

Ocena histologiczna kory hipokampa szczura po długotrwałej ekspozycji na walproinian

Histological study of hippocampal cortex after long-term valproate administration to rats

Krzysztof Sendrowski, Wojciech Sobaniec

Klinika Neurologii i Rehabilitacji Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

STRESZCZENIE

Cel pracy. Celem pracy była ocena wpływu przewlekłej terapii walproinianem sodu (VPA) na obraz histologiczny tkanki nerwowej hipokampa szczura. **Materiał i metodyka.** Badania przeprowadzono na 45 szczurach, samcach rasy Wistar, o wyjściowej masie ciała 160–180 g, które podzielono na 2 grupy. Zwierzęta grupy I – kontrolnej otrzymywały przez cały czas trwania doświadczenia raz dziennie sól fizjologiczną o takiej samej objętości, co stosowany w grupie doświadczalnej lek. Grupa II obejmowała szczury, którym podawano roztwór wodny VPA w dawce 200 mg/kg m.c. przez okres 1, 3, 6, 9 i 12 miesięcy doświadczenia. Badania histologiczne wykonano na materiale pobranym z przyśrodkowego obszaru płata skroniowego mózgu przy użyciu powszechnie stosowanych metod barwienia. **Wyniki.** Pierwsze dyskretne zmiany histopatologiczne w korze zakrętu hipokampa zaobserwowano po 6-miesięcznym okresie stosowania VPA, gdzie w okolicy wnęki oraz w sektorze CA3 hipokampa spotykano pojedyncze neurony wykazujące cechy schorzenia homogenizacyjnego. Nieprawidłowości w obrazie z mikroskopu świetlnego nasilały się wraz z wydłużaniem się okresu ekspozycji na lek. Po 9 i 12 miesiącach doświadczenia dominowały komórki nerwowe warstwy piramidowej hipokampa z cechami schorzenia przewlekłego Nissla oraz objawami stwardnienia. Obserwowano również ubytki komórek nerwowych, niekiedy rozległe. Zmiany te zlokalizowane były głównie w okolicy wnęki hipokampa, nieco słabiej wyrażone w sektorze CA3, a stosunkowo najmniejsze nieprawidłowości dotyczyły sektora CA1. Stopień nasilenia zmian histologicznych był największy po 12 miesiącach doświadczenia. **Wnioski.** Uzyskane wyniki wskazują na duże bezpieczeństwo stosowania VPA w pierwszym półroczu ekspozycji szczura na lek. W dalszych fazach doświadczenia, tj. po 9 i 12 miesiącach, VPA uszkadza korę amonalną zwierząt doświadczalnych, głównie neurony wnęki i neurony sektorów CA3 i CA1 hipokampa. **Słowa kluczowe:** hipokamp, walproinian, encefalopatia walproinainowa, ocena histologiczna

ABSTRACT

Aim. The aim of this study was to assess the effect of long-term sodium valproate (VPA) therapy on the histology of rat hippocampal nerve tissue. **Materials and methods.** The study was conducted on 45 male Wistar rats of initial body mass of 160–180 g, divided into 2 groups. Control group I received physiological saline of the same volume as the drug used in the study group once daily through the entire experiment. Study group II consisted of rats treated with an aqueous solution of VPA at a dose of 200 mg/kg of body weight for 1, 3, 6, 9, and 12 months of the experiment. Histological examination was performed on samples from the medial temporal lobe area using common staining methods. **Results.** The first discrete histopathological changes in the cortex of the hippocampal gyrus were observed after 6 months of VPA administration, where single neurons with features of homogenization were found in the hippocampal hilus and sector CA3. Irregularities in the light microscope image intensified with extended exposure. After 9 and 12 months of the experiment, the pyramidal nerve cell layer of the hippocampus dominated with features of chronic Nissl disease and symptoms of sclerosis. We also observed loss of nerve cells, sometimes extensive. These changes were mainly located in the hippocampal hilus region, somewhat less pronounced in sector CA3; and the smallest, relatively, irregularities were found in sector CA1. The degree of severity of histological changes was the biggest after 12 months of the experiment. **Conclusions.** The obtained results indicate that it is safe to use VPA in rats in the first six months of exposure to the drug. In the subsequent phases of the experiment – after 9 and 12 months – VPA damaged the ammonal cortex, mainly neurons of the hippocampal hilus and sector CA3 and CA1. **Key words:** hippocampus, valproate, valproate encephalopathy, histological study

WSTĘP

Walproinian sodu (VPA) jest podstawowym i najczęściej stosowanym lekiem przeciwpadaczkowym. Ponad 40-letnie doświadczenie kliniczne wykazało jego wysoką skuteczność w leczeniu padaczek i zespołów padaczkowych z napadami zarówno uogólnionymi, jak i częściowymi [1, 2]. W ciągu

ostatnich kilkunastu lat zakres zastosowań VPA w leczeniu wciąż się rozszerza. Lek stosowany jest z dużym powodzeniem w terapii wielu schorzeń psychiatrycznych (głównie chorób afektywnych) [3] oraz w profilaktyce i terapii bólów głowy [4], drgawek gorączkowych [5], neuralgii [6], a ostatnio również chorób nowotworowych [7].

