



Středoškolská technika 2022

**Setkání a prezentace prací středoškolských
studentů na ČVUT**

SUBARACHNOIDÁLNÍ KRVÁCENÍ A ZMĚNY PERMEABILITY HEMATOENCEFALICKÉ BARIÉRY PŘI ZÁNĚTLIVÉ REAKCI

**Subarachnoid hemorrhage and changes of the blood
brain barrier permeability during an inflammation**

**Purkyňovo gymnázium, Strážnice, Masarykova 379
Jihomoravský kraj**

Konzultant: doc. MUDr. Marek Joukal, Ph.D.

Martin Kaleta

2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou výzkumnou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Strážnici dne 1.2.2022

.....
Martin Kaleta

Poděkování

Především bych chtěl poděkovat svému školiteli panu doc. MUDr. Marku Joukalovi, Ph.D., přednostovi Anatomického ústavu Masarykovy univerzity, za vlídný a profesionální přístup, trpělivost, zasvěcení do problematiky a cenné rady a konzultace při tvorbě mé práce. Také chci poděkovat Anatomickému ústavu a Lékařské fakultě Masarykovy univerzity za příležitost pracovat na tomto tématu. Hlavně bych chtěl poděkovat své paní profesorce RNDr. Janě Hálkové, díky které jsem se do výzkumu zapojil, a po celou dobu studia mi byla velkou oporou.

Anotace

Mozek je od periferního oběhového systému oddělen vysoce specifickým rozhraním hematoencefalické bariéry. Funkcí této bariéry je udržovat homeostázu v mozku, bránit vstupu patogenům a regulovat transport živin. Tato práce se zabývá změnami prostupnosti bariéry krev-mozek po krvácivé cévní mozkové příhodě, konkrétně po subarachnoidálním krvácení. Při různých úrazech či onemocněních dochází k patologickým změnám ve stavbě hematoencefalické bariéry, které mohou vézt k porušení její hlavní vlastnosti, selektivní permeability. K subarachnoidálnímu krvácení, na které se moje práce zaměřuje, dojde vždy kvůli prasknutí cévy v mozku. To může nastat dvěma způsoby. Nejčastěji je krvácení vyvoláno rupturou aneurysmatu, ke které dochází například vlivem zvýšeného krevního tlaku. Krev, která je vháněna z prasklé cévy do mozku, způsobuje stažení okolních cév a tzv. vazospasmus. Následně pak nastává nedokrvení určité části mozkové tkáně. Přítomnost rozpadových krve produktů po krvácení povolá prozánětlivé cytokiny, které zde spouštějí akutní zánět a mohou způsobit další spazmy cév (Lucke-Wold et al. 2016).

Hlavní část mojí práce se zaměřila na změny v expresi prozánětlivého cytokinu TNF- α a expresi proteinu těsných spojů Klaudin-5 v endoteliích mozkových kapilár. Experimenty byly pozorovány na zvířatech 1,3,7 a 14 dnů po prodělání subarachnoidálního krvácení (SAK) a po aplikaci umělého mozkomíšního moku (ACSF). Nejvyšší koncentrace cytokinu TNF- α byla zaznamenána pro obě skupiny zvířat v prvních periodách po SAK, což svědčí o silném zánětu. U skupiny ACSF byly pozorovány účinky zvýšení intrakraniálního tlaku nezávisle na přítomnosti krve. Zjistil jsem, že TNF- α je aktivován také v důsledku zvýšení intrakraniálního tlaku. Při sledování těsných spojů HEB výsledky prokázaly, že dochází k mírnému poklesu Klaudinu-5. Z toho můžeme konstatovat, že na úrovni Klaudinu-5 došlo k mírnému zvýšení propustnosti hematoencefalické bariéry.

Klíčová slova

Hematoencefalická bariéra; subarachnoidální krvácení; zánětlivá reakce; cytokiny TNF α

Annotation

The brain is separated from the peripheral circulatory system by a highly specific blood-brain barrier interface. The function of this barrier is to maintain homeostasis in the brain, prevent the entry of pathogens and regulate the transport of nutrients. This work deals with changes in the permeability of the blood-brain barrier after a hemorrhagic stroke, specifically after subarachnoid hemorrhage. In various injuries or diseases, pathological changes occur in the structure of the blood-brain barrier, which can lead to a violation of selective permeability. The subarachnoid hemorrhage that my work focuses on always occurs due to a ruptured blood vessel in the brain. This can happen in two ways. Most often, bleeding is caused by a rupture of the aneurysm, which occurs, for example, due to increased blood pressure. The blood that is blown from a ruptured blood vessel into the brain causes the surrounding blood vessels to constrict and the vasospasm. Subsequently, there is no blood flow to a certain part of the brain tissue. The presence of breakdown blood products after bleeding invokes pro-inflammatory cytokines, which trigger acute inflammation here and can cause further vasculature spasms (Lucke-Wold et al. 2016).

The main part of my work is focused on changes in the expression of the proinflammatory cytokine TNF- α and the expression of the Klaudin-5 tight junction protein in the endothelium of brain capillaries. The experiments were observed in animals 1, 3, 7 and 14 days after subarachnoid hemorrhage (SAK) and after application of artificial cerebrospinal fluid (ACSF). The highest concentration of the cytokine TNF- α was recorded for both groups of animals in the first periods after SAK, indicating severe inflammation. In the ACSF group, the effects of increasing intracranial pressure were observed independent of the presence of blood. I found that TNF- α is also activated due to an increase in intracranial pressure. When monitoring HEB tight junctions, the results showed a slight decrease in Klaudin-5. From this we can state that at the level of Klaudin-5 there was a slight increase in the permeability of the blood-brain barrier.

Keywords

Blood-brain barrier; subarachnoid hemorrhage; inflammatory reaction; cytokines TNF α

Obsah

1 SEZNAM ZKRATEK	8
2 CÍLE PRÁCE	9
3 ÚVOD DO PROBLEMATIKY	10
3.1 Mozkové pleny	10
3.1.1 Dura mater.....	10
3.1.2 Arachnoidea	10
3.1.3 Pia mater.....	10
3.2 Mozkomíšní mok.....	11
3.2.1 Cirkumventrikulární orgány	12
3.3 Ochranné bariéry mozku	13
3.3.1 Hematolikorová bariéra.....	13
3.3.2 Hematoencefalická bariéra	13
3.3.2.1 Mezibuněčné spoje bariér mozku	14
3.3.2.2 Neurovaskulární jednotka	17
3.3.2.3 Struktura HEB.....	18
3.3.2.4 Transportní systém HEB.....	19
3.3.2.5 Důsledky vzniklé poškozením HEB	20
3.4 Zánětlivá reakce v rámci HEB.....	21
3.5 Cévní mozkové příhody.....	23
3.5.1 Subarachnoidální krvácení	23
3.5.1.1 Vznik SAK.....	25
3.5.1.2 Aneurysmata	25
3.5.1.3 Arterio-venózní malformace	26
3.5.1.4 Komplikace SAK.....	27
3.5.1.5 Incidence po SAK.....	29
4 MATERIÁL A METODIKA	30
4.1 Zvířata a biologický materiál.....	30
4.2 Chirurgické zákroky	30
4.3 Zpracování vzorků.....	31

4.3.1	Imunofluorescenční barvení	32
4.4	Analýza obrazu	32
4.5	Statistické vyhodnocení	33
5	VÝSLEDKY	34
5.1	Exprese Claudinu 5 v endoteliích po SAK.....	34
5.2	TNF α po SAK.....	36
6	DISKUZE	38
7	ZÁVĚR	41
	Seznam použitých zdrojů	42
	Seznam obrázků	51
	Seznam grafů	52
	Seznam tabulek	53

1 SEZNAM ZKRATEK

ACSF	<i>artificial cerebro spinal fluid</i> – umělejší mozkomíšní mok
ATP	adenosintrifosfát
AVM	arterio-venózní malformace
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava
CP	choroidální plexus
CPP	<i>cerebral perfusion pressure</i> – mozkový perfuzní tlak
CSF	<i>cerebro-spinal fluid</i> – mozkomíšní mok
CVO	cirkumventrikulární orgány
DCI	<i>delayed cerebral ischemia</i> – zpožděná mozková ischemie
EC	<i>endothelial cells</i> – buňky endotelu
GLUT	<i>glucose transporter</i> – přenašeč pro glukosu
HEB	hematoencefalická bariéra
ICK	intrakraniální krvácení
ICP	<i>intracranial pressure</i> – nitrolební/intrakraniální tlak
ISUIA	<i>International study of unruptured intracranial aneurysms</i>
JAMs	junkční adhezní molekuly
NVU	<i>neurovascular unit</i> – neurovaskulární jednotka
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> – adhezní proteiny krevních destiček
PNS	periferní nervový systém
SAK	subarachnoidální krvácení
SLGT	<i>sodium glucose transporter</i> – transportér sodné glukosy
TIA	tranzitorní ischemická ataka
TJ	<i>tight junctions</i> – těsné spoje
TMP	transmembránové proteiny
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
VRS	Virchowovy-Robinovy prostory
ZO	protein <i>Zonula occludens</i>

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat změny v expresi pro-inflamačního cytokinu TNF α , který se podílí na akutní tvorbě zánětu a jeho regulaci v období po SAK. Dalším cílem bylo zjistit, zdali po subarachnoidálním krvácení dochází ke změnám v propustnosti HEB na úrovni proteinu těsných spojů Klaudinu-5. Přítomnost krve při ruptuře cévy v subarachnoidálním prostoru vede ke dvěma závažným patofyziologickým faktorům. Těmito faktory jsou zvýšení intrakraniálního tlaku a účinky rozpadových produktů hemoglobinu s probíhajícím zánětem. V této práci jsem se zaměřil na oba z nich z různých úhlů pohledu.

