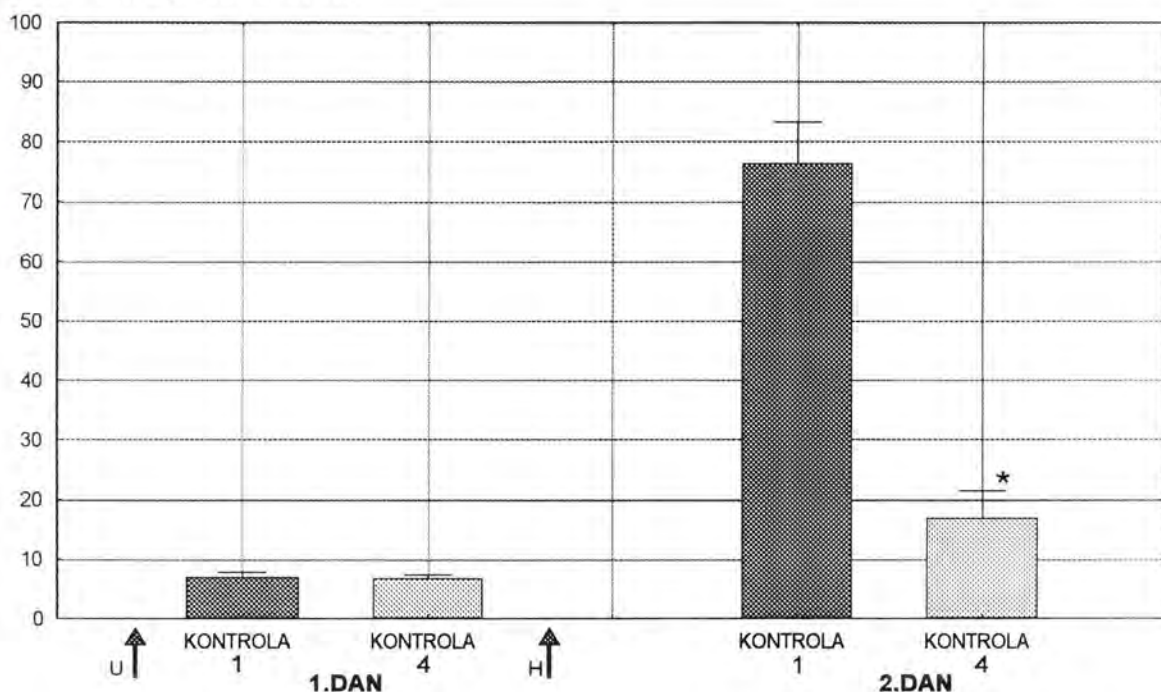
Sl.18. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 3, te intaktnih životinja pretretiranih oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) ili arekolinom (1 mg/kg) (A<sub>1</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (O<sub>50</sub>+A<sub>1</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava prvog eksperimentalnog dana statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 3 (p≤0.05).

Iz rezultata prikazanih na slici 18. vidljivo je da prvog dana pokusa postoji značajan utjecaj kombinacije oksiracetama i arekolina na pasivno izbjegavanje kazne u intaktnih životinja [ $F(1,38)=12,06;p\leq 0,0002$ ]. Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da je sposobnost učenja životinja tretiranih navedenom kombinacijom lijekova statistički značajno bolja u odnosu na životinje kontrolne skupine 3.

### 3.2. PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U ŽIVOTINJA IZLOŽENIH HIPOKSIJI

#### 3.2.1. KONTROLNE SKUPINE

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



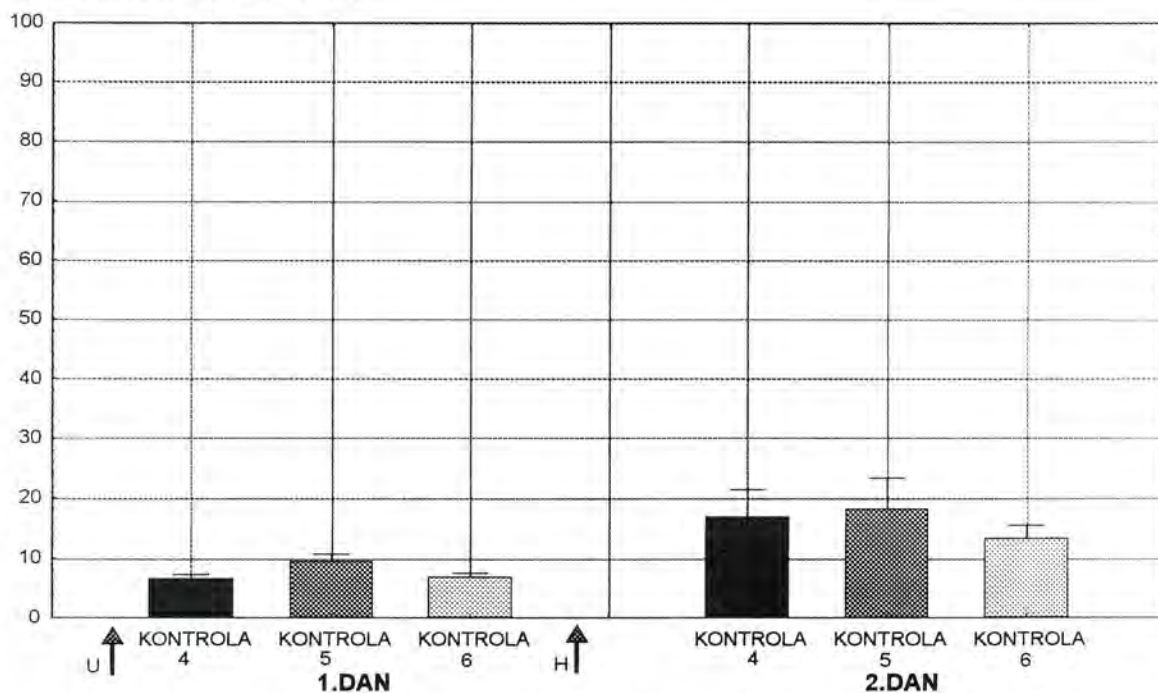
Sl.19. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolnih skupina 1 i 4. Na ovoj i slijedećim slikama strelica ( $\uparrow H$ ) označava izlaganje životinja uvjetima kontrolirane hipoksije. Svaki stupac prikazuje prosječnu vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava drugog dana pokusa statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 1 ( $p\leq 0.05$ ).



Rezultati prikazani na slici 19. pokazuju da izlaganje eksperimentalnih životinja uvjetima kontrolirane hipoksije značajno smanjuje sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne drugog dana pokusa. Naime, analiza varijanci pokazala je da postoji značajan učinak hipoksije [ $F(1,3638)=45,4; p < 0,05$ ], a Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da su vrijednosti izbjegavanja kazne drugog dana pokusa, u životinja kontrolne skupine 4, statistički značajno niže u odnosu na rezultate dobivene u životinja kontrolne skupine 1 (Slika 19).

Iz rezultata prikazanih na slici 20. vidljivo je da ubrizgavanje otapala tj. otopine propilen glikola i etanola (kontrolna skupina 5) odnosno destilirane vode (kontrolna skupina 6) ne mijenja značajno sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u eksperimentalnih životinja niti prvog niti drugog dana pokusa. Naime, vidljivo je da ne postoji statistički značajna razlika u rezultatima sposobnosti izbjegavanja kazne između životinja navedenih skupina te životinja kontrolne skupine 4 [ $F(2,67)=0,16; p \leq 0,85$ ].

#### IZBJEGAVANJE KAZNE (%)

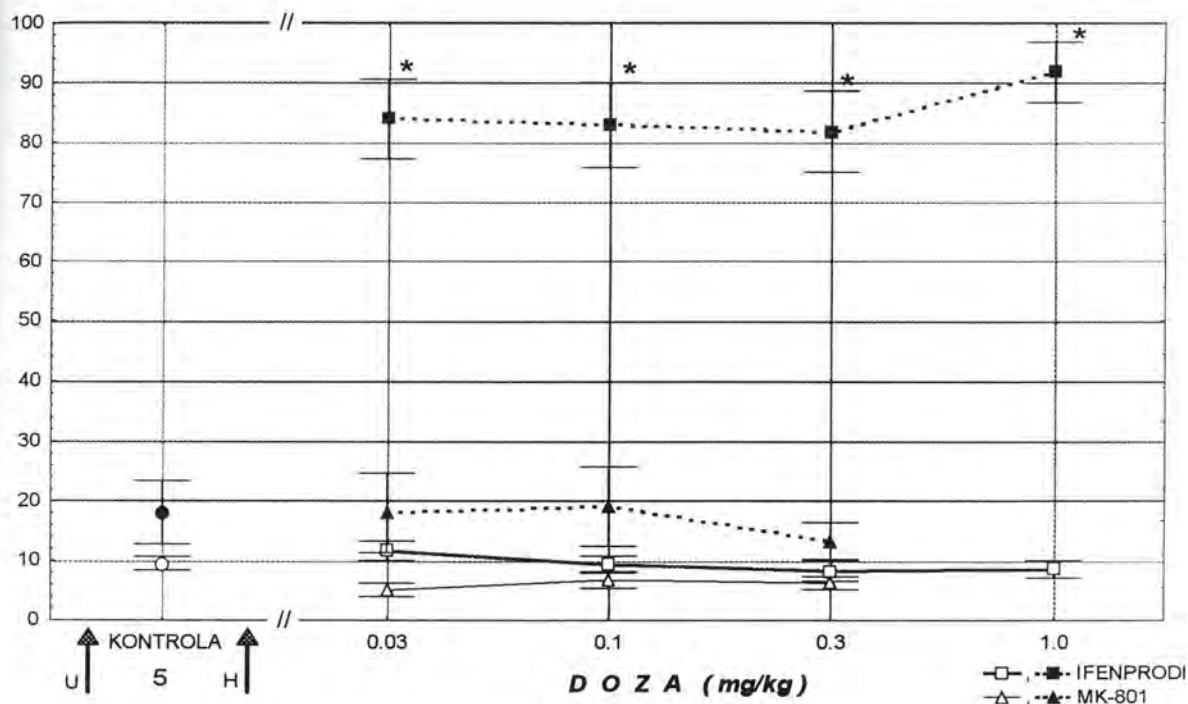


Sl.20. Izbjegavanje kazne (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolnih skupina 4,5, i 6. Svaki stupac prikazuje prosječnu vrijednost  $\pm$  s.g.

### 3.2.2. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA

#### 3.2.2.1. NMDA blokatori

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



Sl.21. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog ( $\circ$ ,  $\square$ ,  $\triangle$ ) odnosno drugog ( $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ) dana treninga u štakora kontrolne skupine 5 ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) i hipoksičnih životinja pretretiranih različitim dozama ifenprodila odnosno MK-801. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava drugog dana pokusa statistički značajnu razliku prema skupini kontrola 5 ( $p \leq 0,05$ ).

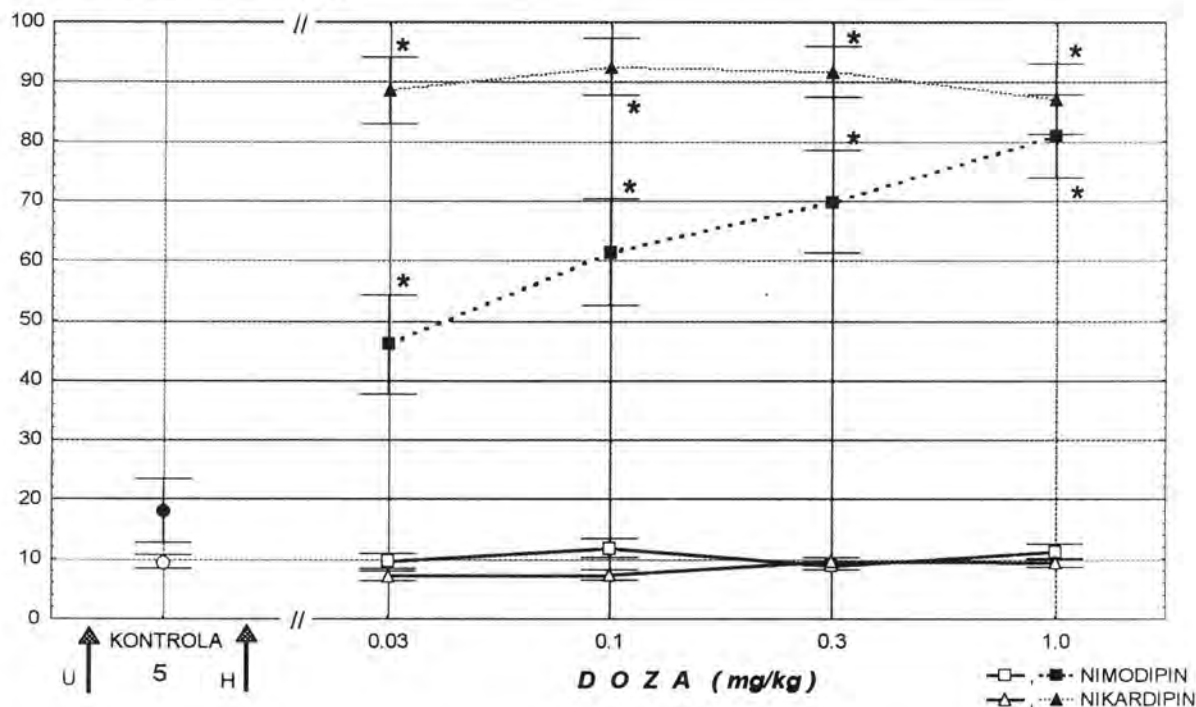
Sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u eksperimentalnih životinja pretretiranih različitim dozama (0,03;0,1;0,3 ili 1 mg/kg) ifenprodila statistički je značajno bolja drugog dana pokusa u odnosu na rezultate izbjegavanja kazne u životinja pretretiranih otapalom [ $F(4,95)=24,4;p < 0,05$ ]. Nasuprot tome, MK-801 upotrijebljen u dozama od 0,03,0,1 i 0,3 mg/kg ne utječe značajno na kognitivne sposobnosti ispitivanih životinja. Naime, vrijednosti postotaka izbjegnute kazne ovih eksperimentalnih skupina ne se razlikuju značajno od



izbjegavanja kazne životinja pretretiranih otapalom prvog odnosno drugog dana treninga (Slika 21).

### 3.2.2.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)

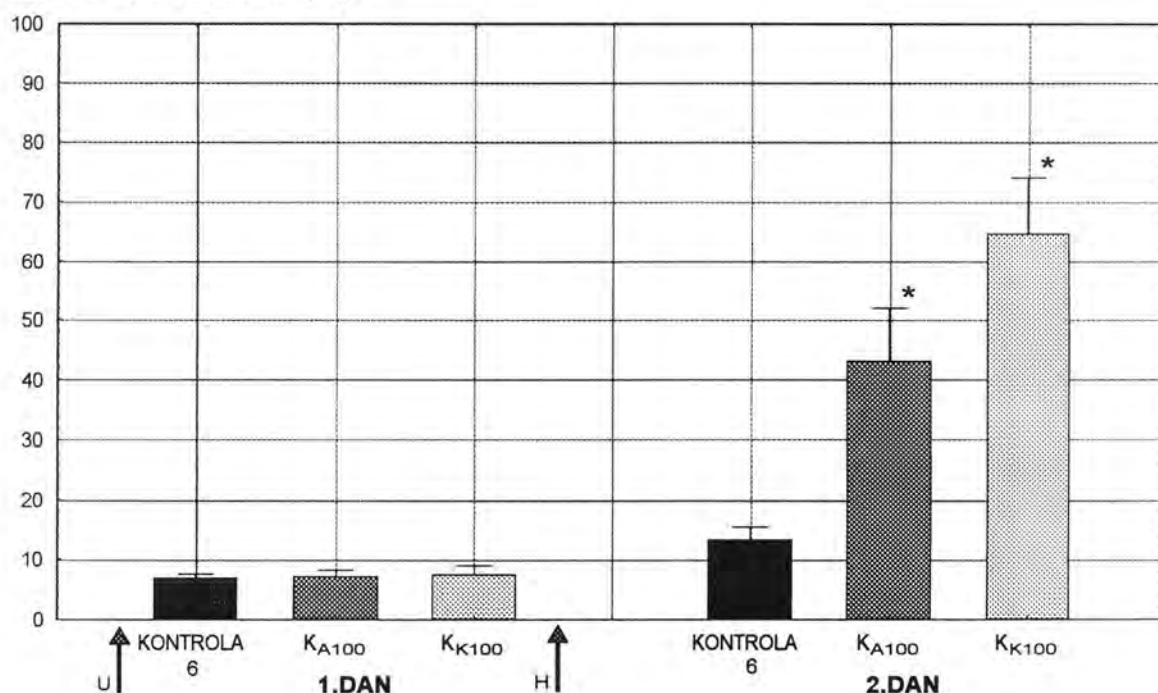


Sl.22. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog (○, □, △) odnosno drugog (●, ■, ★) dana treninga u štakora kontrolne skupine 5 (○, ●) i hipoksičnih životinja pretretiranih različitim dozama nimodipina odnosno nikardipina. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava drugog dana pokusa statistički značajnu razliku prema skupini kontrola 5 ( $p \leq 0,05$ ).

Analizom varijanci ustanovljen je značajan učinak tretmana nimodipinom i nikardipinom [ $F(8,171)=7,1; p < 0,05$ ]. Duncanovim testom multiplih varijanci pokazano je da drugog dana pokusa sve aplicirane doze (0,03; 0,1; 0,3 ili 1 mg/kg) ispitivanih tvari, uzrokuju statistički značajno poboljšanje sposobnosti izbjegavanja kazne u hipoksičnih životinja u odnosu na životinje kontrolne skupine 5 (Slika 22).

### 3.2.3. KOLINOMIMETICI

#### IZBJEGAVANJE KAZNE (%)

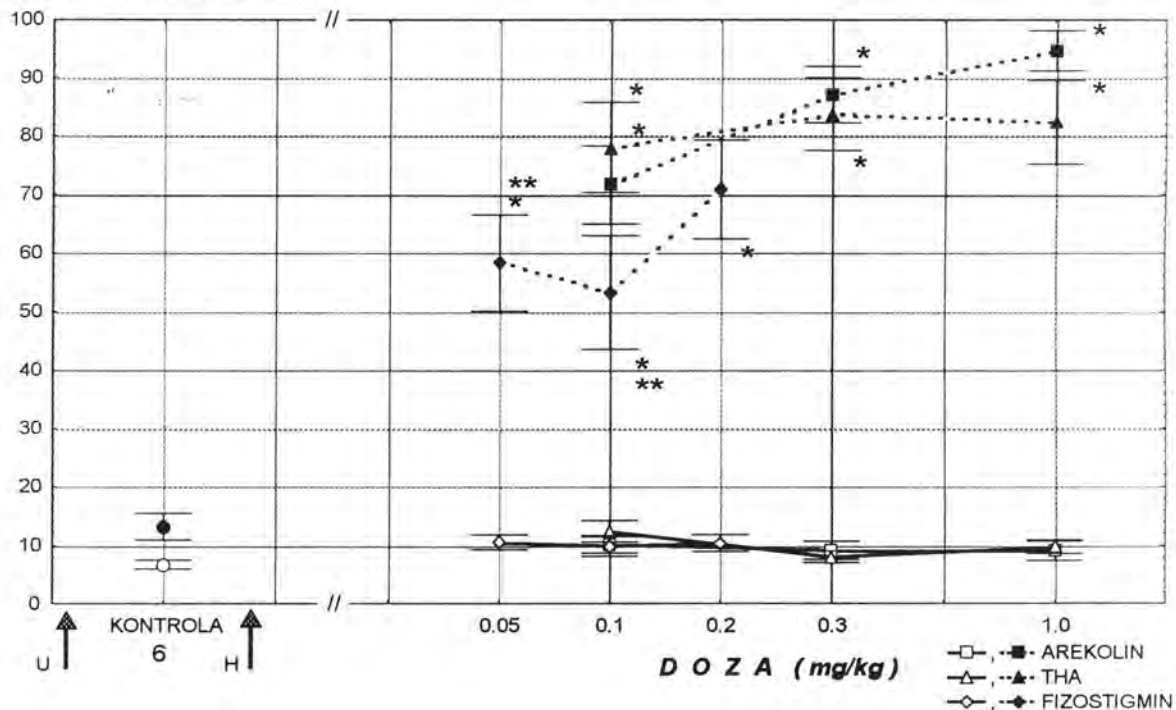


**Sl.23. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 6 i hipoksičnih životinja nakon akutne (KA100) odnosno kronične (KK100) administracije kolina u dozi od 100 mg/kg. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava drugog eksperimentalnog dana statistički značajnu razliku prema skupini kontrola 6 ( $p \leq 0,05$ ).**

Akutna odnosno kronična administracija kolina statistički značajno popravlja kognitivne aktivnosti ispitivanih životinja drugog dana treninga. Naime, analiza varijanci pokazala je drugog dana treninga značajan utjecaj jednokratnog, odnosno desetodnevnog tretmana kolinom na sposobnost učenja u hipoksičnih štakora [ $F(1,57)=22,7; p \leq 0,00002$ ] (Slika 23).



