

KONDICIONOVANIE AKO ŠANCA NA AKTIVOVANIE ISCHEMICKEJ TOLERANCIE V MIECHE KRÁLIKA PO ISCHÉMII/REPERFÚZII

Danková M.¹, Fagová Z.², Domoráková I.², Stebnický M.³, Tóth Š.²

Mechírová E.², Vdoviaková K.⁴, Polák Š.¹

¹ Ústav histológie a embryológie, UK LF, Bratislava

² Ústav histológie a embryológie, UPJŠ LF, Košice

³ II. Chirurgická klinika, UPJŠ LF a UNLP, Košice

⁴ Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

Cieľ Cieľom tejto práce bolo posúdiť vplyv vzdialeného kondicionovania na indukciu ischemickej tolerancie, ako aj na imunoreakciu gliového fibrilárneho kyslého proteínu (GFAP) a ubikvitínu v gliových bunkách v mieche králika po ischémii/reperfúzii.

Materiál a Metodika Kondicionovanie je možným spôsobom indukcie ischemickej tolerancie. Ischemická tolerancia predstavuje schopnosť tkanív a buniek reagovať na subletálne podnety vybudovaním mimoriadne silnej endogénnej ochrany, ktorá im umožňuje prežiť inak smrteľné ischemicko-reperfúzne poškodenie.

Výsledky Zistili sme, že vzdialené perkondicionovanie má na miechu po ischémii/reperfúzii protektívny účinok porovnateľný s protektívnymi účinkami vzdialeného postkondicionovania.

Záver Naše zistenia otvárajú nové okno pre ďalší výskum iných potenciálnych spôsobov získavania ischemickej tolerancie v mieche.

KLúčové slová: králik, ischémia, reperfúzia, ischemická tolerancia, kondicionovanie

Úvod

Paraplégia je závažnou a nepredvídateľnou komplikáciou chirurgických zákrokov na brušnej aorte alebo zákrokov v hrudnej oblasti [15]. Hoci sa na zníženie rizika poškodenia miechy spojeného s týmito chirurgickými krokmi použilo niekoľko stratégií, vrátane indukovanej hypotermie a drenáže mozgovomiechového moku, terapeutický prínos týchto zákrokov zostáva neistý [11]. Nervové bunky a podporné gliové bunky majú rôzne funkcie a ich reakcia na stresové situácie sa líši. Na rozdiel od našich predchádzajúcich publikovaných prác orientovaných na zmeny v sivej hmote miechy sa táto štúdia zameriava na bielu hmotu miechy. Biela hmota obsahuje myelinizované axóny a gliové bunky (fibrilárne astrocyty, oligodendrocyty a mikroglia). Nenachádzajú sa v nej bunkové telá neurónov, dendrity alebo synapsie [21]. Astrocyty obsahujú vláknité proteíny vimentín a gliový fibrilárny kyslý proteín (GFAP) vo svojej cytoplazme. Tieto intermediárne filamenty sú vysoko exprimované vo fibrilárnych astrocytoch bielej hmoty v porovnaní s protoplazmatickými astrocytmi v sivej hmote [7]. V momente, keď ischemický podnet spustí deštruktívny metabolický proces v bunke, je jeho zastavenie a obnovenie normálnych fyziologických podmienok v bunkách náročné. V posledných rokoch bola zaznamenaná zvýšená pozornosť fenoménu ischemickej tolerancie [27]. Potvrdil sa v rôznych zvieracích modeloch fokálnej mozgovej ischémie, globálnej mozgovej ischémie [28] a ischémie miechy [23, 32]. Ischemická tolerancia spočíva v schopnosti buniek reagovať na subletálny podnet vybudovaním mimoriadne silnej endogénnej ochrany, ktorá im umožňuje prežiť inak smrteľné ischemické poškodenie. Tkanivá alebo bunky si môžu poskytovať toleranciu navzájom - vzdialená tolerancia. Ak je stresovým podmienkam s adekvátnymi stresormi vystavená len jedna časť tela, toleranciu môže úplne získať celý orgán, resp.

celé telo [28]. Vzdialený ischemický perconditioning alebo postconditioning aplikovaný vo forme subletálnej ischémie na orgán (napr. končatinu) vzdialený od cieľového orgánu, ako je mozog alebo miecha [13], vyvoláva globálnu endogénnu toleranciu a chráni aj vzdialené cieľové orgány alebo tkanivá pred následným dlhotrvajúcim ischemicko-reperfúznym poškodením. Celkovo možno ochranný účinok ischemického kondicionovania navodiť nielen priamo *in situ*, ale aj vo vzdialených orgánoch [10].

Materiál a metódy

V práci bolo použitých 83 klinicky zdravých samcov novozélandských bielych králikov s hmotnosťou 2,5-3 kg. Králiky boli dodané spoločnosťou Velaz, s.r.o. (Praha, Česká republika) a boli umiestnené v štandardných klietkach, v miestnosti s kontrolovaným svetlom, teplotou (15 - 21 °C) a vlhkosťou (55 % ± 10 %) v užívateľskom zariadení SKP03014. Králiky mali voľný prístup k potrave a vode. Prezentovaný pokus s králikmi Ro-1347/15-221, Ro-3524/17-221 bol povolený Etickou komisiou Lekárskej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach v súlade so smernicou Rady Európskeho spoločenstva (2010/609/EHS).

