ФАРМАЦИЯ
PHARMACIA

Том/Volume LVII **2010** **Книжка/Number 1-4**

СПИСАНИЕ НА БЪЛГАРСКОТО НАУЧНО ДРУЖЕСТВО ПО ФАРМАЦИЯ

JOURNAL OF THE BULGARIAN PHARMACEUTICAL SCIENTIFIC SOCIETY

Адрес на редакицията
Фармацевтичен факултет
ул.. "Дунав" 2, София 1000
Факс (02) 987 987 4
Гл. редактор: ✆ (02) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

Address of Editorial Board
Faculty of Pharmacy
2, Dunav str., Sofia 1000
Fax (02) 987 987 4
Editor in Chief: ✆(+359 2) 987 987 4
E-mail:snikolov@mbox.pharmfac.acad.bg

С Ъ Д Ъ Р Ж А Н И Е

Оригинални статии

М. Георгиева, А. Бижев и П. Проданова. Синтез на пирол-съдържащи хидразони и сравнителен анализ на зависимостта на туберкулостатичната им активност от структурни промени ... 3
А. Тачев, С. Узунова и Н. Василева. Валидиране на спектрофотометричен метод за определяне на Octyl salicylate в слънцезащитни козметични продукти при самостоятелно и при съвместно присъствие с физични ултравиолетови филтри Zinc oxide и Titanium dioxide ... 15
В. Михайлова, Л. Иванов, С. Драев и Ст. Титева. Технологични подходи за създаване на хидрогелни матрични таблетки с много разтворимото лекарствено вещество триметазидин хидрохлорид ... 21
Ц. Маркова, Й. Арагане, М. Табучи, Б. Алексиева, Е. Николова и Х. Хигашино. Ефект на фосфодиестеразните инхибитори върху ERK1/2 map-киназния сигнален път ... 30
В. Цанкова и С. Митушева. Оценка на невроналното тъканно увреждане в модел на мозъчна исхемия на плъх *in vitro* ... 35
В. Вичева, Р. Симеонова и М. Мичева. Поведенчески и биохимични промени след многократно прилагане на етанол, самостоятелно и в комбинация с нифедипин ... 41
Р. Симеонова, В. Вичева и М. Мичева. Хормонално обусловени различия в лекарствения метаболизъм ... 45
М. Кондева-Бурдина, А. Аструг, Е. Бехар, В. Вичева, И. Вълкова и М. Мичева. Сравнителни проучвания на две нови производни на валпроената киселина върху хепатоцити на плъхове ... 51
Г. Драганов, А. Стоименова, М. Манова, П. Пейков и Г. Петрова. Synephrine и *C. aurantium* екстракт в хранителни добавки – оценка на твърденията за ефект и безопасност ... 56

Обзори

Е. Игов и И. Манолов. Природни и синтетични триптаминови производни с физиологична активност ... 63
А. Костовски и М. Караиванова. Bendamustine, алкилиращи цитостатици и молекулни мишени ... 76
In memoriam ... 85
Информационен отдел ... 88

C O N T E N T S

Original articles

M. Georgieva, A. Bijev and P. Prodanova. Synthesis and comparative study of tuberculostatic activity of pyrrole-based hydrazones related to structural variations ... 3
A. Tachev, S. Uzunova and N. Vassileva. Validation of a spectrophotometric method to determine the content of octyl salicylate in sunscreen cosmetic products singularly and in combination with physical ultraviolet filters of zinc oxide and titanium dioxide ... 15
V. Michailova, L. Ivanov, S. Draev and St. Titeva.. Technological studies on hydrogel matrix tablets with the highly soluble drug trimetazidine hydrochloride ... 21
Tz. Markova, Y. Aragane, M. Tabuchi, B. Alexieva, E. Nikolova and H. Higashino. Effect of phosphodiesterase inhibitors on ERK1/2 map kinase signaling pathway ... 30
V. Tzankova and S. Mitusheva. Assessment of neuronal tissue damage in rat brain ischemia *in vitro* ... 35
V. Vitcheva, R. Simeonova and M. Mitcheva. Behavioral and biochemical changes after multiple administration of ethanol alone and in combination with nifedipine ... 41
R. Simeonova, V. Vitcheva and M. Mitcheva. Hormone-dependent differences in drug metabolism ... 45
M. Kondeva-Burdina, H. Astroug, E. Bechar, V. Vitcheva, I. Valkova and M. mitcheva. Comparative studies of two new valproic acid derivatives on rat hepatocytes ... 51
G. Draganov, A. Stoimenova, M. Manova, P. Peikov and G. Petrova. Synephrine and *C. aurantium* extract in food supplements: analysis of safety and health claims ... 56