Pomimo że VPA cechuje się znacznie rzadziej występującymi i słabiej wyrażonymi działaniami ubocznymi w porównaniu z lekami przeciwpadaczkowymi starszej generacji, np. fenobarbitalem czy fenytoiną, terapia VPA nie jest jednak w pełni bezpieczna. Jednym z rzadkich, ale niezwykle poważnych objawów niepożądanych obserwowanych podczas długotrwałego podawania VPA jest tzw. encefalopatia walproinianowa (VE). VE klinicznie manifestuje się kombinacją zespołów neurologicznych, głównie mózdkowego (zaburzenia równowagi, nieźborność ruchowa, oczopląs, dyzartria) i pozapiramidowego (drżenia i dyskinezy), objawami psychiatrycznymi (otępienie, zaburzenia nastroju, głównie pod postacią zespołów sub- lub depresyjnych) oraz towarzyszącymi zaburzeniami świadomości, od stuporu do śpiączki włącznie [8–11]. W przeciwieństwie do zatrucia kwasem walproinowym VE wywołana jest przewlekłym przyjmowaniem VPA w dawkach prawidłowych, gwarantujących utrzymanie terapeutycznego poziomu tej substancji w surowicy krwi [12].

Mechanizm powstawania indukowanej przez VPA encefalopatii pozostaje wciąż niejasny. Dane z piśmiennictwa wskazują, że jest złożony, uwarunkowany wieloma czynnikami, zarówno endogennymi, jak i jatrogennymi, predysponującymi do jej pełnoobjawowego ujawnienia się. Pod uwagę bierze się wzajemne oddziaływanie VPA z enzymami wątrobowymi, bezpośrednie toksyczne działanie leku na receptory mózgowie, paradoksalny efekt epileptogenezy i ogólnoustrojowe interakcje metaboliczne [12]. Wydaje się, że osobami szczególnie narażonymi na możliwość ujawnienia się encefalopatii są te, z genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami enzymów wątrobowych, np. z niedoborem trans-karbamylazy ornitynowej [13], syntetazy I karbamylfosforanu [14] czy oksydazy cytochromu C [15]. Z tego punktu widzenia VE zaliczyć można byłoby do tak zwanych zespołów Reye'a-podobnych (ang. *Reye-like syndrom*) [16]. W wielu pracach omawiających zjawisko VE szczególne znaczenie przypisuje się zaburzaniu przez VPA cyklu mocznikowego, co przejawia się znacznym podwyższeniem stężenia amoniaku w surowicy krwi. Hiperamonemię uważa się za jeden z podstawowych czynników współodpowiedzialnych za objawy encefalopatii, głównie za obrzęk mózgu [11, 17, 18].

Wydaje się, że kolejnym czynnikiem predysponującym do ujawnienia się encefalopatii walproinianowej są ogólnoustrojowe zaburzenia metaboliczne, np. u chorych na cukrzycę [18] oraz jednoczesna terapia innymi lekami przeciwpadaczkowymi, szczególnie induktorami enzymów wątrobowych np. karbamazepiną, fenobarbitalem czy topiramatem. Opisywano również przypadki encefalopatii w przypadku jednoczesnego leczenia VPA i lekami psychotropowymi [20].

Przedstawiony powyżej problem VE stał się inspiracją do przeprowadzenia niniejszych badań. Piśmiennictwo dotyczące VE jest obszerne i dość wnikliwie analizuje kliniczny, farmakologiczny i biochemiczny aspekt encefalopatii. Badania neuropatologiczne, podobnie jak w przypadku innych leków przeciwpadaczkowych, są jednak wyjątkowo skąpe. Ze względu na fakt, iż VPA pozostaje jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwpadaczkowych na

świecie, stanowiących środek z wyboru w terapii wielu typów napadów i zespołów padaczkowych, a także z uwagi na coraz powszechniejsze jego zastosowanie w leczeniu innych schorzeń neurologicznych i psychiatrycznych, istotna wydaje się być ocena przewlekłego wpływu tego leku na obraz morfologiczny tkanki nerwowej.

CEL PRACY

Zasadniczym celem pracy była próba uzyskania odpowiedzi na pytanie: Czy długotrwałe stosowanie VPA wywołuje zmiany histopatologiczne w korze zakrętu hipokampa, a jeżeli tak, to jakiego typu i po jakim czasie ekspozycji na lek?