Králikom bola anestézia navodená *i.m.* podaním zolazepamu (20 mg/kg; Virbac; Carros, Francúzsko), tiletaminu (20 mg/kg; Virbac) a xylazínu (3 mg/kg; ECUPHAR N.V.; Oostkamp, Belgicko). Zvieratá boli operované v sterilných podmienkach. Pred 20min ischémiou miechy bolo podané králikom antibiotikum cefotaxím (50 mg/kg, *i.m.*; Sandoz Pharmaceuticals d.d.; Ljubljana, Slovinsko). Ischémia miechy (SC-ischémia) bola vyvolaná oklúziou aorty pod odstupom ľavej renálnej artérie na 20 minút [36]. Časové obdobie 24 alebo 72 hodín po odstránení oklúzie aorty bolo označené ako obdobie reperfúzie (R). Vzdialené ischemické kondicionovanie bolo vyvolané

kompresiou ľavej prednej končatiny pomocou škrtidla v troch cykloch 2min ischemie prednej končatiny, po ktorých vždy nasledovali 2 minútové reperfúzie. Vzdialeného kondicionovania sa vykonalo v jednom z troch časových bodov: počas posledných 12 minút oklúzie aorty (perkondicionovanie-PerC), 1hod po oklúzii (skoré postkondicionovanie-PostC) alebo 3 hodiny po oklúzii (neskoré postkondicionovanie-PostC). Králiky boli rozdelené do 9 skupín. Králiky kontrolnej skupiny (skupina 1) boli podrobené procedúram súvisiacich s anestéziou a chirurgickými zásahmi, ale nie ischemiou miechy a vzdialeným kondicionovaním. Králiky kontrolnej skupiny boli bezprostredne po týchto procedúrach transkardiálne prepláchnuté 0,9 % fyziologickým roztokom a 4% paraformaldehydrom v 0,1M fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4). Králiky s SC-ischemiou (skupiny 2 a 3) podstúpili iba 20min ischemiu miechy, po ktorej nenasledovala žiadna terapia. Ďalšie králiky boli tiež vystavené SC-ischemii ale aj vzdialenému kondicionovaniu. Tri striedavé 2 minútové kompresie a 2 minútové uvoľnenia kompresie ľavej prednej končatiny škrtidlom boli vykonané počas posledných 12 minút SC-ischemie (vzdialené PerC, skupiny 4 a 5), alebo 1 hodinu (1hod) po SC-ischemii (vzdialené skoré PostC, skupiny 6 a 7), alebo 3 hodiny po SC-ischemii (vzdialené neskoré PostC, skupiny 8 a 9). Po 24 (všetky párne skupiny) alebo 72 hodinách (všetky nepárne skupiny okrem kontrolnej skupiny 1) reperfúzie boli králiky uvedené do anestézy a transkardiálne prepláchnuté 0,9 % fyziologickým roztokom a 4 % paraformaldehydrom v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku (pH 7,4). Odobraté segmenty (L4 - L6) miechy boli postfixované v 4 % roztoku paraformaldehydu a spracované na účely konvenčnej svetelnej mikroskopie.

Motorické funkcie zadných končatín hodnotili dvaja nezávislí, odborne vyškolení pozorovatelia, ktorí nepoznali skupiny zvierat. Hodnotilo sa v čase 24hod a 72hod R. Na hodnotenie sa použil modifikovaný Tarlov skórovací systém. Každému zvieraťu bolo pridelené skóre 0 - 5: 0 - úplná paraplégia, 1 - slabý pohyb zadných končatín, 2 - aktívny pohyb, ale neschopný sedieť bez pomoci, 3 - schopný sedieť, ale neschopný skákať, 4 - slabý skok, 5 - úplná normálna motorická funkcia zadných končatín.

Primárna protilátka proti ubikvitínu (Ub) bola použitá na zistenie priestorovej lokalizácie ubikvitínu v gliových bunkách [6]. Parafínové rezy s hrúbkou 5µm boli upevnené na silanizovaných sklíčka a vysušené. Deparafínované a rehydratované rezy boli ošetrené 20 % metanolom s 3 % H₂O₂ vo fosfátovom pufrí (PBS). Po premytí 0,1M PBS počas 5min sa rezy permeabilizovali v 0,1M PBS s Tritonom X-100 (9002-93-1; SIGMA-ALDRICH, Co.) a 1 % hovädzieho sérového albumínu a 5 % normálneho kozieho séra. Na detekciu Ub sa rezy ošetrili primárnou polyklónálnou rabbit anti-ubiquitin protilátkou (U-5379; 20K9001; 1:100; SIGMA-ALDRICH, Co.) cez noc pri 4°C. Po premytí v PBS sa rezy inkubovali so sekundárnym biotinylovaným anti-rabbit IgG (B6648-3ML; 077K4848; 1:20; SIGMA-ALDRICH, Co.) počas 70 minút a následne s ExtrAvidin-Peroxidase (E8386-3ML; 077K4849; 1:20; SIGMA-ALDRICH, Co.) počas 70 minút vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote.