Reviews

E. *Igov and I. Manolov*. Natural and synthetic tryptamine derivatives with physiological activity ... 63
A. Kostovski and M. Karaivanova. Bendamustine, alkylating antineoplastic drugs and molecular targets ... 76
In memoriam ... 85
Informasion section ... 90

ФАРМАЦИЯ 1-4/2010
ISSN 0428-0296 УДК 615

Организационен секретар *Св. Цветанова*
Стилова редакция *Св. Цветанова и д-р Б. Станчева (на англ. ез.)*
Корекция *Св. Цветанова*
Терминологичен и семантичен контрол *д-р Б. Станчева*
Форматиране *О. Маркова*

Подписана за печат на 11.02.2011 г.
Печатни коли 11.5, формат 60 x 90/8

Централна медицинска библиотека
1431 София, ул. „Св. Г. Софийски" № 1, тел. 952-16-45, Fax: 851 82 65
e-mail: svetlamu@mail.bg

ОЦЕНКА НА НЕВРОНАЛНОТО ТЪКАННО УВРЕЖДАНЕ В МОДЕЛ НА МОЗЪЧНА ИСХЕМИЯ НА ПЛЪХ *IN VITRO*

В. Цанкова и С. Митушева

Катедра "Фармакология, фармакотерапия и токсикология", Фармацевтичен факултет, Медицински университет – София

Резюме. Цел на настоящата работа е да се проследи и оцени времезависимото невронално увреждане в *in vitro* модел на мозъчна исхемия при плъх в условията на кислородно-глюкозен глад. Мозъчните срезове от плъх са поставени в условия на кислородно-глюкозен глад за различен период: 5, 15, 30 и 60 min, последван от период на реоксигенация за 90 min. Тъканното увреждане е оценено чрез определяне на освобождаването на глутамат и лактат дехидрогеназа (LDH) в среда от изкуствена цереброспинална течност (aCSF). Определяна бе и задръжката на вода от мозъчната тъкан в края на експеримента. Кислородно-глюкозният глад предизвика време-зависимо нарастване на глутамат и освобождаване на LDH, както и увеличаване на едема. Най-високи нива на глутамат и LDH са наблюдавани след 30 min период на кислородно-глюкозен глад (съответно 107% и 340% спрямо контролите). Това повишение бе съпътствано от значителна задръжка на вода (142% спрямо контролите). В заключение, периодът на кислородно-глюкозен глад от 30 min, следван от 90 min реперфузия, предизвика най-значимо повишение в стойностите на изследваните показатели за невронално увреждане и съответно е най-подходящ при този *in vitro* модел на мозъчна исхемия при плъх.

