

Vplyv indukovanej hyperhomocysteinémie na ischemicko-reperfúzne poškodenie mozgu potkana: možný experimentálny model rozvoja Alzheimerovej choroby.

Kovalská M.¹, Kovalská L.², Zeliesková M.³, Koprda O.¹, Mešťanová V.¹, Adamkov M.¹, Lehotský J.³

¹Ústav histológie a embryológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

²Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

³Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko

SOUHRN

Ciel štúdie: Alzheimerova choroba (AD) je progresívna a ireverzibilná neurodegeneratívna porucha, ktorá vedie k demencii a smrti. Dochádza k masívnej strate neurónov, najmä v hipokampe a asociačných oblastiach neokortexu. Vysoká koncentrácia cirkulujúceho homocysteínu (Hcy) je považovaná za nezávislý rizikový faktor vzniku cievnej mozgovej príhody. Alzheimerova choroba (AD) sa bežne vyskytuje ako dôsledok mozgovej ischémie. Nedávne prospektívne štúdie ukázali, že hyperhomocysteinémia (hHcy) je silný, nezávislý rizikový faktor pre rozvoj demencie a AD. Molekulárne mechanizmy, ktoré zodpovedajú za rozvoj týchto patológií nie sú úplne objasnené. V práci sme skúmali účinok hHcy na zmeny MAPKs (mitogénom aktivované proteínkinázy) dráhy v neuronových bunkách v korelácii s neurodegeneratívnymi zmenami v mozgu zvierat.

Typ štúdie: Experimentálna.

Názov a sídlo pracoviska: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav histológie a embryológie, Malá Hora 4, 036 01 Martin, Slovensko

Materiál a metódy: Pre naše experimenty sme použili dospelé laboratórne potkany (samce) kmeňa Wistar. Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín. V prvej skupine bol počas 14 dní subkutánne podávaný Hcy v dávke 0,45 µmol/g/zviera dvakrát denne. Druhá skupina bola bez ošetrovania Hcy. Po uplynutí tejto doby bola prvej aj druhej skupine navodená globálna ischémia štvorcievny podväzom, a to 15minútová ischémia s reperfúziou 72 hodín.

Výsledky: Výsledky ukázali, že ischemický inzult v kombinácii s indukovanou hHcy vedie k zvýšeniu smrti nervových buniek v mozgovej kôre. Analýza proteínov MAPKs Western blotom naznačuje, že IR aj hHcy ovplyvňujú hladinu MAPK/ERK a MAPK/p38 proteínov, ktoré sú spojené s prežívaním/smrtou nervových buniek.

Záver: Tieto zistenia naznačujú, že ischemické poškodenie v kombinácii s indukovanou hHcy má u potkanov neurodegeneratívny účinok. Naše výsledky tiež poukazujú na to, že tento kombinovaný model poškodenia by mohol viesť k progresii AD-podobným patologickým črtám u laboratórných zvierat.

Kľúčové slová: hyperhomocysteinémia, neurodegenerácia, MAPK, Alzheimerova choroba.

SUMMARY

Kovalska M., Kovalska L., Zelieskova M., Koprda O., Mestanova V., Adamkov M., Lehotsky J.: Effect of induced hyperhomocysteinemia on ischemia/reperfusion injury of rat brain: An experimental model of possible development of Alzheimer's disease.

Objective: Alzheimer's disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder combined with massive neuronal loss, mainly in the hippocampus and association regions of the neocortex that results in dementia and death. A high circulating concentration of homocysteine (Hcy) is an independent risk factor for stroke. Commonly, Alzheimer's disease (AD) is frequently occurring as a result of stroke. A recent prospective study showed hyperhomocysteinemia to be a strong, independent risk factor for dementia and AD. The molecular mechanisms underlying these mechanisms are not fully understood yet. We investigated the effect of hHcy (hyperhomocysteinemia) on associated changes in MAPK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinase/extracellular signal-regulated kinases) pathways in neuronal cells correlated with neurodegeneration.

Design: Experimental.

Settings: Comenius University, Jessenius Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Mala Hora 4, 036 01 Martin, Slovakia

Material and methods: For our experiments we used adult rats (male) Wistar. Animals were divided into two groups. The first group was treated by subcutaneous injection 0,45 µmol/g of Hcy in duration of 14 days before experiment. After this period both groups underwent global forebrain ischemia by 4-vessels occlusion. Thus, 15 minutes of ischemia was followed by reperfusion period of 72 hours.

Results: The results showed that IR after induced hHcy may attenuate the neural cell death in forebrain cortex. Further Western blot study of MAPKs suggested that IR as well as hHcy affect number and level of MAPK/ERK and MAPK/p38 proteins, which are associated with survival/death of neural cells.

Conclusion: These findings suggest that IR injury after induced hHcy have a neurodegenerative role on global brain ischemia in rats. Our results also indicate that this model of combined insults could lead to the progression of AD-like pathological features.

Keywords: hyperhomocysteinemia, neurodegeneration, MAPK, Alzheimer's disease.

Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je pomaly sa vyvíjajúce degeneratívne ochorenie mozgu [1]. V súčasnej dobe sa radí k najkomplikovanejším formám neurodegenerácie. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie patrí demencia Alzheimerovho typu medzi prvých 10 hlavných ochorení, ktoré končia smrťou pacienta [2-3]. Alzheimerova choroba vedie k rozpadu nervových vlákien, dochádza k ireverzibilnému poškodeniu nervových buniek, čo vedie k významnému ubúdaniu mozgovej hmoty. Alzheimerova choroba nie je, a to aj napriek intenzívnemu výskumu, v súčasnosti liečiteľná. Je však možné zmierňovať symptómy ochorenia (hormonálna terapia, inhibícia acetylcholinesteráz, podávanie antioxidantov...). Liečba nedokáže zastaviť progresiu ochorenia, dokáže však dočasne spomaliť zhoršovanie symptómov demencie, a tak zlepšiť kvalitu života pacientov [3]. Mnohé vedecké práce sa teda uberajú smerom, ktorý upozorňuje na dôležitosť študovania modifikovateľných rizikových faktorov, ktoré môžu rozvoj AD pozastaviť. Jeden z týchto ovplyvniteľných faktorov môže predstavovať zvýšená hladina homocysteínu (Hcy) v plazme, ktorá je nie vždy úspešne potláčaná vitamínovou suplementáciou (B₆, B₁₂ a kyselina listová). Výsledky prác z posledných rokov naznačujú, že hyperhomocysteinémia (hHcy) môže mať priamy efekt na morfológiu mozgu [4-7]. Williams a kol., [6] zistili, že vysoké hladiny Hcy sú asociované s atrofiou hipokampu a temporálneho laloka. Hyperhomocysteinémia tiež ovplyvňuje fosforyláciu hipokampálneho tau-proteínu [2, 7]. Nedávne experimentálne štúdie preukázali simultánny efekt vysokej hladiny metabolitov Hcy na degradáciu cholinesterázy, ktorá môže podporovať rozvoj AD [8]. Na základe výsledkov niektorých štúdií existuje predpoklad, že zvyšujúca sa hladina sérového Hcy je predispozíciou pre vznik AD [4-5, 9-12].

Cieľom tejto práce bolo štúdium ireverzibilných degeneratívnych zmien selektívne vulnérabilných oblastí mozgu po aplikácii globálnej mozgovej ischemie v spojitosti s indukovanou hHcy a ich následný vplyv na rozvoj neurodegenerácie s patologickými znakmi AD. Obzvlášť významné je pochopenie týchto dejov najmä v korelácii s rozvojom demencie v tých sektoroch mozgu, v ktorých sú neuróny viac rezistentné voči neurodegeneratívnym ochoreniam. Objasnenie týchto procesov by mohlo priňať nové prístupy v humánnej terapii ischemických poškodení vitálnych tkanív a k lepšiemu pochopeniu etiopatogenézy skúmaných patologických stavov.

Materiál a metódy

Na naše experimenty sme použili dospelé laboratórne potkany (samce) kmeňa Wistar (Ústav experimentálnej farmakológie Slovenskej akadémie vied,

Dobrá Voda) vo veku 6 až 8 mesiacov. Hmotnosť zvierat bola 300 – 400 g v celkovom počte 40 kusov. Manipulácia so zvieratami v postupe bola schválená Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR s č. rozhodnutia 4373/12-221. Experimentálne zvieratá boli chované v štandardných podmienkach vo zverinci s klimatizáciou pri teplote 22 ± 2°C, s pravidelným striedaním svetla a tmy v 12hodinových intervaloch a so začiatkom svetelnej fázy o 6. hodine ráno. Prístup k potrave a vode bol zvieratám poskytnutý *ad libitum*. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín.

Model ischemicko-reperfúzneho poškodenia mozgu

Zvieratá bez ovplyvnenia

- Kontrolná podskupina (10 ks) zvierat (C) bola uspatá zmesou obsahujúcou 2,5 % halotanu, 30 % O₂ a 70 % N₂O. Vykonala sa operácia naslepo, pri ktorej sa otvorila krčná oblasť bez navodenia ischemie, následne boli zvieratá usmrtené v súlade s etickými zásadami práce s laboratórnymi zvieratami a bolo im odobraté tkanivo mozgu v sterilných podmienkach.
- Ischemicko-reperfúzna podskupina (10 ks) zvierat (IR-72h rep). Prvý deň boli zvieratám uzavreté obidve vertebrálne artérie kauterizáciou cez *alar foramina* počas anestézie (totožná operácia ako u kontrolnej skupiny). Globálna mozgová ischemia bola indukovaná na druhý deň uzavretím obidvoch karotíd na 15 minút s použitím rovnakej anestézie ako deň predtým. Po vyvolaní 15minútovej ischemie ihneď nasledovala 72 hodinová reperfúzia.

Zvieratá s indukovanou hHcy

Zvieratá v tejto skupine dostávali počas 14 dní pred experimentom subkutánne Hcy v množstve 0,45 μmol/g/zviera dvakrát denne podľa Mattého a kol. [13]. Zvieratá boli rozdelené do rovnakých dvoch podskupín A a B ako bolo uvedeno (Hcy-C a Hcy-IR-72h rep skupiny), pričom množstvo zvierat v skupinách, všetky podmienky počas operácie, celého trvania ischemie i reperfúzie, ako aj odobratie tkanív boli totožné s predchádzajúcou skupinou zvierat.