Na dôkaz GFAP v astrocytoch boli použité parafínové rezy (hrúbka 5µm), ktoré boli deparafínované, rehydratované, ošetrené 20 % metanolom s 3% H₂O₂ v PBS, blokovanie v PBS s 3 % hovädzieho sérového albumínu (BSA) a inkubované s mouse anti-GFAP (1:100; MU020-UC Biogenex Lab, San. Ramon, CA;), potom sa pri izbovej teplote inkubovali s biotinylovanou sekundárnou anti-mouse protilátkou (1:50; LINK-Biogenex, Lab, San Ramon, CA) a potom so streptavidínovou peroxidázou (1 : 50; LABEL-Biogenex Lab, San Ramon, CA).

Reakcia sa v oboch imunohistochemických metódach bola vizualizovaná pomocou 3,3'-diaminobenzidínu (32750; SIGMA-ALDRICH, Co.). Na dofarbenie rezov sa použil Mayerov hematoxylin (32750; SIGMA-ALDRICH, Co.). Rezy sa prejasnili ponorením do xylénu a prekryli sa vrstvou Pertexu (Histolab Products AB).

Všetky hodnotenia boli vykonané dvoma odborne zdatnými pozorovateľmi (bez znalosti skupín) pre všetky experimentálne skupiny a metódy. Nezávislí pozorovatelia hodnotili vzorky každého segmentu miechy (L4, L5 a L6) za rovnakých podmienok. Všetky histologické analýzy sa uskutočnili pri zväčšení 200x. Na vyhodnotenie všetkých spracovaných metód bolo použitých 5 histologických rezov zo všetkých segmentov miechy vo všetkých skupinách zvierat. Na analýzu imunohistochemických metód sa použil svetelný mikroskop OLYMPUS BX50 s digitálnym fotoaparátom OLYMPUS SP350 (Olympus; Tokio, Japonsko) a softvér na analýzu obrazu QuickPHOTO Industrial 2.3 (Promicra; Praha, Česká republika). Štatistická analýza sa vykonala v programe GraphPad InStat ver. 3.10 pre Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Kvantitatívne hodnotenie je vyjadrené ako priemer (M) ± SEM. Významnosť rozdielov medzi skupinami sa analyzovala pomocou ANOVA a Tukey-Kramerovho post hoc testu. Hodnota $p < 0,05$ sa považovala za štatisticky významnú.

Výsledky

Neurologické hodnotenie

Hodnotenie neurologických funkcií zadných končatín sa hodnotilo v dvoch rôznych časových bodoch: 24 a 72 hodín po SC-ischemii. Hodnoty získané modifikovaným Tarlovým skórovacím systémom vykazovali trend k poklesu vo všetkých skupinách, ktoré podstúpili ischemiu miechy v porovnaní s kontrolnou skupinou. Štatisticky významný pokles hodnôt bol zaznamenaný 72 hodín po ischemii v skupine 3 v porovnaní s kontrolnou skupinou 1. Výsledky Tarlovho skóre vo všetkých skupinách so vzdialenou kondicionovaním vykazovali trend k zlepšeniu v porovnaní s oboma skupinami s SC-ischemiou, v oboch časových bodoch R. Najvyššie Tarlovo skóre zo všetkých skupín, ktoré boli vystavené SC-ischemii, sa pozorovalo v časovom bode 24 hodín R u králikov, u ktorých bolo uskutočnené vzdialené kondicionovanie 1hod po ischemii miechy (6. skupina so skorým PostC/24hod R). Tarlovo skóre v tejto skupine bolo štatisticky významne vyššie v porovnaní s 3. skupinou s SC-ischemiou v časovom bode 72 hodín R (Tab.1).

Table 1 Tarlov score

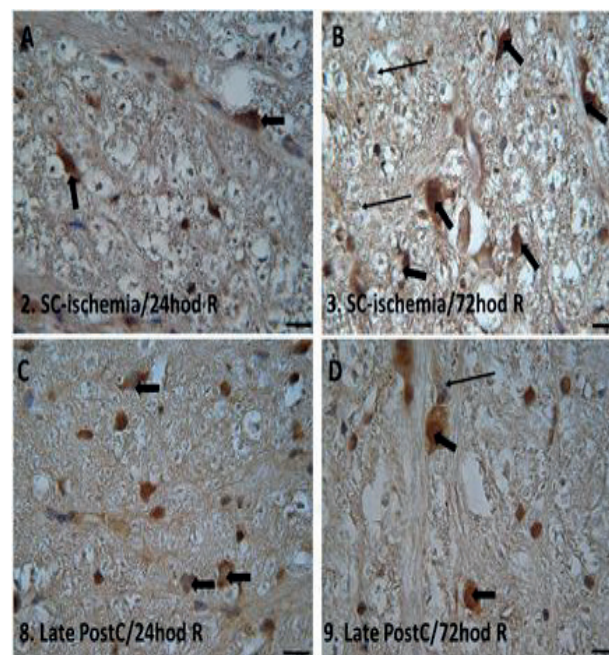
Group	n	Tarlov score (M)	± SEM	p
1. Control	9	5	0	
2. SC-ischemia/24hod R	6	2.7	0.250	
3. SC-ischemia/72hod R	9	1.9	0.585	< 0.01:1** < 0.05:6 °
4. PerC/24hod R	10	3.1	0.657	
5. PerC/72hod R	10	2.9	0.721	
6. early PostC/24hod R	10	4.5	0.341	
7. early PostC/72hod R	10	3.2	0.628	
8. late PostC/24hod R	10	2.8	0.757	
9. late PostC/72hod R	9	3.4	0.728	