Odpowiedź powinna zainteresować nie tylko patomorfologa, ale również neurologa czy psychiatrę, stosujących VPA w codziennej praktyce. Trudność bezpośredniego odniesienia wyników badań u szczura do człowieka nie umniejsza faktu, iż pewne ogólne ustalenia są uniwersalne. Znany jest bowiem fakt, że zawsze od wysokości dawki i czasu stosowania leku zależy jego terapeutyczne lub toksyczne działanie.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 45 szczurach, samcach rasy Wistar, o wyjściowej masie ciała 160–180 g. Zwierzęta przebywały w standardowych warunkach hodowli, w pomieszczeniu dobrze oświetlonym, w temperaturze 18–20°C. Karmione były paszą granulowaną Murigran i pojone wodą *ad libitum*. Do eksperymentu użyto leku Vupral (Polfa Rzeszów), stanowiącego 20% roztwór soli sodowej kwasu walproinowego, rozpuszczonego w soli fizjologicznej. Substancję podawano zwierzętom sondą do żołądka codziennie, raz na dobę, przed karmieniem porannym. Dawka leku wynosiła 200 mg/kg m.c. Czas stosowania oraz wielkość dawki walproinianu sodu oparto na danych z piśmiennictwa [21, 22]. **Szczury grupy kontrolnej** otrzymywały sól fizjologiczną w takiej samej objętości jak VPA, również raz na dobę sondą do żołądka. Pozostały one w tych samych warunkach hodowlanych i na takiej samej diecie jak zwierzęta doświadczalne.

Ocena wyników niniejszego eksperymentu wydaje się być o tyle istotna, że zastosowany model doświadczalny w istocie jest porównywalny z modelem VE u człowieka, bowiem stężenia VPA w surowicy krwi badanych zwierząt, oznaczone metodą chromatografii gazowej, odpowiadały zakresowi stężeń terapeutycznych u pacjentów z padaczką i wahały się od 60 do 135 µg/ml. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku ds. badań na zwierzętach.

Dla potrzeb eksperymentu szczury podzielono na dwie grupy:

- **Grupa I** – kontrolna (n = 15) – zwierzęta otrzymujące przez cały czas trwania doświadczenia sól fizjologiczną. Wiekami odpowiadały szczurom w niższych grupach doświadczalnych.
- **Grupa II** (n = 30) – zwierzęta, które otrzymywały walproinian sodu. W tej grupie wyodrębniono pięć podgrup, po 6 zwierząt każda:

- » II A – szczury uśmiercane po 1 miesiącu stosowania VPA.
- » II B – szczury uśmiercane po 3 miesiącach stosowania VPA.
- » II C – szczury uśmiercane po 6 miesiącach stosowania VPA.
- » II D – szczury uśmiercane po 9 miesiącach stosowania VPA.
- » II E – szczury uśmiercane po 12 miesiącach stosowania VPA

Szczury grupy II uśmiercano po 24 godzinach od podania ostatniej dawki VPA.

Badania histologiczne

Do badań histologicznych przeznaczono po 6 szczurów z każdej podgrupy doświadczalnej (II A–E). Równocześnie uśmiercano po 3 odpowiadające wiekiem zwierzęta grupy kontrolnej.

W określonych powyżej przedziałach czasowych szczury usypiano dootrzewnowym podaniem Nembutalu w dawce 25 mg/kg m.c. Po otwarciu klatki piersiowej wykonywano przeżyciową perfuzję zubożonym 10% roztworem formaliny w soli fizjologicznej pod ciśnieniem 80–100 mmHg (około 200 ml płynu perfuzyjnego na zwierzę). Następnie wyjmowano mózgowia z jamy czaszki i dotrwalało przez 24 godziny w płynie perfuzyjnym, po czym krojono w płaszczyźnie czołowej na płyty grubości 2 mm. Potem w sposób rutynowy przeprowadzano je do parafiny. Do badań mikroskopowych wybierano skrawki zawierające formację hipokampalną. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz fioletem krezylu.

WYNIKI

Obraz histologiczny kory hipokampa szczurów grupy kontrolnej nie różnił się zasadniczo od opisywanego w dostępnych opracowaniach na ten temat. Można było wyróżnić w niej cztery obszary, określane w piśmiennictwie jako pola lub sektory CA1–CA4, różniące się od siebie grubością oraz ilością i wielkością występujących w nich komórek nerwowych. Ciała komórek nerwowych były okrągłe, rzadziej owalne, niekiedy z widocznymi miejscami odejścia wypustek protoplazmatycznych. W cytoplazmie komórek nerwowych widoczne były dość równomiernie rozproszone ziarnistości Nissla (tigroid). Perykariony zawierały duże, jasne, pęcherzykowate, centralnie położone jądro komórkowe, na terenie którego widoczna była niewielka ilość chromatyny oraz barwiące się metachromatycznie jąderko (ryc. 1).