Po ischemii, resp. po reperfúzii boli zvieratá usmrtené dekapitáciou a odobraté mozgové tkanivo bolo použité na prípravu homogenátov na izoláciu bielkovín, resp. na histologickú analýzu.

Príprava homogenátu proteínov

Tkanivá mozgov sa ponorili do 3 ml homogenačného roztoku [0.32 mol.m⁻³ sacharóza + HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid); pH = 7.4 v pomer 1 : 10]. Na homogenizáciu sa po-

užil homogenizátor (Potter S) pri teplote 4°C na 1300 ot./min., 5 zdvihov po 30 sekúnd (uskladnené alikvoty pri -80°C).

Stanovenie Hcy v plazme zvierat

Zvieratá boli usmrtené v rozmedzí 18-20 h od poslednej dávky Hcy. Bola im odobratá krv do skúmaviek, ktoré obsahovali EDTA (kyselina etyléndiamintetraoctová). Krv bola následne scentrifugovaná a plazma bola uchovaná pri -80 °C. Celková hladina Hcy (tHcy) v plazme zvierat bola stanovená dvojureagenčnou enzymatickou metódou (Homocysteine liquidstable reagent kit, Erba Lachema, 50003526) pomocou chemického analyzátoru (Siemens ADVIA 1650) na ústave klinickej biochémie JLF UK a UNM v Martine.

Analýza metódou Western blot (WB)

Na separáciu proteínov, ktoré boli izolované z tkaniva mozgu sa použila metóda elektroforézy v polyakrylamidovom géli v prítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Po skončení separácie na SDS-PAGE sa gély inkubovali v transferovom pufrí (TGM) počas 5 minút, potom sa preniesli na nitrocelulóзовú membránu polosuchým prenosom [14]. Na overenie transferu proteínov na membrány a vylúčenie artefaktov sa membrány farbili počas 4 minút v Ponceau S. Membrány sa premyli v TBS-T a počas noci sa inkubovali v blokovačom roztoku zloženom z Bloto non-fat dry milk (2,5 % w/v, Santa Cruz) a TBS-T. Po blokovaní sa premyté membrány inkubovali na druhý deň 3 hodiny s primárnymi protilátkami pERK (riedenie 1:300, Santa Cruz) a p-p38 (riedenie 1:500, Santa Cruz). Po premývaní boli membrány 3 x 10 minút v roztoku TBS-T, za stáleho miešania v shakeri (Polymax 1040) sa membrány inkubovali 1 hodinu so sekundárnymi protilátkami (riedenie 1 : 1000 anti-mouse IgG-HRP a anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz). Membrány sa po následnom dôkladnom premytí roztokom TBS-T (3 x 10 minút) inkubovali 5 minút s roztokom ECL (Thermo Fisher Scientific) a chemiluminiscenčný signál v podobe príslušných pásikov bol detekovaný na prístroji Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad). Na vyhodnotenie intenzity signálov bola použitá bodová analýza použitím programu *Gene Tools* (SynGene).

Histologická analýza

Príprava tkaniva

Zvieratá boli anestetizované 2,5 % halotanom v zmesi 30 % O₂ a 70 % N₂O. V hlbokjej anestézii im bol otvorený hrudník, sprístupnené srdce, bola im uzavretá zostupná časť aorty v brušnej dutine. Zvieratám bola nastrihnutá pravá predsieň s následnou kanyláciou ľavej komory. Cez kanylu im bol peristaltickou pumpou aplikovaný fyziologický roztok v množstve približne 300 ml a následne 4 % paraformaldehyd v 0,1 mol/l fosfátovom tlmivom roztoku s pH 7,4. Na perfúziu sa tiež použilo 300 ml roztoku. Po perfúznej fixácii boli mozgy opatrne vypreparované a uložené v rovnakom fixačnom roztoku 24 hodín pri 4°C. Tkanivá boli uložené 24 hodín v 30% sacharóze a schladené na 4°C. Po postfixácii boli z mozgového tkaniva

narezané na kryocut-e (Thermo Fisher Scientific) rezy s hrúbkou 30 µm, rezy boli natiahnuté na silanizované sklá a uskladnené pri -20°C.

Flouro-Jade C

Degeneráciu buniek v mozgovom tkanive sme sledovali farbením s Fluoro-Jade C. Pred samotným farbením sme kryopreparáty vložili do termostatu t= 55°C na 30 minút. Po uplynutí tejto doby sme sklíčka s kryopreparátmi vložili do kyvety s 99% alkoholom. Po 3 min. sme sklíčka presunuli do kyvety so 70% alkoholom na 2 minúty. Následne sme sklíčka s preparátmi premyli v H₂O a presunuli do kyvety s 0,06% KMnO₄, kde sme ich inkubovali 15 minút. Po inkubácii v KMnO₄ sme sklíčka opäť premyli v H₂O a premiestnili do kyvety s farbiacim roztokom Fluoro-Jadu C, kde sme ich ponechali 2 hodiny. Po farbení sme sklíčka s preparátmi opäť premyli v H₂O (3x). Na prejasnenie preparátov sme sklíčka ponorili na 2 min. do xylénu a montovali do Fluoromontu (SERVA).