Significant decrease of Tarlov score in 3. group (**value differs from control significantly; $p < 0.01$), increase of Tarlov score in 6. group (° value differs from 3. group significantly; $p < 0.05$). Values are showed as average (M) ± S.E.M., the one-way ANOVA test with a multiple comparison Tukey–Kramer post hoc test.

Dôkaz ubikvitínu v gliových bunkách bielej hmoty kráľíka

V tejto štúdií bola hodnotená distribúcia ubikvitínu v gliových bunkách bielej hmoty miechy kráľíka. V cytoplazme gliových buniek bielej hmoty miechy v kontrolnej skupine 1 sa pozorovala normálna - slabá imunopozitivita na ubikvitín. V cytoplazme gliových buniek v 2. skupine s SC-ischémiou v časovom bode 24hod R boli viditeľné tmavohnedé agregáty ubikvitínu, ako aj tmavé ubikvitín pozitívne jadrá gliových buniek. V 3. skupine s SC-ischémiou bola pozorovaná v 72 hodine R prítomnosť poškodenia väčšiny gliových buniek bielej hmoty kráľíka. Cytoplazma poškodených gliových buniek bola svetlá, bez imunoreakcie na ubikvitín a v niektorých poškodených gliových buniek boli viditeľné tmavohnedé bunkové jadrá nepravidelného tvaru so silnou imunoreakciou na ubikvitín. V časovom bode 24 hodín R sa v 4. skupine so vzdialeným PerC, v 6. skupine so vzdialeným skorým PostC a v 8. skupine so vzdialeným neskorým PostC prejavila slabá imunoreakcia na ubikvitín v cytoplazme gliových buniek. Jadrá gliových buniek boli bez imunoreakcie na ubikvitín. Cytoplazmatická imunopozitivita na ubikvitín bola prítomná v časovom bode 72 hodín R v podobe jemných ubikvitínových agregátov v cytoplazme gliových buniek v 5. skupine so vzdialeným PerC, 7. skupine so vzdialeným skorým PostC a 9. skupine so vzdialeným neskorým PostC. Niektoré gliové bunky v časovom bode 72 hodín R vykazovali silnú imunoreakciu na ubikvitín v

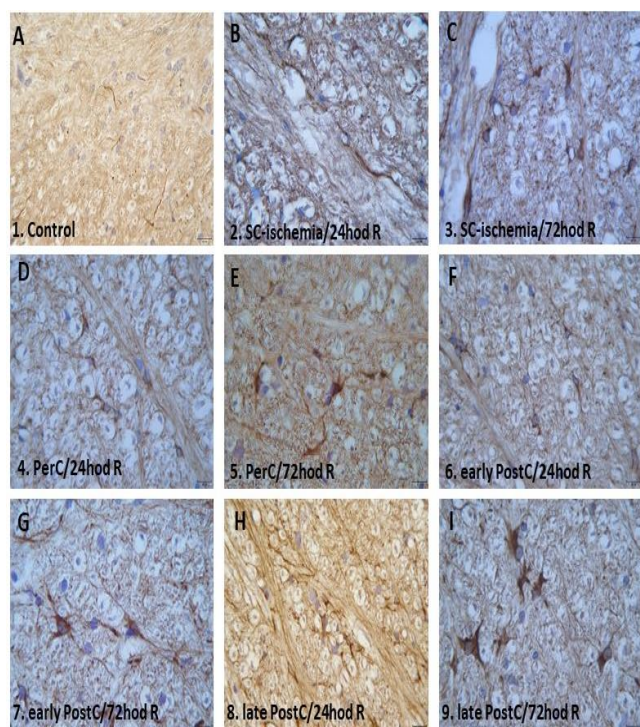
jadrách nepravidelného tvaru, ostatné jadrá gliových buniek boli bez imunoreakcie na ubikvitín (Obr.1).

Figure 1 Ubiquitin (Ub) immunoreaction in glial cells

A. Dark brown Ub aggregates (thick arrow) B. strong Ub positivity in nuclei of some glial cells (thick arrow), shrunk pale cells without Ub positivity (thin arrow). C. weak nuclear Ub positivity (thick arrow) D. strong nuclear Ub positivity (thick arrow), glial cells without Ub positivity (thin arrow). Scale bar: 50 µm.