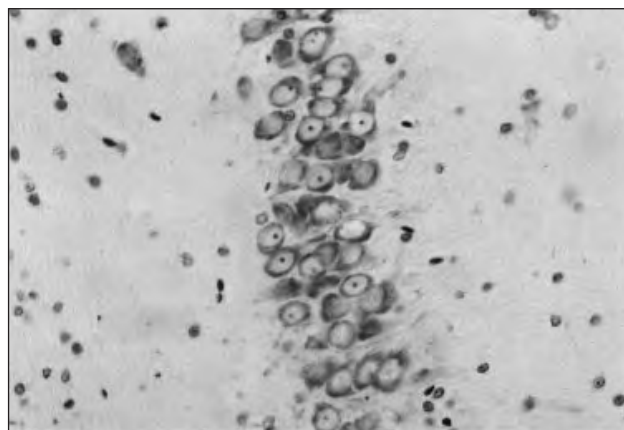
Przewlekłe stosowanie VPA (Grupa II)

Po 1 i 3 miesiącach podawania VPA (podgrupa IIA i IIB)

W porównaniu z odpowiadającymi wiekowo podgrupami kontrolnymi nie stwierdzono różnic w obrazie histologicznym i ultrastrukturalnym kory zakrętu hipokampa.

Po 6 miesiącach podawania VPA (podgrupa II C)

Na tym etapie doświadczenia uwidoczniło się po raz pierwszy w mikroskopie świetlnym zmiany patologiczne tkanki nerwowej kory zakrętu hipokampa. Obok neuronów o prawidłowo zachowanej budowie histologicznej spotykano

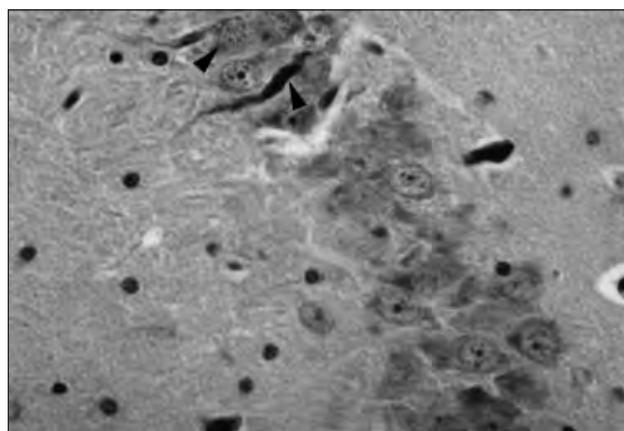


Ryc. 1. Sektor CA3. Komórki nerwowe warstwy piramidowej o prawidłowej budowie histologicznej. Grupa kontrolna (po 9 miesiącach obserwacji). Fiolet krezylu x 400. *Fig. 1. Normal pyramidal neurons of CA3 sector. Control group (after 9 months observation). Cresyl violet x 400.*

komórki nerwowe wykazujące cechy schorzenia homogenizacyjnego o nieznacznym lub średnim nasileniu. Neurony te były nieco powiększone, ich ciała komórkowe zaokrąglone. W obrębie cytoplazmy stwierdzano ogniskowy rozpad tigroidu (ogniskową tigrolizę). Jądra komórkowe z dobrze widocznym, centralnie położonym jąderkiem wydawały się być niezmiennymi. Neurony takie spotykano przede wszystkim w okolicy wnętrza hipokampa.

Po 9 miesiącach podawania VPA (podgrupa II D)

Po 9 miesiącach doświadczenia w mikroskopie świetlnym obserwowano zmiany neuronalne kory amonalnej charakterystyczne dla schorzenia przewlekłego Nissla. Przejawiały się one obkurczeniem komórek nerwowych i zaostrzeniem ich zarysów, niekiedy obecnością dendrytów o falistym, korkociągowatym przebiegu (ryc. 2). Ziarnistości Nissla znacznie zagęszczały się, przesłaniając jądro komórkowe; zarysy perykarionów i jądra ulegały obkurczeniu. Jądra



Ryc. 2. Sektor CA3. Widoczne neurony o cechach schorzenia przewlekłego (►) z charakterystycznymi dendrytami o falistym przebiegu. Po 9 miesiącach stosowania VPA. Fiolet krezylu x 630. *Fig. 2. Sector CA 3. Neurons with features of chronic disease (►) are visible. After 9 months of VPA administration. Cresyl violet x 630.*

komórkowe niejednokrotnie wykazywały wyraźną hiperchromazję. Powyższe nieprawidłowości zlokalizowane były w trzech obszarach kory amonalnej: polach CA3 i CA1 warstwy piramidowej oraz we wnętrzu. Warto wspomnieć, że u części zwierząt sektor CA3 widoczny był w mikroskopie świetlnym w postaci pasma ciemnych, obkurczonych neuronów, wyraźnie odgraniczonych od prawidłowo zachowanych sektorów CA2 i CA4. W polu CA1 najrzadziej spotykano komórki nerwowe o histologicznych cechach schorzenia przewlekłego. Często na terenie wyżej wymienionych obszarów kory amonalnej, przy czym głównie w obrębie wnętrza hipokampa, spotykano również komórki nerwowe o cechach stwardnienia. Neurony te były bardziej obkurczone niż w schorzeniu przewlekłym, wyglądem przypominały ciemne, różnokształtne bryłki, z niewidocznymi strukturami śródkomórkowymi (ryc. 3).