Ключови думи: лактат дехидрогеназа, исхемия, мозък, плъх

ASSESSMENT OF NEURONAL TISSUE DAMAGE IN RAT BRAIN ISCHEMIA *IN VITRO*

V. Tzankova and S. Mitusheva

Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Sofia

Summary. The aim of present investigation was to assess the time-dependent effects of oxygen-glucose deprivation on neuronal damage in an *in vitro* model of brain ischemia. Rat cortical brain slices were prepared and subjected to 5, 15, 30 and 60 min oxygen-glucose deprivation, followed by 90 min reperfusion. Tissue damage was assessed by measuring the release of glutamate and lactate dehydrogenase into bathing artificial cerebrospinal fluid (aCSF) during reperfusion and determining tissue water gain (edema). The oxygen-glucose deprivation caused time-dependent increase in glutamate and LDH release, as well as in tissue water gain. The highest glutamate and LDH release were observed at 30 min oxygen-glucose deprivation (107% and 340% vs. controls, respectively). This increase was accompanied by a huge edema (142% vs. controls). In conclusion, the effect of 30 min oxygen-glucose deprivation followed by 90 min reperfusion caused a more pronounced neuronal injury in an *in vitro* model of brain ischemia.

Key words: lactate dehydrogenase, ischemia, brain, rat

Въведение

Исхемичното мозъчно увреждане е следствие от комплекс от патологични събития, включващи невротоксичност, възпаление и програмирана клетъчна смърт [4, 11]. Изследванията върху потенциална невротоксичност и невропротекция зависят в голяма степен от наличието на подходящи експериментални модели на исхемия.

In vitro моделите на церебрална исхемия в условия на кислородно-глюкозен глад представляват подходящ експериментален модел за проучване на исхемия/реперфузионно предизвикано увреждане на мозъка и за оценка на невропротективните ефекти на много лекарства [2, 12]. *In vitro* моделите имат някои предимства в сравнение с *in vivo* моделите, защото дават възможност за проучване на механизмите на хипоксично невронално увреждане при контролирани експериментални условия. Те имат важното предимство, че предоставят сравнима информация за

потенциала, ефикасността, селективността на лекарствата, без да се повлияват от различните физиологични променливи, като церебрална циркулация, седация на животното и/или хипотермията, които се вземат под внимание при *in vivo* моделите. *In vitro* моделите позволяват оценка на клетъчното увреждане чрез определяне на много параметри по време на хипоксичния шок, напр. екстра- или интрацелуларни електрофизиологични измервания могат да бъдат извършвани по време на и веднага след хипоксичната експозиция. Оценката на лекарственото действие при експериментални животни *in vivo* е затруднено от комплекс от фармакокинетични и фармакодинамични особености на изследваното съединение, път на въвеждане, пенетрация през кръвно-мозъчната бариера, дифузия през тъканите, пермеабилитет на прицелната клетъчна мембрана. За разлика от това *in vitro* моделите позволяват достъп на веществата директно до екстраневроналното пространство, изчисляването на ефективните концентрации и директна оценка на ефектите. *In vitro* моделите позволяват провеждането на скринингови програми за оценка на невропротективни ефекти [7, 10, 17].

Цел на настоящата работа е да се оценят някои параметри на тъканно увреждане в in vitro модел на мозъчна исхемия при плъх в условията на кислородно-глюкозен глад. Тъканното увреждане в различни времеви интервали е оценено чрез определяне на освобождаването на глутамат (GLU) и лактат дехидрогеназа (LDH) в среда на изкуствена цереброспинална течност (aCSF) и чрез определяне на задръжката на вода от мозъчните срезове след периода на реперфузия.

Материал и методи

Експериментални животни и приготвяне на срезове от мозък на плъх

Експериментите са проведени в съответствие с изискванията на националното и европейското законодателство и съответните наредби и ръководства за работа с лабораторни животни (86/609/EEC; National Research Council. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996).

Използвани са мъжки плъхове от линията "Sprague-Dawley" с тегло 350-400 g (Charles River, Italy). Животните са отглеждани при стандартни условия с достъп до храна и вода *ad libitum*. След изолиране мозъкът се поставя в студен разтвор на aCSF (състав в mM: 120 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 $MgCl_2$, 1.0 NaH_2PO_4, 1.5 $CaCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 11 glucose, наситен с карбоген 95% O_2 – 5% CO_2, pH на разтвора 7.4, осмолалитет 285-290 mOsmol). След дисекция от кортекса се получават срезове с размери 400 μm посредством Manual Chopper Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA. След това срезовете се поставят в среда от оксигениран разтвор aCSF, в който са прибавени аскорбинова киселина 400 μM, и се темперират за 1 h при стайна температура с цел максимално възстановяване от травматичния стрес при подготовката [3].