Vyhodnocovanie preparátov

Preparáty mozgu boli vyhodnocované konfokálnym mikroskopom OLYMPUS Fluoview FV10i pri zväčšení 400x. Intenzita fluorescencie degenerujúcich buniek bola hodnotená v M1 (primary motor cortex) kôrovej oblasti mozgu každého zvieraťa.

Matematické a štatistické vyhodnotenie

K štatistickému vyhodnocovaniu sme použili počítačový program GraphPad InStat V2.04a. Výsledky sme udávali ako priemerné hodnoty, rozptyl hodnôt nameraných údajov +- štandardnú chybu (SEM). Štatisticky významné odchýlky v skúmaných parametroch boli spracované metódou analýzy premenných (ANOVA), a rozdiely jednotlivých časových úsekov v jednotlivých skupinách zvierat sme vyhodnotili pomocou Studentovho-Newmanovho-Keulsovho testu. Rozdiely sa považovali za štatisticky významné pri hodnote p < 0,05.

Výsledky

Výšetrenia tHcy v plazme zvierat ukázali, že v kontrole so 14dňovou Hcy premedikáciou je hladina Hcy zvýšená oproti fyziologickým hodnotám Hcy v plazme potkanov kmeňa Wistar [15]. Nami stanovaná hladina Hcy v skupine s indukovanou hHcy bola 16,64 ± 1,38 µmol/l, pričom Martins a kol. [15] uvádzajú fyziologickú hodnotu hladiny Hcy v plazme 6mesačných samcov potkanov kmeňa Wistar 6,42 ± 1,65 µmol/l.

Pomocou metódy Fluoro-Jade C, ktorou je možné identifikovať dezintegrované nervové bunky sme zistili, že v samotnej kontrole s indukovanou hHcy v kôrovej oblasti dochádza k značeniu gliových elementov aj napriek nízkej afinite Fluoro-Jade k týmto bunkám [16-17]. Ďalej sme zistili, že 72hodinová reperfúzia v kombinácii s indukovanou hHcy vedie k poškodeniu neurónov v M1 kôrovej oblasti, pričom sme zistili štatisticky významný nárast počtu Fluoro-Jade C značených buniek na 122,4 násobok (36,7 ± 2,6; p< 0,001)

v porovnaní s kontrolou a na 28,2násobok ($1,3 \pm 0,1$; $p < 0,001$) v porovnaní s Hcy-C skupinou (obr. 1 A-D). Medzi IR skupinami so 72hodinovou reperfúziou s/bez indukovanej hHcy sme taktiež zaznamenali nárast počtu značených neurónov v skupine s indukovanou hHcy a to 36,7násobne ($1,1 \pm 0,2$; $p < 0,001$) viac ako v skupine bez Hcy ošetrenia (Obr. 1 E).

ko-reperfúznym (IR) poškodením a indukovanou hHcy s dobou reperfúzie 72 hodín. V porovnaní s kontrolou sme zistili pokles hladiny p-ERK o 49,9% ($p < 0,01$) a oproti kontrole s indukovanou hHcy sme sledovali pokles hladiny p-ERK o 73,7% ($p < 0,001$; obr. 2 A). Na druhej strane sme zistili, že po indukcii hHcy dochádza k aktivácii aj MAPK/p-p38 proteínu, ktorý je