Dôkaz GFAP v astrocytoch bielej hmoty kráľíka

Astrocyty v bielej hmote miechy v kontrolnej skupine 1 vykazovali iba slabú imunoreakciu na GFAP v cytoplazme tenkých výbežkov. V 2. skupine s SC-ischémiou boli v bielej hmote miechy prítomné GFAP pozitívne aktivované astrocyty, ktorých hypertrofické výbežky obklopovali eferentné axóny vybiehajúce z predných rohov sivej hmoty. V 3. skupine s SC-ischémiou boli prítomné reaktívne astrocyty s intenzívnejšou imunoreakciou na GFAP, predovšetkým v blízkosti opuchnutých eferentných axónov. V časovom bode 24 hodín (24hod) R v 4. skupine so vzdialeným PerC, v 6. skupine so vzdialeným skorým PostC a v 8. skupine so vzdialeným neskorým PostC bola zaznamenaná mierna astrocytóza. Výbežky reaktívnych astrocytov boli výrazne hrubšie a vykazovali silnejšiu imunoreakciu na GFAP. V časovom bode 72 hodín (72hod) R sa v 5. skupine so vzdialeným PerC, 7. skupine so vzdialeným skorým PostC a 9. skupine so vzdialeným neskorým PostC objavili výrazné reaktívne astrocyty s intenzívnou GFAP imunoreakciou v ich hypertrofických telách ako aj výbežkoch cytoplazmy. Vyššiu hustotu GFAP imunopozitívnych astrocytov bola prítomná na hranici sivej a bielej hmoty miechy (Obr.2).

Figure 2 GFAP immunoreaction in astrocytes

A. weak GFAP positivity in thin processes B. GFAP positive astrocytes with hypertrophic processes in close vicinity of efferent axons C. strong GFAP positivity in reactive astrocytes in close vicinity of efferent axons D. F. H. moderate astrocytosis E. G. I. strong GFAP positivity in reactive astrocytes. Scale bar: 50 μm.

Diskusia

Konjugácia ubikvitínu s cieľovými proteínmi, po ktorej nasleduje ich následná proteazomálna degradácia, sa stala charakteristickým znakom mechanizmu, ktorým bunky špecificky odstraňujú regulačné proteíny, modulujú ich aktivitu alebo odstraňujú poškodené proteíny [35]. Ubikvitín-proteazómová dráha sa podieľa na ochrane buniek pred ischemicko-reperfúznym poškodením. Zistilo sa, že inhibícia agregácie ubikvitínom konjugovaných proteínov môže mať zásadnú úlohu pri navodení ischemickej tolerancie v mozgu pomocou izofluránového pre-kondicionovania v modeli prechodného globálneho mozgového ischemicko-reperfúzneho poškodenia u myši [34]. Degradácia dysfunkčných, poškodených alebo nesprávne zložených proteínov je kľúčovou časťou zložitého procesu kontroly kvality proteínov na udržanie bunkovej homeostázy. Dysfunkcia v regulácii homeostázy nastáva v dôsledku nerovnováhy v syntéze, skladaní a degradácii pozmienených proteínov a podporuje hromadenie týchto proteínov, ktoré môžu participovať na poškodení bunky. Ubikvitín-proteazómový systém preto zohráva dôležitú úlohu v mnohých z týchto bunkových procesoch [1]. Možným mechanizmom, ktorý sa podieľa na získaní ischemickej tolerancie, je obnovenie proteosyntézy v bunkách [17, 18]. Ubikvitín-proteazómový systém zohráva rozhodujúcu úlohu pri odstraňovaní toxických metabolitov v bunkách, abnormálnych poškodených proteínov a je

zožku a v talamických oblastiach pri viacerých neurodegeneratívnych ochoreniach [3, 4, 5, 14]. Predpokladá sa, že ubikvitín je jedným z proteínov stresovej odpovede, ktoré sa podieľajú na eliminácii poškodených proteínov v bunkách, a jeho zvýšená imunoreakcia sa pozoruje pri oxidačnom strese [8]. Dysfunkcia ubikvitínproteazómového systému je ústredným prvkom všetkých degeneratívnych mechanizmov [31].