**IZBJEGAVANJE KAZNE (%)**



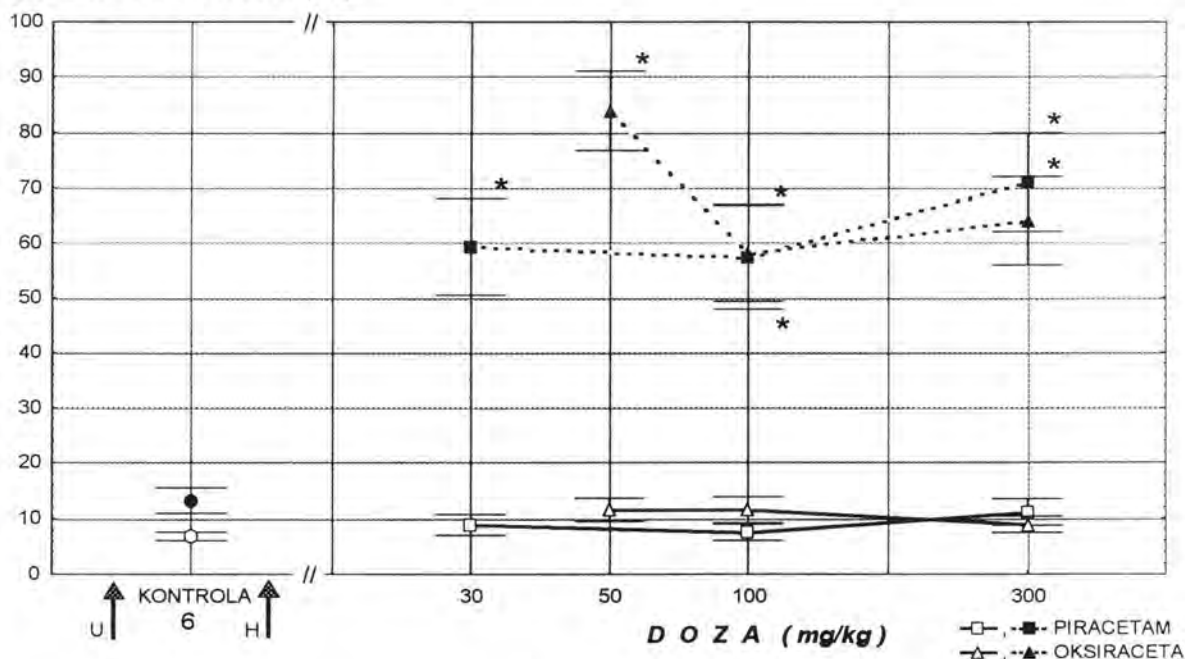
**Sl.24. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog (○, ◇, ◊, △) odnosno drugog (●, ◆, ◐, ▲) dana treninga u štakora kontrolne skupine 6 (○, ●) i hipoksičnih životinja pretretiranih različitim dozama fizostigmina, THA i arekolina. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava drugog dana pokusa statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 6 ( $p \leq 0.05$ ). \*\* označavaju statistički značajnu razliku prema štakorima pretretiranim s 1,0 mg/kg arekolina drugog dana treninga ( $p \leq 0.05$ ).**

Analiza varijanci pokazala je značajan učinak tretmana s arekolinom, THA i fizostigminom na kognitivne aktivnosti životinja izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije [ $F(9,190)=11,2; p < 0,05$ ]. Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da drugog dana pokusa sve ispitivane doze korištenih kolinomimetika uzrokuju statistički značajno poboljšanje sposobnosti pasivnog izbjegavanja kazne u odnosu na hipoksične životinje pretretirane otapalom (Slika 24). Vidljivo je također da su drugog dana pokusa rezultati izbjegavanja kazne dobiveni u životinja tretiranih s 1,0 mg/kg

arekolina statistički značajno bolji u usporedbi s rezultatima dobivenim u životinja tretiranih s 0,05 ili 0,1 mg/kg fizostigmina.

### 3.2.4. NOOTROPICI

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



Sl.25. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog ( $\circ$ ,  $\square$ ,  $\triangle$ ) odnosno drugog ( $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ,  $\blacktriangle$ ) dana treninga u štakora kontrolne skupine 6 ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) i hipoksičnih životinja pretretiranih različitim dozama piracetama odnosno oksiracetama. Svaka točka prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava drugog dana pokusa statistički značajnu razliku prema skupini kontrola 6 ( $p \leq 0,05$ ).

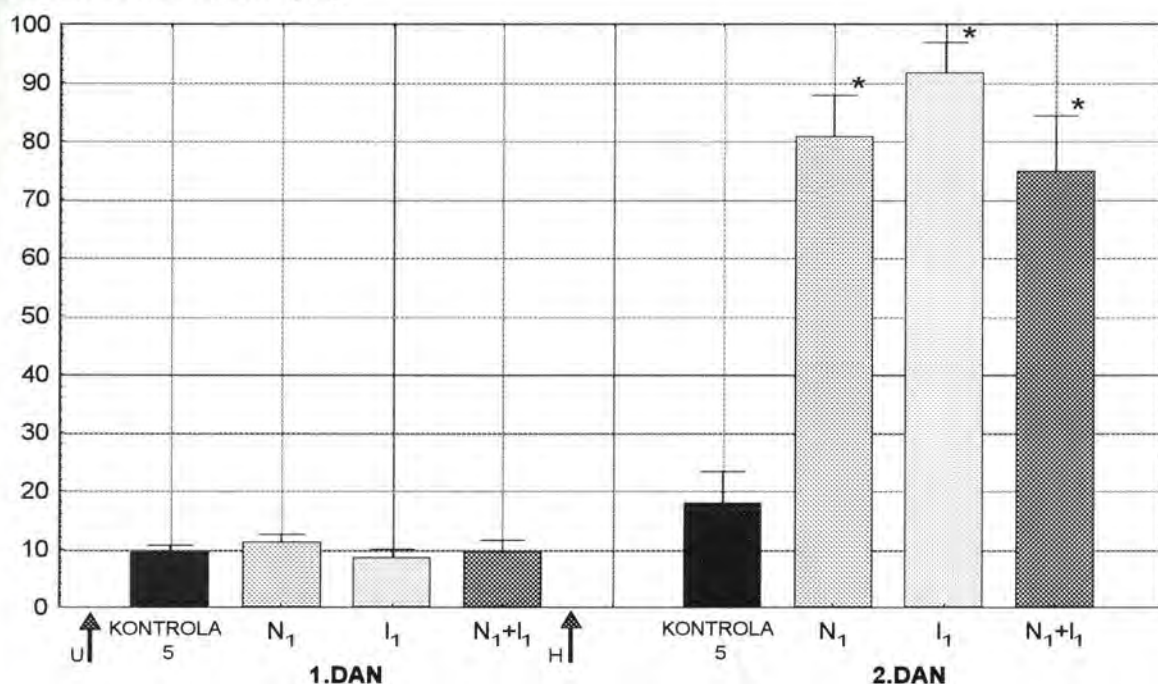
Piracetam i oksiracetam ostvaruju značajno antiamnestičko djelovanje (Slika 25). Naime, analizom varijanci utvrđen je značajan učinak tretmana spomenutim tvarima na sposobnost učenja u hipoksičnih životinja [ $F(6,133)=7,4; p \leq 0,000001$ ]. Postoci izbjegavanja kazne hipoksičnih životinja pretretiranih različitim dozama (30;100 ili 300 mg/kg) piracetama odnosno (50;100 ili 300 mg/kg) oksiracetama statistički su značajno viši u odnosu na postotak izbjegavanja kazne kontrolnih životinja drugog dana treninga.



### 3.2.5. KOMBINACIJE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA

#### 3.2.5.1. Nimodipin i ifenprodil

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



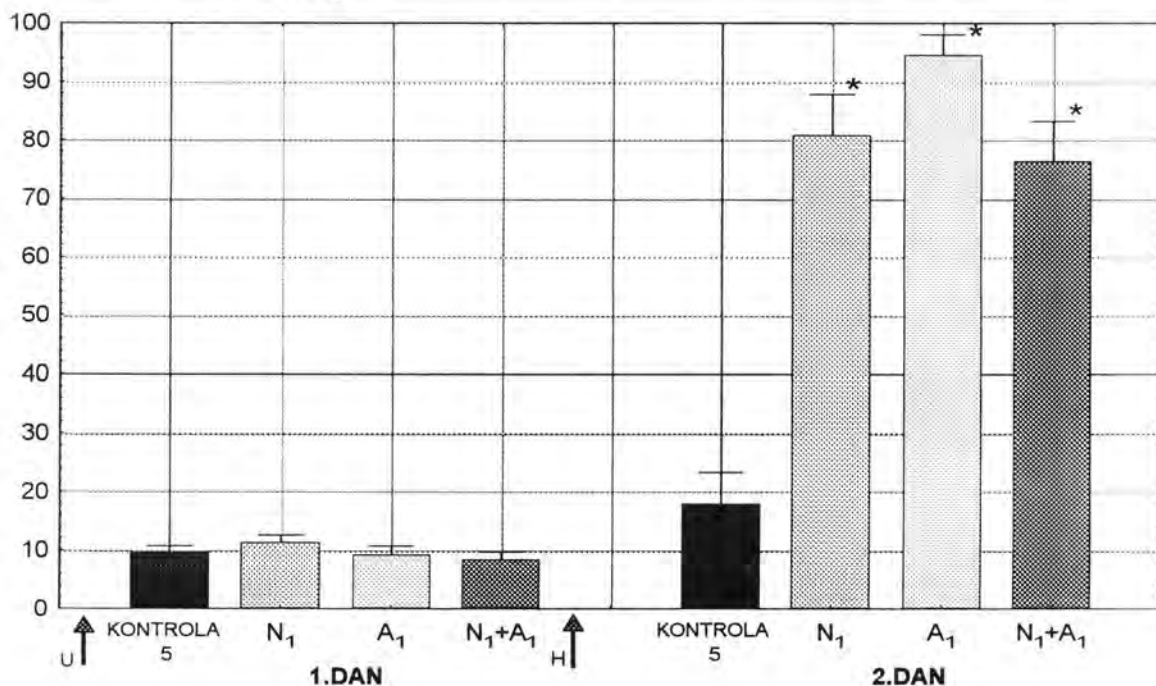
**Sl.26.** Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 5, te hipoksičnih životinja pretretiranih nimodipinom (1,0 mg/kg) ( $N_1$ ) ili ifenprodilom (1,0 mg/kg) ( $I_1$ ) ili kombinacijom navedenih tvari ( $N_1+I_1$ ). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava drugog dana pokusa statistički značajnu razliku prema skupini kontrola 5 ( $p \leq 0.05$ ).

Analizom rezultata prikazanih na slici 26. ustanovljeno je da drugog dana pokusa postoji značajan učinak kombinacije nimodipina i ifenprodila na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u hipoksiji izloženih štakora [ $F(1,38)=37,5; p < 0,05$ ]. Naime, pokazano je da životinje pretretirane navedenom

kombinacijom lijekova drugog dana eksperimenta statistički značajno bolje izvršavaju postavljene zadatke u odnosu na životinje kontrolne skupine 5. Vrijednost postotaka izbjegnute kazne u životinja pretretiranih kombinacijom navedenih blokatora kalcijevih kanala ne razlikuje se značajno u odnosu na vrijednosti dobivene u životinja pretretiranih samo nimodipinom, odnosno samo ifenprodilom drugog dana pokusa [ $F(2,57)=0,99; p \leq 0,37$ ].

### 3.2.5.2. Nimodipin i arekolin

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



Sl.27. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 5, te hipoksičnih životinja pretretiranih nimodipinom (1 mg/kg) (N<sub>1</sub>) ili arekolinom (1 mg/kg) (A<sub>1</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (N<sub>1</sub>+A<sub>1</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava drugog eksperimentalnog dana statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 5 ( $p \leq 0,05$ ).

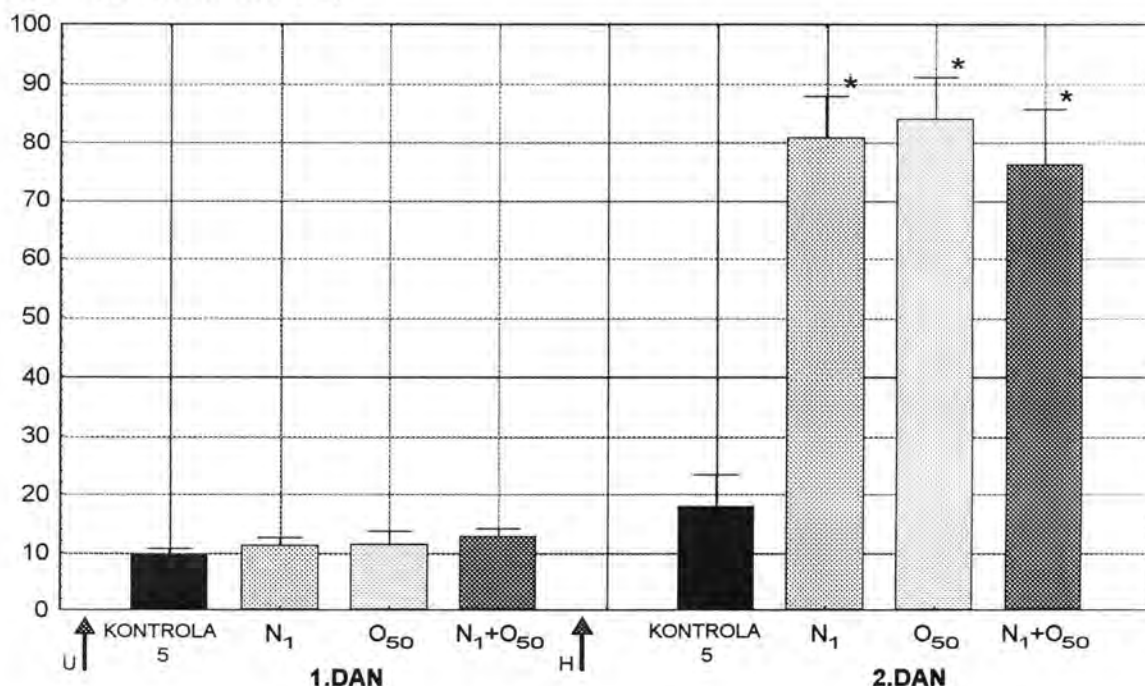
Iz rezultata prikazanih na slici 27. očito je da drugog dana pokusa životinje pretretirane kombinacijom nimodipina i arekolina, statistički značajno bolje uče u odnosu na životinje kontrolne skupine 5. Prikazani rezultati



upućuju na zaključak da testiranom kombinacijom nimodipina i arekolina nije moguće pojačati spoznajne aktivnosti hipoksičnih štakora. Naime vrijednosti izbjegnute kazne retencionog testa dobivene kombinacijom navedenih tvari ne razlikuju se značajno od vrijednosti dobivenih pojedinačnom aplikacijom bilo nimodipina bilo arekolina.

### 3.2.5.3. Nimodipin i oksiracetam

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



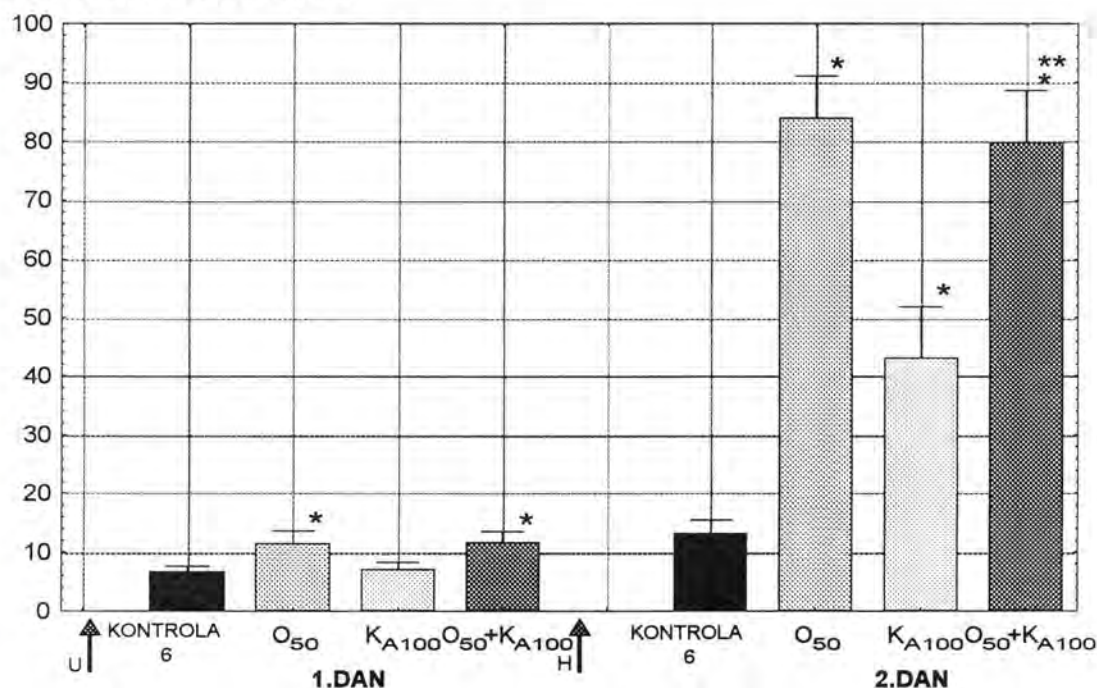
Sl.28. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 5, te hipoksičnih životinja pretretiranih nimodipinom (1 mg/kg) (N<sub>1</sub>) ili oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (N<sub>1</sub>+O<sub>50</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava drugog dana treninga statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 5 ( $p \leq 0,05$ ).

Na temelju rezultata prikazanih na slici 28. evidentno je da je poboljšanje pasivnog izbjegavanja kazne u hipoksičnih životinja postignuto kombinacijom nimodipina i oksiracetama drugog eksperimentalnog dana. Naime, analizom

varijanci ustanovljen je statistički značajan utjecaj tretmana [ $F(1,38)=30,1;p<<0,05$ ] u odnosu na kontrolne uvjete. Kombinacija spomenutih tvari ne pojačava spoznajne aktivnosti u odnosu na rezultate dobivene aplikacijom pojedinačnih tvari niti prvog niti drugog dana pokusa.

### 3.2.5.4. Oksiracetam i kolin

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



Sl.29. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana pokusa u štakora kontrolne skupine 6, te hipoksičnih životinja pretretiranih oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) ili kolinom (K<sub>A100</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (O<sub>50</sub>+K<sub>A100</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 6 ( $p \leq 0,05$ ). \*\* označavaju drugog dana pokusa statistički značajnu razliku prema skupini K<sub>A100</sub>.

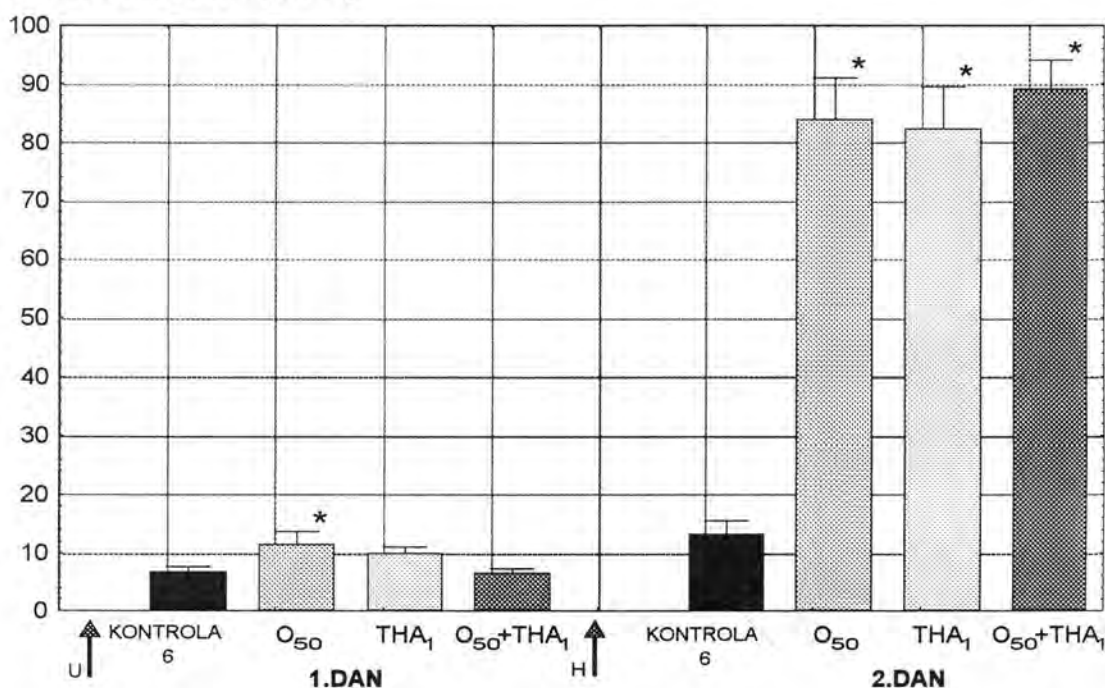
Analiza varijanci pokazuje značajan utjecaj istovremenog davanja oksiracetama i kolina na sposobnost učenja u životinja izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije [ $F(1,38)=50,2;p<<0,05$ ]. Naime, postoci izbjegavanja kazne u životinja pretretiranih spomenutom kombinacijom statistički su



značajno viši prvog odnosno drugog eksperimentalnog dana u odnosu na životinje kontrolne skupine 6 [F(1,38)=80,4;p<<0,05].Vrijednosti dobivene kombinacijom navedenih tvari drugog dana pokusa statistički su značajno više u usporedbi s vrijednostima dobivenim u životinja pretretiranih s 100 mg/kg kolina [F(1,38)=9,75;p≤0,004] (Slika 29).