Osobním cílem pro mě bylo seznámení s vědeckou prací a zpracování odborné literatury. Jako další cíl jsem si stanovil osvojit si základní laboratorní a analytické metody používané při zkoumání mozkové tkáně.

3 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

3.1 Mozkové pleny

Mozek a hřbetní mícha jsou na svém povrchu kryty třemi obaly. Tyto obaly zajišťují ochranu a krevní zásobení centrálního nervového systému (CNS). Tyto pleny vznikají z ektomezenchymu hlavy. Pleny mají své mízní cévy, mozek mízní drenáž neobsahuje. Lymfu zde zastupuje mozkomíšní mok (CSF) cirkulací kolem cév v perivaskulárních prostorech, které pak navazují na Virchowovy-Robinovy prostory, kde se nachází intersticiální tekutina (Ambler 2011).

3.1.1 Dura mater

Zevní obal, vazivová *dura mater* (tvrdá plena) přiléhá pevně k vnitřní okostici lebečních kostí (*dura mater encephali*) a v otvoru týlním přechází v trubicovitý vak kolem hřbetní míchy (*dura mater spinalis*). Jedná se o cévně zásobenou vazivovou membránu tvořenou kolagenním vazivem. Tepny spolu s žilami probíhají v hloubce pleny, žilní krev je odváděna z CNS pomocí venózních splavů (*sinus durae matris*), které jsou uloženy v řasách *dura mater*. Tvrdá plena v dutině lebeční tvoří vazivové přepážky, mezi oběma hemisférami a mozečkem. Při poranění kostí lebky může dojít ke vzniku krváčení z meningeálních tepen tvrdé pleny mozkové, které se pak označuje jako epidurální a v jeho důsledku může dojít k odloučení tvrdé pleny od kosti (Čihák et al. 2001).

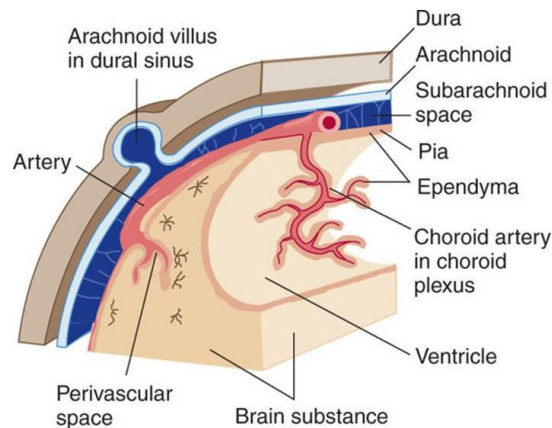
3.1.2 Arachnoidea

Pod *dura mater* se nachází tenká blána *arachnoidea* (pavučnice), která svým vzhledem připomíná pavučinu. Zevně přiléhá k *dura mater* a na rozdíl od omozečnice nelze k povrchu mozku. Výživu této pleny zajišťují velmi jemné cévy, které tvoří spojku mezi *dura mater* a *pia mater*. Větší cévy zde chybí, a proto můžeme říct, že je arachnoidea z makroskopického hlediska bezcévná. Mezi *dura mater* a *arachnoideou* se nachází subdurální prostor (*spatium subdurale*)(Čihák et al. 2001).

3.1.3 Pia mater

Omozečnice (*pia mater*) je tenká a jemná vazivová blána, která těsně pokrývá nerovnosti mozku a míchy. Tato blána zajišťuje ochranu a krevní zásobení cévami, které z *pia mater* pronikají do

tkáně CNS (Biaggioni a Kaufmann 2003). Omozečnice vytváří podklad pro *plexus choroideus*, který je tvořen z vazivové ploténky – *tela choroidea*. Kolem cév vstupujících do mozkové tkáně jsou vytvořeny tzv. Virchowovy-Robinovy prostory (perivaskulární prostory), které plní hlavně funkci kompenzace objemových změn cév při tepové vlně. Mezi pavučnicí a omozečnicí se nachází subarachnoidální prostor (*spatium subarachnoideum*), který je zcela vyplněn mozkomíšním mokem, který sem přitéká skrze stropní otvory IV. komory mozkové (Čihák et al. 2001).



Obrázek 1: Leptomeningeální vrstva - Mozkové pleny, perivaskulární prostory navazující na Virchowovy-Robinovy prostory (převzato z Waxman 2010).

3.2 Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok (*liquor cerebrospinalis*, CSF) je specifická extracelulární tělní tekutina tvořící se z krevní plazmy v *plexus choroideus* (CP) mozkových komor. Tato tekutina vyplňuje mozkové komory a subarachnoidální prostor (prostor mezi pia mater a arachnoideou). Mok obsahuje bílkoviny (200 – 400 mg/l), glukózu (2,5 - 4,5 mmol/l) a soli plazmy, pH je 7,33. Objem CSF se pohybuje kolem 180 ml a pouze čtvrtina se nachází v dutinách. Přibližná denní produkce je až 500 ml. Cirkulace CSF začíná v laterálních komorách, odkud putuje přes III. a IV. mozkovou komoru do subarachnoidálního prostoru. Zde se pak mok se vstřebává hlavně v *granulationes arachnoideae Pacchioni* a ve VRS do žilních splavů CNS (Agamanolis 2020).

Hlavní funkce mozkomíšního moku je mechanická ochrana. Mozková i míšní tkáň je velmi jemná a citlivá a vlastní vahou by se i při běžných pohybech mohla poškodit. Orgány CNS v mozkomíšním moku „plavou“. Tím pádem víme, že vlivem vztlakové síly z Archimedova zákona mok nadlehčuje centrální nervstvo a hmotnost mozku je podstatně menší než bez této tekutiny. Skrze perivaskulární prostory tedy likvor komunikuje přímo s intersticiální tekutinou (Trojan 2003). Svým konstantním prostředím zajišťuje mok homeostázu CNS. Další důležitá funkce je lymfatická, protože CSF svým způsobem nahrazuje lymfu v CNS.

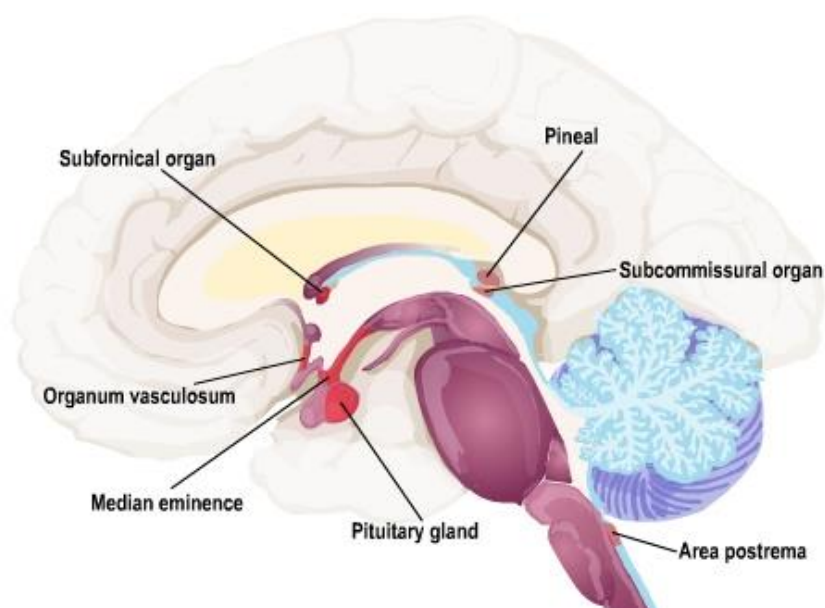
DÍLČÍ SOŽKA	HODNOTA	DÍLČÍ SOŽKA	HODNOTA
	<i>mg/100ml</i>		<i>mmol/kg</i>
Glukóza	50 - 65	Na ⁺	147
Bílkoviny	16 - 38	K ⁺	2,86
Kreatin	0,5 - 2,2	Ca ²⁺	1,14
Urea	12	Mg ²⁺	1,1
Cholesterol	0,2	Cl ⁻	113

Tabulka 1: Složení CSF je klíčové pro homeostázu mozku (Stephen B Hladky 2014, upraveno).