W porównaniu z grupą kontrolną znamienne były opustoszenia komórek nerwowych warstwy piramidowej kory amonalnej. Największe ubytki neuronów spotykano we wnętrzu hipokampa. W najbliższym sąsiedztwie ubytków znajdowano również rozpadające się komórki nerwowe. Niekiedy widoczne były tylko „cienie” po rozpadłych neuronach. Wyraźne opustoszenia neuronalne wykrywano również w sektorze CA3, rzadziej w sektorze CA1 warstwy piramidowej kory zakrętu hipokampa.

Po 12 miesiącach stosowania VPA (podgrupa II E)

W obrazie histologicznym elementów parenchymalnych kory hipokampa szczurów otrzymujących VPA przez okres 12 miesięcy nie wykazano istotnych różnic w sensie ilościowym i umiejscowienia zmian patologicznych w porównaniu z grupą poprzednią (II D). Stwierdzono natomiast nieznacznie większą intensywność i rozległość obserwowanych nieprawidłowości. Manifestowało się to głównie większą rozległością ubytków neuronów warstwy piramidowej, a także wzrostem liczby komórek nerwowych z cechami sklerotyzacji.

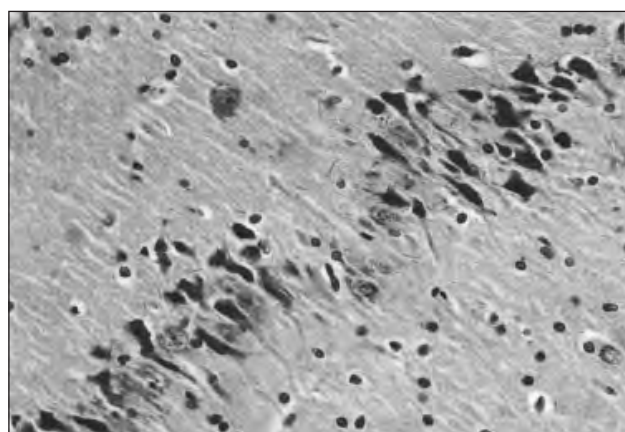
Podobnie jak w grupie poprzedniej, indukowana walproinianem patologia tkanki nerwowej najbardziej zaznaczona była we wnętrzu oraz, w nieco mniejszym stopniu, w polach CA3 i CA1 hipokampa. W tych obszarach widoczne były opustoszenia komórek nerwowych, czasem dość rozległe (ryc. 4). Na tym etapie doświadczenia w obrazie histologicznym spotykano znacznie częściej komórki nerwowe o cechach stwardnienia. Neurony te miały postać ciemno barwiących się, wielokątnych bryłek o całkowicie zatartej strukturze wewnętrznej, z niewidocznymi ziarnistościami Nissla i jądrem. Sąsiadowały one często z komórkami o budowie prawidłowej i neuronami charakterystycznymi dla schorzenia przewlekłego, o obkurczonych i zaostzonych ciałach komórkowych, z dającymi się prześledzić elementami wewnątrzkomórkowymi.

DYSKUSJA

Wyniki badań doświadczalnych oraz wieloletnie obserwacje kliniczne wskazują, że stosowane zazwyczaj przewlekle leki z grupy *antiepileptica* mogą wywoływać szereg, niekiedy bardzo poważnych, działań ubocznych. O ile problem ten jest powszechnie znany ze strony klinicznej,



Ryc. 3. Stwardniałe neurony piramidowe sektora CA3. Komórki nerwowe obszaru CA2 prawidłowo zachowane. Po 9 miesiącach stosowania VPA. Fiolet krezyłu x 200. *Fig. 3. Sclerotic pyramidal neurons in hippocampal CA 3 sector. After 9 months of VPA administration. Cresyl violet x 200.*



Ryc. 4. Sektor CA1. Neurony piramidowe o cechach sklerotyzacji; wyraźny odcinek kory hipokampa pozbawiony komórek nerwowych; widoczne dość liczne jądra komórek glejowych. Po 12 miesiącach stosowania VPA. H, E x 400. *Fig. 4. Sector CA1. Sclerotic pyramidal neurons; extensive loss of nerve cells and numerous glial cell nucleus are visible. After 12 months of VPA administration. H, E x 400.*

szczególnie wśród neurologów i epileptologów, to dane na temat wpływu leków przeciwpadaczkowych na obraz morfologiczny mózgu są niezwykle skąpe. Należy natomiast przypuszczać, że podłożem takich stanów jak encefalopatie polekowe, a wśród nich analizowana obecnie VE, mogą być nie tylko zaburzenia czynnościowe, ale również strukturalne tkanki nerwowej mózgu. Dlatego też celem niniejszej pracy była ocena morfologiczna kory zakrętu hipokampa w doświadczalnym modelu VE. Nieprzypadkowo do badań wybrano właśnie korę amonalną. Z piśmiennictwa wiadomo bowiem, iż hipokamp charakteryzuje się szczególną wrażliwością zarówno na endo-, jak i egzogenne czynniki uszkodzające. Ponadto w tej strukturze *archeocortex*, w porównaniu z innymi obszarami mózgowia, obserwuje się najwyższe stężenia badanego leku – walproinianu sodu i jego metabolitów [23]. Należało więc przypuszczać, że

ewentualne zmiany neuropatologiczne pojawiają się właśnie w korze amonalnej i będą w niej najsilniej wyrażone.