Модел на експериментална исхемия in vitro

Етапите на *in vitro* предизвиканата мозъчна исхемия в условията на кислородно-глюкозен глад са представени на фиг. 1. Накратко, мозъчните срезове (≈ 4-5, общо тегло 33.6 ± 2.6 mg, n = 10) се поставят в покрити инкубационни петрита, съдържащи 2 ml aCSF под непрекъснато обгазяване с карбоген (95% O_2/5% CO_2), и се инкубират при 37°C за период от 30 min. Следва периодът на кислородно-глюкозен глад, който се провежда чрез инкубиране на срезовете за 30 min в разтвор на aCSF, в който glucose е заместена с еквимоларна захароза, а обгазяването с карбоген е заместено с 95% N_2/5% CO_2. След този етап на кислородно-глюкозен глад исхемичният разтвор е заменен с пресен, оксигениран aCSF (карбоген) за следващ период от 90 min (реперфузия, реоксигенация).

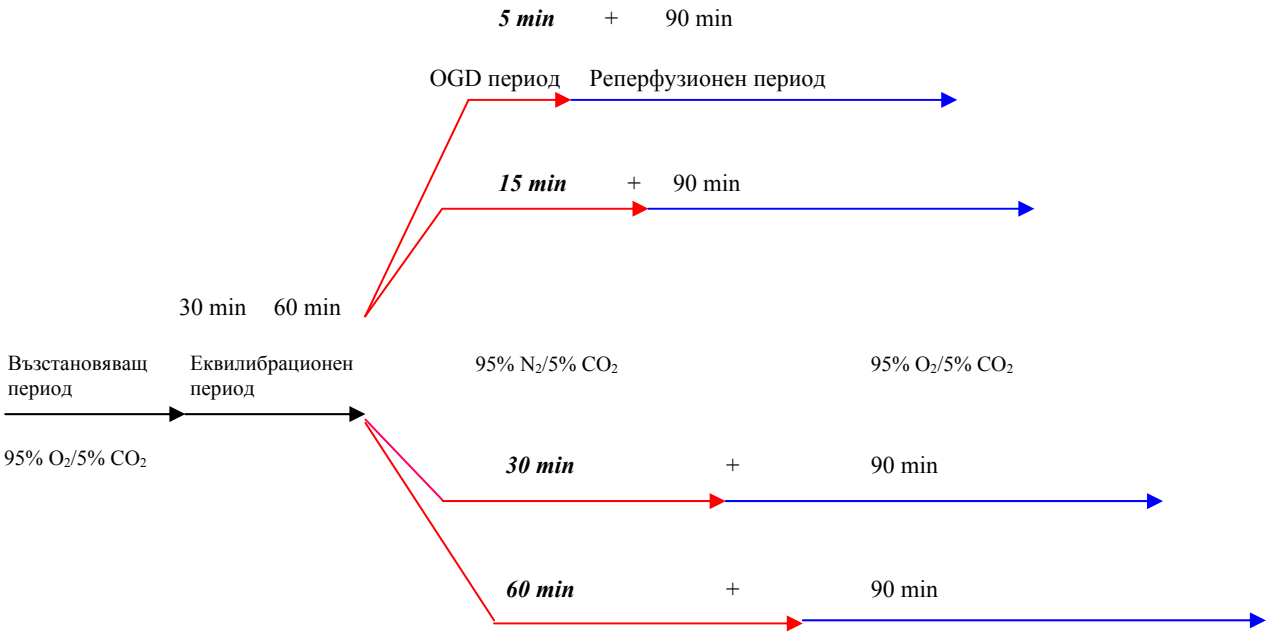
Оценка на невроналното увреждане

Невроналното увреждане бе количествено оценено чрез измерване на освободения глутамат и лактат дехидрогеназа (LDH) в разтвора aCSF след периода на 90 min реоксигенация.