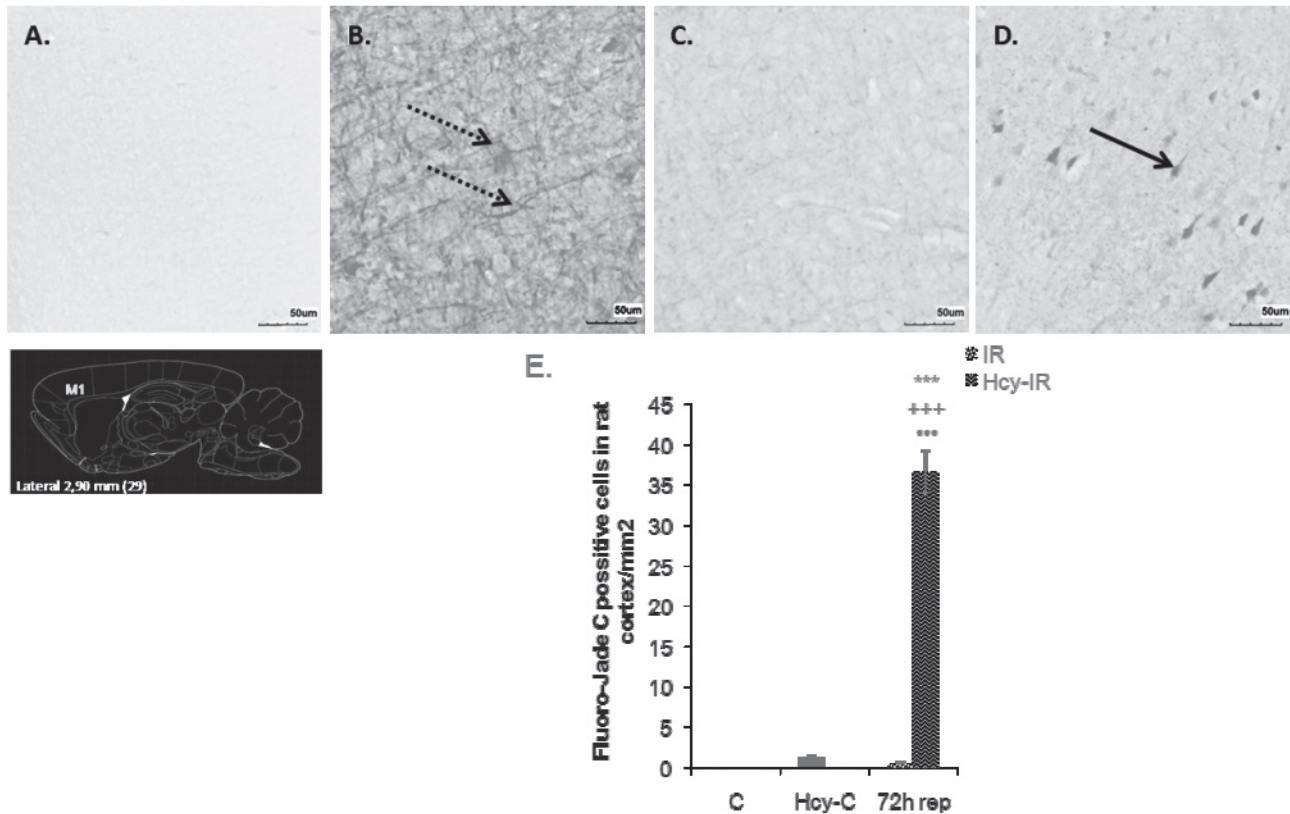


Fig. 1. Fluorescence micrographs and statistical evaluation of Fluoro-Jade C-labeled cells in cortical M1 region of rat forebrain after IR insult with/without induced hHcy. Micrographs of control (A.), control with induced hHcy (B.), IR-72h rep (C.) and Hcy-IR-72h rep (D.). The arrows indicate numbers of the fluorescent neurons in the M1 area whilst dashed arrows show glia elements. Bar = 50 μm, n = 5/group. (E.) Fluoro-Jade C positive neuronal cells in the cortical M1 region of rat forebrain in control group, control with induced hHcy and groups after 72 h reperfusion with/without hHcy. Comparison between control group, Hcy-C group and groups with 15 min. ischemia followed by 72 h reperfusion with/without Hcy treatment, respectively. Results are presented as mean ± SEM for n = 5/group, normalized to the control levels. *** $P < 0,001$ indicates statistically significant difference as compared to the control. +++ $P < 0,001$ means statistically significant difference as compared to the control with induced hHcy. *** $P < 0,001$ shows statistically significant difference between IR and Hcy-IR animals in the same time points.

Pre potvrdenie zmien na translačnej úrovni v mozgovom tkanive sme tkanivá analyzovali aj pomocou Western blot analýzy MAPK proteínov. Výsledky Western blot analýzy ukázali značný nárast hladiny MAPK/p-ERK proteínov v Hcy-C skupine v porovnaní s kontrolami bez indukovanej hHcy. V porovnaní s kontrolou sme zistili v Hcy-C skupine štatisticky významné zvýšenie hladiny proteínov o 87,9% ($p < 0,001$; obr. 2 A). Aktivovaný MAPK/ERK proteín je spájaný s protektívnymi účinkami na nervové tkanivo [14, 18-19] a v skupine s IR poškodením sme zistili štatisticky významný pokles hladiny p-ERK proteínu o 39,9% ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. V porovnaní s kontrolou s navodenou hHcy sme v IR-72h rep zaznamenali pokles aktivovaného MAPK/ERK až o 68,7% ($p < 0,001$). Podobné procesy sme zistili aj v skupine s ischemic-

spájaný s navodením bunkovej degenerácie [18-19]. Namerali sme zvýšenie hladiny tohto proteínu v Hcy-C skupine o 70% ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolnou skupinou (obr. 2 B). V IR-72h rep skupine sme zistili nárast aktivovaného p-p38 o 190% ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou a o 70,6% ($p < 0,001$) v porovnaní s Hcy-C skupinou. Štatisticky najvýznamnejšie zmeny sme pozorovali v Hcy-IR-72h rep skupine, kde sa hladina p-p38 zvýšila o 220% ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou a o 88% ($p < 0,001$) v porovnaní s kontrolou s indukovanou hHcy ($p < 0,001$; obr. 2 B). Medzi skupinami po IR s/bez hHcy sme pri oboch sledovaných proteínoch štatisticky významné zmeny nezistili, ale v skupine s indukovanou hHcy v kombinácii s IR poškodením boli zmeny v hladinách oboch sledovaných proteínov výraznejšie.