3.2.1 Cirkumventrikulární orgány

V určitých oblastech mozkových komor najdeme místa s fenestrovaným endotelem a tancyty, kde je hematoencefalická bariéra (HEB) neúplná. Tyto části mozku nazýváme cirkumventrikulární orgány (CVO) a členíme je do dvou skupin. Prvně zmíníme senzoričké CVO sloužící k detekci homeostatických změn v systémové cirkulaci, které kontrolují koncentrace hormonů a ostatních látek a jako odpověď může mozek přímo provádět nutné ochranné fyziologické procesy. K těmto orgánům patří subfornický orgán, *organum vasculosum laminae terminalis* a *area postrema*.

Dalším typem CVO jsou sekreční orgány, které jsou zodpovědné za vylučování hormonů a glykoproteinů přímo do krve nebo CSF. Konkrétně jde o neurohypofýzu, epifýzu, subkomisurální orgán a *eminentia medialis* (Brian a Michael 2015).



Obrázek 2: Umístění sekrečních a senzoričkých CVO (převzato z Dash 2010).

3.3 Ochranné bariéry mozku

Centrální a periferní nervový systém (CNS, PNS) je velmi zranitelný a citlivý vůči látkám na něj působícím. Proto vznikly velmi specializované struktury oddělující nervové buňky od krve a likvoru. Tyto struktury chrání nervovou tkáň před toxickými a patogenními látkami, zařizují nutriční transport a brání potenciálně škodlivým molekulám. Buněčné bariéry tvoří hranici mezi tělními tekutinami a tkání CNS. Rozlišujeme hematolikvorovou bariéru (HLB), hematomíšní bariéru (HMB), hematoneurální bariéru (HNB) a hematoencefalickou bariéru (HEB), kterou se v této práci budeme zabývat nejvíce (Piřha 2014).

3.3.1 Hematolikvorová bariéra

Mozkomíšní mok je produkován skrze meningy a přes stěnu *Plexus choroideus*, kde probíhají cévy. Endotel těchto cév obsahuje fenestrované kapiláry, přes které pronikají molekuly. Chorioideální plexus (CP) je složen ze dvou částí – nejhluběji najdeme vrstvu kubických endymových buněk, (specializované gliové buňky), které produkují CSF do komor. Ke zvětšení povrchu endymu slouží výběžky *microvilly* umístěny na apikální straně těchto buněk. Tyto buňky jsou k sobě spojeny těsnými spoji typu *zonula occludens* a desmozomy. Z bazální strany je endym kryt bazální membránou, která je připojena k cévně zásobené *pia mater* (Byrne 2020). Krevní průtok je zde asi 10x rychlejší než v ostatních cévách mozku. Vývoj CP začíná v 6. až 7. týdnu těhotenství a pokračuje do 40. týdne vývoje (Johanson et al. 2011). CP je tedy poměrně prostupná a fenestrovaná bariéra, která CNS zásobuje nutričními látkami a spolu s HEB se podílí na homeostáze mozku.

3.3.2 Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra (HEB) je specifické biologické rozhraní, které odděluje mozek od periferního oběhového systému. Funkcí této bariéry je udržovat homeostázu v mozku, bránit vstupu potenciálně škodlivým látkám, a regulovat transport živin (Trojan 2003).

První vrstvou, která snižuje propustnost HEB je endotel kontinuálního typu. Endotelové buňky (EC), které tvoří stěnu cévy jsou k sobě připoutány pomocí adhezních a těsných spojů *zonula occludens*. Sílu a průměr cévy ovlivňuje počet vrstev EC, kapilára může mít vrstvu jen jednu. Na rozdíl od ostatních vlásečnic, kde probíhá látková výměna skoro bez omezení endotel HEB postrádá póry. EC mozku jsou k sobě připoutány pomocí těsných spojů *Tight junctions* (TJ). Těsná spojení selektují a výrazně redukují libovolný průnik látek endotelem – snižují pasivní

paracelulární difúzi (Abbott 2002; Junqueira a Mescher 2010; Wachter et al. 1975). Tento endotel má pak kolem sebe pericyty a souvislou bazální laminu, která zpevňuje abluminální povrch. Pericyty jsou zde dalším pomocným regulantem HEB, regulují také krevní průtok a fagocytují patogeny nebo rozpadlé buňky. Poslední vrstvu HEB tvoří oploštělé výběžky astrocytů, které přiléhají na bazální laminu kapilár (*membrana limitans gliae perivascularis*). Astrocyty se pak svými dalšími výběžky dotýkají povrchu neuronů a tím umožňují látkovou výměnu. Pasivní pohyb ve vodě rozpustných látek skrze HEB je díky těsným spojmům mezi endotelovými buňkami zanedbatelný. Naopak činidla rozpustná v tucích difundují přes HEB snadno (Ballabh et al. 2004).

3.3.2.1 Mezibuněčné spoje bariér mozku

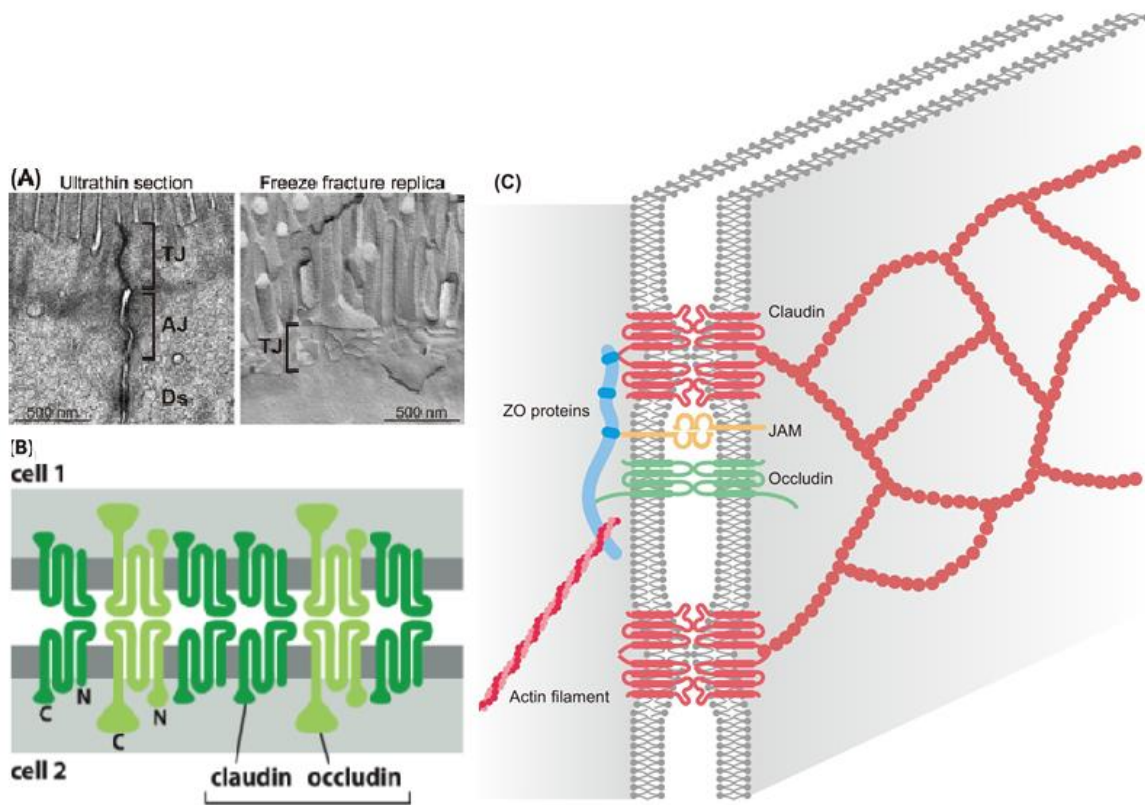
Základní funkcí endotelu cév mozku je oddělení tělních tekutin od okolní tkáně. Další funkcí je regulace výměny látek mezi nimi. U běžného endotelu cév je intercelulární prostor mezi buňkami široký asi 20 nm a obsahuje póry. Mozkové kapiláry jsou odlišné – obsahují více mitochondrií, než běžné kapiláry a intercelulární prostor není porézní. Tyto prostory jsou vyplněny speciálními spoji, které podle jejich funkce klasifikujeme do tří kategorií na kohezní spoje zonula adhaerens (pásový desmozom) či macula adhaerens (bodový desmozom), dále na spoje komunikační gap junctions a v neposlední řadě jsou tvořeny okluzními spoji. Tato práce je zaměřena na okluzní (uzavírající) buněčné spoje zonula occludens. Tyto buněčné spoje jsou z makroskopického hlediska tvořeny systémem úzkých krist, které obkružují celou buňku. U některých sousedních buněk dojde ke splnutí membrán díky transmembránovým proteinům (TMP), ty jsou tvořeny komplexem proteinů tight junctions (TJ) (Abbott et al. 2006).