Uzyskane wyniki badań morfologicznych kory zakrętu hipokampa wykazały, że podstawowy lek przeciwpadaczkowy – VPA, stosowany dożołądkowo w przewlekłym modelu doświadczalnym u szczurów przez 1, 3, 6, 9 i 12 miesięcy w dawce 200 mg/kg m.c./dobę powodował dopiero w późniejszych fazach doświadczenia, to jest po 9 i 12 miesiącach, istotne zmiany neuropatologiczne w korze zakrętu hipokampa. Nasilały się one wraz z wydłużaniem okresu ekspozycji na lek.

W ocenie histologicznej w grupie zwierząt poddanych 6-miesięcznej ekspozycji na VPA dominującymi nieprawidłowościami były zmiany o typie homogenizacji komórek warstwy piramidowej, wyrażające się uszkodzeniem ich tigroidu. Natomiast u szczurów otrzymujących VPA przez okres 9 i 12 miesięcy na plan pierwszy wysuwały się zmiany o charakterze schorzenia przewlekłego i sklerotyzacji oraz ubytki komórek piramidowych. Największe nieprawidłowości obserwowano we wnętrzu hipokampa, nieco mniej wyrażone – w polu CA3. Stosunkowo najmniejsze zmiany dotyczyły pola CA1. Obszary CA2 i CA4 wydawały się być niepodatne na toksyczne działanie VPA. Ich obraz histologiczny był porównywalny z obserwowanym u szczurów nieotrzymujących VPA.

Wyniki oceny histologicznej uzyskane w doświadczeniu nie wykazywały cech swoistości dla VPA. Zbliżone pod względem jakościowym, lecz o zróżnicowanym nasileniu i rozległości zmiany histologiczne kory hipokampa wywoływano bowiem, stosując inne czynniki uszkadzające ośrodkowy układ nerwowy, a w szczególności alkohol. Lukoyanov i wsp. [24] stwierdzili u szczurów poddanych 13-miesięcznej intoksykacji etanolem ubytki neuronów warstwy piramidowej hipokampa w sektorach CA3 i CA1 odpowiednio o 19% i 18%. Podobne wyniki, po różnie długich okresach ekspozycji na etanol, uzyskali inni autorzy [25, 26].

Na szczególną wrażliwość sektorów CA3 i CA1 kory hipokampa na inne czynniki toksyczne wskazują również inne doniesienia. I tak np. w obszernej pracy Jiang i wsp. przeanalizowali obraz morfologiczny kory amonalnej szczurów w modelu doświadczalnym drgawek gorączkowych [27]. Opisywali liczne zmiany neurodegeneracyjne o charakterze „ciemnych”, uszkodzonych ciał komórkowych i wypustek dendrytycznych neuronów warstwy piramidowej oraz ubytki komórek nerwowych w obrębie tej warstwy. Powyższe nieprawidłowości najbardziej nasilone były w okolicy wnętrza hipokampa, w dalszej kolejności dotyczyły części dystalnej sektora CA3 i proksymalnego odcinka obszaru CA1. Sektory CA2 i CA4 wydawały się być niewrażliwe na działający patogen. Podobne wyniki w modelu drgawek hipertermicznych uzyskaliśmy w naszym ośrodku [28].

Należy podkreślić, iż szczególną podatność pól CA1, CA3 i wnętrza na wpływ czynników uszkadzających tłumaczy się nieco odmiennym składem podjednostek receptora GABA-A w tych obszarach kory starej w porównaniu do pozostałych sektorów hipokampa. Receptory takie miałyby cechować się słabszymi właściwościami cytoprotekcyjnymi [29]. Nie bez znaczenia wydaje się być również fakt, iż sektor CA3 zawiera największą ilość receptorów dla kwasu kainowego, a więc jest wysoce podatny na procesy ekscytotoksyczności. Zmiany, głównie o typie ogniskowych ubytków komórek nerwowych warstwy piramidowej kory hipokampa z towarzyszącymi „ciemnymi” neuronami, spotykano również w innych, niż wyżej wymienione, modelach doświadczalnego uszkodzenia OUN. Obserwowane były głównie w następstwie: ostrych stanów niedotlenieniowo-niedokrwienych [30–32], intoksykacji chlorkiem manganu [33], podawaniem fenobarbitalu [34], doświadczalnych drgawek padaczkowych, zwłaszcza napadów gromadnych i stanów padaczkowych [35–37], modelu kindlingu elektrycznego [38], a także u pacjentów z padaczką [39, 40].