### 3.2.5.5. Oksiracetam i THA

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



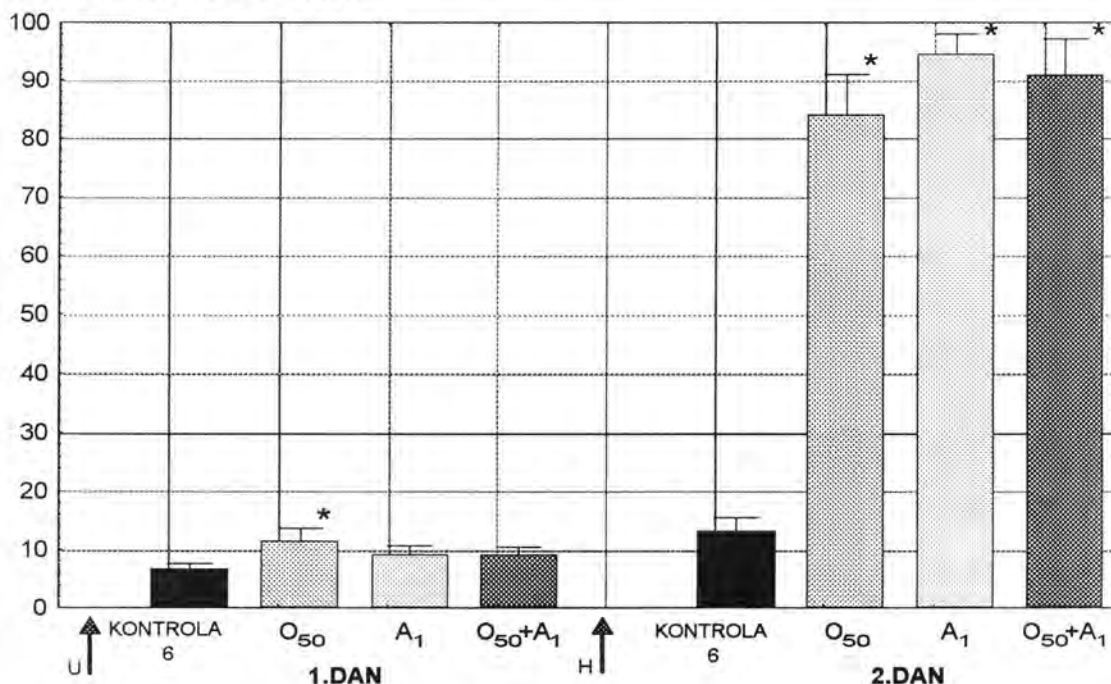
Sl. 30. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 6, te hipoksičnih životinja pretretiranih oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) ili THA (1 mg/kg) (THA<sub>1</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (O<sub>50</sub>+THA<sub>1</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 6 prvog odnosno drugog dana pokusa (p≤0,05).

Kombinacija oksiracetama i THA statistički značajno popravlja spoznajne aktivnosti hipoksičnih štakora drugog dana treninga. Naime, analiza varijanci pokazuje značajan utjecaj tretmana spomenutom kombinacijom tvari na sposobnost učenja u eksperimentalnih životinja [F(1,38)=184;p<<0,05]

(Slika 30).Usporedba rezultata dobivenih upotrebom kombinacije oksiracetama i THA s rezultatima u životinja pretretiranih samo s oksiracetamom odnosno samo s THA pokazuje da među njima ne postoji statistički značajna razlika.

### 3.2.5.6. Oksiracetam i arekolin

IZBJEGAVANJE KAZNE (%)



Sl.31. Izbjegnuta kazna (%) tijekom prvog odnosno drugog dana treninga u štakora kontrolne skupine 6, te hipoksičnih životinja pretretiranih oksiracetamom (50 mg/kg) (O<sub>50</sub>) ili arekolinom (1 mg/kg) (A<sub>1</sub>) ili kombinacijom navedenih tvari (O<sub>50</sub>+A<sub>1</sub>). Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost ± s.g. \* označava statistički značajnu razliku prema kontrolnoj skupini 6 prvog odnosno drugog eksperimentalnog dana ( $p \leq 0,05$ ).

Iz rezultata prikazanih na slici 31. evidentno je da drugog dana pokusa, u hipoksičnih životinja postoji statistički značajno poboljšanje spoznajnih aktivnosti uvjetovano aplikacijom oksiracetama i arekolina. U usporedbi s životinjama kontrolne skupine 6 [ $F(1,38)=122,7; p < 0,05$ ], spomenuta



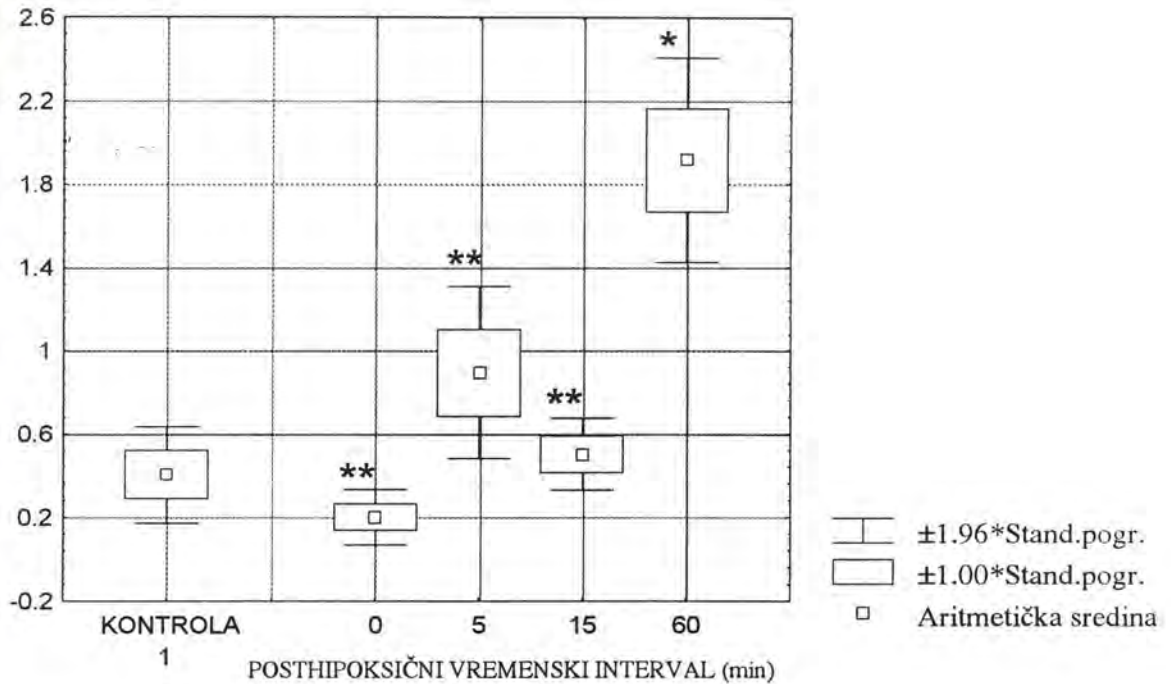
kombinacija lijekova ne pojačava antiamnestički učinak samog oksiracetama odnosno samog arekolina [ $F(2,57)=0,39;p\leq 0,67$ ] (Slika 31).

### 3.3. BIOKEMIJSKI REZULTATI

#### 3.3.1. UTJECAJ HIPOKSIJE NA RAZINU UKUPNIH MASNIH KISELINA TE SLOBODNE ARAHIDONSKE KISELINE MOZGA U ŠTAKORA

Izlaganje štakora uvjetima kontrolirane hipoksije uzrokuje povećanje razine ukupnih SMK mozga ( Slika 32 ). Analiza varijanci razine ukupnih SMK mozga u životinja kontrolne skupine 1 i hipoksičnih životinja dekapitiranih u različitim vremenskim intervalima po gubitku "righting" refleksa, ukazuje na značajan utjecaj posthipoksičnog vremenskog intervala [ $F(4,22)=18,87;p\leq 0,000001$ ]. Duncanovim testom multiplih varijanci utvrđeno je da je razina ukupnih SMK mozga u hipoksičnih štakora dekapitiranih 60 minuta po prestanku izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije statistički značajno veća u odnosu na vrijednosti štakora kontrolne skupine 1. Ove su vrijednosti značajno veće i u odnosu na vrijednosti hipoksičnih štakora koji su dekapitirani: neposredno, 5 ili 15 minuta po hipoksiji (Slika 32).

Ukupne SMK (mg/g)

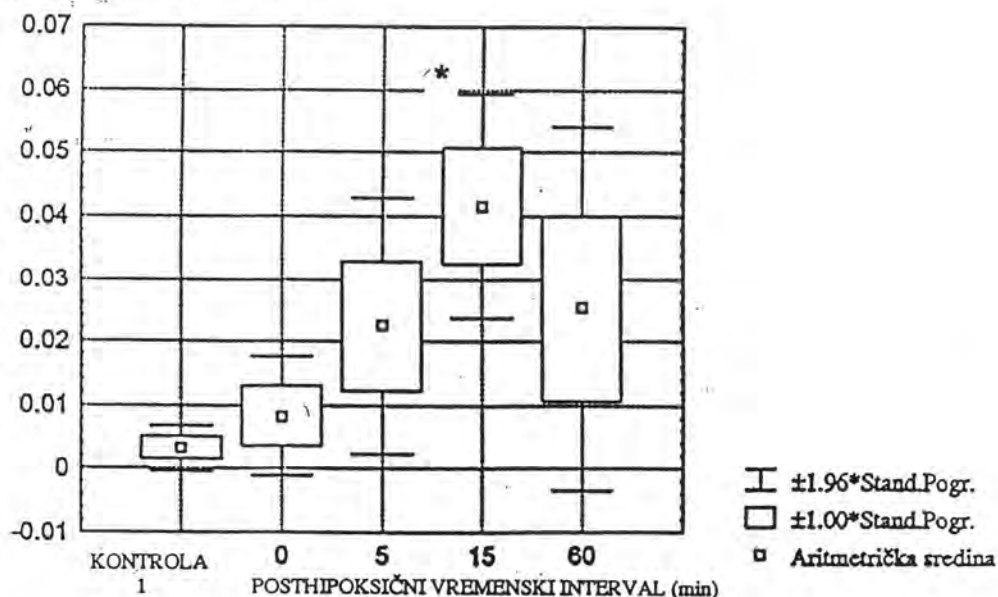


**Sl.32. Razina ukupnih SMK (mg/g) mozga u štakora kontrole 1 i hipoksičnih štakora dekapitiranih: neposredno,5;15 ili 60 minuta po prestanku izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije.Svaki "box-and-viskar plot" predstavlja vrijednost od 6 štakora.\*  $p \leq 0,05$ : Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnom skupinom 1. \*\*  $p \leq 0,05$ :Statistički značajna razlika prema skupini hipoksičnih štakora dekapitiranih 60 minuta po prestanku izlaganja hipoksiji.**

Analiza varijanci razine SAK mozga u životinja iz kontrolne skupine 1 i hipoksičnih životinja dekapitiranih u različitim vremenskim intervalima po prestanku izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije također ukazuje na značajan utjecaj vremena [ $F(9,88)=14,85;p < 0,05$ ].Duncanov test multiplih varijanci pokazao je da je razina SAK u mozgu hipoksičnih štakora dekapitiranih 15 minuta po prestanku izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije statistički značajno veća u usporedbi s kontrolnom skupinom 1 (Slika 33).



Slobodna arahidonska kiselina (mg/kg)



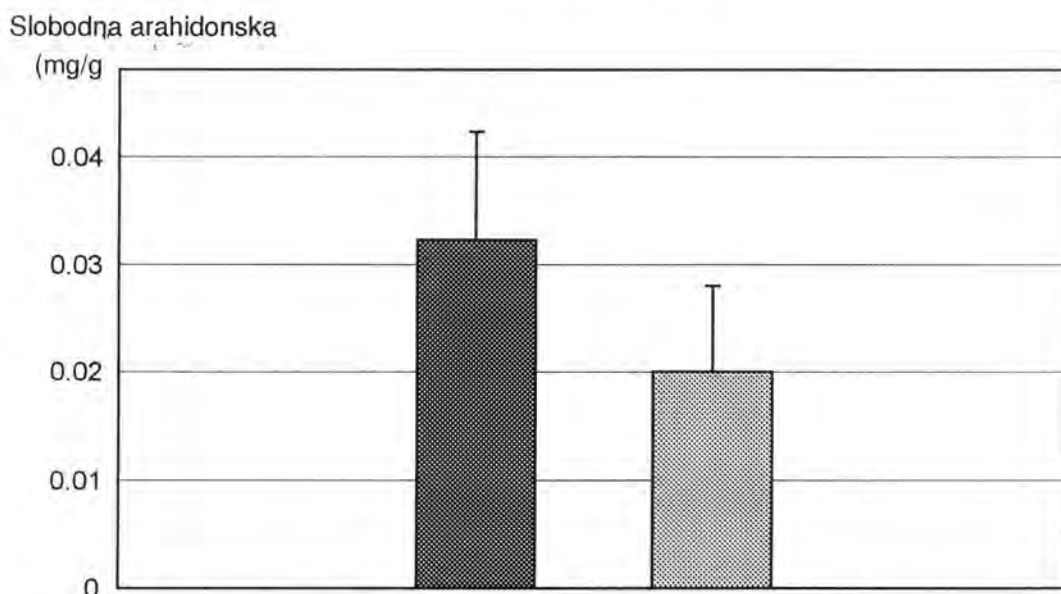
**Sl.33. Razina SAK (mg/g) mozga u štakora kontrolne skupine 1 i hipoksičnih štakora dekapitiranih neposredno, 5; 15 ili 60 minuta po prestanku izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije. Svaki "box-and-whisker plot" predstavlja vrijednost od 6 štakora. \* $p \leq 0,05$ : Statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolnom skupinom 1.**

### 3.3.2. UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA NA RAZINU SLOBODNE ARAHIDONSKE KISELINE U MOZGU ŠTAKORA IZLOŽENIH HIPOKSIJI

#### 3.3.2.1. Kontrolne skupine

Ubrizgavanje otopine propilenglikola i etanola životinjama kontrolne skupine 5 koje su dekapitirane 15 minuta po prestanku izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije ne mijenja značajno razinu SAK mozga (Slika 34). Naime, u hipoksičnih životinja pretretiranih navedenim otapalom razina SAK iznosila je  $0,0323 \pm 0,0070$  mg/g (Slika 34). Očito je da ne postoji statistički značajna razlika u razini navedenog biokemijskog markera mozga između hipoksičnih životinja

koje su dobivale testirano otapalo odnosno hipoksičnih štakora kojima prije izlaganja uvjetima kontrolirane hipoksije nije injicirana nikakva tvar.



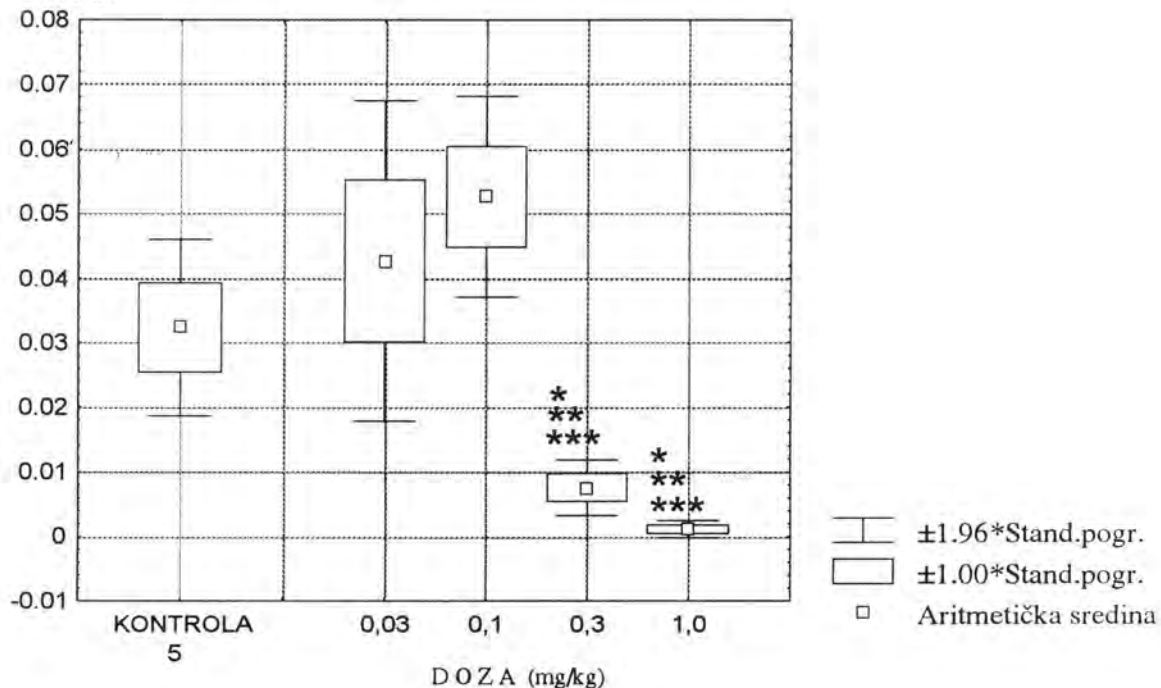
Sl. 34. Razina SAK (mg/g) mozga u štakora kontrole 5 (■) i kontrole 1 (▨), a koji su dekapitirani 15 minuta po gubitku "righting" refleksa. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost od 6 pokusa  $\pm$  s.g.

### 3.3.2.2. Utjecaj nimodipina na razinu slobodne arahidonske kiseline mozga u štakora izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije

Značajan utjecaj tretmana različitim dozama nimodipina utvrđen je analizom varijanci razine SAK mozga štakora kontrolne skupine 5 i hipoksičnih štakora tretiranih različitim dozama nimodipina [ $F(4,24)=8,07; p \leq 0,000284$ ]. Duncanov test multiplih varijabli pokazao je da je učinak nimodipina ovisan o veličini doze. Doze nimodipina od 0,03 mg/kg i 0,1 mg/kg ne mijenjaju značajno razinu SAK mozga u hipoksičnih životinja. Ali, doze od 0,3 i 1 mg/kg navedenog blokatora kalcijevih kanala statistički značajno smanjuju razinu mjenog biokemijskog parametra mozga u štakora izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije u odnosu na životinje kontrolne skupine 5 (Slika 35).



Slobodna arahidonska kiselina  
(mg/g)



**SI.35. Razina SAK (mg/g) mozga u štakora kontrole 5 i hipoksičnih šakora kojima su aplicirane različite doze nimodipina. Svaki "box-and-viskar plot" predstavlja vrijednost od 6 štakora.**

**\*  $p \leq 0,05$ : Statistički značajna razlika prema kontrolnoj skupini 5.**

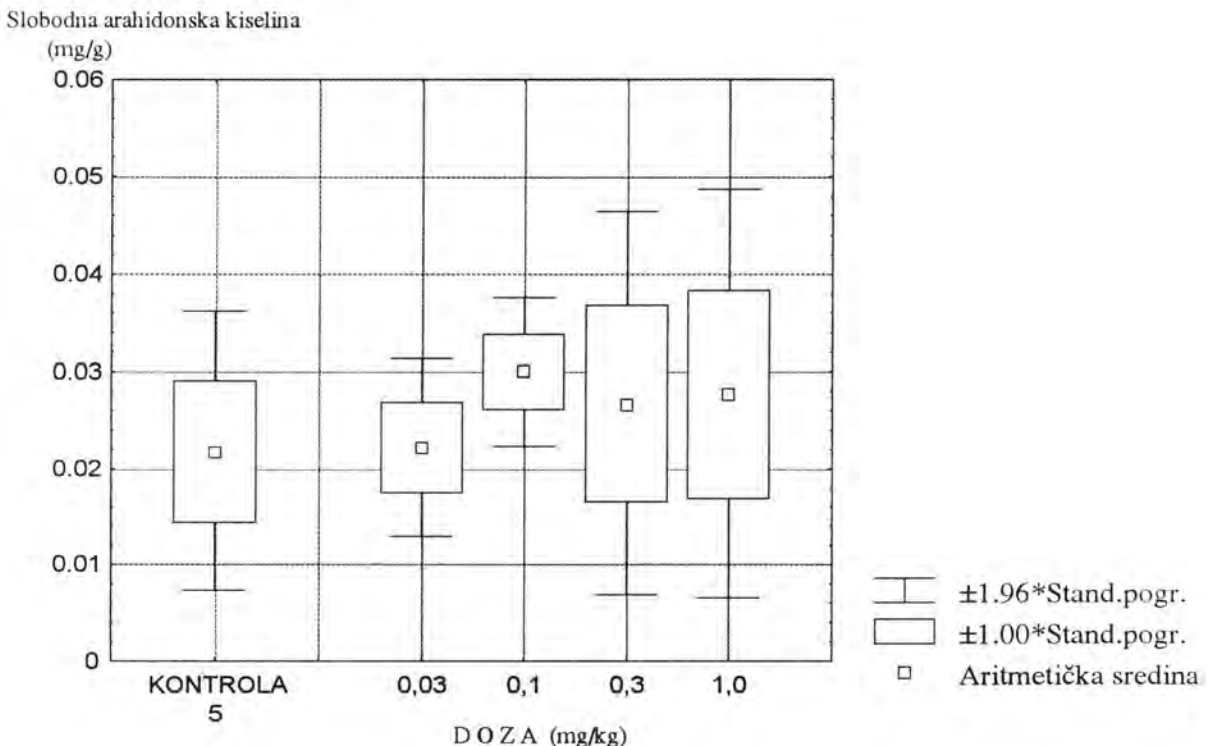
**\*\*  $p \leq 0,05$ : Statistički značajna razlika prema skupini hipoksičnih štakora kojima je aplicirana doza od 0,03 mg/kg nimodipina.**

**\*\*\*  $p \leq 0,05$ : Statistički značajna razlika prema skupini hipoksičnih štakora kojima je injicirana doza od 0,1 mg/kg nimodipina.**

Iz rezultata prikazanih na slici 35. evidentno je također da je razina SAK u mozgu hipoksičnih životinja koje su primile 0,3 ili 1 mg/kg nimodipina statistički značajno niža i u odnosu na hipoksične životinje kojima je aplicirano 0,03 ili 0,1 mg/kg navedene tvari.