EC mozku obsahují membránu na dvou stranách. Mezi povrchem apikální (neboli luminální – směr do cévy) a basolaterální (abluminální – směrem do mozku) membrány EC existuje polarita. To znamená, že jedna strana komunikuje přímo s proudící krví a druhá je naopak v kontaktu s bazální membránou (Kniesel a Wolburg 2000). Doposud byly identifikovány jako hlavní dvě složky TJ vláken – kladiny a okludiny.

Těsná spojení významně pomáhají ke snížení pasivní paracelulární difuze molekul rozpustných ve vodě. Přenos na molekulární úrovni tedy musí probíhat převážně transcelulární dráhou. Proteiny TJ zajišťují selektivní permeabilitu epitelu. Jsou to tedy vysoce efektivní a dynamické struktury regulující přechod molekul a iontů mezi EC. Na snímcích z elektronové mikroskopie (obr. 3A) jsou TJ viditelné jako série membránových kontaktů mezi sousedními buňkami. Hlavními transmembránovými molekulami, které umožňují epiteliální kontakt jsou kladin a okludin (Wolburg a Lippoldt 2002).

Proteiny realizující těsné spojení zonulae occludentes nazýváme jako transmembránové proteiny (TMP), do kterých řadíme kladin, okludin a junkční adhezní molekuly (JAMs). Kladiny a okludiny vytváří svými transmembránovými doménami heterodimerová přemostění, které tvoří páteř TJ. JAMs jsou důležité adhezivní molekuly umožňující navázání buňky k buňce. Patří do imunoglobulinové superrodiny proteinů (IgSF). Jsou také důležité pro komunikaci s leukocyty při zánětlivé odpovědi (González-Mariscal et al. 2003). Kladin je integrální TMP protein, který výrazně ovlivňuje permeabilitu TJ. Jeho C-konce interagují s ZO-1, 2, 3. U člověka popisujeme 24 typů kladinu. Název kladin pochází z latinského slova „claudere“, což je v překladu zavřít. Kladin-5 je přechodně exprimován také během vývoje pigmentového epitelu sítnice (Kojima et al. 2002). TMP okludin obsahuje dvě extracelulární smyčky a čtyři transmembránové domény a tři cytoplazmatické domény (obr. 3B) Tento protein byl objeven nejdříve z proteinů TJ. Okludiny primárně zodpovídají za nepropustnost a těsnost TJ spojů, takže čím vyšší je exprese okludinů, tím více je snížena samotná paracelulární difúze. Jeho molekulová hmotnost je v rozmezí 60-65 KDa. Obsahuje dva konce N a C tak, že je schopen se vázat přímo prostřednictvím tohoto karboxylového segmentu na proteiny zonuliny ZO-1 (Abbott 2002). Zonuliny *zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 a ZO-3) jsou cytoplazmatické rekogniční proteiny, které interagují s TMP. Jsou to sub-membránové složky TJ. Tvoří totiž strukturní podporu okluzních spojů. Zonuliny jsou členy membrány asociovaného guanylátu rodiny kináz (MAGUK - membrane associated guanylate kinase like proteins) (Wittchen et al. 2000). Bílkoviny v této rodině mají strukturálně konzervované domény – interakce protein-protein (SH3) a moduly vázající protein (PDZ). Interagují s proteiny, jejichž molekuly zajišťují transdukcí signálu. ZO-1 je spojena s adhezními spoji přes α -katenin při buněčné polarizaci. Molekula ZO-1 je tedy zapojena jak v těsných spojích, tak v adhezních spojích. Zonuliny interagují také s cytoplazmatickými doménami kladinů a okludinů a aktinovými vlákny cytoskeletu. (González-Mariscal et al. 2003).

Endoteliální adhezní proteiny krevních destiček PECAM jsou důležitým modulátorem adheze či agregace krevních destiček v místech malého poškození endotelu v mozkových kapilárách (Rosenblum William I. et al. 1996). Endoteliální TJ kromě své role v regulaci propustnosti kompartmentů slouží také jako překážka pro výstup leukocytů. Během probíhajícího zánětu však leukocyty procházejí snadno (González-Mariscal et al. 2003).



Obrázek 3: Znázornění molekulárních interakcí membránových spojů HEB u epitelálních buněk cerebrálních cév.

A – snímek z elektronového mikroskopu zobrazující těsná a adherentní spojení.

B – znázornění smyček proteinů těsných spojů Klaudinu a Okludinu.

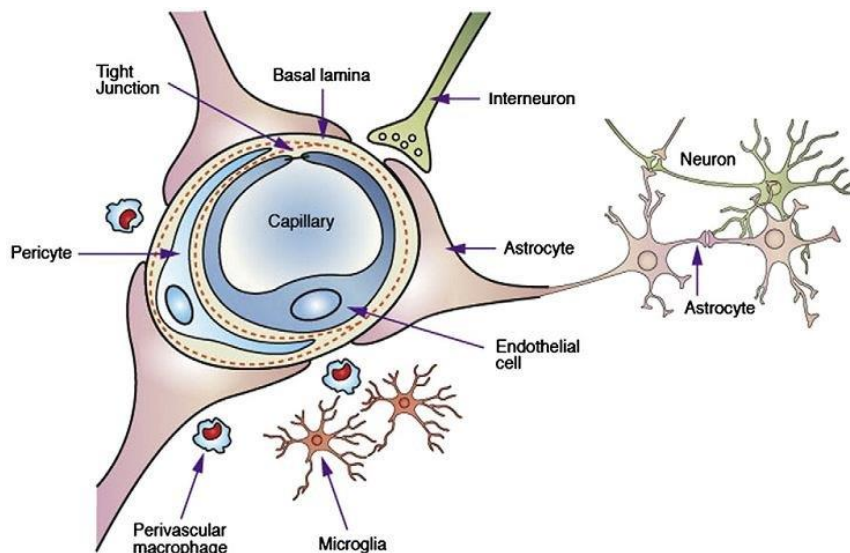
C – schéma znázorňující mezibuněčné spojení buněk mozkových kapilár.

Proteiny TJ zde vytváří spojení mezi přiléhajícími EC v HEB bariéře. Klaudin, Okludiny a JAM jsou spojeny s vlákny aktinu díky ZO proteinům. Tato síť z proteinů je zásadní pro udržení integrity hematoencefalické bariéry (Jackson et al. 2019).

3.3.2.2 Neurovaskulární jednotka

Myšlenky o vlastním krevní zásobení mozku se vyvíjely dlouho. V 18. a 19. století bylo pravidlem, že mozek nijak nedokáže ovlivňovat svoji dodávku krve. Předpokládalo se, že systémový oběh má výhradní prioritu nad zásobením mozku (Friedland a Iadecola 1991). Tato teorie byla vyvrácena v průběhu 20. století několika výzkumy. Ve třicátých letech Hendrix a Schmidt demonstrovali na kočce, že při osvětlení oka dochází ke zvýšení teploty zrakové kůry zvýšeným prokrvením mozku (Shalit et al. 1967). Další výzkumy objasnily odlišnost vaskulární hustoty v různých částech mozku v závislosti na mozkové aktivitě. Poznatky z těchto výzkumů byly prvními důkazy toho, že ke splnění potřeb aktivních oblastí mozku je nezbytná vlastní mozková regulace průtoku krve.

Spojení cév a neuronů napříč sítí mozkových cév se výrazně liší. Vzájemný vztah cerebrovaskulární sítě a samotných neuronů definoval Harder jako Neurovascular unit (NVU). Podle něj jde o strukturu složenou z neuronů, astrocytů, bazální laminy s hladkou svalovinou, pericytů, endoteliálních buněk a extracelulárního matrix. Tyto části jsou vzájemně propojené a tvoří vysoce efektivní anatomický celek, který reguluje průtok krve mozkem (Harder et al. 2002). Tato souhra mozkových buněk a krve je umožněna díky TJ, adhezivním molekulám integrinů a cadherinů, a také díky iontovým kanálům regulujícím průchod K^+ , Ca^{2+} a ATP (Zlokovic 2008).