Глутамат бе определян флуориметрично (excitation 366 nm; emission: 450 nm), използвайки превръщането на NAD+ в NADH посредством ензима glutamate dehydrogenase [6].

Активността на LDH бе определяна спектрофотометрично чрез понижението в абсорбцията при 340 nm, което се получава при реакцията на окисление на NADH до NAD+ [8]. Окислението се катализира от LDH, а реакцията се извършва в присъствие на пируват.

Количественото определяне на задръжката на вода в мозъчната тъкан се изчислява по метода, описан от MacGregor и сътр. [13].



Фиг. 1. *Експериментална схема на in vitro модел на исхемия в мозъчни срезове от плъх, в условията на кислородно-глюкозен глад за периоди от 5, 15, 30 и 60 min и реперфузионен период от 90 min*

Статистическа обработка на резултатите

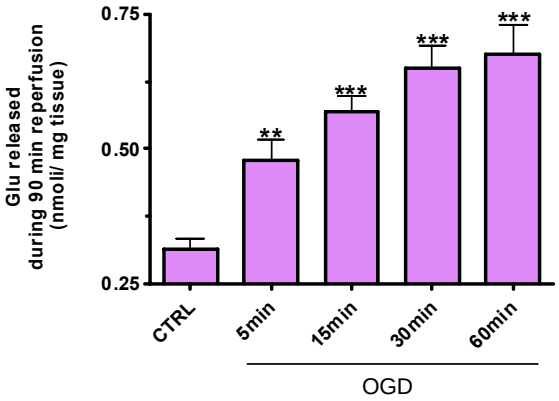
Всички експерименти са проведени чрез използването на мозъчни срезове, приготвени от най-малко 4 животни. Представени са данните ± S.E.M., като с "n" е означен броят на пробите в съответния експеримент. Данните за глутамат и лактат дехидрогеназа (LDH) са представени съответно в nmol/mg тъкан и U/mg тъкан. Статистическата оценка на резултатите е извършена чрез one-way ANOVA followed by post-hoc Dunnett test (GraphPad INSTAT v3.00, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Резултати

Времезависим ефект на периода на кислородно-глюкозен глад/реперфузия върху освобождаването на глутамат

С цел установяване на продължителността на периода, в който кислородно-глюкозният глад (OGD) ще индуцира най-висока степен на тъканно увреждане, мозъчните срезове бяха подложени на OGD с продължителност 5, 15, 30 или 60 min. Този период бе последван от 90 min реперфузия, както е описано в „Материал и методи". Мозъчните срезове, инкубирани в разтвор на aCSF за 120 min (контроли, CTRL), освобождават в инкубационната среда глутамат в количество 0.31 ± 0.02 nmol mg тъкан (n = 8) (фиг. 2).

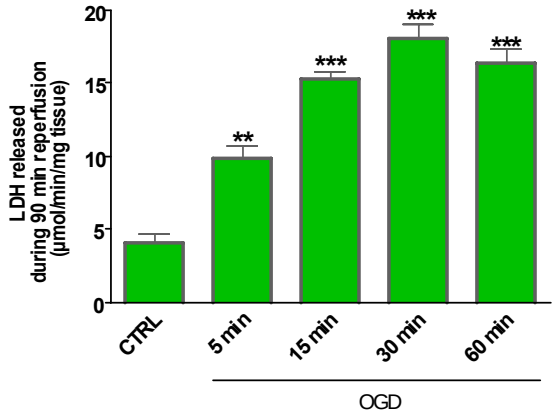
Освобождаването на глутамат нараства линейно с времето. При продължителност на исхемичния период (OGD) до 5 min количеството на освободения глутамат се повиши с 53%. На 30 min се наблюдава най-голямо освобождаване на глутамат в инкубационната среда (+ 107% спрямо контролите). С нарастване на OGD до 60 min обаче нивата на освободения глутамат не се различават статистически значимо от стойностите при 30 min.