### 3.3.2.3. Utjecaj nikardipina na razinu slobodne arahidonske kiseline mozga u štakora izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije

Tretman nikardipinom ne mijenja značajno razinu SAK mozga u hipoksičnih štakora (Slika 36).



**Sl.36. Razina SAK (mg/g) mozga u štakora kontrole 5 i hipoksičnih štakora kojima su aplicirane različite doze nikardipina. Svaki "box-and-viskar plot" predstavlja vrijednost od 6 štakora.**

Sa slike 36. evidentno je da ne postoji niti statistički značajna razlika u razini SAK mozga između životinja kontrolne skupine 5 odnosno štakora izloženih uvjetima kontrolirane hipoksije, a pretretiranih različitim dozama nikardipina.

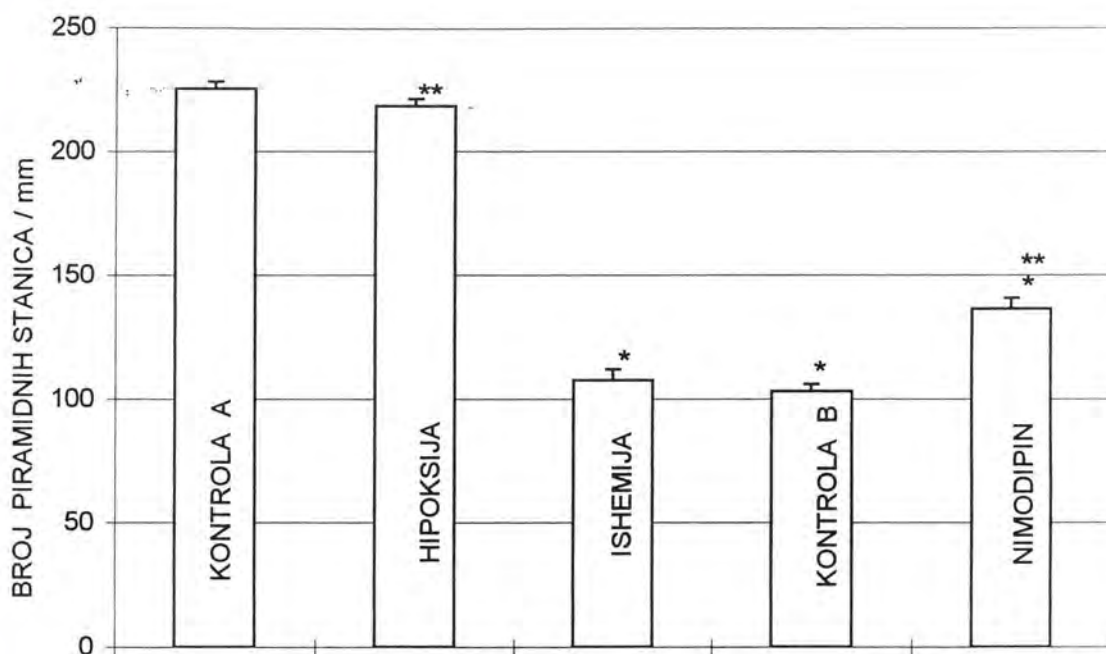


### 3.4. HISTOLOŠKI REZULTATI

Histološka analiza rezultata pokazala je da gustoća piramidnih stanica CA<sub>1</sub> regije hipokampusa u intaktnih, netretiranih životinja (kontrolna skupina A) iznosi  $225,6 \pm 16,1/\text{mm}$  (Slika 37).

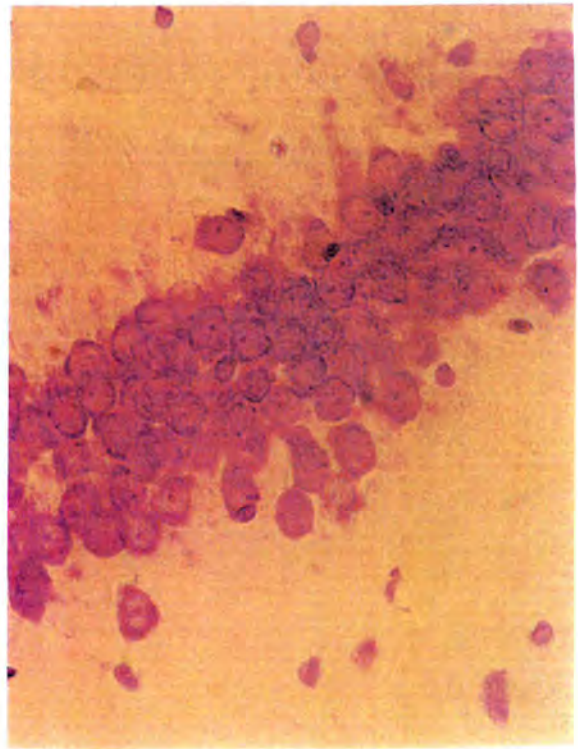
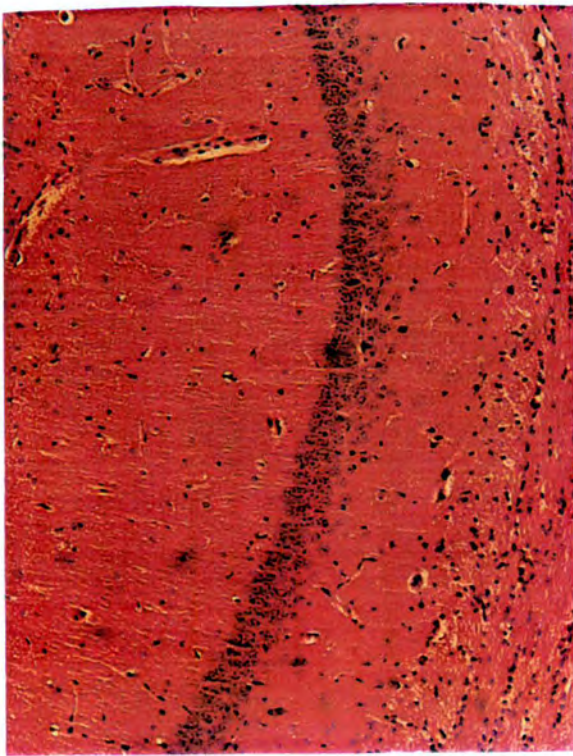
Izlaganje eksperimentalnih životinja hipoksičnim uvjetima ne mijenja značajno broj ( $216,5 \pm 11,1/\text{mm}$ ) (Slika 37) i morfološke osobitosti piramidnih stanica (Slika 39) u usporedbi s životinjama kontrolne skupine A (Slika 37 i Slika 38). Nasuprot tome, četverožilna okluzija u trajanju od 20 minuta uvjetuje statistički značajno smanjenje broja piramidnih stanica ( $107,5 \pm 14,3/\text{mm}$ ) (Slika 37). Posljedica izlaganja opisanim ishemičnim uvjetima su i izrazite morfološke promjene većine očuvanih stanica koje se u potpunosti manifestiraju sedam dana po ishemiji. Degeneraciju stanica dominantno karakterizira piknoza jezgara, te pojava kondenzirane hiperkromatske citoplazme (Slika 40).

Nimodipin, apliciran u dozi od 1 mg/kg, 30 minuta prije izlaganja ishemičnim uvjetima, statistički značajno smanjuje stupanj staničnog oštećenja. Naime, broj hipokampalnih, piramidnih stanica CA<sub>1</sub> regije u životinja tretiranih nimodipinom iznosi  $138,7 \pm 5,5$  (Slika 37) i statistički je značajno viši u odnosu na broj stanica u životinja izloženih ishemiji, odnosno ishemičnih životinja pretretiranih samo otapalom (kontrola B). Očito je također da su morfološke promjene piramidnih stanica znatno manje izražene u životinja pretretiranih nimodipinom, u odnosu na ishemične životinje (Slika 41).

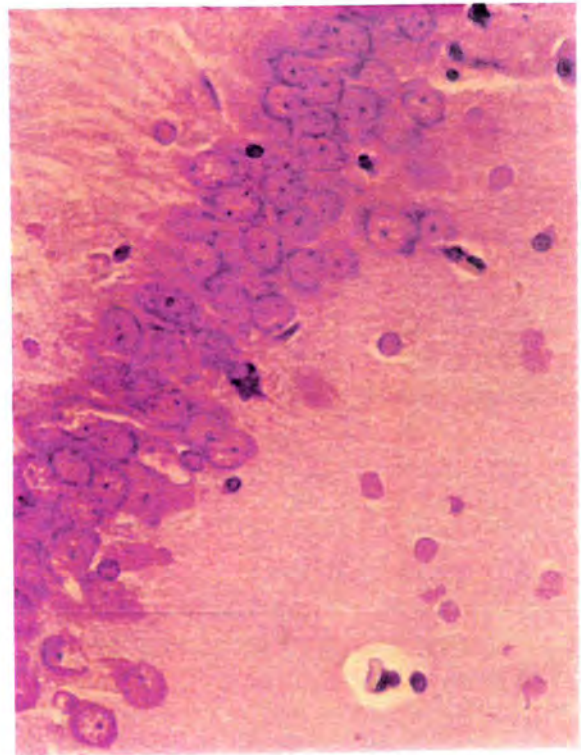
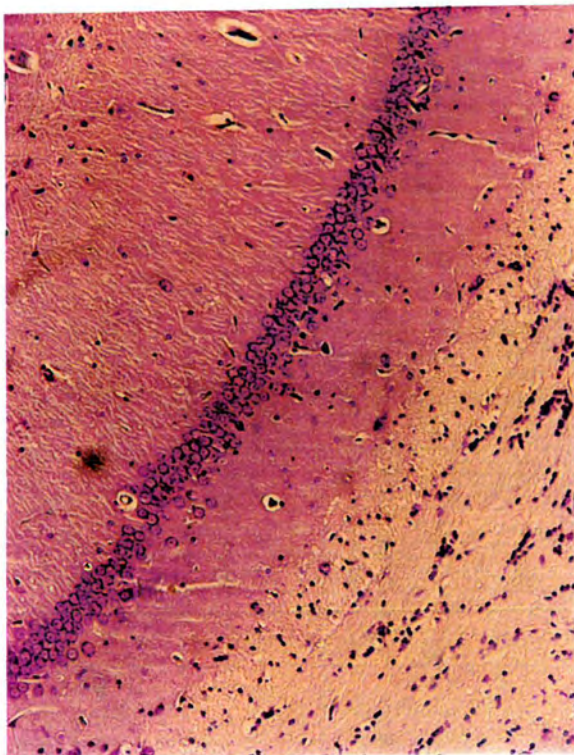


**Sl. 37. Broj piramidnih stanica CA<sub>1</sub> regije hipokampusa. Svaki stupac prikazuje srednju vrijednost  $\pm$  s.g. \* označava statistički značajnu razliku prema skupini kontrola A. \*\* statistički značajna razlika prema skupini kontrola B i skupini ishemičnih životinja ( $p \leq 0,05$ ).**





**Sl. 38. Poprečni presjek CA<sub>1</sub> regije hipokampusa u štakora kontrole A. Metoda HE. a) povećanje 100x, b) povećanje 400x.**

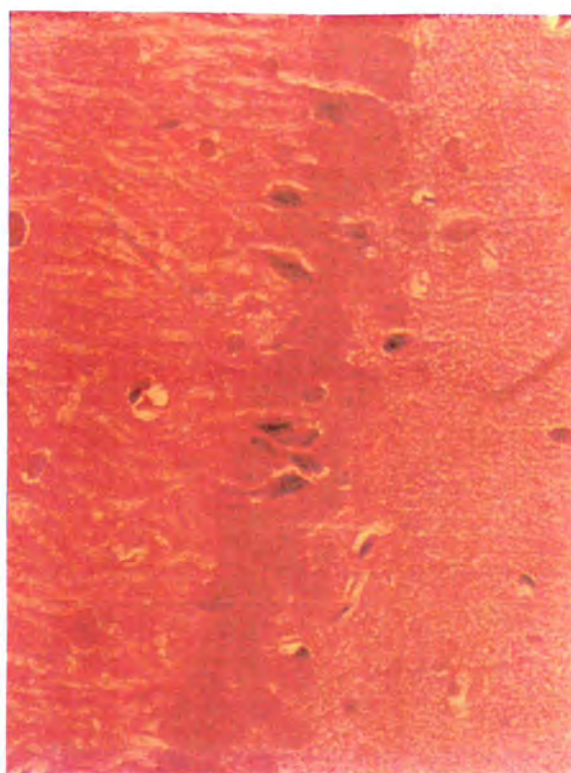
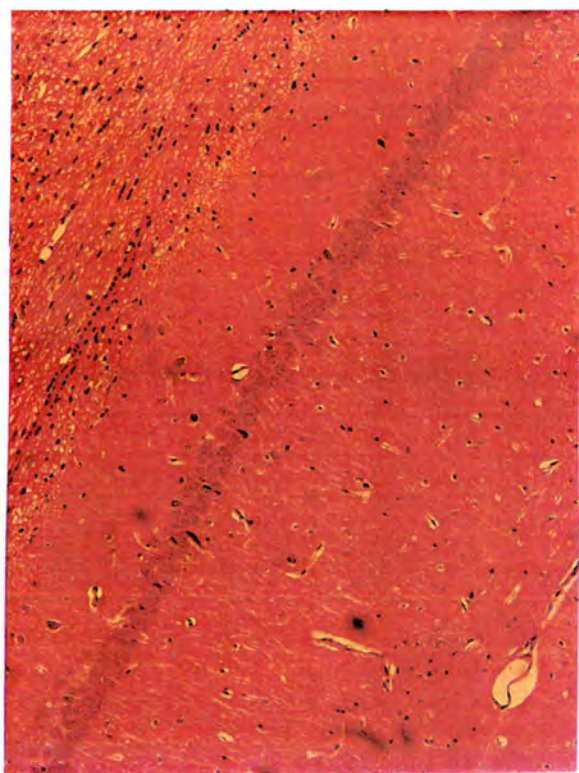


**Sl. 39. Poprečni presjek CA<sub>1</sub> regije hipokampusa u štakora izloženih hipoksiji. Metoda HE. a) povećanje 100x, b) povećanje 400x.**





**Sl.40. Poprečni presjek CA<sub>1</sub> regije hipokampusa u štakora u kojih je ishemija uvjetovana četverožilnom okluzijom. Metoda krezil violet. a) povećanje 100x, b) povećanje 400x.**



**Sl.41. Poprečni presjek CA<sub>1</sub> regije hipokampusa u ishemičnim štakora pretetiranih nimodipinom. Metoda HE. a) povećanje 100x, b) povećanje 400x.**



Na temelju dobivenih rezultata kao i podataka iz literature, smatramo da su za diskusiju najaktualnija slijedeća pitanja:

1. utjecaj hipoksije na pasivno izbjegavanje kazne u štakora,
2. utjecaj blokatora  $\text{Ca}^{2+}$  kanala, kolinomimetika i nootropika na pasivno izbjegavanje kazne u a) intaktnih štakora, odnosno b) štakora u kojih je spoznajni deficit uvjetovan hipoksijom,
3. utjecaj a) hipoksije na razinu ukupnih slobodnih masnih kiselina te slobodne arahidonske kiseline u mozgu štakora, odnosno b) blokatora  $\text{Ca}^{2+}$  kanala na razinu spomenutih kiselina u mozgu hipoksičnih štakora,
4. utjecaj a) hipoksije odnosno ishemije na broj i strukturu piramidnih stanica  $\text{CA}_1$  regije hipokampusa, odnosno b) blokatora  $\text{Ca}^{2+}$  kanala na spomenute karakteristike stanica  $\text{CA}_1$  regije hipokampusa u hipoksično-ishemičnim uvjetima.

#### 4.1. UTJECAJ HIPOKSIJE NA PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U ŠTAKORA

U ljudi pad vrijednosti kisika na 8-10,5 V% uzrokuje snažne poremećaje rasudjivanja (68).U štakora tek mnogo izrazitija hipoksija (3-5 V% kisika) dovodi do značajnijih funkcionalnih,neuroloških i biokemijskih ispada (20).Vrhunac neuroloških poremećaja u navedene životinjske vrste manifestira se gubitkom "righting" refleksa (231) što korelira s nizom biokemijskih promjena (poremećajem ionske homeostaze uz masivni influks  $Ca^{2+}$  u stanicu,aktivacijom intracelularnih enzima,oslobadjanjem SMK, poglavito arahidonske,iscrpljenjem energetskih potencijala stanice, aktivacijom  $Ca^{2+}Mg^{2+}ATP$ -aze te oštećenjem oksidativne fosforilacije mitohondrija) ( 77 ).

Opisani poremećaji potencirani su sekrecijom ekscitatornih neurotransmitora (npr.l-Glu),poremećajem metaboličkog protoka ACh, noradrenalina, dopamina te serotonina u SŽ kao i poremećajem sinaptičke plastičnosti (53,198).Spomenute promjene naročito su izražene u području hipokampusa (moždana regija odgovorna za kontrolu kognitivnih aktivnosti).Navedena struktura smatra se jednim od najvulnerabilnijih područja mozga prema djelovanju hipoksije (144).Stoga je oštećenje spoznajnih aktivnosti (dominantno sposobnosti učenja i pamćenja) jedan od najčešćih poremećaja koji prati akutni ili kronični oblik cerebralne hipoksije.

Različiti čimbenici (npr. hipoksija,ishemija elektrošok,trauma itd.),mogu u eksperimentalnim uvjetima iskazati amnestičko djelovanje ukoliko se primjene u periodu konsolidacije znanja (73).Time se remeti ili onemogućava pohranjivanje neposredno stečenih informacija (217).Po Vacheru konsolidacija traje 10-20 sekundi ( 217 ),po Taberu nekoliko minuta (217), a po Giurgiu i do jednog sata (73 ).

Giurgia i sur. (73), te Sara i Lefevre (187) su izlagali eksperimentalne životinje hipoksičkim uvjetima u različitim vremenskim intervalima nakon



učinjenog pokusa pasivnog izbjegavanja kazne. Dio životinja izložili su naglo hipoksičkim uvjetima od 3,5V% (tzv. "sudden hypoxia"), a dio životinja izlagan je postupnoj deprivaciji kisika (tzv. "progressive hypoxia"), do vrijednosti od 3,5 V% kisika. Hipoksija je trajala 25-30 minuta. Amnestički učinak hipoksije u obje spomenute skupine bio je vrlo snažan. Izlaganje štakora hipoksičkim uvjetima u intervalima duljim od jednog sata po učinjenom pokusu pasivnog izbjegavanja kazne nije uvjetovao pojavu kognitivnih poremećaja. Po Vacheru i sur. (217) snažna hipoksija kojom se želi uvjetovati amnestički učinak mora uslijediti unutar 10-20 sekundi po izvršenju postavljenih zadataka. Iako pouzdanih i definitivnih saznanja o trajanju konsolidacionog perioda još uvijek nema, većina istraživača smatra da je trajanje navedenog vremenskog intervala nekoliko minuta do jednog sata.

Budući da je jedan od ciljeva ovog istraživanja bio ispitati učinke hipoksije kao faktora koji u eksperimentalnih životinja može provocirati zaboravljanje naučenog, u našem eksperimentu štakori su izlagani kontroliranim hipoksičkim uvjetima neposredno nakon pokusa pasivnog izbjegavanja. Razina kisika je postupno smanjivana na 3,5V% i održavana do gubitka "righting" refleksa.

Iz prikazanih rezultata evidentno je da izlaganje štakora uvjetima progresivne hipoksije neposredno nakon treninga statistički značajno smanjuje sposobnost izvršenja postavljenih zadataka tijekom retencionog treninga. Na osnovu dobivenih rezultata kao i podataka iz literature (42,44,73,117,138,187), zaključujemo da je hipoksija snažan amnestički faktor.