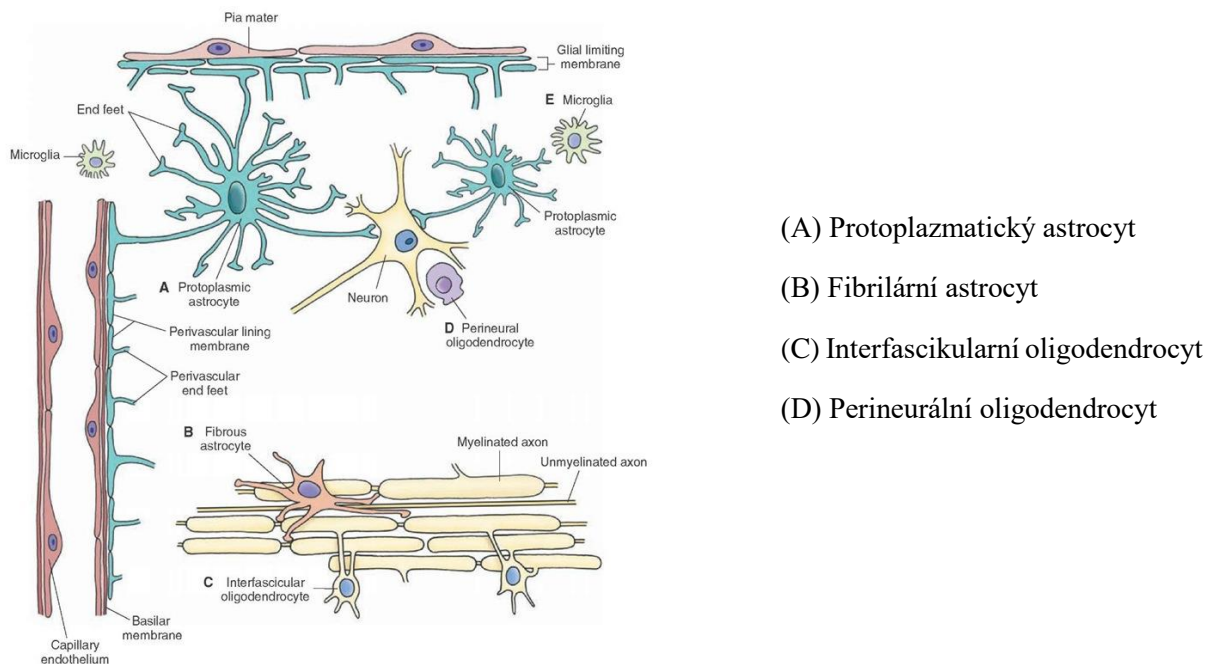
Obrázek 4: Buněčné složky neurovaskulární jednotky – vztah mezi buňkami mozku a jejich cévami je pro správnou funkci mozku klíčový (Pullagurla et al. 2015).

3.3.2.3 Struktura HEB

Pericyty jsou buňky, původně z mezodermu, zanořené do bazální membrány. Jedná se o oploštěné buňky na albuminální straně EC. Zaujímají přibližně jednu čtvrtinu z celkového počtu buněk HEB. Pericyty dokážou regulovat průtok kapilárním řečištěm díky možnosti kontrakce a relaxace. Tyto buňky mají jedinečnou schopnost fagocytózy, čímž zprostředkují imunitní odpověď. Pericyty produkují speciální cytokiny, kterými se aktivně podílí v akutní fázi zánětu viz 2.4 Zánětlivá reakce v HEB (Haddad-Tóvolli et al. 2017).

Astrocyty jsou podpůrné gliové buňky, které neurony ochraňují regulací koncentrace iontů a neurotransmiterů. Astrocyty významně přispívají k regulaci kyslíku a glukózy. Při traumatu mozkové tkáně dochází ke zvýšení hladiny glukózy. Je možné, že před tímto stavem mohou astrocyty neurony chránit (Lok et al. 2015). Tyto buňky nasedají na albuminární stěnu bazální membrány. Dělíme je na protoplazmatické astrocyty a fibrilární astrocyty, které se liší v četnosti a členitosti výběžků, a hlavně v umístění. Plazmatické najdeme v šedé hmotě, fibrilární v bílé hmotě CNS. Propojení astrocytů zajišťují tzv. vodivé spoje (*Gap junctions*), které umožňují výměnu určitých látek. Základem těchto spojů jsou proteinové komplexy *konexony*. Princip spočívá v reakci na zvýšenou hladinu Ca^{2+} v cytoplazmě a na hladinu pH v celé buňce. Tyto buňky tvoří tzv. *gliovou jizvu*, která vzniká po nekroze nervové tkáně náhradou astrocyty (Abbott et al. 2006).

Oligodendrocyty jsou rozměrově menší než astrocyty a mají taky menší počet výběžků. Zastávají funkci producentů myelinu. Tyto buňky se taktéž dělí podle výskytu na interfascikulární, které jsou lokalizovány v bílé hmotě a perineurální v šedé hmotě. Hlavním úkolem gliových buněk je tvorba myelinové pochvy (Kimura et al. 2020).



Obrázek 5: Různé druhy neuroglií: (převzato z Tabata 2015).

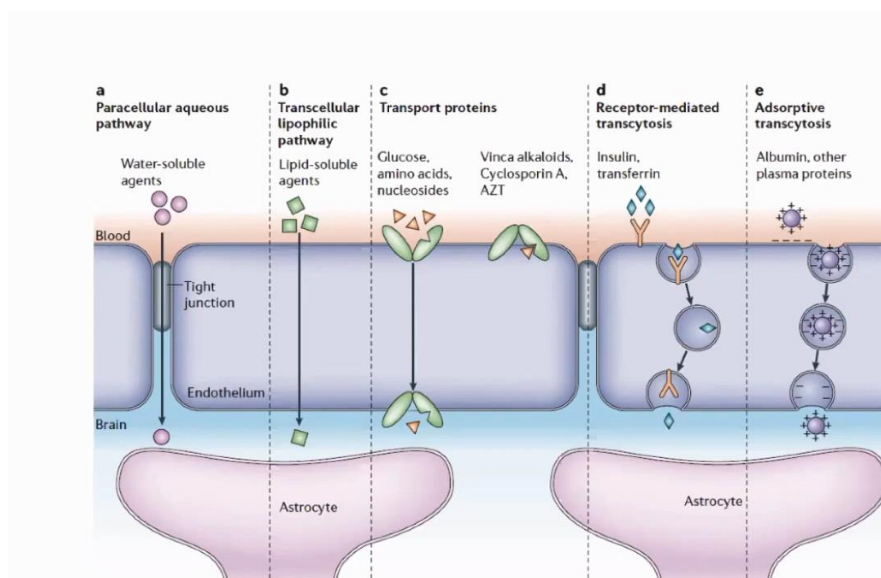
3.3.2.4 Transportní systém HEB

Zásadní funkcí HEB je zajišťovat homeostázu mozku. Jedním z faktorů ovlivňujících propustnost léčiv skrze HEB je lipofilita, která ale podle W. Pardridge platí pouze do molekulové hmotnosti 400 Da. To znamená, že je účinná farmakologická složka tímto rozmezím výrazně omezena. Platí tedy, že vysoce lipofilní, neionizované a nevázané látky s malou molekulou prochází nejběžnějším transportním mechanismem prostou pasivní difúzí (Pardridge 1995).

Pro difúzi přes HEB jsou důležité fyzikálně-chemické vlastnosti látek (např. elektrický náboj či rozpustnost v tucích). Malé molekuly a plyny jako hydrofobní molekuly uhlovodíků, O₂ nebo CO₂, NO, voda či alkoholy difundují bariérou snadno. Difúzi nedokáže buňka nijak regulovat, protože pronikání látek ustane až při vyrovnání koncentrací na obou stranách (ustálení koncentrační rovnováhy). Pro transport látek oběma směry slouží membránové přenašečové a kanálové proteiny.

Naopak metabolicky důležité látky jako jsou aminokyseliny a glukóza jsou do mozku aktivně transportovány specifickými transportními systémy. V choroidálním plexu a v endotelu kapilár je pro glukózu Na⁺ nezávislý přenašeč GLUT1 (Glucose transporter), jehož hlavním úkolem je transport glukózy do mozku. Nachází v membránách buněk tvořících HEB a v astrocytech. Dalším přenašečem je SLGT (Sodium Glucose Transporter). U aminokyselin jde například o přenašeče pro velké aminokyseliny systém LAT1, o kterém předpokládáme, že přenáší centrálně působící léky (Pardridge 2007). Velmi důležitým proteinovým přenašečem je i tzv. Na⁺/K⁺ ATP-áza známá jako sodno-draselná pumpa, která zajišťuje fyziologickou rovnováhu iontů. (Na⁺ extracelulárně a K⁺ intracelulárně). Anorganické ionty transportují iontové kanály – symportní kanál (ko-transportér K⁺/Na⁺/Cl⁻), kanál antiportní (Na⁺/H⁺) a kanál pro draslík. Tok molekul může být velmi velký, ale stále závisí na koncentračním gradientu a regulaci kanálem. Hlavním způsobem transportu molekul o vyšší molekulové hmotnosti do CNS je transport transcytózou. V neposlední řadě musíme určitě uvést endocytózu jako efektivní, ale vysoce energeticky náročný druh transportu, např. transport insulinu (Pardridge 2005).