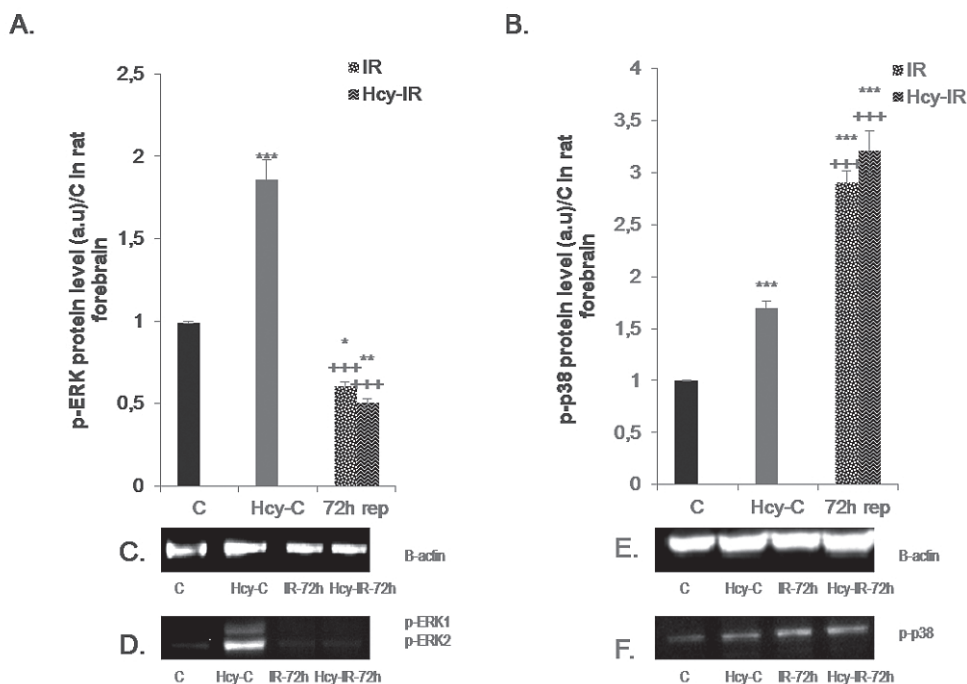


Fig. 2. Western blot analysis of p-ERK and p-p38 in whole brain homogenates. (A.) Western blot band density of p-ERK1/2 brain homogenates after 15 min. ischemia and 72 h reperfusion with/without Hcy treatment. Comparison between control group, control with Hcy treatment and groups with 15 min of ischemia and 72 h reperfusion with/without induced hHcy, respectively. Results are presented as mean \pm SEM for $n = 5$ /group, normalized to the control levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ show statistically significant difference as compared to the control. +++ $P < 0.001$ indicates statistically significant difference as compared to the control with induced hHcy. (B.) Western blot band density of p-p38 in the brain homogenates after 15 min. ischemia and 72 h reperfusion with/without Hcy treatment. Comparison between control group, control with Hcy treatment and groups with 15 min of ischemia and 72 h reperfusion with/without induced hHcy, respectively. Results are presented as mean \pm SEM for $n = 5$ /group, normalized to the control levels. *** $P < 0.001$ shows statistically significant difference as compared to the control. +++ $P < 0.001$ indicates statistically significant difference as compared to the control with induced hHcy. (C.) Western blot of β -Actin. (D.) Western blot of p-ERK. (E.) Western blot of β -Actin. (F.) Western blot of p-p38.

Diskusia

Alzheimerova choroba patrí k najkomplikovanejším formám progresívnej neurodegenerácie. Vzhľadom k tomu, že vhodný liek na liečbu AD ešte stále absentuje, mnohé štúdie naznačujú, že je dôležité študovať modifikovateľné rizikové faktory, ktoré môžu rozvoj AD pozastaviť. Jeden z týchto faktorov môže predstavovať zvýšená hladina Hcy [1-14,20-25].

V našej práci sme sa zamerali na štúdium vplyvu globálnej mozgovej ischémie na selektívne vulnérabilné neuróny, ktoré sú citlivejšie na IR poškodenie ako aj na ich neurodegeneratívne zmeny. Zaujímalo nás, či 14dňovou subkutánnou aplikáciou Hcy dokážeme u laboratórných zvierat vyvolať hHcy a či následná indukcia IR inzulntu bude mať na nervové tkanivo neurodegeneratívne účinky. Chemicky vyvolaná hHcy, ktorá bola zvieratám navodená zodpovedala koncentrácii Hcy nameranej pacientom s homocysteinúriou a dosahovala hodnoty miernej hHcy [15, 27]. V našej predchádzajúcej práci [27] sme zistili priamy vplyv Hcy na kontraktilitu myokardu a dezintegráciu samotných kardiomyocytov. Rovnako bol dokázaný priamy efekt Hcy na endotel ciev obličiek pacientov s renálnym zlyhaním, pričom Hcy atherogénny efekt ostatných štandardných rizikových faktorov zvyšoval [28]. V našich prácach sme dokázali negatívnu koreláciu medzi IR poškodením

a chemicky indukovanou hHcy, pričom v závislosti od sily a dĺžky trvania inzulntu, ako aj ich kombinácie, sa rozvoj degenerácie nervového tkaniva potencioval [14, 20-22].

Naše výsledky naznačujú, že hHcy v kombinácii s IR inzulntom môže viesť k znižovaniu objemu kortikálnej hmoty, čo podporujú aj výsledky klinických [3, 10-11, 25] ako aj experimentálnych štúdií [14,23]. Zvýšená hladina Hcy bola tiež signifikantne asociovaná so známami ranej fázy AD pri aterosklerotických zmenách karotíd alebo s léziami v bielej hmote [3]. Aj napriek mnohým experimentom, či v klinickej alebo experimentálnej medicíne, nie je stále celkom jasné, či sa hHcy dá považovať za rizikový faktor vzniku AD [1, 3, 5, 8-11, 25].