## 4.2. UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA NA PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U INTAKTNIH ŠTAKORA

### 4.2.1. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA

#### 4.2.1.1. Blokatori NMDA receptora

Eksperimentalni rezultati dobiveni apliciranjem različitih doza (0,03;0,1;0,3;1 mg/kg) ifenprodila pokazuju da spomenuta tvar ne mijenja značajno stupanj izbjegavanja kazne u intaktnih štakora. Naime, vrijednosti postotaka izbjegnute kazne u ovih eksperimentalnih skupina ne razlikuju se značajno od vrijednosti u životinja pretretiranih otapalom. Iz spomenutih rezultata proizlazi da ifenprodilom nije moguće pojačati spoznajne aktivnosti u fiziološkim uvjetima.

Nasuprot tome, dobiveni rezultati pokazuju da MK-801 izrazito utječe na sposobnost učenja u intaktnih životinja. Naime, aplikacija MK-801 u dozama od 0,1 ili 0,3 mg/kg statistički značajno smanjuje sposobnost učenja u usporedbi s intaktnim životinjama pretretiranih otapalom. Uočili smo također da je u štakora pretretiranih navedenim dozama, MK-801 uzrokovao promjene ponašanja, dominantno ispade motoričke aktivnosti. Nasuprot tome, sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u životinja pretretiranih najnižom korištenom dozom (0,03 mg/kg) spomenute tvari, ne razlikuju se od rezultata izbjegavanja kazne kontrolnih životinja. Opisani rezultati sukladni su rezultatima Daniellijeve koja je ustanovila da i.p. aplikacija MK-801 u dozi od 1 mg/kg uzrokuje izrazite promjene ponašanja, u smislu povećane lokomotoričke aktivnosti, nekontroliranog "trčanja", Straub efekta i stereotipnog ponašanja (38). Također, Keith i sur. su pronašli da aplikacija MK-801 u dozi većoj od 1 mg/kg blokira LTP i dovodi do senzomotoričkih ispada koji mogu otežati



interpretaciju rezultata u testovima ispitivanja ponašanja i kognitivnih sposobnosti (112). Opisane promjene ponašanja se tumače tzv. fenciklidinskim učinkom MK-801. Poznato je naime, da navedena tvar svoje djelovanje na razini NMDA kanala ostvaruje vezivanjem za pridruženo PCP receptorsko mjesto. Nadalje, Spangler i sur. su pronašli da aplikacija MK-801 u dozi od 0,5 mg/kg statistički značajno smanjuje sposobnost stjecanja znanja u intaktnih životinja. Spomenuta tvar, aplicirana u dozi od 0,125 mg/kg, izazvala je ataksiju praćenu promjenama ponašanja (199). Wozniak i sur. (229) su pratili učinke MK-801 na štakore odnosno "gerbile" u različitim modelima učenja. Na temelju dobivenih rezultata autori su zaključili da akutna administracija toksičnih doza MK-801 (po njima su to doze 0,02 mg/kg MK-801) značajno smanjuje sposobnost stjecanja i retencije znanja. Obzirom na spomenuto mjesto djelovanja, navedeni autori smatraju da u okviru eksperimentalnih modela učenja i ponašanja nije moguće decidirano tvrditi da li je dobiveni rezultat posljedica blokade NMDA receptora odnosno inhibicije fiziološke uloge glutamata u procesima indukcije LTP ili poremećaja motoričke aktivnosti ili kombinacije oba učinka. Međutim, Cotman i Monaghan (34) smatraju da je smanjena sposobnost učenja u opisanim slučajevima (za dozu manju od 1 mg/kg) isključivo posljedica blokade NMDA receptora. Budući da su oni odgovorni za indukciju LTP, inhibicija njihove aktivnosti neminovno vodi do poremećaja u sposobnosti stjecanja znanja.

#### 4.2.1.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala

Injiciranje različitih doza (0,03; 0,1; 0,3 i 1 mg/kg) nimodipina i nikardipina, 30 minuta prije početka treninga, u našim pokusima, ne mijenja značajno stupanj izbjegnute kazne u intaktnih štakora. Rezultati izbjegavanja kazne u spomenutih skupina životinja ne razlikuju se značajno od rezultata dobivenih u životinja pretretiranih otapalom. Ovi rezultati su u suglasnosti s nalazima Kazde i sur. (101) i Trigglea i sur. (214) koji su pronašli da apliciranje

nimodipina u fiziološkim uvjetima nema utjecaja na spoznajne aktivnosti u štakora.

#### 4.2.2. KOLINOMIMETICI I NOOTROPICI

Akutna odnosno kronična aplikacija kolina u dozi od 100 mg/kg, statistički značajno popravlja sposobnost učenja prvog dana pokusa u intaktnih štakora. Naši rezultati komplementarni su rezultatima McGeer-a i sur. (122) koji su pronašli da se navedenim prekursorom ACh, u fiziološkim uvjetima, može povećati razina ACh u kolinergičkim neuronima i posljedično tome sposobnost učenja u eksperimentalnih životinja. Bartus i sur. su pokazali da administracija vrlo visokih doza kolina (engl. "precursor loading"), popravlja učenje u miševa (9) odnosno majmuna (10). Nasuprot tome, Eckernas i sur. nisu postigli povećanje razine i aktivnosti ACh administracijom kolina (237).

Nadalje, u našim pokusima, aplikacija različitih doza (0,1; 0,3 ili 1 mg/kg) arekolina ili THA, odnosno (0,05; 0,1 ili 0,2 mg/kg) fizostigmina ne mijenja značajno postotke izbjegnute kazne u intaktnih štakora. Na osnovu dobivenih rezultata zaključujemo da u fiziološkim uvjetima, u intaktnih životinja, nije moguće pojačati spoznajne aktivnosti navedenim kolinomimeticima. Ovaj rezultat je u suglasnosti s nalazom Flooda i sur. (57) koji su pronašli da aplikacija arekolina ne utječe bitno na učenje u intaktnih miševa, te Riekkina i sur. koji nisu uspjeli popraviti retenciju pasivnog izbjegavanja kazne u intaktnih štakora arekolinom (177).

Aplikacija različitih doza (30; 100 ili 300 mg/kg) piracetama odnosno (100 ili 300 mg/kg) oksiracetama ne utječe bitno na kognitivne sposobnosti intaktnih životinja. Nasuprot tome, pretetretiranje eksperimentalnih životinja s 50 mg/kg oksiracetama statistički značajno popravlja sposobnost učenja prvog dana pokusa. Do sličnih rezultata su došli i Sansone i sur. (186). Oni su



pronašli da aplikacija oksiracetama popravlja sposobnost učenja u intaktnih životinja.

Na osnovu dobivenih rezultata kao i potvrda u literaturi, zaključujemo da je u fiziološkim uvjetima, u intaktnih štakora, moguće pojačati spoznajne aktivnosti aplikacijom kolina (u svim ispitivanim uvjetima) odnosno oksiracetama u dozi od 50 mg/kg. Ostali ispitivani kolinomimetici odnosno nootropici pokazali su se neučinkovitima.

#### 4.2.3. KOMBINACIJE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA

Pretriranje eksperimentalnih životinja kombinacijom nimodipina (1 mg/kg) s ifenprodilom (1 mg/kg), arekolinom (1 mg/kg) ili oksiracetamom (50 mg/kg) te oksiracetama (50 mg/kg) i akutno administriranog kolina (100 mg/kg) odnosno arekolina (1 mg/kg) ne pojačava sposobnost izbjegavanja kazne u ispitivanih životinja. Rezultati pasivnog izbjegavanja kazne u životinja ispitivanih skupina ne razlikuju se značajno od rezultata dobivenih pojedinačnom aplikacijom svake od navedenih tvari.

Zaključno, navedene kombinacije različitih blokatora kalcijских kanala, kolinomimetika i nootropika ne pojačavaju kognitivne sposobnosti u našim eksperimentalnim uvjetima.

### 4.3. UTJECAJ BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA NA PASIVNO IZBJEGAVANJE KAZNE U ŠTAKORA U KOJIH JE SPOZNAJNI DEFICIT UVJETOVAN HIPOKSIJOM

#### 4.3.1. BLOKATORI KALCIJSKIH KANALA

##### 4.3.1.1. Blokatori NMDA kanala

Masivan utok  $Ca^{2+}$  iona iz ekstracelularnog u intracelularni prostor uz posljedične morfološke, funkcionalne i biokemijske promjene, je jedan od osnovnih patofizioloških supstrata hipoksičnog oštećenja cerebralnih stanica. Spomenuti proces uvjetovan je dominantno značajnim porastom koncentracije i aktivnosti ekscitatornih aminokiselina glutamata i aspartata. Neurotoksičnost navedenih neurotransmitora odvija se najvećim dijelom putem stimulacije NMDA receptora. Logično je stoga da posljednjih godina NMDA antagonisti predstavljaju osnovu novog terapijskog pristupa u liječenju niza neuroloških oboljenja praćenih hipoksično-ishemičnim oštećenjima (53,171,172).

NMDA antagonisti ne-kompetitivnog tipa kao što su fenciklidin, ketamin, dekslorfan, MK-801 itd., kao i ifenprodil i njegov derivat SL.82.0715, dobro prolaze krvno-moždanu barijeru te izrazito smanjuju utok  $Ca^{2+}_e$  u moždane stanice. Smatra se također da neki od njih ostavaruju i direktno vazodilatacijsko djelovanje u mozgu (111).

Zbog navedenih saznanja kao i činjenice da centralni učinci blokatora kalcijских kanala NMDA tipa nisu dovoljno istraženi, smatrali smo interesantnim proučiti učinke različitih lijekova spomenute skupine na pasivno izbjegavanje kazne u štakora u kojih je kognitivni deficit uvjetovan hipoksijom.

Propilen glikol i etanol u omjeru 1:1 standardno se koriste kao otapalo za blokatore kalcijских kanala NMDA grupe (21,36,46).



U našim pokusima pretretiranje hipoksičnih životinja otopinom propilen glikola i etanola ne utječe značajno na sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne. Dobiveni rezultat sukladan je s rezultatom Moursia i sur. (133) koji su ustanovili da injiciranje navedenog otapala prije ili nakon hipoksije odnosno ishemičnog inzulta nema utjecaja na kognitivne sposobnosti životinja.

Rezultati naših eksperimentalnih studija pokazuju da aplikacija ifenprodila statistički značajno popravljiva sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u hipoksičnih štakora. Spomenuto se odnosi na sve korištene doze (0.03; 0.1; 0.3 i 1 mg/kg) ispitivane tvari. Najveći postotak izbjegnute kazne ostvaren je najvećom dozom. Točan mehanizam cerebroprotektivnog učinka ifenprodila nije u potpunosti jasan. Još su 1975. god. Hagikara i Toyoda (111) ustanovili da ifenprodil izrazito povećava cerebralnu cirkulaciju te poboljšava reološke osobitosti krvi, što može biti značajno kod postishemičnih poremećaja cerebralne cirkulacije. Štoviše, Yamasuta i sur. su pronašli da ifenprodil popravljiva mitohondrijsku respiraciju i stanični metabolizam. Utvrđeno je također da spomenuta tvar ostvaruje izrazito vazodilatacijsko djelovanje antagonističkim učinkom u području  $\alpha$  adrenergičkih receptora (233). Pronađeno je također da uzrokuje značajnu blokadu VOK kanala uz posljedičnu redukciju staničnog edema (111). Novije "binding" i elektrofiziološke studije kao i radovi Gottia i sur. (74) ukazuju da je protektivni učinak ifenprodila u modelu fokalne cerebralne ishemije u štakora i mačaka uvjetovan sposobnošću antagoniziranja poliaminskog receptorskog mjesta NMDA kanala. Spomenuti autori ustanovili su da ifenprodil ostvaruje cerebroprotektivno djelovanje i u modelu globalne cerebralne ishemije. Gustafson i sur. su došli do sličnih saznanja, objašnjavajući spomenute učinke vjerojatnim kombiniranim učinkom blokade NMDA receptora i a antagonističkog djelovanja (80).

Na temelju predočenih rezultata i navoda iz literature zaključujemo da je ifenprodilom moguće uspješno antagonizirati spoznajni deficit uvjetovan hipoksijom.

Brojni autori, između ostalih Meldrum i sur. (129) te Wong i sur. (228) smatraju da je MK-801 tvar s izrazitim neuroprotektivnim djelovanjem. Dokazali su naime, da akutna "in vitro" aplikacija ispitivane tvari štiti stanicu od pretjerane aktivacije NMDA receptora, uvjetovane različitim tipovima oštećenja (fizikalna trauma, hipoksija, ishemija, epilepsija itd.). Postoje međutim i sasvim suprotni stavovi. Mc Donalds i sur. (125) su ustanovili da i.p. injiciranje MK-801 u dozi od 1 mg/kg, uvjetuje brz i dugotrajan porast broja NMDA receptora. Pronašli su također da osjetljivost spomenutih receptora prema djelovanju I-Glu izrazito raste i to paralelno sa sniženjem razine MK-801 u organizmu. Štoviše, dokazano je da se u hipoksičnim uvjetima značajno povećava osjetljivost hipokampalnih neurona prema neurotoksičnosti I-Glu (108). Na temelju navedenog, smatra se da u hipoksičnim uvjetima aplikacija MK-801 može i pogoršati stanje. Sukladno tome, injiciranje MK-801 u našim eksperimentalnim uvjetima nije poboljšalo spoznajni deficit u hipoksičnih štakora. Naime, rezultati dobiveni u životinja pretretiranih s 0,03; 0,1 ili 0,3 mg/kg MK-801 pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u sposobnosti pasivnog izbjegavanja kazne u odnosu na hipoksične životinje pretretirane otapalom.

Na temelju naših eksperimentalnih rezultata kao i podataka iz literature možemo zaključiti da spoznajni deficit uvjetovan hipoksijom nije moguće antagonizirati spomenutim dozama MK-801.

#### 4.3.1.2. Blokatori voltažno ovisnih kanala

Posljednjih godina intenzivno se proučava mogućnost upotrebe blokatora voltažno ovisnih kanala za kalcij DHP grupe u liječenju cerebralnih oboljenja. Naime, radi se o lijekovima koji dobro prolaze krvno-moždanu barijeru (61,78,175), pokazuju visok afinitet prema L tipu VOK kanala, a većina ih ostvaruje i cerebralne vazodilatacijske učinke (61,78). Dokazano je da je moždana cirkulacija jedinstvena morfološka, funkcionalna i biokemijska



cjelina. Spomenute krvne žile mnogo su osjetljivije od perifernih prema disbalansu iona  $Ca^{2+}$ , a također i prema djelovanju lijekova iz grupe DHP blokatora kalcijских kanala (78). Stoga spomenuti lijekovi (u dozama do 1 mg/kg) mogu primarno iskazati svoje centralne vazodilatacijske učinke bez većeg utjecaja na sistemsku cirkulaciju i krvni tlak (224). Međutim, smatra se da je mehanizam djelovanja DHP blokatora u središnjem živčevlju mnogo kompleksniji. Neki od njih djeluju direktno na cerebralni parenhim poboljšavajući metabolizam moždanih stanica. Lijekovi navedene skupine preveniraju energetske poremećaje, ubrzavaju ATP resintezu te degradaciju štetnih produkata (osobito laktata i SMK) u oštećenim stanicama (13).

Analiza naših eksperimentalnih rezultata pokazala je da pretretiranje različitim dozama nimodipina popravlja sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u hipoksičnih štakora. Učinak svih testiranih doza navedene tvari statistički je signifikantan. Najveći porast postotaka izbjegnute kazne evidentan je kod najviše (1 mg/kg), a najmanji kod najniže (0,03 mg/kg) doze nimodipina. Pronadjeno je također da životinje pretretirane s 1 mg/kg nimodipina statistički značajno bolje izvršavaju postavljene zadatke u odnosu na životinje pretretirane s 0,03 odnosno 0,1 mg/kg ispitivane tvari. Dobiveni rezultati sukladni su s rezultatima Hoffmeistera i sur. (90) koji su ispitivali učinke nimodipina na pasivno izbjegavanje kazne u različitim modelima cerebralne hipoksije i ishemije. Ustanovili su da spomenuti blokator kalcijских kanala, ovisno o dozi, značajno popravlja sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne odnosno da se povećanjem doze lijeka povećava sposobnost učenja u pokusnih životinja. Do sličnih saznanja došli su u svojim eksperimentalnim radovima i brojni drugi istraživači (21,39,62,67,116,185). Međutim, Groo i sur. (77) te Kriegelstein i sur. (109), smatraju da je potreban oprez s dozama većim od 1 mg/kg nimodipina. Naime, cerebroprotektivno djelovanje nimodipina može biti umanjeno zbog mogućeg hipotenzivnog učinka većih doza lijeka. La Vere i sur. (113) su ustanovili da se nimodipinom mogu uspješno prevenirati amnestički učinci izazvani osim hipoksijom, i traumom, starenjem, epileptičkim

napadima, intoksikacijom s etanolom itd. Stoga je logično pretpostaviti da vazodilatacijski učinci nimodipina i posljedično poboljšanje protoka krvi u mozgu ne mogu biti jedino objašnjenje njegova djelovanja. Pronađeno je također da da spomenuta tvar posjeduje optimalan stupanj amfifilnosti koji pojačava njegovo međudjelovanje s membranom stanice i omogućava lakši prijelaz krvno-moždane barijere. Radioimunološke studije Bellemana i sur. (11), potvrdile su da se  $^3\text{H}$ -nimodipin specifično veže za stanice cerebralnog parenhima, dominantno hipokampusa, te da afinitet vezivanja raste s povećanjem doze. Time se ujedno mogu objasniti dozno ovisni učinci nimodipina dobiveni u brojnim eksperimentalnim studijama. Opsežne biokemijske analize Edwina i sur. (51) pokazale su da pretretiranje nimodipinom značajno štiti stanicu od povećanog utoka  $\text{Ca}^{2+}$  iona, "popravlja" energetski status stanice ubrzanjem ATP resinteze, sprečava oslobađanje SMK-a i njenih metabolita, te tako štiti i integritet same plazmatske membrane. Hadley i sur. (81) te Stanley i sur. (203) su pronašli da su opisani učinci nimodipina jače izraženi ukoliko se spomenuti lijek aplicira prije, a ne nakon hipoksičnog ili ishemičnog infarkta. Smatra se, naime, da spomenuta stanja smanjuju broj receptorskih mjesta za blokatore kalcijevih kanala (mada ne nužno i gustoću samih kanala), te tako onemogućavaju ili umanjuju mogućnost djelovanja lijeka.

Na osnovu naših rezultata, kao i podataka iz literature, zaključujemo da nimodipin uspješno antagonizira spoznajni deficit u štakora izloženih hipoksiji te da je veličina učinka ovisna o dozi.

Dosadašnja preliminarna istraživanja ukazuju na činjenicu da je nikardipin DHP derivat koji ostvaruje značajne učinke u SŽ. Vazodilatacijski učinci navedene tvari dokazani su u mozgu štakora, pasa i primata (179). Pokazao se djelotvornim u uklanjanju spazma bazilarne arterije nakon subarahnoidalnog krvarenja (1), te cerebralnog infarkta (83). Ustanovljeno je također da pretretiranje eksperimentalnih životinja nikardipinom značajno



reducira stupanj ishemičnog oštećenja mozga nakon okluzije karotidnih arterija (1).Navedeni blokator kalcijevih kanala povećava parcijalni tlak kisika u mozgu, popravljajući energetske ravnoteže moždanih stanica te smanjuje oslobađanje SMK (61,78).Smatra se da su opisani učinci lijeka posljedica snažnog cerebrovazodilatacijskog djelovanja,odnosno aktivacije biokemijskih mehanizama koji dodatno štite integritet stanice (181).

U našim pokusima hipoksiji izložene životinje pretretirali smo s 0,03;0,1;0,3 i 1 mg/kg nikardipina.Iz dobivenih rezultata očito je da sve korištene doze nikardipina popravljaju sposobnost učenja i pamćenja u hipoksičnim životinjama.Životinje pretretirane s 1 mg/kg nikardipina statistički značajno bolje izvršavaju postavljene zadatke u odnosu na štakore pretretirane s 0,03 ili 0,1 mg/kg ispitivane tvari.Dobiveni rezultati sukladni su s rezultatima Grottae i sur. (78) koji su utvrdili da pretretiranje nikardipinom značajno umanjuje kognitivne ispade u hipoksičnim životinjama.

Na temelju navoda iz literature te naših eksperimentalnih podataka može se zaključiti da je nikardipin kalcijev blokator izrazitih citoprotektivnih mogućnosti,te da uspješno antagonizira spoznajni deficit uzrokovan hipoksijom.Spomenuti učinci ovisni su o dozi lijeka.

#### 4.3.2. KOLINOMIMETICI

Budući da hipoksija izrazito ometa kolinergičku transmisiju (68),kao i odvijanje spoznajnih procesa,pokušali smo pojačati aktivnost spomenutog neurotransmitskog sustava: 1.) povećanjem sinteze ACh apliciranjem prekursora, ili 2.) sprečavanjem razgradnje ACh inhibicijom ACh esteraze (AChE), ili 3.) direktnom stimulacijom kolinergičkih muskarinskih receptora.