Rychlý přestup molekul vody skrze buněčné membrány vzhledem k osmotickému gradientu zprostředkovávají integrální membránové aquaporiny. Ty jsou na rozdíl od difuze mnohem rychlejší. Pokud dojde ke změně jejich exprese může dojít ke vzniku otoku mozku. Nejčastěji se aquaporiny nachází na koncových výběžcích astrocytů (AQP-4) a na epiteliálních membránách buněk *plexus choroideus* (AQP-1), kde hrají možná roli v produkci likvoru (Nielsen et al. 1997).



Obrázek 6: Transportní systém hematoencefalické bariéry.: A: paracelulární difuze B: Lipidová difuze C: Přenašečové proteiny D,E: Endocytóza (Bramini et al. 2018).

3.3.2.5 Důsledky vzniklé poškozením HEB

HEB je relativně nepropustná, a za fyziologických podmínek přísně reguluje výměnu látek mezi krví a mozkem. Při většině neurologických onemocnění může být velmi často integrita HEB porušena. V úzkém vztahu s poruchami funkce této bariéry jsou různé onemocnění jako traumatické poranění mozkové tkáně, mozkové mrtvice, intracerebrální krvácení, a neurodegenerativní a nádorová onemocnění. Při úplné dysfunkci HEB může dojít ke zvýšené vaskulární propustnosti proteinů do plazmy s následkem přítoku velkého množství vody za vzniku hydrocefalu. Se zvyšujícím se věkem stoupá také prudce možnost rozvoje neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova či Parkinsonova nemoc, nebo roztroušená skleróza. U roztroušené sklerózy je porucha prostupnosti HEB typickým příznakem. Roztroušená skleróza je autoimunitní onemocnění, kdy imunitní systém napadá CNS. Konkrétně dochází k demyelizaci neuritů a vzniku zánětu. SAK je doprovázeno dvěma patofyziologickými faktory – degradací krve jejíž produkty působí na mozek jako patogeny a zvýšením intrakraniálního tlaku (ICP). Prokázal jsem, že oba tyto faktory přispívají k porušení HEB a zároveň vedou k silné zánětlivé reakci.

3.4 Zánětlivá reakce v rámci HEB

Infekce CNS mohou být vyvolány různými druhy patogenů, jako jsou viry, bakterie, houby či paraziti. Tyto patogeny mohou do CNS vstoupit různými cestami. Například migrací buněk prostřednictvím rozvolněných TJ paracelulární dráhou. Po invazi patogenů následuje sekrece cytokinů a povolání buněk imunitního systému. Nedávné pokusy na zvířatech svědčí tomu, že některé proteiny slouží jako přímý signální mechanismus v reakci na poškození mozkové tkáně. Výsledně pak dochází k aktivaci neuroimunitních reakcí a astrocytů, což může ovlivnit průběh neurodegenerativním procesům. Tyto výzkumy dokázaly, že hematoencefalická bariéra může sloužit jako potenciační bioindikátor neurologických poruch, s možností předpovědi komplikací a následného neurologického stavu (Price a Kinsner-Ovaskainen 2013).

Při normálních stavech není mozek jako takový v přímém kontaktu s krví díky přítomnosti HEB. Při vzniku SAK ale dochází k porušení tohoto dogmatu prasknutím cévy. Porucha funkce HEB je podmíněna obvykle narušením struktury TJ. Při tomto stavu dojde ke změně transportu molekul mezi krví a mozkem. Mozek na tento stav reaguje vznikem zánětu. Zánět začíná při pasivním rozlitím krevních složek do subarachnoidálního prostoru. Zánětlivých reakcí se účastní velké množství typů buněk. Nejprve dojde k aktivaci mikroglií a astrocytů. Změna permeability HEB a vznik zánětlivé reakce má ale také svoji aktivní stránku. Touto stránkou je produkce cytokinů. Cytokiny mohou mít na průběh zánětu dvojí vliv – zánět mohou podpořit, nebo mohou zánětu bránit. Cytokiny, které pomáhají nastartovat imunitní odpověď se nazývají prozánětlivé neboli pro-inflamační cytokiny. Do této skupiny patří (IL-1, IL-6 a TNF). Cytokiny, které tlumí, či dokonce blokují imunitní odpověď označujeme jako protizánětlivé anti-inflamační (IL-3, IL-4, IL-10). Cytokiny jsou malé nízkomolekulární signální proteiny, které jsou syntetizovány téměř všemi buňkami imunitního systému, jako odpověď na různé stimuly (Kimura et al. 2003). Jsou to molekuly klíčové pro mezibuněčnou komunikaci a signalizaci. Na buňky působí cytokiny díky povrchovým receptorům. Cytokiny působí pleiotropně, což znamená, že dokážou vyvinout více různých odpovědí na danou imunitní reakci. Chovají se podobně jako tkáňové hormony, ale nejsou produkovány žlázou, nýbrž samotnými buňkami. Endokrinně mohou působit ve vzdálených tkáních, většinou však působí autokrinně nebo parakrinně v těsné blízkosti. Hlavní rolí cytokinů po prodělání SAK je aktivace a řízení specifické i vrozené imunity (Pan et al. 2011).

Cytokiny můžeme dále kategorizovat dle funkce do sedmi skupin. Mezi nejvýznamnější cytokiny aktivované přítomností krve v subarachnoidálním prostoru patří zánětlivé mediátory, nekrotizující tumory typu α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*), které jsem sledoval v této práci. TNF- α je prozánětlivý cytokin, který je produkován zejména aktivovanými leukocyty (monocyty, neutrofilů, makrofágy či lymfocyty). TNF- α aktivuje buňky endotelií k adhezi buněk a je jedním z hlavních iniciátorů zánětu po SAK. Zvýšená koncentrace TNF- α může aktivovat řízenou buněčnou smrt – apoptózu (Yarlagadda et al. 2009). TNF- α je protein, který se skládá ze tří shodných podjednotek. V těle můžeme cytokin TNF- α najít ve dvou biologicky

aktivních formách – jako transmembránovou formu nebo solubilní formu (Tang et al. 1996). Na regulaci imunitních reakcí se tyto cytokiny podílejí nejen aktivací signálního mechanismu buňky, ale hlavně díky vazbě na specifické receptory. Častějším typem receptoru je TNF-R1, který je nespecifický a vyskytuje se na membránách většiny buněk. Druhým typem receptoru pro TNF- α je TNF-R2, jehož výskyt je omezen na endotelie a buňky imunitního systému (Tracey et al. 2008). Při vazbě s TNF-R1 je aktivován jaderný faktor NF- κ B, který reguluje expresi mnoha složek imunitního systému a výsledně stimuluje ke vzniku zánětlivé reakce (Chýlková et al. 2010). NF- κ B a STAT3 jsou skupiny transkripčních faktorů, které umožňují signalizaci do jádra buňky. K aktivaci NF- κ B dochází skrze TLR receptory pro IL-1 a TNF- α . Po kontaktu s cytokinem vstoupí NF- κ B do jádra a ovlivňuje přepis více než sta genů. Aktivace NF- κ B v leukocytech indukuje produkci interleukinů a TNF. Transkripční faktor STAT3 pracuje na podobném mechanismu s rozdílem, že k aktivaci dochází především po navázání IL-2 a IL-4. Cytokiny tedy díky těmto faktorům aktivují DNA transkripci (W et al. 2011).

Další významnou skupinou cytokinů jsou interleukiny (IL). Jedná se o humorální signální cytokiny produkované převážně monocyty a makrofágy. Tyto molekuly jsou aktivovány, když dojde ke kontaktu leukocytů a mozku a je možné, že přispívají ke vzniku vazospasmů po hemoragii (Petereit et al. 2003). Interleukiny jsou cytokiny, které podporují zánět, ale také zánětu brání, patří do pro-inflamačních i anti-inflamačních cytokinů. V rámci zánětlivé reakce mozku popisujeme 5 hlavních typů interleukinů, prozánětlivé IL-1, IL-6 a protizánětlivé IL-3, IL-4, IL-10. Cytokiny jsou ve většině případů odvozeny z CD4 T-pomocných lymfocytů (Yarlagadda et al. 2009).

Po SAK se zánětlivé buňky také podílejí na odlučování krve ze subarachnoidálního prostoru. Zajímavé je, že některé studie prokázaly, že buňky specifického imunitního systému (B a T-lymfocyty) se při odběru CSF lumbální punkcí vyskytují pouze zřídka. V kontrastu s tím bylo prokázáno, že buňky nespecifického vrozeného imunitního systému se v posthemoragickém CSF nachází vysoce aktivní a ve vysokém počtu (Miller et al. 2014). Cytokiny jsou tedy látky, které mohou snadno překonat HEB a v mozku narušit integritu této bariéry. Proto jsem se jimi v praktické části práce zabýval podrobně.