Podľa našich získaných výsledkov, v 2. skupine s SC-ischémiou a 24hod R, sme pozorovali v cytoplazme gliových buniek agregáty so silnou imunoreakciou na ubikvitín. Jadrá týchto gliových buniek mali jasne detekovateľnú imunopozitivitu na ubikvitín. Prítomnosť týchto ubikvitínových agregátov je jedným z prvých príznakov poškodených, degenerovaných buniek, ktoré stratili schopnosť vnútrobunkovej hydrolytickej degradácie pozmienených proteínov [22]. Vo výrazne poškodených oblastiach bielej hmoty, boli prítomné poškodené bunky glie bez imunopozitivity na ubikvitín v bunkovom jadre aj cytoplazme. Naopak, v skupine so vzdialeným PerC, skupine so vzdialeným skorým PostC a skupine so vzdialeným neskorým PostC sa po 24hod R detegovala slabá imunopozitivita na ubikvitín v cytoplazme gliových buniek. Po 72hod R sa poškodenie bielej hmoty miechy plne rozvinulo v 3. skupine so SC-ischémiou, kde väčšina gliových buniek mala bledú cytoplazmu bez imunopozitivity na ubikvitín, na rozdiel od ich zmenšeného a nepravidelne tvarovaného jadra s intenzívnou imunopozitivitou na ubikvitín. Axóny a s nimi spojené gliové bunky vykazovali štrukturálne poškodenie a vakuolizáciu bielej hmoty. V 5. skupine so vzdialeným PerC, 7. skupine so vzdialeným skorým PostC a 9. skupine so vzdialeným neskorým PostC vykazovala väčšina gliových buniek 72hod R imunopozitivitu na ubikvitín vo svojej cytoplazme, jadrá boli bez imunopozitivity na ubikvitín. Iba v poškodených oblastiach bielej hmoty boli v gliových bunkách pozorované výrazné ubikvitín imunopozitívne agregáty cytoplazme aj v jadrách nepravidelného tvaru. V bunkových jadrách sa po prechodnej ischémii zvyšuje množstvo poškodených proteínov a na prežitie ischemického infarktu, je dôležité tieto proteíny eliminovať. Za normálnych podmienok je ubikvitín mierne exprimovaný v cytoplazme buniek, ale jeho pozitivita sa nepozoruje v ich jadrách [31]. Astrocyty sú najpočetnejšie neurogliové bunky, ktoré majú mnohé funkcie vrátane štrukturálnej podpory, podpory metabolizmu, udržiavania extracelulárneho prostredia, regulácie prietoku krvi, stabilizácie komunikácie medzi bunkami a obrany proti oxidačnému stresu [29]. V bielej hmote majú fibrilárne astrocyty fyzický kontakt s oligodendrocytmi a zohrávajú kľúčovú úlohu pri podpore myelinizácie [19]. Aktivácia astrocytov je charakterizovaná zvýšenou expresiou GFAP a vimentínu. GFAP je proteín, ktorý sa nachádza v elementoch cytoskeletu astrocytov [33]. Aktivácia astrocytov zvyčajne vedie k ich morfológickým zmenám, napríklad k hypertrofii, zvýšenej produkcii GFAP [24] a zvyšuje sa aj počet GFAP pozitívnych astrocytov [20, 25]. V našej práci sme poukázali na to, že vzdialené kondicionovanie aplikované počas alebo po SC-ischémii ovplyvňuje imunoreakciu GFAP v astrocytoch. Aktivované as-

lióza je multifaktoriálny jav, ktorý zvyčajne nastáva po poranení miechy. Astroglióza minimalizuje sekundárne poškodenie nervového tkaniva tým, že poskytuje rastové faktory a cytokíny v poškodenej oblasti [2]. Reaktívne astrocyty sú jedným z prispievajúcich faktorov pri znižovaní sekundárnej degenerácie nervového tkaniva po ischémii/reperfúzii. Na druhej strane, v skupinách s SC-ischémiou bez vzdialeného kondicionovania sme zaznamenali zvýšenie imunoreakcie na GFAP v aktivovaných astrocytoch v oblastiach, kde axóny vystupovali zo sivej hmoty do bielej hmoty miechy. Ich zastúpenie bolo vyššie a výraznejšie. Axóny v týchto oblastiach prechádzali výraznými morfológickými zmenami ako je napr. opuch. Astrocyty bielej hmoty majú vyššiu kapacitu na metabolizmus glutamátu ako astrocyty v sivej hmote [9]. Preťaženie glutamátom môže spôsobiť cytotoxicitu v oligodendrocytoch, čo naznačuje, že odbúravanie glutamátu astrocytmi v bielej hmote chráni oligodendrocyty. Okrem toho sú astrocyty schopné odstraňovať reaktívne formy kyslíka a dusíka ako včasná reakcia na oxidačný stres [30]. Celá zložitost' interakcie týchto dráh sa neustále skúma, avšak astrocyty okrem tejto pozitívnej schopnosti zvyšujú šancu na obnovu v bielej hmote ale naopak môžu prispieť aj k oslabeniu procesu obnovy po ischemickom infulte [12]. Dôvod tohto kontrastu vo funkcii aktivovaných astrocytov je spôsobený tým, že okrem ochranných úloh, ktoré môžu byť posilnené aktiváciou astrocytov, ako napr. produkcia protizápalových faktorov, môžu tieto bunky získať aj toxický reaktívny fenotyp, a tak produkovať cytokíny, ktoré zhoršujú poškodenie v mieche [19, 33]. Predpokladáme, že vzdialené kondicionovanie môže vyvolať pozitívnu odpoveď v reaktívnych astrocytoch. Na druhej strane, v skupinách s SC-ischémiou narušenie alebo strata týchto funkcií počas procesu reaktívnej astrogliózy môže byť základom pre dysfunkciu bielej hmoty [26]. Nie je jasné, ako aktivácia astrocytov vedie k rôznym reakciám v skúmanom modeli vzdialeného kondicionovania, kde je jej časové okno, v ktorom sa prejavuje prospešná funkcia aktivovaných astrocytov, a kde je tá hranica, keď sa zmení na toxickú funkciu. Predpokladáme, že nami aplikované vzdialené kondicionovanie môže iniciovať funkčnú aktiváciu astrocytov, ktorá vedie k zvýšenej imunoreakcii na GFAP a pravdepodobne to zohráva určitú úlohu pri ochrane axónov v bielej hmote. Poškodenie nervového tkaniva nastáva, keď závažnosť zmien nastávajúcich v bielej hmote, prekročí protektívne pôsobenie astrocytov a zároveň sa presiahne kapacita schopnosti ubikvitín-proteazómového systému odstraňovať poškodené proteíny.