Prema našim eksperimentalnim podacima,rezultati pasivnog izbjegavanja kazne dobiveni jednokratnom aplikacijom prekursora ACh tj.kolina u dozi od 100 mg/kg,statistički su značajno bolji u odnosu na

rezultate pasivnog izbjegavanja kazne u životinja pretretiranih otapalom. Dobiveni rezultat u suglasnosti je s rezultatima dobivenim u drugim eksperimentalnim modelima. Npr. Sitarma i Weingartner (197) te Bartus i sur. (9) su opisali poboljšanje spoznajnih aktivnosti nakon akutne aplikacije kolina u štakora u kojih je spoznajni deficit uvjetovan lezijom NBM. Pretpostavlja se da u ovim eksperimentalnim uvjetima egzogeno unesen kolin pojačava aktivnost preostalih, nelediranih neurona NBM ili intrinzičnih kolinergičkih neurona neokorteksa ili drugih kolinergičkih struktura SŽ koje su uključene u procese učenja i pamćenja (237).

U našem pokusu desetodnevna aplikacija 100 mg/kg kolina, značajno popravlja sposobnost pasivnog izbjegavanja kazne u hipoksičnih štakora. Obzirom na dobiveni rezultat smatramo da kronična aplikacija kolina u spomenutoj dozi ostvaruje pozitivne učinke na spoznajne procese u hipoksičnih životinja najvjerojatnije povećavanjem sinteze ACh ili stimulacijom otpuštanja ACh ili stimulacijom postsinaptičkih kolinergičkih receptora.

Iz rezultata dobivenih aplikacijom različitih doza ( 0,05;0,1;0,2 mg/kg ) fizostigmina i THA ( 0,1;0,3;1 mg/kg ) evidentno je da sve korištene doze statistički značajno popravljaju izbjegavanje kazne u hipoksičnih životinja. Dobiveni rezultati u skladu su s nalazima po kojima navedeni inhibitori AChE mogu poboljšati spoznajne aktivnosti u štakora s ekscitotoksičnom lezijom NBM, u zdravih osoba, u bolesnika sa SDAT, te u ispitanika sa skopolaminom izazvanom amnezijom (227,237). Na osnovu iznesenih rezultata smatramo da je korištenim dozama navedenih inhibitora AChE postignuta potrebna koncentracija ACh u SŽ koja kompenzira kolinergičku hipofunkciju neokorteksa uvjetovanu hipoksijom.

Budući da hipoksija smanjuje intenzitet kolinergičke neurotransmisije, a muskarinski receptori su dominantni receptori neokorteksa (237) pretpostavili smo da će primjena direktnog muskarinskog agonista, arekolina povećati spoznajne aktivnosti hipoksičnih štakora.



Iz rezultata naših pokusa evidentno je da arekolin poboljšava pasivno izbjegavanje kazne u štakora izloženih hipoksiji. Dobiveni rezultati u suglasnosti su s nalazima više autora (10,63,223) po kojem arekolin olakšava spoznajne procese u eksperimentalnih životinja s lezijama NBM.

Očito je također da je povećanje sposobnosti ispitivanih životinja da izbjegnu kaznu upravo proporcionalno s veličinom doze arekolina. Naime, najizraženije izbjegavanje kazne evidentno je kod najveće (1 mg/kg), a najmanje kod najniže doze (0,1 mg/kg) arekolina.

Sumirajući naše rezultate o utjecaju kolinomimetika na pasivno izbjegavanje kazne u hipoksičnih štakora možemo zaključiti da je aplikacijom kolina odnosno injiciranjem fizostigmina, THA i arekolina moguće antagonizirati spoznajni deficit u životinja izloženih hipoksiji.

#### 4.3.3. NOOTROPICI

Iz naših eksperimentalnih rezultata evidentno je da piracetam popravlja kognitivne aktivnosti u hipoksičnih štakora. Naime, rezultati pasivnog izbjegavanja kazne u životinja pretretiranih različitim dozama (30;100 ili 300 mg/kg) piracetama statistički su značajno bolji u odnosu na rezultate dobivene u životinja kontrolne skupine. Antihipoksično djelovanje piracetama opisali su i Chleide i sur. (25). Oni su ustanovili da životinje pretretirane s 100 mg/kg piracetama, i.p., 30 min prije izlaganja hipoksičnim uvjetima (3,5 V% kisika kroz 10 minuta) statistički značajno bolje rješavaju postavljene zadatke u odnosu na životinje koje su dobivale otapalo.

Oksiracetam je noviji, dva do tri puta potentniji nootropik (8,48) od piracetama. Pokazao se naročito efikasnim u očuvanju kognitivnih sposobnosti u uvjetima poremećene funkcije SŽ (različiti tipovi organskog moždanog sindroma) (95). Naši eksperimentalni rezultati pokazuju da sve korištene doze oksiracetama (50;100; ili 300 mg/kg) statistički značajno

popravljaju spoznajni deficit u štakora izloženih hipoksiji. Životinje pretretirane s 50 mg/kg spomenute tvari, statistički značajno bolje izvršavaju postavljene zadatke u odnosu na životinje pretretirane s višim dozama. Naši rezultati su u sukladnosti s rezultatima Cumina i sur. (95) koji su pronašli da oksiracetam statistički značajno popravlja izbjegavanje kazne u životinja u kojih je kognitivni deficit uvjetovan hipoksijom.

Mehanizam antihipoksičnog odnosno antiamnestičkog djelovanja nootropika nije jasan. Po nekima, spomenuti je učinak posljedica pojačanja metaboličke aktivnosti SŽ-a (132,156), dok drugi smatraju da je to odraz stimulacije sinteze i otpuštanja ACh (165,200,202), uz posljedično potenciranje EPSP i LTP (188) u hipokampusu. Na temelju naših eksperimentalnih podataka možemo zaključiti da je korištenim nootropicima moguće antagonizirati spoznajni deficit u hipoksičnih štakora.

#### 4.3.4. KOMBINACIJE POJEDINIH BLOKATORA KALCIJSKIH KANALA, KOLINOMIMETIKA I NOOTROPIKA

Obzirom na patofiziološku pozadinu hipoksičnog oštećenja (masivan utok  $Ca^{2+}_e$  u stanicu, pad kolinergičke aktivnosti, poremećaj metabolizma i energetske produkcije) te ohrabrujuće rezultate dobivene aplikacijom pojedinačnih lijekova iz skupine blokatora kalcijских kanala, kolinomimetika i nootropika, zanimalo nas je da li je kombinacijom ispitivanih tvari moguće pojačati spoznajne aktivnosti u hipoksičnih životinja.

Iz naših eksperimentalnih rezultata očito je da kombinacija nimodipina (1 mg/kg) s ifenprodilom (1 mg/kg) ili arekolinom (1 mg/kg) ili oksiracetamom (50 mg/kg) statistički značajno popravlja izbjegavanje kazne u testiranih skupina životinja. Učinci dobiveni kombinacijom navedenih tvari ne razlikuju se statistički značajno od učinaka postignutih aplikacijom svake pojedinačne tvari.



Dokazano je da nootropici povećavaju aktivnost kolinergičke neurotransmisije. Stoga nas je zanimalo ispitati djelovanje kombinacije oksiracetama (50 mg/kg) s kolinomimeticima različitog mehanizma djelovanja: kolina (100 mg/kg) ili THA (1 mg/kg) ili arekolina (1 mg/kg). Životinje pretretirane navedenim kombinacijama lijekova statistički bolje izvršavaju kaznu u odnosu na hipoksične životinje tretirane otapalom. Akutna administracija kolina u kombinaciji s oksiracetamom statistički značajno popravlja sposobnost učenja u odnosu na životinje tretirane samo kolinom. Do sličnih saznanja došli su i Pomare i sur (165). Oni su ustanovili da kombinacija oksiracetama i kolina značajno popravlja kognitivni deficit u pacjenata sa SDAT.

#### 4.4. RAZINA UKUPNIH SLOBODNIH MASNIH KISELINA I SLOBODNE ARAHIDONSKE KISELINE U MOZGU ŠTAKORA IZLOŽENIH HIPOKSIJI

Rezultati naših pokusa pokazuju da izlaganje eksperimentalnih životinja uvjetima kontrolirane hipoksije (3,5V%) uzrokuje porast razine ukupnih SMK, poglavito arahidonske. Spomenuti rezultat u skladnosti je s radovima Shiu i sur. (193) te Kidooke i sur. (103) koji su pronašli da izlaganje hipoksično/ishemičnim uvjetima uzrokuje aktivaciju membranskih fosfolipaza, uz posljedičnu degradaciju membranskih fosfolipida i značajan porast sadržaja kako ukupnih tako i SAK u mozgu. Prateći dinamiku spomenutih kiselina naši rezultati kazuju da razina ukupnih SMK u hipoksičnih štakora postupno raste, dosežući statističku značajnost 60 minuta po izlaganju hipoksiji. Registrirali smo također i progresivni porast sadržaja SAK u mozgu. Maksimalnu razinu dokazali smo 15 minuta nakon izlaganja hipoksiji. Nakon spomenutog perioda razina SAK postupno pada. Dobiveni

rezultati mogli bi se objasniti različitim obrascima oslobađanja SMK u hipoksičnim uvjetima. Čini se da u ranom periodu cerebralne hipoksije dolazi do selektivne degradacije specifičnih membranskih fosfolipida uz posljedičan signifikantan porast SMK, poglavito SAK. U kasnijem periodu hipoksije, degradacija membranskih fosfolipida odvija se putem nespecifičnih fosfolipaza uz pojavu sporog otpuštanja različitih SMK. Isti kemijski put koji u ranoj fazi rezultira signifikantnim porastom razine SAK, a u kasnijem periodu i porastom različitih SMK, odvija se i za vrijeme cerebralne ishemije. Vjerojatno objašnjenje postupnog smanjenja koncentracije SAK jest njena pregradnja u eikosanoide.

Smatra se da je u hipoksično-ishemičnim uvjetima masivan utok  $Ca^{2+}_e$  odgovoran za niz intracelularnih promjena koje vode staničnom oštećenju i smrti. Jedna od neposrednih posljedica izrazitog porasta  $Ca^{2+}_i$  je aktivacija  $FLA_2$  i FLC, razgradnja membranskih fosfolipida i posljedično otpuštanje SMK, poglavito SAK (105). Obzirom na navedeno, interesiralo nas je da li je moguće blokadom utoka iona  $Ca^{2+}$  u stanicu, prevenirati porast razine SAK.

Ispitali smo učinke različitih doza (0,03; 0,1; 0,3 ili 1 mg/kg) blokatora kalcijских kanala, nimodipina i nikardipina.

Kao otapalo za spomenute lijekove, korišten je propilenglikol i etanol, u omjeru 1:1. Ustanovili smo da pretretman hipoksičnih životinja spomenutom smjesom ne utječe na razinu SAK. Dobiveni rezultat sukladan je s nalazima Kidooke i sur. (103) koji su pronašli da spomenuto otapalo ne mijenja razinu SAK u ishemičnih životinja.

Nadalje, pokazalo se da nimodipin u dozama 0,3 i 1 mg/kg, u potpunosti reducira hipoksijom uvjetovan porast SAK. Dobiveni rezultat ide u prilog prethodno iznesenoj tvrdnji da je akumulacija SAK uvjetovana poremećajem homeostaze iona  $Ca^{2+}$ , te ukazuje na mogućnost neuroprotektivnog djelovanja nimodipina u hipoksičnim uvjetima.

Nasuprot tome, aplikacija nikardipina nije reducirala razinu ispitivanih masnih kiselina u mozgu. Dobiveni rezultat je u suprotnosti s rezultatima Kidooke i sur.



(102) koji su s dozom od 1 mg/kg nikardipina uspješno inhibirali oslobađanje SMK, posebice SAK u modelu globalne cerebralne ishemije u štakora. U literaturi međutim, postoje podaci o tome da je nikardipinom moguće postići neuroprotektivno djelovanje isključivo korištenjem izrazito visokih doza (64,102). Postoje podaci da je spomenuta tvar sklona ionizaciji, poglavito u uvjetima praćenim acidozom. To posljedično dovodi do različite stanične distribucije i kinetike vezivanja na ionskom kanalu za kalcij (23,178). Spomenuti navodi mogli bi ići u prilog objašnjenju nedjelotvornosti nikardipina u našim eksperimentalnim uvjetima.

#### 4.5. SELEKTIVNA VULNERABILNOST PIRAMIDNIH STANICA CA<sub>1</sub> REGIJE HIPOKAMPUSA

Piramidne stanice CA<sub>1</sub> regije hipokampusa su nejednoliko osjetljive prema hipoksično-ishemičnom oštećenju (189). Dokazano je da intenzitet lezije ovisi o stupnu i trajanju spomenutog inzulta. Tako npr. izlaganje eksperimentalnih životinja hipoksiji (različitog intenziteta i duljine trajanja) ili kombinaciji hipoksije i unilateralne okluzije karotida odnosno hipotenziji (189,232) ne dovodi do značajnijih poremećaja gustoće i morfoloških osobitosti piramidnih stanica hipokampusa. Nasuprot tome, difuzna cerebralna ishemija uvjetovana četverožilnom okluzijom u trajanju od 10-20 minuta praćena je manifestnim poremećajima gustoće, strukture i integriteta piramidnih stanica CA<sub>1</sub> regije hipokampusa (15,39,41,45). Svjetlosno-mikroskopske analize (SM) pokazuju da se manifestna oštećenja strukture spomenutih stanica ne javljaju odmah, nego tek 2-3 dana po ishemičnoj leziji, te da se u potpunosti manifestiraju tek sedam dana po oštećenju. Otkriće opisanog fenomena odgođenog staničnog oštećenja i smrti (engl. "delayed

neuronal death") potaklo je nadu u mogućnost terapijskog djelovanja prije razvoja kompletne neuronalne degeneracije.

Neurokemijske analize pokazale su da za vrijeme i neposredno po ishemičnom oštećenju dolazi do masivnog influksa iona  $Ca^{2+}$  u stanice čitave hipokampalne regije. U ranom periodu reperfuzije razina  $Ca^{2+}_i$  se kratkotrajno normalizira (51,60, 87), da bi potom uslijedio sekundarni porast i to isključivo u području  $CA_1$  regije. Više autora smatra da upravo sekundarni rast  $Ca^{2+}$  iona prethodi pojavi morfoloških promjena piramidnih stanica  $CA_1$  regije, odnosno da je  $Ca^{2+}$  uzročno povezan s odgođenim neuronalnim oštećenjem (189).

Budući da se smatra da je poremećaj kalcijske homeostaze primarni uzrok neuronalne degeneracije u postishemičnom periodu (189), zanimalo nas je ispitati utjecaj blokatora kalcijevih kanala nimodipina na stanični integritet u štakora izloženih četverostrukoj okluziji krvnih žila. Analiza naših histoloških rezultata pokazuje statistički značajan pad broja piramidnih stanica  $CA_1$  regije praćen morfološkim i strukturnim promjenama. Naši rezultati se podudaraju s rezultatima Pulsinellia i Brierleya koji su opisali oštećenje u području piramidnih stanica  $CA_1$  regije hipokampusa nakon četverožilne okluzije (168). Pretretiranje ishemičnih štakora nimodipinom (1 mg/kg) pokazuje da je broj  $CA_1$  stanica statistički značajno viši u odnosu na ishemične, netretirane štakore, te da su integritet i morfološke osobine očuvane. Opisani rezultat je u sukladnosti s rezultatima Krieglsteina i sur. (109) koji su pronašli da pretretiranje ishemičnih životinja s 0,1 ili 0,3 mg/kg nimodipina značajno reducira stupanj neuronalnog oštećenja.

Dobiveni rezultati idu u prilog prethodno iznesenoj tvrdnji o značajnoj ulozi  $Ca^{2+}$  u degenerativnim promjenama stanica  $CA_1$  regije hipokampusa te ukazuje na mogućnost učinkovite zaštite ishemičnih stanica nimodipinom.



Zaključno, rezultati naših eksperimentalnih istraživanja pokazuju da primjena blokatora kalcijских kanala (receptor- i voltažno ovisnih), zatim kolinomimetika različitih mehanizama djelovanja, nootropika kao i njihovih kombinacija može popraviti stanično oštećenje i posljedično tome spoznajni deficit u životinja izloženih hipoksičnim odnosno ishemičnim uvjetima. Navedeni nalazi dopuštaju pretpostavku o uspješnosti eventualne kliničke primjene i iskoristivosti ovih lijekova i njihovih kombinacija u tretiranju poremećaja pamćenja uvjetovanih hipoksično-ishemičnim oštećenjem SŽ-a.

M. 1. 1980

## 5. ZAKLJUČAK



## 6. LITERATURA

1. ALPS B,HASS AR 1985 Nicardipine and phenytoin prevention of cerebral ischemic cell change in a new rat survival model of brief four-vessel occlusion *Abstr Neurology* 35: 141-145
2. ANDERSEN P,BLISS TVP 1971 Lamellar organisation of hippocampal excitatory pathways *Expl Brain res* 13: 222-238
3. ANDINE P,JACOBSONI,HAGBERG H 1988 Calcium uptake evoked by electrical stimulation is enhanced postischemically and precedes delayed neuronal death in CA1 of rat hippocampus:involvement of NMDA receptors *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 799-807
4. ARAI H,LUST WD 1986 Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil *Metab Brain Dis* 1: 263-278
5. ASCHER P,NOWAK L 1987 Electrophysiological studies of NMDA receptors *TINS* 10(7): 284-288
6. ASHFORD JW,SOLDINGER S,SCHAEFFER J,COCHRAN L,JARVIJ LF 1981 Physostigmine and its effect on six patients with dementia *Am J Psychiatry* 138: 829-830
7. BADDELEY A 1988 Cognitive psychology and human memory *TINS* 11: 176-181
8. BANFI S,DORIGOTTI L 1986 Experimental behavioral studies with oxiracetam on different types of chronic cerebral impairment *Clin Neuropharm* 9(3): S19-S26
9. BARTUS RT,DEAN RL,SHERMAN K,FRIEDMAN E 1980 Enhancement of aged rodent retention via pharmacological modulation of choline availability *Abstr Soc Neurosci* 6: 112
10. BARTUS RT 1981 Age-related memory loss and cholinergic dysfunction: possible directions based on animal models. U: *Strategies for the Development of an Effective Treatment for Senile Dementia*. Mark Powley Associates Inc. New Canaan Connecticut, 71-79
11. BELLEMANN P,SCHADE A,TOWART R 1983 Dhp receptor in rat brain labeled with <sup>3</sup>H nimodipine *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2356-2360
12. BERING B,MULLER E 1985 Interaction of piracetam with several neurotransmitter receptors in the central nervous system *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 35(9): 1350-1352
13. BIELENBERG GW,SAUER D,NUGLISCH J,BECK T,KRIEGLSTEIN J 1989 Effects of emopamil on postischemic blood flow and cell damage in the rat brain *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 339: 230-235
14. BLISS TVP,COLLINGRIDGE GL 1993 A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus *Nature* 361: 31-39
15. BLOMQUIST P,MABE H,SIESJO BK 1984 Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat.Circulatory and functional effects of 4-vessel occlusion *Acta Neurol Scand* 69: 376-384



16. BLOMQUIST P,WIELOCH T 1984 Delayed postischemic hypoperfusion: evidence against involvement of the noradrenergic locus coeruleus system *J Cereb Blood Flow Metab* 4: 425-429
17. BOISSARD CG,LINDNER MD,GRIBKOFF VK 1992 Hypoxia produces cell death in the rat hippocampus in the presence of an A1 adenosine receptor antagonist:an anatomical and behavioral study *Neuroscience* 48(4): 807-812
18. BORTOLOTTO ZA,COLLINGRIDGE GL 1993 Characterisation of LTP induced by the activation of glutamate metabotropic receptors in area CA<sub>1</sub> of the hippocampus *Neuropharmacology* 32: 1-9
19. BRENNAN MJ,FREEDMAN LS,SHERMAN A,FRIEDMAN E 1981 Behavioral deficit induced by a choline deficient diet in the mouse *Fed Proc* 40: 268
20. BROWN R,DAVIS JN,CARLSSON A 1973 Dopa reversal of hypoxia induced disruption of the conditioned avoidance response *J Pharm Pharmac* 25: 412-414
21. BUNNELL OS,LOUIS TM,DALDANHA RL,KOPELMAN AE 1987 Protective action of the calcium antagonists,flunarizine and nimodipine,on cerebral ischemia *Med Sci Res* 15: 1513-1514
22. CAINE ED 1980 Cholinomimetic treatment fails to improve memory disorders *N Engl J Med* 303: 585-586
23. CALDERINI G,BONETTI AC,BATTISTELLA A,CREWS FT,TOFFANO G 1983 Biochemical changes of rat brain membranes with aging *Neurochem Res* 8(4): 483-492
24. CHALLISS RAJ,MISTRY R,GRAY DW,NAHORSKI SR 1994 Modulation of muscarinic cholinceptor-stimulated inositol1,4,5-trisphosphate accumulation by NMDA in neonatalrat cerebral cortex *Neuropharmacology* 33(1): 15-27
25. CHLEIDE E,BRUHWYLER J,MERCIER M Enhanced resistance effect of piracetam upon hypoxia-induced impaired retentionof fixed-interval responding in rats *Pharmacol Biochem Behav* 40: 1-6
26. CHLEIDE E,ISHIKO K 1991 Effects of hypoxia on release of acetylcholine and amino acids-an application of brain dialysis *Neuroscience* 17(1): 83-86
27. CHRISTIE JE,SHERING A,FERGUSON SJ,GLEN MI 1981 Physostigmine and arecoline:effects of intravenous infusions in Alzheimer presenile dementiam*Brit J Psychiat* 138: 46-50
28. CLEMENTS MP,BLISS TVP,LYNCH MA 1991 Increase in arachidonic acid concentration in a postsynaptic membrane fraction following the induction of LTP in the dentate gyrus *Neuroscience* 45: 379-389
29. COLLERTON D 1986 Cholinergic function and intellectual decline in AD *Neuroscience* 19: 1-28
30. COLLEY PA,ROUTTENBERG A 1993 Long-term potentiation as synaptic dialogue *Brain Res Rev* 18(1): 115-123