Patomechanizm powstawania stwierdzanych w niniejszym doświadczeniu zmian morfologicznych tkanki nerwowej i złącza naczyniowo-tkankowego wydaje się być niezwykle złożony, podobnie jak sam mechanizm działania VPA. Pod uwagę należy brać bezpośrednie oddziaływanie leku i/lub jego metabolitów na ośrodkowe systemy neuroprzebieżności, równowagi jonowej i metabolizmu energetycznego komórki, manifestujące się m.in. indukcją zjawiska aponekrozy neuronalnej, co potwierdziliśmy w badaniach ultrastrukturalnych neuronów hipokampa w tym samym modelu doświadczalnym [41]. Nie bez znaczenia patofizjologicznego dla VE wydają się być również ogólnoustrojowe zaburzenia metaboliczne, związane przede wszystkim z działaniem hepatotoksycznym walproinianu.

WNIOSKI

1. W początkowym 6-miesięcznym okresie przewlekłego podawania walproinianu sodu (VPA) u szczura obserwowano jedynie dyskretne nieprawidłowości strukturalne kory zakrętu hipokampa, co mogłoby wskazywać, że stosowanie leku w tym czasie jest bezpieczne. Półroczny okres podawania VPA szczurom odpowiada okresowi 2–4-letniej terapii przeciwpadaczkowej u ludzi, a więc klasycznemu okresowi leczenia, który jest potrzebny do opanowania napadów u większości pacjentów z padaczką.
2. W dalszych fazach doświadczenia, tj. po 9 i 12 miesiącach podawania VPA, lek uszkadzał korę amonalną, głównie neurony wnętrza i neurony sektorów CA3 i CA1 hipokampa. Uszkodzone komórki nerwowe wykazywały histologiczne cechy schorzenia przewlekłego i sklerotyzacji.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Davis R., Peters D.H., McTavish D.: Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 1994; 47: 332–372.
- [2] Józwiak S., Kotulska K.: Aktualne rekomendacje w leczeniu padaczki i zespołów padaczkowych u dzieci i młodzieży. *Neurol Dziec* 2010; 38: 11–18.
- [3] Haddad P.M., Das A., Ashfaq M., et al.: A review of valproate in psychiatric practice. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5: 539–551.
- [4] Vikelis M., Rapoport A.M.: Role of antiepileptic drugs as preventive agents for migraine. *CNS Drugs* 2010; 24: 21–33.
- [5] Lux A.L.: Treatment of febrile seizures: historical perspective, current opinions, and potential future directions. *Brain Dev* 2010; 32: 42–50.
- [6] Gill D., Derry S., Wiffen P.J., et al.: Valproic acid and sodium valproate for neuropathic pain and fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 10: CD009183.
- [7] Witt D., Burfeind P., von Hardenberg S., et al.: Valproic acid inhibits the proliferation of cancer cells by re-expressing cyclin D2. *Carcinogenesis* 2013; 34: 1115–1124.
- [8] Jones G.L., Matsuo F., Baringer J.R., et al.: Valproic acid-associated encephalopathy. *West J Med* 1990; 153: 199–202.
- [9] Visticot F., Montreuil G.: Stupor encephalopathy caused by sodium valproate. *Rev Med Interne* 1994; 15: 365–366.
- [10] Kifune A., Kubota F., Shibata N., et al.: Valproic acid – induced hyperammonemic encephalopathy with triphasic waves. *Epilepsia* 2000; 41: 909–912.
- [11] Chopra A., Kolla B.P., Mansukhani M.P., et al.: Valproate-induced hyperammonemic encephalopathy: an update on risk factors, clinical correlates and management. *Gen Hosp Psychiatry* 2012; 34: 290–298.
- [12] Gobel R., Gortzen A., Braunig P.: Encephalopathies caused by valproate. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1999; 67: 7–11.
- [13] Oechsner M., Steen C., Stürenburg H.J., et al.: Hyperammonemic encephalopathy after initiation of valproate therapy in unrecognised ornithine transcarbamylase deficiency. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 680–682.
- [14] Bourrier P., Varache N., Alquier P., et al.: Cerebral edema with hyperammonemia in valpromide poisoning. Manifestation in an adult, of a partial deficit in type I carbamylphosphate synthetase. *Presse Med* 1988; 17: 2063–2066.
- [15] Chabrol B., Mancini J., Chretien D., et al.: Valproate-induced hepatic failure in a case of cytochrome c oxidase deficiency. *Eur J Pediatr* 1994; 153: 133–135.
- [16] Hou J.W., Chou S.P., Wang T.R.: Metabolic function and liver histopathology in Reye-like illnesses. *Acta Paediatr* 1996; 85: 1053–1057.
- [17] Triggs W.J., Gilmore R.L., Millington D.S., et al.: Valproate-associated carnitine deficiency and malignant cerebral edema in the absence of hepatic failure. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1997; 35: 353–356.