Z literatúry je známe, že zmeny v intracelulárnych signalizačných dráhach zohrávajú dôležitú úlohu v mechanizmoch poškodenia/protektie nervových buniek po inzulnte [14, 18-23, 26, 28], preto sme ďalej v našej práci študovali jednu z MAPK dráh. V našich experimentoch sme potvrdili aktiváciu MAPK/ERK dráhy následkom hHcy ako aj IR inzulntu. Následne je aktivovaný MAPK/p-ERK translokovaný do jadra, kde aktivuje transkripčné faktory, ktoré zabráni nástupu bunkovej smrti [13, 18-19, 26]. Na druhej strane sme sledovali tiež aktiváciu MAPK/p-p38, ktorá súvisí s navodením smrti buniek [18-19]. Naše výsledky naznačujú, že

umelo indukovaná hHcy v neurónoch aktivuje „cross-talk“ mechanizmus medzi oboma MAPK dráhami, kedy záleží od sily a dĺžky trvania inzultu [14, 18-19]. Poddar a Paul [23], pri experimentoch na bunkových líniách nervového tkaniva za podmienok *in vitro* zistili, že po chemickej indukcii hHcy dochádza k aktivácii MAPK/ERK ako aj MAPK/p38 dráhy. Títo autori ďalej uvádzajú, že v závislosti od typu, intenzity a dĺžky pôsobenia inzultu je aktivita MAPK/ERK dráhy spočiatku vysoká, ale postupne klesá a je nahradená aktivovaním iných dráh, ktoré súvisia s navodením bunkovej smrti, alebo nástupom zápalovej reakcie [18-19, 23]. V našej predchádzajúcej práci sme zistili podobný trend v kardiomyocytoch po indukcii hHcy [26]. Na základe našich výsledkov aj výsledkov Poddara a Paulovej [23] predpokladáme, že k podobnej situácii dochádza v nervovom tkanive aj za podmienok *in vivo*. Z našej práce ako aj z prospektívnych štúdií [25] vyplýva, že za predpokladu, že Hcy zohráva významnú úlohu pri rozvoji demencie Alzheimerovho typu, znižovanie hladiny Hcy v plazme by mohlo mať určitý protektívny účinok. Rovnako by sa znižovaním hladiny plazmatického Hcy dalo preventívne pôsobiť voči mozgovej ischémii [14, 20-22] alebo zlepšiť následné neuropatologické prejavy [9, 25]. Hlbšie poznanie podstaty molekulovo-biologických mechanizmov prebiehajúcich v bunkách pri IR poškodení mozgu v asociácii s hHcy by mohlo v budúcnosti prispieť k zefektívneniu terapie pacientov po ischemickom inzulte v možnej spojitosti s neurodegeneratívnymi zmenami v mozgu.

Záver

Indukovaná hHcy vedie k poškodeniu buniek glie v mozgovej kôre. Indukovaná hHcy v kombinácii s ischémiou prispieva k rozvoju neurodegeneratívnych zmien v III. a V. vrstve mozgovej kôry. Počas indukovanej hHcy v spojitosti s IR inzultom dochádza k aktivácii oboch MAPK dráh, pričom neskorší rozpad p-ERK je charakteristický pre rozvoj AD. Naše výsledky naznačujú, že tento kombinovaný model poškodenia nervového tkaniva môže viesť k rozvoju zmien, s ktorými sa stretávame pri demencii Alzheimerovho typu. V budúcich prácach sa v tomto modeli poškodenia zameriame na detekciu proteínov, ktoré priamo súvisia s rozvojom AD. Uvedené výsledky v konečnom dôsledku môžu ovplyvniť terapeutický prístup k pacientom s neurodegeneratívnymi ochoreniami.

Prehľad literatúry

1. **Georges, J., Jansen, S., Jackson, J. et al.** Alzheimer's disease in real life--the dementia carer's survey. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 2008, 23 (5), p. 546-551.
2. **Filipcik, P., Cente, M., Ferencik, M. et al.** The role of oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Bratisl. Lek. Listy*, 2006, 107 (9-10), p. 384-394.
3. **Babusikova, E., Evinova, A., Jurecekova, J. et al.** Alzheimer's Disease: Definition, Molecular and Genetic Factors. In: Chang, R. C. C. 2012. *Advanced Under-*