Záver

Naše zistenia dokazujú, že vzdialené perkondicionovanie má protektívne účinky na miechu porovnateľné s účinkom vzdialeného skorého a neskorého postkondicionovania. Vzdialené kondicionovanie, realizované na vzdialenom orgáne po vzniku ischémie miechy alebo až počas reperfúzie má veľký potenciál. Tento model je jednoduchý, klinicky relevantný a poskytuje silnú neuroprotektívnu v modeli ischemicko-reperfúzneho poškodenia miechy. Táto štúdia tiež otvára nové okno pre ďalší výskum spôsobov získavania ischemickej tolerancie v mieche. Je možné konštatovať, že jednoduchosť a neinvazív-

nosť tohto modelu vzdialeného kondicionovania, ako aj jeho flexibilita načasovania, môže mať sľubné klinické dôsledky u pacientov, ktorí podstupujú napr. operáciu torakoabdominálnej aorty.

Literatúra

1. Bax, M. et al.: The Ubiquitin Proteasome System Is a Key Regulator of Pluripotent Stem Cell Survival and Motor Neuron Differentiation. *Cells*. 8, 2019, (6):581. doi: 10.3390/cells8060581.
2. Braten, O. et al.: Generation of free ubiquitin chains is up-regulated in stress and facilitated by the HECT domain ubiquitin ligases UFD4 and HUL5. *Biochem J*. 444, 2012, (3):611-17. doi: 10.1042/BJ20111840.
3. Bylicky, M.A. et al.: Mechanism of Endogenous Neuroprotective Effects of Astrocytes in Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2018, doi: 10.1155/2018/6501031.
4. Ciechanover, A.: Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Bioorg Med Chem*. 21, 2013, (12):3400-10. doi: 10.1016/j.bmc.2013.01.056.
5. Fagoe, N.D. et al.: Spinal cord injury and the neuron-intrinsic regeneration-associated gene program. *Neuromolecular Med*. 16, 2014, (4):799-813. doi: 10.1007/s12017-014-8329-3.
6. Fagová, Z. et al.: Ubiquitin and endogenous antioxidant enzymes participate in neuroprotection of the rabbit spinal cord after ischemia and bradykinin post-conditioning. *Acta Histochem*. 121, 2019, (6):732-41. doi: 10.1016/j.acthis.2019.06.009.
7. Goursad, S., et al.: Cultured astrocytes derived from corpus callosum or cortical grey matter show distinct glutamate handling properties. *J Neurochem*. 108, 2009, (6):1442-52. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05889.x.
8. Gubellini, P., et al.: Ubiquitin-mediated stress response in a rat model of brain transient ischemia/hypoxia. *Neurochem Res*. 22, 1997, (1):93-100. doi: 10.1023/a:1027389623767.
9. Hassel, B., et al.: Glutamate transport, glutamine synthetase and phosphate-activated glutaminase in rat CNS white matter. A quantitative study. *J Neurochem*. 87, 2003, (1):230-37. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01984.x.
10. Hess, D.C., et al.: Remote ischaemic conditioning—a new paradigm of self-protection in the brain. *Nat Rev Neurol*. 11, 2015, (12):698-710. doi: 10.1038/nrneurol.2015.223.
11. Huang, H., et al.: Effect of ischemic post-conditioning on spinal cord ischemic-reperfusion injury in rabbits. *Can J Anaesth*. 54, 2007, (1):42-8. doi: 10.1007/BF03021898.