- [18] Verrotti A., Greco R., Morgese G., et al.: Carnitine deficiency and hyperammonemia in children receiving valproic acid with and without other anticonvulsant drugs. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29: 36–40.
- [19] Averbuch-Heller L., Ben-Hur T., Reches A.: Valproate encephalopathy and hypocarnitinaemia in diabetic patients. *J Neurol* 1994; 241: 567–569.
- [20] Rottach K.G., Weiss-Brummer J., Wieland U., et al.: Valproic acid in prophylaxis of bipolar disorder. A case of valproate-induced encephalopathy. *Nervenarzt* 2000; 71: 401–403.
- [21] Sobaniec W., Jankowicz E., Sobaniec-Łotowska M.: The effect of valproic acid on the morphology of the rat cerebellum and brain stem. *Neuropat Pol* 1989; 27: 137–150.
- [22] Löscher W.: Valproinsäure. *Pharmakodynamische Wirkungen und biochemische Wirkungsmechanismen.* [w:] Krämer G., Laub M. [red.]: Valproinsäure. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-NY 1992.
- [23] Adkison K.D., Ojemann G.A., Rapport R.L., et al.: Distribution of unsaturated metabolites of valproate in human and rat brain – pharmacologic relevance? *Epilepsia* 1995; 36: 772–782.
- [24] Lukoyanov N.V., Madeira M.D., Paula-Barbosa M.M.: Behavioral and neuroanatomical consequences of chronic ethanol intake and withdrawal. *Physiol Behav* 1999; 66: 337–346.
- [25] Lundqvist C., Alling C., Knoth R., et al.: Intermittent ethanol exposure of adult rats: hippocampal cell loss after one month of treatment. *Alcohol Alcohol* 1995; 30: 737–748.
- [26] Franke H., Kittner H., Berger P., et al.: The reaction of astrocytes and neurons in the hippocampus of adult rats during chronic ethanol treatment and correlations to behavioral impairments. *Alcohol* 1997; 14: 445–454.
- [27] Jiang W., Duong T.M., de Lanerolle N.C.: The neuropathology of hyperthermic seizures in the rat. *Epilepsia* 1999; 40: 5–19.
- [28] Sendrowski K., Sobaniec W., Sobaniec-Łotowska M.E., et al.: Topiramate as a neuroprotectant in the experimental model of febrile seizures. *Adv Med Sci.* 2007; 52 (Suppl 1): 161–165.
- [29] Fritschy J.M., Kiener T., Bouillere V., et al.: GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* 1999; 34: 435–445.
- [30] Desphande J., Bergstedt K., Linden T., et al.: Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp Brain Res* 1992; 88: 91–105.
- [31] Fukuda T., Wang H., Nakanishi H., et al.: Novel non-apoptotic morphological changes in neurons of the mouse hippocampus following transient hypoxic-ischemia. *Neurosci Res* 1999; 33: 49–55.
- [32] Barenberg P., Strahlendorf H., Strahlendorf J.: Hypoxia induces an excitotoxic – type of dark cell degeneration in cerebellar Purkinje neurons. *Neurosci Res* 2001; 40: 245–254.
- [33] Bikashvili T.Z., Shukakidze A.A., Kiknadze G.I.: Changes in the rat cerebral cortex ultrastructure following peroral administration of manganese chloride. *Morfologija* 2000; 118: 14–18.
- [34] Bergman A., Feigenbaum J.J., Yanai J.: Neuronal losses in mice following both prenatal and neonatal exposure to phenobarbital. *Acta Anat (Basel)* 1982; 114: 185–192.
- [35] Liu Z., Nagao T., Desjardins G.C., et al.: Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. *Epilepsy Res* 1994; 17: 237–247.
- [36] Miettinen R., Kotti T., Tuunanen J., et al.: Hippocampal damage after injection of kainic acid into the rat entorhinal cortex. *Brain Res* 1998; 813: 9–17.
- [37] Fujikawa D.G., Shinmei S.S., Cai B.: Seizure – induced neuronal necrosis: implications for programmed cell death mechanisms. *Epilepsia* 2000; 41: 9–13.
- [38] Cavazos J.E., Das I., Sutula T.P.: Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizures. *J Neurosci* 1994; 14: 3106–3121.
- [39] Sagar H.J., Oxbury J.M.: Hippocampal neuronal loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. *Ann Neurol* 1987; 22: 334–340.
- [40] Kim J.H., Guimaraes P.O., Shen M-Y., et al.: Hippocampal neuronal density in temporal lobe epilepsy with and without gliomas. *Acta Neuropathol* 1990; 80: 41–45.
- [41] Sendrowski K., Sobaniec W., Sobaniec P., et al.: Ultrastructural study of hippocampal cortex neurons in an experimental model of valproate encephalopathy. *Folia Histochem Cytobiol* 2013; 51: 31–37.

Adres do korespondencji:

Krzysztof Sendrowski, Klinika Neurologii i Rehabilitacji Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, ul. J. Waszyngtona 17, 15-274 Białystok, e-mail: krsen@mp.pl