standing of Neurodegenerative Diseases, InTech, p. 442, ISBN 978-953-307-529-7

4. **Rabameda, L. G., Carrasco, M., López-Toledano, M. A. et al.** Homocysteine inhibits proliferation of neuronal precursors in the mouse adult brain by impairing the basic fibroblast growth factor signaling cascade and reducing extracellular regulated kinase 1/2-dependent cyclin E expression. *FASEBJ.* 2008, 22 (11), p. 3823-35.
5. **Van Dam, F., Van Gool, W. A.** Hyperhomocysteinemia and Alzheimer's disease: a systematic review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2009, 48 (3), p. 425-430.
6. **Williams, J. H., Pereira, E. A. C., Budge, M. M. et al.** Minimal hippocampal width relates to plasma homocysteine in community-dwelling older people. *Age Ageing*, 2002, 31, p. 440-444.
7. **Zhang, C. E., Tian, Q., Wei, W. et al.** Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiol Aging*, 2008, 29 (11), p. 1654-65.
8. **Darvesh, S., Walsh, R., Martin, E.** Homocysteine thio-lactone and human cholinesterases. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2007, 27, p. 33-48.
9. **Farkas, M., Keskitalo, S., Desiree, E. C., Smith, D. E. C. et al.** Hyperhomocysteinemia in Alzheimer's Disease: The Hen and the Egg? *J Alzheimers Dis.*, 2013, 33 (4), p. 1097-104.
10. **Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F. et al.** Homocysteine and cognitive performance in healthy elderly subjects. *Mech. Ageing Dev.*, 2000, 121, p. 251-261.
11. **Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J. et al.** Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl. J Med.*, 2002, 346, p. 476-483.
12. **Linnebank, M., Popp, J., Smulders, Y. et al.** S-adenosylmethionine is decreased in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.*, 2010, 7 (6), p. 373-8.
13. **Matté, C., Mussulini, B. H. M., Santos, T. M. et al.** Hyperhomocysteinemia reduces glutamate uptake in parietal cortex of rats. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2010, 28 (2), p. 183 - 187.
14. **Kovalská, M., Kovalská, L., Furjelová, M. et al.** Indukovaná hyperhomocysteinémia a ischemické poškodenie mozgu. *Slovenský lekár*, 2012, 22 (3-4), p. 46-51.
15. **Martins, P. J. F., Galdieri, L. C., Souza, F. G. et al.** Physiological variation in plasma total homocysteine concentrations in rats. *Life Sci.*, 2005, 76, p. 2621-2629.
16. **Anderson, K. J., Fugaccia, I., Scheff, S. W.** Fluoro-jade B stains quiescent and reactive astrocytes in the rodent spinal cord. *J Neurotrauma.*, 2003, 20 (11), p. 1223-31.
17. **Orendáčová, J., Ondrejčá, T., Kuchárová, K. et al.** Fluoro-Jade B Evidence of Induced Ischemic Tolerance in the Rat Spinal Cord Ischemia: Physiological, Neurological and Histopathological Consequences. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2005, 24, p. 75-87.
18. **Kovalska, M., Kovalska, L., Mikuskova, K. et al.** P-erk involvement in the neuroprotection exerted by ischemic preconditioning in rat hippocampus subjected to four vessel occlusion. *J Physiol. Pharmacol.*, 2014, 65 (6), p. 767-776.
19. **Kovalska, M., Kovalska, L., Pavlikova, M. et al.** Intracellular signaling MAPK pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury. *Neurochem. Res.*, 2012, 37, p. 1568-1577.
20. **Pavlikova, M., Kovalska, M., Tatarkova, Z. et al.** Response of secretory pathways Ca2+ATPase gene expression to hyperhomocysteinemia and/or ischemic preconditioning in rat cerebral cortex and hippocampus. *Gen. Physiol. Biophys.*, 2011, 30, p. S61-S69.

21. **Petras, M., Tatarkova, Z., Kovalska, M. et al.** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *J Physiol. Pharmacol.*, 2014, 65, p. 15–23.
22. **Lehotsky, J., Petras, M., Kovalska, M. et al.** Mechanisms involved in the ischemic tolerance in brain: effect of the homocysteine. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2015, 35 (1), p. 7-15.
23. **Poddar, R., Paul, S.** Novel crosstalk between ERK MAPK and p38 MAPK leads to homocysteine-NMDA receptor-mediated neuronal cell death. *J Neurochem.*, 2013, 124, p. 558-70
24. **Zhang, W., Sun, K., Chen, J. et al.** High plasma homocysteine levels contribute to the risk of stroke recurrence and all-cause mortality in a large prospective stroke population. *J Mol. Med.*, 2010, 16 (7-8), p. 307-315.
25. **Herrman, W., Obeid, R.** Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2011, 49 (3), p. 435-441.
26. **Kovalska, M., Kovalska, L., Kaplan, P. et al.** Vplyv indukovanej hyperhomocysteinémie na kardiomyocyty v experimentálnom modeli. *Klin. Biochem. Metab.*, 2014, 22 (43)/2, p. 81–86.
27. **Brattström, L., Wilcken, D. E.** Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am. J Clin. Nutr.*, 2000, 72 (2), p. 315-23.
28. **Yue, T. L., Wang, C., Gu, J. L. et al.** Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ. Res.*, 2000, 86, p. 692–699.
29. **Paxinos, G., Watson, C.** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, London, 2006, <http://www.scribd.com/doc/22822097/Rat-Brain-Atlas>. Accessed 26 June 2012

Táto práca bola podporená projektmi VEGA 00213/12 a 00229/15.

Do redakce došlo 4. 6. 2015

*Adresa pro korespondenci
RNDr. Mária Kovalská, Ph.D.
Univerzita Komenského v Bratislave
Jesseniova lekárska fakulta v Martine
Ústav histológie a embryológie
Malá Hora 4
036 01 Martin
e-mail: kovalska@jfmed.uniba.sk*