12. Huang, L., et al.: Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *Int J Med Sci.* 11, 2014, (4):344-8. doi: 10.7150/ijms.8140.
13. Changhong, R., et al.: Limb remote ischemic preconditioning in combination with post-conditioning reduces brain damage and promotes neuroglobin expression in the rat brain after ischemic stroke. *Restor Neurol Neurosci.* 33, 2015, (3):369-79. doi: 10.3233/RNN-140413.
14. Jankowska, E., et al.: The proteasome in health and disease. *Curr Pharm Des.* 19, 2013, (6):1010–28. PMID: 23016682.
15. Kim, W., et al.: Tat-HSP70 protects neurons from oxidative damage in the NSC34 cells and ischemic damage in the ventral horn of rabbit spinal cord. *Neurochem Int.* 129, 2019, 104477. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104477.
16. Kumar, D., et al.: Ubiquitin biology in neurodegenerative disorders: From impairment to therapeutic strategies. *Ageing Res Rev.* 61, 2020, 101078. doi: 10.1016/j.arr.2020.101078.
17. Liang, J., et al.: Ischemic postconditioning protects neuronal death caused by cerebral ischemia and reperfusion via attenuating protein aggregation. *Int J Med Sci.* 9, 2012, (10): 923–32. doi: 10.7150/ijms.4878.
18. Liu, C., et al.: Ischemic preconditioning prevents protein aggregation after transient cerebral ischemia. *Neuroscience.* 134, 2005, (1):69–80. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.03.036.
19. Lundgaard, I., et al.: White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience.* 276, 2014, 161-73. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.050.
20. Marrif, H., et al.: Differential vulnerability of oligodendrocytes and astrocytes to hypoxic-ischemic stresses. *Adv Mol Cell Biol.* 31, 2003, 857-67. doi: 10.1016/S1569-2558(03)31037-9.
21. Matute, C., et al.: Protecting white matter from stroke injury. *Stroke.* 44, 2013, (4):1204-11. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.658328.
22. Mechírová, E., et al.: Extract EGb 761 pretreatment limits ubiquitin positive aggregates in rabbit spinal cord neurons after ischemia/reperfusion. *Cell Mol Neurobiol.* 26, 2006, (7-8):1443-52. doi: 10.1007/s10571-006-9035-y.
23. Mukai, A., et al.: Protective effects of remote ischemic preconditioning against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 163, 2022, (2):137-156. doi: 10.1016/j.jtcvs.2020.03.094.
24. Ozen, O.A., et al.: The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat prefrontal cortex. *Neurol Sci.* 29, 2008, (3):147-52. doi: 10.1007/s10072-008-0926-1.
25. Ransom, B.R., et al.: Astrocytes: Multitalented stars of the central nervous system. In: Milner, R. (eds) *Astrocytes. Methods in Molecular Biology.* 814, 2012, 3-7. doi: 10.1007/978-1-61779-452-0_1.
26. Pekny, M., et al.: Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol.* 131, 2016, (3):323-45. doi: 10.1007/s00401-015-1513-1.
27. Pignataro, G., et al.: Sodium/calcium exchanger as main effector of endogenous neuroprotection elicited by ischemic tolerance. *Cell Calcium.* 87, 2020, 102183. doi: 10.1016/j.cecca.2020.102183.
28. Riksen, N.P., et al.: Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application - part I. *Neth J Med.* 62, 2004, (10):353-63. PMID: 15683090.
29. Sofroniew, M.V., et al.: Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 2010, (1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
30. Suzuki, T., et al.: Toward clinical application of the Keap1–Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 34, 2013, (6):340-46. doi: 10.1016/j.tips.2013.04.005.
31. Yamauchi, T., et al.: Ubiquitin-mediated stress response in the spinal cord after transient ischemia. *Stroke.* 39, 2008, (6):1883-9. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.455832.
32. Yazar, U., et al.: Effects of Metoprolol on Experimental Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *J DU Health Sci Inst.* 11, 2021, (1):33-8. doi: 10.33631/duzcesbed.739536.
33. Yokobori, S., et al.: Acute Diagnostic Biomarkers for Spinal Cord Injury: review of literature and preliminary research report. *World Neurosurg.* 83, 2015, (5):867-78. doi: 10.1016/j.wneu.2013.03.012.
34. Zhang, H.P., et al.: Isoflurane preconditioning induces neuroprotection by attenuating ubiquitin-conjugated protein aggregation in a mouse model of transient global cerebral ischemia. *Anesth Analg.* 111, 2010, (2):506-14. doi: 10.1213/ANE.0b013e3181e45519.
35. Ziv, N.E., et al.: A possible non-proteolytic role of ubiquitin conjugation in alleviating the pathology of Huntingtin's aggregation. *Cell Death Differ.* 28, 2021, 814–17. doi: 10.1038/s41418-020-00617-7.
36. Zivin, J.A., et al.: Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. *Stroke* 11, 1980, (2):200-2. doi: 10.1161/01.str.11.2.200.

CONDITIONING AS CHANCE FOR ACTIVATION OF ISCHEMIC TOLERANCE IN RABBIT SPINAL CORD AFTER ISCHEMIA/REPERFUSION

Danková M., Fagová Z., Domoráková I., Stebnický M., Tóth Š., Mechírová E., Vdoviaková K., Polák Š.

Aim The aim of present work is to assess the effects of remote conditioning on induction of ischemic tolerance as well as on the immunoreaction of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ubiquitin in glial cells in the rabbit's spinal cord after ischemia/reperfusion.

Material and Methods Conditioning is possible way to induce the ischemic tolerance. Ischemic tolerance represents the ability of tissues and cells to respond to sublethal stimuli by building of extremely powerful endogenous protection allowing them to survive otherwise lethal ischemic injury.

Results Based on our results, we concluded that remote preconditioning has protective effect on the spinal cord after ischemia/reperfusion comparable to the remote early or late postconditioning.

Conclusion Our findings also open a new window for further research on other potential ways of acquiring ischemic tolerance in the spinal cord.

Key words: rabbit, ischemia, reperfusion, ischemic tolerance, conditioning

Korešpondujúci autor

MVDr. Zuzana Fagová, PhD.

Ústav histológie a embryológie

Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta

Šrobárova 2, 040 01 Košice

E-mail: zuzana.fagova@upjs.sk