Фиг. 2. *Ефект на продължителността на периода на кислородно-глюкозен глад (OGD) върху освобождаването на глутамат. Мозъчните срезове са инкубирани в aCSF за 120 min (контроли, CTRL) или са поставени в условия на OGD за 5, 15, 30 или 60 min, с последващ 90 min период на реперфузия, както е описано в „Материал и методи". Представени са данните ± S.E.M. от 4 независими експеримента **P < 0,01,***P < 0,001 спрямо контролите*

Времезависим ефект на периода на кислородно-глюкозен глад/реперфузия върху освобождаването на LDH

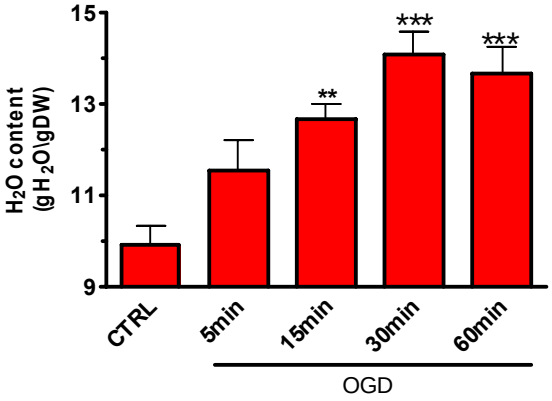
В условията на гореописания експеримент бе установено, че мозъчните срезове, инкубирани в разтвор на aCSF за 120 min (контроли, CTRL), освобождават в инкубационната среда LDH 4.1 ± 0.6 U mg protein (n = 17) (фиг. 3). Наблюдава се линейна зависимост в нарастването на освободената LDH с нарастване на OGD периода. При 5 min продължителност на OGD количеството на освободената LDH нараства със 138% спрямо контролите. Най-висока степен на освобождаване на LDH се наблюдава до 30 min от OGD периода (+ 340% спрямо контролите). На 60 min нивата на освободената LDH не се различават от тези в периода 30 min OGD.



Фиг. 3. *Ефект на продължителността на периода на кислородно-глюкозен глад (OGD) върху освобождаването на лактат дехидрогеназа (LDH). Мозъчните срезове са инкубирани в aCSF за 120 min (контроли, CTRL) или са поставени в условия на OGD за 5, 15, 30 или 60 min, с последващ 90 min период на реперфузия, както е описано в „Материал и методи". Представени са данните ± S.E.M. от 4 независими експеримента. ** P<0,01,*** P<0,001 спрямо контролите*

Времезависим ефект на периода на кислородно-глюкозен глад/реперфузия върху количеството на задържана вода в мозъчни срезове (едем)

След инкубация от 120 min в aCSF задръжката на вода от контролните срезове (CTRL) бе 9.93 ± 0.4 g H_2O (g сухо тегло) (n = 16) (фиг. 4). Тази стойност бе с около 4% по-висока от измерената в пробите след 1 h еквилибриращ период при стайна температура [10]. Времезависимото нарастване на едема е линейно в период на OGD до 30 min. Когато исхемичния период (OGD) бе лимитиран до 5 min, не се наблюдава статистически значим ефект върху задръжката на вода. С нарастване на периода на OGD обаче нараства и статистически значимо едемът, като най-висок ефект се наблюдава след 30 min OGD (+ 142% спрямо контролите).