3.5 Cévní mozkové příhody

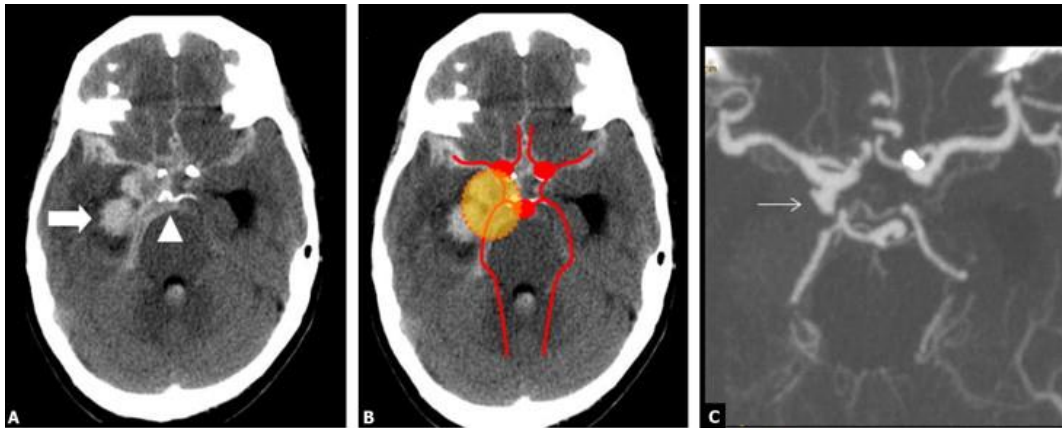
Mrtvice neboli cévní mozková příhoda (CMP) je druhá nejčastější příčina úmrtí na světě. Mozek dospělého člověka tvoří svou velikostí přibližně jen 2 % celkové hmotnosti těla, ale vyžaduje více než 20 % krve ze srdečního výdeje. Jedná se o orgán s extrémní biologickou výkonností, která má speciální nároky na zásobení. Přívod krve zajišťují čtyři hlavní tepny: *arteriae carotides internae dextra et sinistra* a *arteriae vertebrales dextra et sinistra*. U zdravého člověka je přibližný krevní průtok na 100g tkáně 60 ml/min, pro celkový mozek pak asi 750ml/min (Pavel a kolektiv 2010).

Mozek je tedy extrémně citlivý na nedostatek kyslíku. Pokud dojde v některé části mozku k zastavení nebo poruše přívodu krve mluvíme o iktu ke kterému může dojít dvěma způsoby. Ucpáním cévy nebo krvácením. Pokud dojde k ucpání cévy, tak se jedná o mozkovou ischémií. Příčinou neprůchodnosti cévy je ucpání trombem nebo embolem, ke kterému přispívá například ateroskleróza či zánět cévní stěny. Druhým sice méně častým, ale velmi nebezpečným typem CMP je mozková hemoragie. Jedná se o krvácení z mozkové cévy z důsledku narušení její stěny. Rozlišujeme dva druhy, intracerebrální krvácení (ICK) a subarachnoidální krvácení (SAK), kterému se zde budeme věnovat podrobně.

3.5.1 Subarachnoidální krvácení

Subarachnoidálním krvácením (SAK) rozumíme intermeningeální nitrolební krvácení do prostoru mezi arachnoideou a pia mater s následným únikem krve do likvoru. Jedná se o méně častý, ale velmi závažný typ hemoragické CMP. K tomuto krvácení může nezávisle na pohlaví dojít v jakémkoli věku, častěji se ale vyskytuje u žen (Diringer 2009). Profesor Beneš ve svých publikacích uvádí pravidlo třetin, kdy se jedna třetina pacientů uzdraví, ale následující komplikace jsou velmi časté, třetina umře přímo v nemocnici na komplikace SAK, ale zbylí pacienti bohužel podléhají okamžitě (Beneš a Suchomel 2017). Nejen proto je mortalita a morbidita tohoto onemocnění velmi vysoká a dosahuje 70 až 80 %. K SAK může dojít traumaticky poraněním hlavy a netraumaticky poškozením zevnitř. V této práci se budeme zabývat netraumatickým SAK (Edjlali et al. 2015).

Změny v propustnosti HEB, a hlavně pak zvýšení prostupnosti vedou také ke tvorbě otoku, který patří mezi závažné příčiny poškození mozku po CMP. SAK vzniká nejčastěji rupturou cévního aneurysmatu v oslabeném místě cévní stěny.



Obrázek 7: CT snímek po subarachnoidálním krvácení. Převzato z (Edjlali et al. 2015).
 A – Šipkou označena přítomnost krve v subarachnoidálním prostoru.
 B – Cévy Willisova okruhu s vyznačenými aneurysmaty
 C – Kontrastní angiografie cerebrálních cév je jednou ze zobrazovacích metod užívaných pro diagnostiku poškození cév, šipkou označeno aneurysma

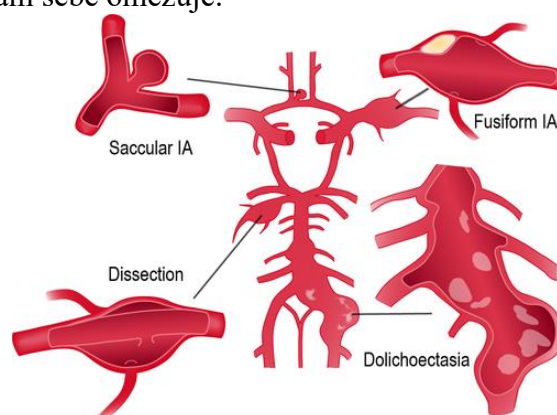
Základní diagnostickou metodou, pro zjištění subarachnoidálního krvácení je nativní CT (počítačová tomografie) mozku, kde se krev objeví v subarachnoidálním prostoru (obr. 7a). Přítomnost SAK se může zjistit i při odběru mozkomíšního moku, který by byl krvavý.

Z patofyziologické stránky SAK vyvolá hypoxii mozku, která vede podle Kotoa ke snížení exprese proteinu těsných spojů claudinu-5 (Koto et al. 2007). Výzkumy Marka a Davise z roku 2002 se naopak zaměřily na změny v uspořádání dalších proteinů TJ ZO-1,2 a Okcludinu, kde prokázali signifikantní snížení exprese těchto proteinů (Mark a Davis 2002). Na výskyt a změny v expresi Klaudinu-5 jsem se zaměřili v praktické části této práce.

Při CMP přispívá k poškození mozku také tvorba zánětu a přestup bílých krvinek z krve skrze HEB do mozku. Zánět je spuštěn produkcí prozánětlivých a chemotaktických cytokinů zasaženými buňkami mozku, nejvíce astrocyty. Astrocyty a buňky imunitního systému za těchto podmínek produkují proinflamační cytokiny $TNF-\alpha$ a $IL-1\beta$, které byly také předmětem méj studie. Podle Zahanga jsou nejdůležitější právě $TNF-\alpha$, jejichž snížením by bylo možné zmírnit zánět po ischemii a zmírnit tak sekundární poškození mozku (Zhang et al. 2000).

3.5.1.1 Vznik SAK

K vzniku netraumatickému SAK může dojít několika způsoby. Méně často vzniká SAK kvůli nádorům nebo arteriální disekci. Nejčastěji jde o rupturu aneurysmatu nebo arterio-venózní malformace. Při úniku krve do subarachnoidálního prostoru dojde ke zvýšení intrakraniálního tlaku (ICP), který je nejvyšší po přibližně 30 sekundách od začátku krvácení. V závislosti na rostoucím ICP klesá mozkový perfuzní tlak (CPP) podle Monroeovy-Kellieho doktríny. Pokud pokračuje redukce CPP, dochází prvně k reverzibilní ischemii, následně pak k poruše vědomí (McCormick et al. 1994). Následně dochází k rozpadu krevních produktů a aktivaci koagulační kaskády likvorem, za vzniku sraženiny. Tento proces vede k poklesu ICP a zástavě krvácení vzniklým koagulem v místě ruptury (Hindersin et al. 1984). Subarachnoidální krvácení je tedy patologický stav, který sám sebe omezuje.