31. COLLINGRIDGE GL 1985 Long term potentiation in the hippocampus: mechanisms of initiation and modulation by neurotransmitters *TIPS* 10: 407-411
32. COSNIER D, CHEUCLE M, RISPAT G, STREICHENBERGER G 1977 Influence of hypercapnia on the cerebrovascular activities of some drugs used in the treatment of cerebral ischemia *Arzneim-Forsch/Drug Res* 27(II): 1566-1569
33. COSTA LG, KAYLOR G, MURPHY SD 1986 Interaction of choline with muscarine receptor-stimulated phosphoinositide metabolism in the rat brain *Naun Schmied Arch Pharmacol* 334: 536-539
34. COTMAN CW, IVERSEN LL 1987 Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors *TINS* 10(7): 263-265
35. COTMAN CW, NIETO-SAMPEDRO M 1984 Cell biology of synaptic plasticity *Science* 225: 1287-1293
36. CUNNINGHAM MD, FERKANY JW, ENNA SJ 1993 Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention *Life Sci* 45: 135-148
37. DALKARA T, TAN E, ERDEMLI G, ONUR R, ZILELI T 1990 Electrophysiological evidence for activation of NMDA receptors and its antagonism by MK-801 in cerebral ischemia *Brain Res* 532: 101-106
38. DANIELL LC 1989 The noncompetitive NMDA antagonists, MK-801, phencyclidine and ketamine, increase the potency of general anesthetics *Pharm Biochem Behav* 36: 111-115
39. DANKS AM, HAMMOND DN, WAINER BH, VAN BUSKIRK RG, ISAACSON RL 1992 Cellular alterations produced by the experimental increase in intracellular calcium and the nature of protective effects from pretreatment with nimodipine *Mol Brain Res* 16: 168-172
40. DAVIES SN, MARTIN D, MILLAR JD, ARAM JA, CHURCH J, LODGE D 1987 Differences in results from in vivo and in vitro studies on the use-dependency of NMDA antagonism by MK-801 and other phencyclidine receptor ligands *Eur J Pharm* 145: 141-151
41. DE LA TORRE JC, FORTIN T 1991 Partial or global rat brain ischemia: the SCOT model *Brain Res Bull* 26(3): 365-372
42. DE NOBLE VJ, REPETTI SJ, GELPKE LW, WOOD LM, KEIM KL 1986 Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats *Pharm Biochem Behav* 24: 1123-1128
43. DEFEUDIS FV 1988 Central cholinergic systems, cholinergic drugs and Alzheimer's disease-an overview *Drugs of today* 24(7): 473-490
44. DESPHANDE JK, WIELOCH T 1986 Flunarizine, a calcium entry blocker, ameliorates ischemic brain damage in the rat *Anesthesiology* 64: 215-224
45. DESPHANDE JK, WIELOCH T 1985 Amelioration of ischemic brain damage by postischemic treatment with flunarizine *Neurol Res* 7: 27-29



46. DOLIN SJ,LITTLE HJ 1989 Are changes in neuronal calcium channels involved in ethanol tolerance J Pharmacol Exp Ther 250(3): 985-991
47. DRAGUNOW M,YOUNG D,HUGHES P,MACGIBBON G,LAWLOR P,SINGLETON K,SIRIMANNE E,BEILHARZ E,GLUCKMAN P 1993 Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury? Mol Brain Res 18(4): 347-352
48. DUDKIN SM,POLEV PV,SOLDATOV NM 1990 Calcium entry blockers and oxiracetam have opposite effects on the density of dihydropyridine receptors in rat cerebral cortex Brain Res 525: 319-321
49. DUNETT SB 1985 Comparative effects of cholinergic drugs and lesions of NB of fimbria-fornix on delayed matching in rats Psychopharmacology 87: 357-363
50. DURKIN T 1989 Central cholinergic pathways and learning and memory processes:presynaptic aspects Comp Biochem Physiol 93(1): 273-280
51. EDVINSSON L,JANSEN I,OLESENJ,TFELT-HANSEN P 1989 Comparison of the effects of flunarizine and nimodipine on cerebral and temporal arteries with comments on their clinical use in cerebrovascular disorders. U: Cerebral Ischemia and Calcium.Springer-Verlag. Berlin, 300-305
52. FARBER JL,CHIEN KR,MITTNACHT S JR 1981 The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia Am J Pathol 102: 271-281
53. FAROOQUI AA,HORROCKS LA 1991 Excitatory amino acid receptors,neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders Brain Res Rev 16: 171-191
54. FAZELI MS,ERRINGTON ML,DOLPHIN AC,BLISS TV 1990 Increased efflux of a haemoglobin-like protein and an 80 kDa protease into push-pull perfusates following the induction of LTP in the dentate gyrus Brain Res 521: 247-253
55. FERRIS SH,SATHANANTHAN G,REISBERG B,GERSHON A 1979 Long-term choline treatment of memory-impaired elderly patients Science 1039-1040
56. FILE SE,HYDE JRG 1979 Evidence that piracetam has an anxiolytic action J of Affective Dis 1: 227-235
57. FLOOD JF,SMITH GE,CHERKIN A 1984 Memory retention: effect of prolonged cholinergic stimulation in mice Pharmacol Biochem Behav 20: 161-163
58. FOLCH JL,SLOZNE-STANLY GH 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues J BiolChem 227: 107-111
59. FRANKLIN SR,SETHY VH,TANG AH 1986 Amnesia prouced by intracerebroventricular injections of hemicholinium-3 in mice was prevented by pretreatment with piracetam-like compounds Pharmacol Biochem Behav 25: 925-927



60. FUJISAWA A, MATSUMOTO M, MATSUYAMA T, UEDA H, WANAKA A, YONEDA S, KIMURA K, KAMADA T 1986 The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia *Stroke* 17: 748-752
61. GAAB MR, HOLLERHAGE HG, SOLLMANN WP, RICKELS E 1989 Calcium antagonists in acute cerebral damage: therapy or risk for the brain? U: *Cerebral Ischemia and Calcium*. Springer Verlag. Berlin, 79-82
62. GAHWILER BH, BROWN DA 1987 Effects of dihydropyridines on calcium currents in CA3 pyramidal cells in slice cultures of rat hippocampus *Neuroscience* 20(3): 731-738
63. GALLIANI G, CESANA R, BARZAGHI F 1987 Reversal of scopolamine-induced amnesia in the mouse by arecoline *Med Sci Res* 15: 313-314
64. GARDINER M, NILSSON B, REHNCRONA S, SIESJO BK 1981 Free fatty acids in the rat brain in moderate and severe hypoxia *J Neurochem* 36(4): 1500-1505
65. GEBER J, MAROVIĆ A 1988 Piracetam facilitira evocirane potencijale hipoksičnih neurona. U: *Sažeci izlaganja VI susreta farmakologa '88*. Zagreb, 15-18
66. GEINISMAN Y, DE TOLEDO-MORELL L, MORELL F 1991 Induction of LTP is associated with an increase in the number of axospinosus synapses with segmented postsynaptic densities *Brain Res* 566: 77-88
67. GELMERS HJ 1989 Calcium blocker therapy in acute ischemic stroke. U: *Cerebral Ischemia and Calcium*. Springer-Verlag. Berlin, 362-366
68. GIBSON GE, PELMAS CJ, PETERSON C 1983 Cholinergic drugs and 4-aminopyridine alter hypoxic-induced behavioral deficits *Pharmacol Biochem Behav* 18: 909-916
69. GIBSON GE, PETERSON C 1985 Calcium and the aging nervous system *Neurobiol of Aging* 8: 329-343
70. GIBSON GE, TORAL-BARZA L, MANGER T, FREEMAN G 1989 Neurotransmitters and calcium during hypoxia. U: *Cerebral Ischemia and Calcium*. Springer-Verlag. Berlin, 215-221
71. GIBSON GE, DUFFY TE 1981 Impaired synthesis of acetylcholine by mild hypoxic hypoxia or nitrous oxide *J Neurochem* 36(1): 28-33
72. GINSBERG MD, GRAHAM DI, BUSTO R 1985 regional glucose utilisation and blood flow following graded forebrain ischemia in the rat: correlation with neuropathology *Ann Neurol* 18: 470-481
73. GIURGEA CE 1982 The nootropic concept and its prospective implications *Drug Dev Res* 2: 441-446
74. GOTTI B, DUVERGER J, BERTIN C, DUPONT J, FROST B 1988 Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. I. Evidence for efficacy in models of focal cerebral ischemia *J Pharmacol Exp Ther* 247: 1211-1215
75. GRAU M, MONTERO JL, BALASCH J 1987 Effect of piracetam on electrocorticogram and local cerebral glucose utilization in the rat *Gen Pharmac* 18(2): 205-211



76. GRAY J, MCNAUGHTON N 1983 Comparison between the behavioral effects of septal and hippocampal lesions: a review *Neurosci Biobehav Rev* 7: 119-188
77. GROO D, PALOSI E, SZPORNÝ L 1989 Cognitive enhancers prevent the hypoxia-induced disruption of conditioned avoidance response *Drug Dev Res* 18: 19-28
78. GROTTA JC, PETTIGREW LC, LOCKWOOD AH 1987 Brain Extraction of a calcium channel blocker *Ann Neurol* 21(2): 171-175
79. GUBAREV N 1988 Stanja u kojima se javljaju poremećaji pamćenja. U: Sažeci izlaganja VI Susreta Farmakologa '88. Hrvatsko društvo farmakologa. Zagreb, 1988
80. GUSTAFSON I, MIYAUCHI Y, WIELOCH TW 1989 Post-ischemic administration of idazoxan, an alpha 2 adrenergic receptor antagonist, decreases neuronal damage in the rat brain *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 171-177
81. HADLEY MN, MAJOR MD 1989 Experimental results of nimodipine in the treatment of focal cerebral ischemia. U: Abstract book of 4<sup>th</sup> International Symposium on Calcium Antagonists. Fondazione Giovanni Lorenzini. Firenze, 103-105
82. HAGBERG H, LEHMANN A, SANDBERG M, 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
83. HANDA J, YONEDA S, KOYAMA T, HANDA H, MATSUDA M 1975 Experimental cerebral vasospasm in cats: modification by a new synthetic vasodilator YC-93 *Abstr Surg Neurol* 3: 195-199
84. HANSEN AJ 1985 Effect of anoxia on ion distribution in the brain *Physiol Rev* 65: 101-148
85. HARA H, OZAKI A, YOSHIDOMI M, SUKAMOTO T 1990 Protective effect of kb-2796, a new calcium antagonist, in cerebral hypoxia and ischemia *Arch int Pharmacodyn* 304: 206-218
86. HARA H, KATO H, ARAKI T, ONODERA H, KOGURE K 1991 Involvement of lipid peroxidation and inhibitory mechanisms on ischemic neuronal damage in gerbil hippocampus: quantitative autoradiographic studies on second messenger and neurotransmitter systems *Neuroscience* 42(1): 159-169
87. HARRIS RJ, BRANSTON NM, SYMON L, BAYHAN M, WATSON A 1982 The effects of a calcium antagonist, nimodipine, upon physiological responses of the cerebral vasculature and its possible influence upon focal cerebral ischaemia *Stroke* 13: 759-766
88. HEIZMANN CW, BRAUN K 1992 Changes in Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in human neurodegenerative disorders *TINS* 15(7): 259-263
89. HIRSCH MJ, WURTMAN RJ 1978 Acute lecithin consumption elevates brain ACh content *Fed Proc* 37: 819
90. HOFFMEISTER F, BENZ U, HEISE A, KRAUSE P, NEUSER V 1982 Behavioral effects of nimodipine in animals *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 32(I): 347-360



91. HONORE T,SHEARDOWN MJ,HANSEN AJ,ESKESEN K,DIEMER N 1990 Non-NMDa antagonists protect against delayed neuronal cell death induced by cerebral ischemia *Clin Neuropharm* 13(2): 162-163
92. HOSSMANN KA,GROSSE B 1986 Recovery of monkey brain after prolonged ischemia.*Electrophysiology and brain electrolytes J Cereb Blood Flow metab* 6: 15-21
93. HOSSMANN KA 1989 Calcium antagonists for the treatment of brain ischemia:a critical appraisal. U: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*.Ed. Krieglstein J.Stuttgart, 53-63
94. IINO T,KATSURA M,KURIYAMA K 1992 Protective effect of vinconate on ischemia-induced neuronal damage in the rat hippocampus *Europ J Pharmacol* 224: 117-124
95. ITIL TM,MENON GN,SONGAR A,ITIL KZ 1986 CNS pharmacology and clinical therapeutic effects of oxiracetam *Clin Neuropharm* 9(3): S70-S72
96. JAFFARD R,GALEY D,MICHEAU J,DURKIN T 1985 The cholinergic septo-hippocampal pathway;learning and memory. U: *Brain Plasticity, Learning and Memory*. Ed. Schmitt P.Plenum.New York, 167-181
97. JARVIK ME,KOPP A 1967 An improved one-trial passive avoidance learning situation *Psychol Rep* 21: 221-224
98. JEFFERY KJ,ABRAHAM WC,DRAGUNOW M,MASON SE 1990 Induction of fos-like immunoreactivity and the maintance of LTP in the dentate gyrus of unanesthetized rats *Molec Brain Res* 8: 267-274
99. JOPE RS,1984 Effects of lecithin administration to rats on blood choline and brain choline and acetylcholine *Fed Proc* 43: 343
100. KASS IS,LIPTON P 1982 Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice *J Physiol* 332: 459-472
101. KAZDA S 1989 Complex effect of calcium antagonists in hypertensive disease. U: *Abstract book of 4<sup>th</sup> International Symposium on Calcium Antagonists*. Fopndazione Giovanni Lorenzini. Firenca, 86-88
102. KIDOOKA M,MATSUDA M,HANDA J 1987 Ca<sup>2+</sup> antagonist and protection of the brain against ischemia:effects of nicardipine on free fatty acid liberation in the ischemic brain in rats *Surg Neurol* 28: 437-440
103. KIDOOKA M,MATSUDA M,HANDA J 1987 Effect of calcium antagonist and agonist on free fatty acid liberation in the ischemic brain of rats *Surg Neurol* 28: 41-45
104. KIRINO T 1982 Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia *Brain Res* 239: 57-69
105. KITAGAWA K,MATSUMOTO M,ODA T,NIINOBE M,HATA R,HANDA N,FUKUNAGA R,ISAKA Y,KIMURA K,MAEDA H,MIKOSHIBA K,KAMADA T 1990 Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death *Neuroscience* 35(3): 551-558
106. KIYOTA Y,MIYAMOTO M,NAGAOKA A 1991 Relationship between brain damage and memory impairment in rats exposed to transient forebrain ischemia *Brain Res* 538(2): 295-302



107. KOCHER M,XIE Y,BRINKER G,DUX E,HOSSMANN KA 1989 Effect of calcium antagonists on cerebral blood flow,protein synthesis and histopathology after global ischemia of gerbil brain. U: Cerebral Ischemia and Calcium. Springer-Verlag. Berlin, 29-35
108. KOHMURA E,YAMADA K,HAYAKAWA T,KINOSHITA A,MATSUMOTO K,MOGAMI H 1990 Hippocampal neurons become more vulnerable to glutamate after subcritical hypoxia:an in vitro study J of Cereb Blood Flow 10: 877-884
109. KRIEGLSTEIN J,SAUER D,NUGLISCH J,KARKOUTLY C,BECK T,BIELENBERG GW,ROSSBERG C,MENNEL HD 1989 Protective effects of calcium antagonists against brain damage caused by ischemia.U: Cerebral Ischaemia and Calcium.Springer-Verlag.Berlin,223-230
110. KROGSGAARD-LARSEN P,JENSEN B,FALCH E,JORGENSEN FS 1989 Heterocyclic muscarinic agonists:structural and therapeutic aspects Drugs of the future 14(6): 541-561
111. KURIHARA J,SAHARA T,ODA N,TOMITA H,KATO H 1990 Selective dysfunction of the vagal component of the baroreflex following cerebral ischemia:protection by ifenprodil and flunarizine Eur J Pharm 190: 23-30
112. KURUMAJI A,MCCULLOCH J 1990 Effects of MK-801 upon local cerebral glucose utilisation in conscious rats following unilateral lesion of caudal enthorinal cortex Brain Res 531: 72-82
113. LE VERE TE,BRUGLER T,SANDIN M,GRAY-SILVA S 1989 Recovery of function after brain damage:facilitation by the calcium entry blocker nimodipine Behav Neurosci 103: 561-565
114. LEE KS,SCHUBERT P,REDDINGTONM,KREUTZBERG GW 1983 Adenosine receptor density and the depression of evoked neuronal activity in the rat hippocampus in vitro Neurosci Lett 37: 81-85
115. LYNCH G,BAUDRY M 1984 The biochemistry of memory:a new and specific hypothesis Brain Res 244: 1057-1063
116. MABE H,NAGAI H,TAKAGI T,UMEMURA S,OHNO M 1985 Effect of nimodipine on cerebral functional and metaboic recovery following ischemia in the rat brain Stroke 17: 501-505
117. MALCANGIO M,BARTOLINI A,GHELARDINI C,BENNARDINI F,MALMBERG-AIELLO P,FRANCONI F,GIOTTI A 1989 Effect of ICV taurine on the impairment of learning,convulsions and death caused by hypoxia Psychopharmacology 98: 316-320
118. MANSBACH RS,WILLETTS J,JORTANI SA,BALSTER RL 1991 NMDA antagonists:lack of antipunishment effect in squirrel monkeys Pharm Biochem Behav 39: 977-981
119. MASSOTO C,APUD JA,RACAGNI G 1985 Neurochemical studies on gabaergic and aminergic systems in the rat brain following acute and chronic piracetam administration Pharmacol Res Commun 17: 749-772
120. MATESIC DF,LIN RCS 1994 Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain J Neurochem 63: 1012-1020



121. MATTHIES H 1975 The biochemical basis of learning and memory *Life Sci* 15: 2017-2031
122. MC GEER PL,ECCLES JC,MC GEER EG 1979 Neuronal mechanisms involved in learning and memory. U: *Molecular Neurobiology of the mammalian brain*. New York, 501-535
123. MC GUINNESS N,ANWYL R,ROWAN M 1991 Trans-ACPD enhances LTP in the hippocampus *Eur J Pharmac* 197: 231-232
124. MCDONALD JW,JOHNSTON MV 1990 Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development *Brain Res Rev* 15(1): 41-70
125. MCDONALD JW,SILVERSTEIN FS,JOHNSTON MV 1990 MK-801 pretreatment enhances NMDA mediated brain injury and increases brain NMDA recognition site binding in rats *Neuroscience* 38(1): 103-113
126. MELDRUM BS, EVANS MC,SWAN JH,SIMON RR 1987 Protection against hypoxic/ischemic brain damage with excitatory amino acid antagonists *Med Biol* 65: 153-157
127. MELDRUM B,EVANS M,GRIFFITH T,SIMON R 1985 Ischemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry *Br J Anesth*
128. MELDRUM B 1993 Amino acids as dietary excitotoxins:a contribution to understanding neurodegenerative disorders *Brain Res Rev* 18(3): 293-314
129. MELDRUM BS,SWAN JH 1989 Competitive and non-competitive NMDA antagonists as cerebroprotective agents. U: *Pharmacology of Cerebral Ischemia*.Ed.Krieglstein J. Stuttgart, 157-163
130. MIWA S,FUJIWARA M,INOUE M,FUJIWARA M 1986 Effects of hypoxia on the activities of noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat brain *J Neurochem* 47(1): 63-69
131. MOHS RC,DAVIS KL 1985 Interactions of choline and scopolamine in human memory *Life Sci* 37: 193-197
132. MOOS WH,DAVIS RE,SCHWARZ RD,GAMZU ER 1988 Cognition activators *Med Res Rev* 8(3): 353-391
133. MOURSI MM,LUYCKX BA,ALECY DG 1983 The role of ethanol in diluents of drugs that protect mice from hypoxia *Stroke* 14(5): 791-796
134. MUBRIN Z 1986 Mehanizam pamćenja. U: *Sažeci izlaganja VI Susreta farmakologa '88*. Hrvatsko društvo farmakologa. Zagreb, 10-14
135. MUNEKATA K,HOSSMANN KA 1987 Effect of 5-minute ischemia on regional pH and energy state of the gerbil brain:relation to selective vulnerability of the hippocampus *Stroke* 18: 412-417
136. NABESHIMA T,NAKAYAMA S,ICHIHARA K,YAMADA K,SHIOTANI T,HASEGAWA T 1994 Effects of nefiracetam on drug-induced impairment of latent learning in mice in a water finding task *Europ J Pharmacol* 255: 57-65