Фиг. 4. *Ефект на продължителността на периода на кислородно-глюкозен глад (OGD) върху тъканния едем. Мозъчните срезове са инкубирани в aCSF за 120 min (контроли, CTRL) или са поставени в условия на OGD за 5, 15, 30 или 60 min, с последващ 90 min период на реперфузия, както е описано в „Материал и методи". Представени са данните ± S.E.M. от 4 независими експеримента*
***P < 0,01; ***P < 0,001 спрямо контролите*

Обсъждане

Исхемичното увреждане на мозъчната тъкан предизвиква верига от последващи физиологични и биохимични реакции, като крайният резултат е невронално увреждане и смърт [4]. *In vitro* моделът за исхемия в мозъчни срезове от плъх в условията на кислородно-глюкозен глад е подходяща система за оценка на потенциална невропротективна активност на различни вещества. В настоящата работа бе установено тъканното увреждане, предизвикано *in vitro* в условия на кислородно-глюкозен глад, в различни времеви интервали (5, 15, 30 и 60 min), чрез определяне на освобождаването на глутамат (GLU), лактат дехидрогеназа (LDH) в среда на изкуствена цереброспинална течност (aCSF) и чрез определяне на задръжката на вода в мозъчната тъкан след 90 min период на реперфузия.

Още след най-краткия OGD период (5 min) нивата на освободения глутамат и LDH от мозъчните срезове са повишени статистически значимо (съответно + 53% и + 138% спрямо контролите). Тези данни са в унисон с очакваните ефекти при модел на кислородно-глюкозното отнемане в инкубационната среда на мозъчните

срезове. В нормални физиологични условия мозъчната тъкан се отличава с висока консумация на кислород и глюкоза, като физиологичните мозъчни функции зависят в голяма степен от процесите на окислително фосфорилиране [5]. При исхемия се наблюдава фокално понижение на мозъчния кръвен ток и съответно намаляване на доставянето на енергийните източници кислород и глюкоза. Това води до промяна на вътреклетъчния йонен градиент, силно понижение на мембранния потенциал и деполяризация на невроните и глиалните клетки. След активиране на соматодендритните и на потенциал-зависимите калциеви канали в екстрацелуларното пространство се освобождават възбудните аминокиселини (глутамат) [16]. В същото време енергоемките процеси, като пресинаптичния реъптейк на възбудни аминокиселини, силно намаляват, което води до натрупване на глутамат в екстрацелуларното пространство [14, 16].

Наблюдавана бе линейна зависимост в нарастването на освободения глутамат, LDH и задръжката на вода с времето (OGD период 5, 15, 30 min). Най-високите стойности на определяните параметри са след 30 min OGD период, в който се наблюдават повишение на количествата на освободения в инкубационната среда глутамат и LDH, съответно до + 107% и + 340% спрямо контролите. Тези ефекти са съпътствани от масивна задръжка на вода в мозъчната тъкан (+ 142% спрямо контролите). Има достатъчно доказателства, които показват, че с повишаване на глутаматната невротрансмисия нараства и невроналното увреждане вследствие на исхемията [5, 12]. В резултат от глутамат-медиираната свръхактивация Na и Cl йони навлизат в невроните през каналите за моновалентни йони (напр. AMPA рецептор – канал), водата следва пасивно инфлукса на тези йони, който надвишава ефлукса на К йони, предизвиквайки задръжка на тъканни течности (едема) [1, 9, 15].

Удължаването на OGD периода до 60 min не води до статистически значима промяна в изследваните показатели спрямо измерените на 30 min. Напротив, след 30-ата минута се наблюдават уголемяване на клетъчните вакуоли, нарушаване целостта на мембраната и разпукване на вакуолата, и като следствие нарушаване на целостта на клетката.

Резултатите от проведените експерименти показват, че OGD период от 30 min е най-подходящ при модел за исхемично увреждане, тъй като тогава се наблюдават значителна задръжка на вода в мозъчната тъкан и най-високи нива на освобождаване на глутамат и LDH, без да се компрометират клетъчните функции и интегритетът на клетките.

Благодарности. Северина Митушева бе стипендиант по програма Erasmus на Медицинския университет – София, във Факултета по фармация на Университета в Сиена, където работи под ръководството на проф. Мария Фрозини и проф. Масимо Валоти.

Библиография

1. A l l e n , N. J., D.J. Rossi et D. Attwell. Sequential release of GABA by exocytosis and reversed uptake leads to neuronal swelling in simulated ischemia of hippocampal slices. – J. Neurosci., **24**, 2004, 3837-3849.
2. B u d d , S. L. Mechanism of neuronal damage in brain hipoxia\ischemia:focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. – Pharmacol. Ther., **80**, 1998, 203-29.
3. B r a h m a , B., R. E. Forman, E. E. Stewart, C. Nicholson et M. E. Rice. Ascorbate inhibits edema in brain slices. – J. Neurochem., **74**, 2000, 1263-1270.
4. D i r n a g l , U., C .Iadecola et M. A. Moskowitz. Pathology of ischaemic stroke: an intefrated view. – Trends Neurosci, **22**, 1999, 391-7.
5. D i e m e r , N. H. et al. Glutamate receptor transmission and ischemic nerve cell damage: evidence for involvement of excitoxic mechanism. – Prog. Brain Res., **96**, 1993,10-23.
6. E i l e r s , H., C. H. Kindler et P. E .Bickler. Different effects of volatile anesthetics and polyhalogenated alkanes on depolarization-evoked glutamate release in rat cortical brain slices. – Anesthesia and Analgesia, **88**, 1999, 1168-1174.
7. G l o b u s , M. Y.-Y. et al. Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and GABA in vulnerable and nonvulnerublebrain regions in the rat. – J. Neurochem., **57**, 1991, 470-477.
8. G a y , R. J., R. B. McComb et G.N. Bowers Jr. Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. – Clin. Chem., **14**, 1968, 740-753.
9. G a l e f f i , F. Et al. Changes in intracellular chloride after oxygen-glucose deprivation of the adult hippocampal slice: Effect of diazepam. – J. Neurosci., **24**, 2004, 4478-4488.
10. I n g l e f i e l d , J. R., C. A. Wilson et R. D. Schwartz-Bloom. Effect of trancient cerebral ischemia on GABA A receptor 1 – subunit-immunoreactive interneurons in gerbil CA1 hippocampus. – Hippocampus, **7**, 1997, 511-523.
11. L i p t o n , P. Ischemic cell death in brain neurons. – Physiol. Rev., **79**, 1999, 1431-568.
12. M a r t i n , L. J. et al. Neurodegeneration in excitatory, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. – Brain Res. Bull., **46**, 2001, 281-309.

13. M a c G r e g o r , D. G., M. V. Avshalumov et M. E. Rice. Brain edema induced by in vitro ischemia: Causal factors and neuroprotection. – J. Neurochem., **85**, 2003, 1402-1411.
14. M e l d r u m , B. Pathophysiology of cerebral ischemia and trauma in relation possible therapeutic approaches. – Prog. Clin. Res., **361**, 1990, 275-90.
15. P o n d , B. B. et al. The chloride transporter Na(+)-K(+)-Cl- cotransporter isoform-1 contributes to intracellular chloride increases after in vitro ischemia. – J. Neurosci., **26**, 2006, 1396-1406.
16. R o s s i , D. J., T. Oshima et D. Attwell. Glutamate release in sever brain ischemia is mainly by reversed uptake. – Nature, **403**, 2000, 316-21.
17. S c h w a r t z , R. D. et al. Diazepam, given postischemia, protects selectively vulnerable neurons in the rat hippocampus and striatum. – J. Neurosci., **15**, 1995, 529-39.

Адрес за кореспонденция:
Вирджиния Цанкова
Катедра по фармакология, фармакотерапия и токсикология
Фармацевтичен факултет
Медицински университет
ул. „Дунав" № 2
1000 София
✆ +35929236524
e-mail: virginia_tzankova@yahoo.com

Address for correspondence:
Virginia Tzankova
Department of Pharmacology, Pharmacotherapy and Toxicology
Faculty of Pharmacy
Medical University
2 Dunav Str.
1000 Sofia
✆ +35929236524
e-mail: virginia_tzankova@yahoo.com