137. NAKAMURA S,TANI Y,MAEZONO Y,ISHIHARA T,OHNO T 1992 Learning deficits after unilateral AF64A lesions in the rat basal forebrain:role of cholinergic and noncholinergic systems *Pharm Biochem Behav* 42: 119-130
138. NAKANO S,KATO H,KOGURE K 1989 Neuronal damage in the rat hippocampus in a new model of repeated reversible transient cerebral ischemia *Brain Res* 490: 178-180
139. NAKANO S,KOGURE K,FUJIKURA H 1990 Ischemia-induced slowly progressive neuronal damage in the rat brain *Neuroscience* 38(1): 115-124
140. NICKOLSON VJ,WOLTHUIS OL 1976 Effects of the acquisition-enhancing drug piracetam on rat cerebral energy metabolism,comparison with naftidrofuryl and methamphetamine *Biochem Pharmacol* 25: 2241-2244
141. NIKOLAEV E,TISCHMEYER W,KRUG M,MATTHIES H,KACZMAREK L 1991 C-fos protooncogene expression in the rat hippocampus and enthorinal cortex following tetanic stimulation of the perforant path *Brain Res* 560: 346-349
142. NILSSON OG,LEANZA G,BJORKLUND A 1992 Acetylcholine release in the hippocampus:regulation by monoaminergic afferents as assessed by in vivo microdialysis *Brain Res* 584: 132-140
143. NOWAK TS,FRIED RL 1985 Changes in brain energy metabolism and protein synthesis following transient bilateral ischemia in gerbil *J Neurochem* 44: 487-494
144. NYAKAS C,MARKEL E,BOHUS B,SCHUURMAN T,LUITEN PGM 1990 Protective effect of the calcium antagonist nimodipine on discrimination learning deficits and impaired retentionbehavior caused by prenatal nitrite exposure in rats *Behav Brain Res* 38: 69-76
145. NYBACK H,AHLIN A,JUNTTI T,OMAN G,NORDGREN I 1989 THA in AD-clinical and biochemical results of a double-blind cross-over study. U: *Book of Abstracts of Pharmacological Interventions on central Cholinergic Mechanisms IN SDAT*. Berlin, 73
146. OLNEY JW,DEGUBAREFF T,SLOVITER RS 1983 "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path *Brain Res Bull* 10: 699-712
147. OLNEY JW 1988 Endogenous excitotoxins and neuropathological disorders. U: *Excitatory Amino Acids in Health and Disease*. John Wiley. London, 337-351
148. OLTON DS,BECKER JT,HANDELMANN GE 1979 Hippocampus,space and memory *Behav Brain Sci* 2: 313-365
149. O'NEILL SK,BOLGER GT 1990 The effects of dihydropyridine calciumchannel modulators on pentylentetrazole convulsions *Brain Res Bull*25: 211-214
150. ONODERA H,KOGURE K 1990 Calcium antagonist,adenosine A1 and muscarinic bindings in rat hippocampus after transient ischemia *Stroke* 21(5): 771-775



151. OTANI S, ROISIN -LALLEMAND MP, BEN-ARI Y 1992 Enhancement of extracellular protein concentration during LTP in the rat hippocampus slice *Neuroscience* 47: 265-272
152. PAOLETTI R, CORSINI A, BERNINI F 1989 Calcium antagonists and atherosclerosis. U: Abstract book of 4<sup>th</sup> International Symposium on Calcium Antagonists. Fondazione Giovanni Lorenzini. Firenze, 83-86
153. PAOLI F, SPIGNOLI G, PEPEU G 1990 Oxiracetam and d-pyroglutamic acid antagonize a disruption of passive avoidance behaviour induced by the NMDA receptor antagonist 2-amino-5-phosphonovalerate *Psychopharmacology* 100: 130-131
154. PASTUZSKO A, ERECINSKA M, WILSON DF, SILVER IA 1985 Some effects of ischemia and hyperglycaemia on neurotransmitter metabolism in rat brain *Neurol Res* 7: 120-128
155. PEDATA F, LO CONTE G, SORBI S, MARCONCINI-PEPEU I, PEPEU G 1982 Changes in high affinity choline uptake in rat cortex following lesions of the magnocellular forebrain nuclei *Brain Res* 233: 359-367
156. PEPEU G, SPIGNOLI G 1990 Neurochemical actions of "nootropic drugs" *Adv Neurol* 51: 247-252
157. PEPEU G, SPIGNOLI G, GIOVANNINI G, MAGNANI M 1989 The relationship between the behavioral effects of cognition-enhancing drugs and brain acetylcholine *Pharmacopsychiat* 22: 116-119
158. PEPEU G, SPIGNOLI G 1989 Nootropic drugs and brain cholinergic mechanisms *Prog neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 13: S77-S88
159. PETERSON C, GIBSON GE 1985 Nerve ending acetylcholine metabolism and calcium homeostasis during hypoxia *J Neurochem* 45: 1779-1790
160. PETROVIĆ D 1986 Klinička slika, tok, prognoza i prevencija primarne degenerativne demencije s posebnim osvrtom na poremećaje pamćenja. U: Poremećaji pamćenja u odrasloj dobi. Medicinska akademija Hrvatske. Zagreb, 99-107
161. PHILLIS JW, WALTER GA 1989 Hypoxia/hypotension evoked release of glutamate and aspartate from the rat cerebral cortex *Neurosci Lett* 106: 147-151
162. PIERCEY MF, VOGELSANG GD, FRANKLIN SR, TANG AH 1987 Reversal of scopolamine-induced amnesia and alterations in energy metabolism by the nootropic piracetam: implications regarding identification of brain structures involved in consolidation of memory traces *Brain Res* 424: 1-9
163. PLUM F 1981 Potential directions for therapy in cerebral vascular disease. U: Cerebrovascular disease. Raven Press. New York, 195-204
164. POGAČNIK T 1986 Osobitosti posttraumatske encefalopatije. U: Poremećaji pamćenja u odrasloj dobi. Medicinska akademija Hrvatske. Zagreb, 93-99
165. POHORECKI R, BECKER GL, REILLY PJ, LANDERS DF 1990 Ischemic brain injury in vitro: protective effects of NMDA receptor antagonists and calmidazolium *Brain Res* 528: 133-137



166. POMARA N,BLOCK R,MOORE N,RHIEW HB,BERCHOU R,STANLEY M, GERSHON S 1984 Combined piracetam and cholinergic precursor treatment for primary degenerative dementia *IRCS Med Sci* 12: 388-389
167. POPPER KR,ECCLES JC 1977 Conscious memory: The cerebral processes concerned in storage and retrieval. U: The self and its brain. Springer International,377-406
168. PRIESTLEY T,HORNE AL,MCKERNAN RM,KEMP JA 1990 The effect of NMDA receptor glycine site antagonists on hypoxia-induced neurodegeneration of rat cortical cell cultures *Brain Res* 531: 183-188
169. PULSINELLI WA,BRIERLEY JB 1979 A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat *Stroke* 10(3): 267-272
170. PULSINELLI WA,BRIERLEY JB,PLUM F 1982 Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia *Ann Neurol* 11: 491-498
171. PULSINELLI WA,LEVY DE 1982 Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia *Ann Neurol* 11: 499-509
172. RADER RK,LANTHORN TH 1989 Experimental ischemia induces a persistent depolarization blocked by decreased calcium and NMDA antagonists *Neurosci Let* 99: 125-130
173. RAEBURN D,GONZALES RA 1988 CNS disorders and calcium antagonists *TIPS* 9: 117-119
174. RAGO LK,ALLIKMETS LH,ZARKOVSKY AM 1986 Effects of piracetam on the central dopaminergic transmission *Naun-Schmied Arc Pharmacol* 318: 36-37
175. RAMKUMAR V,EL-FAKAHANY E 1986 The current status of the dihydropyridine calcium channel antagonist binding sites in the brain *TIPS* 7: 171-172
176. RIDLEY RM,BAKER HF,DREWETT B 1987 Effects of arecoline and pilocarpine on learning ability in marmosets pretreated with hemicholinium *Psychopharmacol* 91: 512-514
177. RIEKKINEN P jr,SIRVIO J,RIEKKINEN M,RIEKKINEN P 1991 Effects of THA on passive avoidance retention performance of intact,nucleus basalis,frontal cortex and nucleus basalis+ frontal cortex-lesioned rats *Pharmacol Biochem Behav* 39: 841-846
178. ROBINSON PJ,NORONHA J,DEGEORGE JJ,FREED LM,NARIAI T,RAPOPORT SI 1992 A quantitative method for measuring regional in vivo fatty-acid incorporation into and turnover within brain phospholipids:review and critical analysis *Brain Res Rev* 17(3): 187-214
179. ROCA J,BALASCH J 1984 Effect of nicardipine on vertebral blood flow in dogs *Drugs* 6: 399-403
180. ROD MR,AUER RN 1989 Pre- and post-ischemic administration of MK-801 reduces cerebral necrosis in the rat *Can J Neurol Sci* 16: 340-344

181. ROSENBAUM DM,GROTTA JC,YATSU FM,PICONE CM,PETTIGREW LC 1989 A pilot study of nicardipine for acute ischemic stroke-the nicardipine group. U: Cerebral Ischemia and Calcium. Springer-Verlag. Berlin, 123-125
182. ROSSOR MN 1982 Neurotransmitters and CNS disease The Lancet 2: 1200-1204
183. ROTHMAN SM,OLNEY JW 1985 Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage Ann Neurol 19: 105-111
184. ROTHMAN SM 1983 Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons Science 220: 536-537
185. SANDIN M,JASMIN S,LEVERE TE 1990 Aging and cognition:facilitation of recent memory in aged nonhuman primates by nimodipine Neurobiol Aging 11: 573-575
186. SANSONE M,CASTELLANO C,BATTAGLIA M,AMMASSARI-TEULE M 1991 Effects of oxiracetam-nicotine combinations on active and passive avoidance learning in mice Pharm Biochem Behav 39: 197-200
187. SARA SJ,LEFEVRE S 1972 Hypoxia-induced amnesia in the one-trial learning and pharmacological protection by piracetam Psychopharmacologia (Berl.) 25: 32-40
188. SARTER M 1986 Some considerations of different modes of action of nootropic drugs Neuropsychobiology 15: 192-200
189. SCHMIDT-KASTNER R,FREUND TF 1991 Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia Neuroscience 40(3): 599-636
190. SCHMIDT-KASTNER R,PASCHEN W,HOSSMANN KA 1989 A modified 4-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats Stroke 20: 938-946
191. SCREMIN OU,JENDEN DJ 1989 Brain choline and ACh levels in forebrain global ischemia J Cereb Blood Flow Metab 9: 655
192. SHIMIZU-SASAMATA M,TERAI M,HARADA M,YAMAMOTO 1993 Anti-hypoxic and anti-ischemic actions of indeloxazine hydrochloride and its optical isomers:possible involvement of cerebral energy metabolism Arch int Pharmacodyn 324: 5-16
193. SHIU GK,NEMOTO EM 1981 Barbiturate attenuation of brain free fatty acid liberation during global ischemia J of Neurochem 37(6): 1448-1456
194. SIESJO BK,BENGSSON F 1989 Calcium fluxes,calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia,hypoglycemia and spreading depression:a unifying hypothesis J Cereb Blood Flow Metab 9: 127-140
195. SIMON RP,SWAN JH,GRIFFITHS T,MELDRUM BS 1984 Blockade of NMDA receptors may protect against ischemic damage in the brain Science 226: 850-852
196. SIMONIĆ A 1986 NOotropne tvari. U: Medicinska enciklopedija,II dopunski svezak.JLZ. Zagreb, 428-430



197. SITARAM N,WEIGARTNER H,CAINE ED,GILLIN JC 1978 Choline: selective enhancement of serial learning and encoding of low imagery words in man *Life Sci* 22: 1555-1560
198. SMITH ML,AUER RN,SIESJO BK 1984 The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia *Acta Neuropathol* 64: 319-332
199. SPANGLER EL,BRESNAHAN EL,GAROFALO P,MUTH NJ,HELLER B,INGRAM DK 1991 NMDA receptor channel antagonism by dizocilpin (MK-801) impairs performance of rats in aversively motivated complex maze task *Pharmacol Biochem Behav* 40: 949-958
200. SPIGNOLI G,PEPEU G 1986 Oxiracetam prevents electroshock-induced decrease in brain acetylcholine and amnesia *Eur J Pharm* 126: 253-257
201. SPIGNOLI G,PEDATA F,GIOVANNELLI L,BANFI S,MORONI F,PEPEU G 1986 Effect of oxiracetam and piracetam on central cholinergic mechanisms and active-avoidance acquisition *Clin Neuropharm* 9(3): S39-S47
202. SPIGNOLI G,PEPEU G 1987 Interactions between oxiracetam, aniracetam and scopolamine on behavior and brain acetylcholine *Eur J Pharmacol* 27: 491-495
203. STANLEY AT,WELCOME M,CHHABRA A,FAIRHURST AS 1985 Effects of DHP calcium channel blockers on rat brain muscarinic and alfa adrenergic receptors *Biochem Pharmacol* 34: 175-180
204. SUZUKI R,YAMAGUCHI T 1983 The effects of 5- minute ischemia in Mongolian gerbils:Blood-brain barrier,cerebral blood flow,and local cerebral glucose utilisation changes *Acta Neuropath* 60: 207-216
205. SUZUKI R,WAGNER HG 1985 Microphysiology of selectively vulnerable neurons *Prog Brain Res* 63: 59-68
206. SYVALAHTI EKG,LAUREN L,MARKKANEN J,KUNELIUS R 1987 Interaction of psychotropic drugs with brain muscarinic cholinoceptors:similarities of biperiden with pirenzepine in receptorbinding properties *Pharmacol Toxicol* 60: 66-69
207. TACCONI MT,WURTMAN RJ 1984 Physiological disposition of oral piracetam in Sprague-Dawley rats *J Pharm Pharmacol* 36: 659-662
208. TAKADERA T,SUZUKI R,MOHRI T 1990 Protection by ethanol of cortical neurons from NMDA-induced neurotoxicity is associated with blocking calcium influx *Brain Res* 537: 109-114
209. TAKAGI T,KAMIYA K,FUKUOKAH M,MABE H,NAGAI H 1979 Effect of Ca antagonists on experimental cerebral vasospasm *Acta Neurol Scand* 60: 486-487
210. THILMANN R,XIE Y,KIESSLING M 1986 Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus *Acta Neuropath* 71: 88-93
211. TOBE A,YAMAGUCHI T,NAGAI R,EGAWA M 1985 Effects of bifemelane hydrochloride (MCI-2016) on experimental amnesia (passive avoidance failure) in rodents *Japan J Pharmacol* 39: 153-161



212. TODD NV, ROSS RUSSEL R 1986 Reperfusion after cerebral ischemia: influence of duration of ischemia *Stroke* 17: 460- 466
213. TOUMANE A,DURKIN T,MARIGHETTO A,GALEY D,JAFFARD R 1988 Differential hippocampal and cortical cholinergic activation during the acquisition,retention,reversal and extinction of a spatial discrimination in an 8-arm radial maze by mice *Behav Brain Res* 30: 225-234
214. TRIGGLE DJ,LANGS DA,JANIS RA 1989 Calcium channel ligands:structure-function relationship of the 1,4 DHP *Med Res Rev* 9(2): 123-180
215. TROVARELLI G,GAITI A,DE MEDIO GE,BRUNETTI M,PORCELLATI G 1986 Biochemical studies on the nootropic drug,oxiracetam in brain *Clin Neuropharm* 9(3): S56-S64
216. TSUBOKAWA H,OGURO K,ROBINSONHPC,MASUZAWA T,RHEE TSG,TAKENAWA T,KAWAI N 1994 Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a mediator of neuronal death in ischemic hippocampus *Neuroscience* 59(2): 291-297
217. VACHER JM,KING RA 1968 Failure of hypoxia to produce retrograde amnesia *J Comp Physiol Psychol* 66(1): 179-181
218. VAN REEMPTS J,HASELDONCKX M,VAN DEUREN B,WOUTERS L,BORGERS M 1986 Structural damage of the ischemic brain:involment of calcium and effects of postischemic treatment with calcium entry blockers *Drug Dev Res* 8: 387-395
219. VAN REEMPTS J,HASELDONCKX M,VAN DEUREN B,WOUTERS L,BORGERS 1986 Structural damage of the ischemic brain: involment of calcium and effects of postischemic treatment with calcium entry blockers *Drug Dev Res* 8: 387-395
220. VRHOVAC B 1988 Smetnje pamćenja kao nuspojave lijekova. U: Sažeci izlaganja VI Susreta farmakologa '88. Hrvatsko društvo farmakologa. Zagreb, 31-32
221. WENK G,HUGHEY D,BOUNDY V,KIM A 1987 Neurotransmitters and memory:role of cholinergic,serotonergic and noradrenergic systems *Behav Neurosci* 101(3): 325-332
222. WENK GL,MARKOWSKA AL,OLTON DS 1989 Basal forebrain lesions and memory:alterations in neurotensin,not acetylcholine,may cause amnesia *Behav Neurosci* 103(4): 765-769
223. WENK GL,OLTON DS 1984 Recovery of neocortical choline CAT activity following ibotenic acid injection into the nucleus basalis of Meynert in rats *Brain Res* 293: 184-186
224. WHITE BC,WINEGAR CD,WILSON RF,HOEHNER PJ,TROMBLEY JH 1983 Possible role of calcium blockers in cerebral resuscitation:a review of the literature and synthesis for future studies *Crit Care Med* 11(3): 202-207
225. WIERNSPERGER N,GYGAX P,HOFMANN A 1984 Calcium antagonist PY-108-068: Demonstration of its efficacy in various types of experimental brain ischemia *Stroke* 15: 679-685



226. WOLF G 1971 Elementary histology for neurophysiologists. U: Methods in psychobiology. Acad Press. London, 281-299
227. WOLTHUIS OL 1971 Experiments with UCB 61215. A drug which enhances acquisition in rats: its effects compared with those of metamphetamine Eur J pharmacol 16: 283-297
228. WONG EHF, KEMP JA, PRIESTLEY T, KNIGHT AR, WOODRUFF GN, IVERSEN LL 1986 The anticonvulsant MK-801 is a potent NMDA antagonist Proc Natl Acad Sci 83: 7104-7108
229. WOZNAK DF, OLNEY JW, KETTINGER L, PRICE M, MILLER JP 1990 Behavioral effects of MK-801 in the rat Psychopharmacology 101: 47-56
230. WURTMAN RJ, MAGIL SG, REINSTEIN DK 1980 Piracetam diminishes hippocampal ACh levels in rats Life Sci 28: 1091-1093
231. YAMAMOTO M, SHIMIZU M 1988 Effects of a new TRH analogue, YM-14673 on a passive avoidance test as a possible criterion of improvement in cognitive disturbance in rodents Naunyn-Schmeid Arch Pharmacol 338: 262-267
232. YAMAZAKI N, KIYOTA Y, TAKE Y, MIYAMOTO M, NAGAWA Y, NAGAOKA A 1989 Effects of ideobene on memory impairment induced in ischemic and embolisation models of cerebrovascular disturbance in rats Arch Gerontol Geriatr 8: 213-224
233. ZEEVALK GD, NICKLAS WJ 1990 Action of the anti-ischemic agent ifenprodil on NMDA and kainate-mediated excitotoxicity Brain Res 522: 135-139
234. ZEEVALK GD, NICKLAS WJ 1992 Developmental differences in antagonism of NMDA toxicity by the polyamine site antagonist ifenprodil Develop Brain Res 65: 147-155
235. ZOLA-MORGAN S, SQUIRE LR, AMARAL DG 1986 Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA<sub>1</sub> of the hippocampus J Neurosci 6: 2950-2967
236. ZWEITEN PA 1989 Pharmacological activities of calcium antagonists: therapeutic applications and adverse reactions. U: Cerebral Ischemia and Calcium. Springer-Verlag. Berlin, 16-22
237. ŽUPAN G 1989 Utjecaj kolinomimetika, piracetama i dihidroergotoksina na pasivno izbjegavanje kazne u štakora s lezijom bazalne jezgre. Doktorska disertacija. Rijeka, 80-107

ŽIVOTOPIS



Rođena sam u Rijeci 24. lipnja 1962. godine gdje sam završila svoje dosadašnje školovanje. Osnovnu i srednju školu završila sam s odličnim uspjehom. Pohađala sam Centar za kadrove u obrazovanju i kulturi, smjer biologija-kemija.

Medicinski fakultet upisala sam 1981., a završila ga 1986. godine. Za vrijeme studija, četiri godine bila sam demonstrator na Zavodu za histologiju i embriologiju. Diplomski rad izradila sam i obranila na Zavodu za farmakologiju.

Obavezan pripravnički staž obavila sam u zdravstvenim ustanovama u Rijeci. Stručni ispit položila sam 1988. godine.

Školske godine 1987/88. upisala sam posljediplomski studij iz "Kliničke patofiziologije" - smjer Opća patofiziologija, na Medicinskom fakultetu u Rijeci. Magistarski rad pod naslovom "Utjecaj blokatora kalcijских kanala na spoznaju u intaktnih i hipoksiji izloženih štakora" obranila sam 1992. godine na istom fakultetu i time stekla akademski stupanj magistra medicinskih znanosti iz područja medicine.

Od 1987. godine zaposlena sam na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci kao liječnik na radu. Godine 1993. izabrana sam za znanstvenog asistenta za predmet Farmakologija na istom fakultetu.

Objavila sam deset znanstvenih radova i 22 kongresna priopćenja.