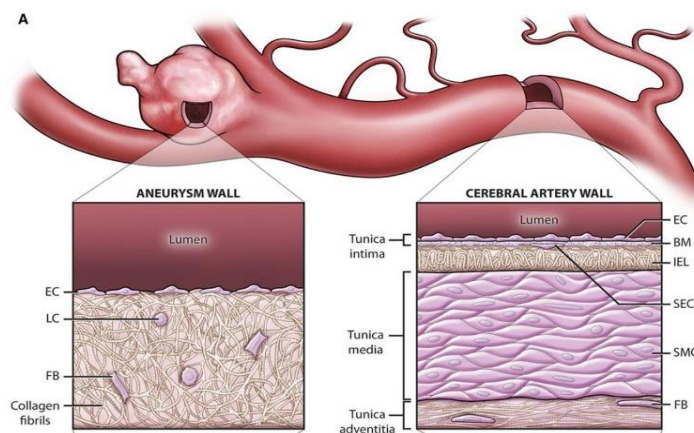
Obrázek 8: Nejčastější typy aneurysmat Willisova okruhu - a. vakovitá (*a. saccatum*) obvykle v místech větvení tepen (levá horní část) a aneurysmata vřetenovitá (*a. fusiforme*) pravá horní část (Kurtelius Arttu et al. 2019).

3.5.1.2 Aneurysmata

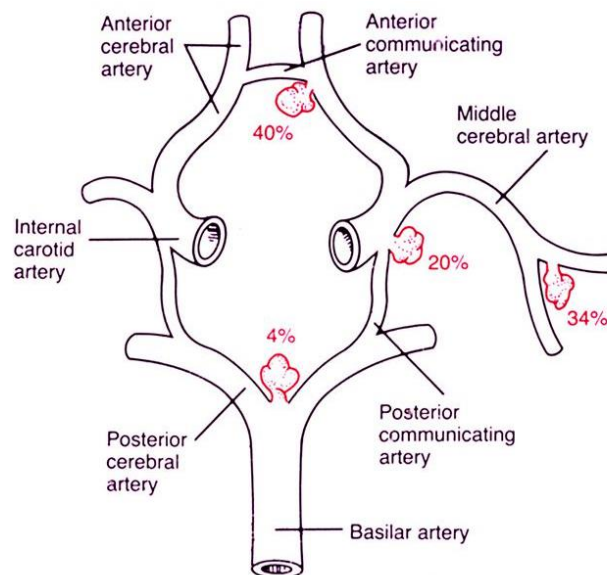
Nejčastější příčinou vzniku netraumatického SAK je ze 75 % ruptura nitrolebního aneurysmatu. Aneurysma vypadá jako váček vystupující přímo z cévy. Podle tvaru rozlišujeme aneurysma vakovitá (*a. saccatum*) a vřetenovitá (*a. fusiforme*) (viz obr. 8). Mozkové arterie mají oproti ostatním tepnám v těle menší podíl elastických vláken. Příčinou vzniku aneurysmatu může být jakékoli oslabení stěny cévy. Tato oslabená část cévní stěny se pak díky krevnímu tlaku a pulzaci vydouvá. Z histologického hlediska dochází v místě krčku aneurysmatu k oslabení svaloviny a elastické hmoty. Stěna aneurysmatu je tedy odlišná od zdravé cévní stěny – hladká svalovina je zde řidší a méně organizovaná, stěna je tvořena kolagenními vlákny a vrstva endotelu je nepravidelná (viz obr. 9) (Brisman et al. 2009). Nejčastěji postižená místa jsou v oblasti větvení velkých cévních kmenů Willisova okruhu. Konkrétně na *a. cerebri media*, a *arteriae communicans posterior et anterior* (Beneš a Suchomel 2017). Aneurysma je pro svého nositele vlastně časovanou bombou, protože k ruptuře může dojít kdykoliv. Menší aneurysmata ani nemusí prasknout. Nejčastěji k ruptuře dochází při zvětšení aneurysmatu v kombinaci se zvýšením krevního tlaku, je ale zajímavé, že poměrně velké množství SAK

vzniká v klidu. Podle *International study of unruptured intracranial aneurysms (ISUIA)* je kritická hranice pro rupturu 7 mm v průměru. Jsou ale známy i ojedinělé případy, kdy aneurysma může dosáhnout v průměru i gigantických 15 mm, oproti tomu dochází velmi často k ruptuře už při velikosti do 5mm (Raymond et al. 2008).

Mezi další rizikové faktory patří vedle lokalizace a velikosti aneurysmatu také jeho tvar. U aneurysmat nepravidelného tvaru je riziko ruptury vyšší. (obr. 8) K ruptuře může také výrazně přispět probíhající zánět ve stěně výdutě. Profesor Beneš ve svých publikacích srovnává rizikové faktory diagnózy aneurysmat s rizikovými faktory ostatních kardiovaskulárních chorob. Zmiňuje zde tedy hypertenzi, obezitu, stáří, ženské pohlaví, zvýšenou hladinu cholesterolu a rodinnou anamnézu CMP. K tomuto stavu obvykle dochází mezi 40. až 60. rokem života (Kalvach 2010).



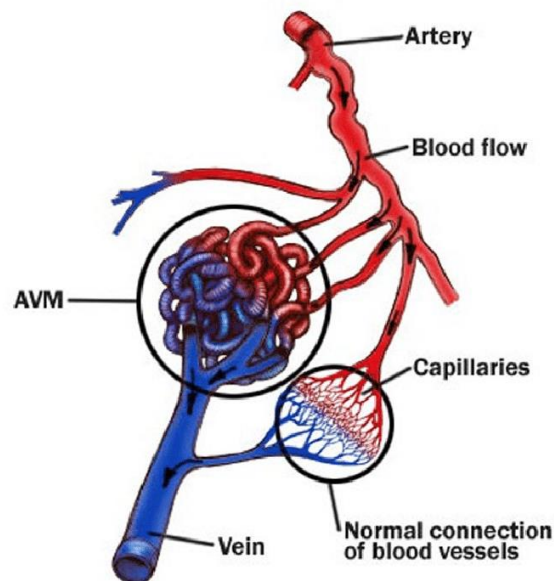
Obrázek 9: Rozdílná struktura stěny aneurysmatu (vlevo) a zdravé mozkové cévy (vpravo). Aneurysma postrádá vnitřní elastickou membránu a naopak převládají kolagenní vlákna (Etminan Nima et al. 2014).



Obrázek 10: Aneurysma - nejčastější příčina netraumatikého SAK - výskyt aneurysmat v oblasti Willisova okruhu při větvení tepen (upraveno z Madhukar 1993).

Další možnou příčinou vzniku SAK je ruptura arteriovenózní malformace (AVM). Jedná se o poruchu, která vzniká už při embryogenezi v mozku. AVM je spleť nezralých cév v mozku, která může připomínat ptačí hnízdo. Z nějakého důvodu během vývoje dojde k absenci kapilár a tím pádem jsou tepny a žíly přímo spojeny a nedochází zde vlastně k poklesu tlaku. Nejčtenější oblast výskytu AVM je v supratentoriální krajině mozku. Některé druhy AVM jsou dokonce řazeny mezi cévní tumory hemangiom-hemangioblastom. Silně dilatované AVM dokonce ochuzují sousední cévní řečiště svým abnormálním průtokem tzv. „steal syndrom“, který může v některých případech vyvolat tranzitorní ischemickou ataku (TIA). AVM může vyústit také ve fokální i generalizovaný epileptický záchvat, který patří s krvácením k nejčastějším projevům AVM (Kim et al. 2011).

Největší nebezpečí pro pacienta ale hrozí při ruptuře. Jak už jsem výše popsal krev proudí z tepen pod velkým tlakem skrze primitivní hypertrofické vaskulární kanálky přímo do žil. Tlak narůstá až do bodu, kdy jej žíla nedokáže vydržet, dojde ke zúžení stěny žíly a ta následně praská (Kyoung 2017). Podle Kalvacha je mortalita SAK z AVM menší než z aneurysmatu kvůli tomu, že ruptura AVM častěji postihuje mladší pacienty a krvácení nastává z menších cév při menším tlaku než u aneurysmat Willisova okruhu (Kalvach 2010).



Obrázek 11: Arteriovenózní malformace - Cévní anomálie, při které dochází k absenci kapilárního přechodu mezi tepnami a žilami. Nedochází tedy ke snížení intravaskulárního tlaku a krev proudí z tepen přímo do žil. Spodní část pro srovnání se zdravou cévní tkání (převzato z Oliveri et al. 2018).

3.5.1.4 Komplikace SAK

Adamsova analýza okolností vzniku SAK

<i>Fyzická aktivita</i>	27 %
<i>Aktivita bez úsilí</i>	26 %
<i>Spánek</i>	13 %
<i>Alkohol dlouhodobě</i>	7 %
<i>Alkohol bezprostředně</i>	4 %
<i>Koitus</i>	3 %
<i>Defekace</i>	2 %

Tabulka 2: Okolnosti vzniku SAK podle Adamse. Výzkum byl proveden celkem na 286 pacientech, z toho u 25% pacientů nebyly okolnosti vzniku SAK zjištěny (Kalvach 2010).

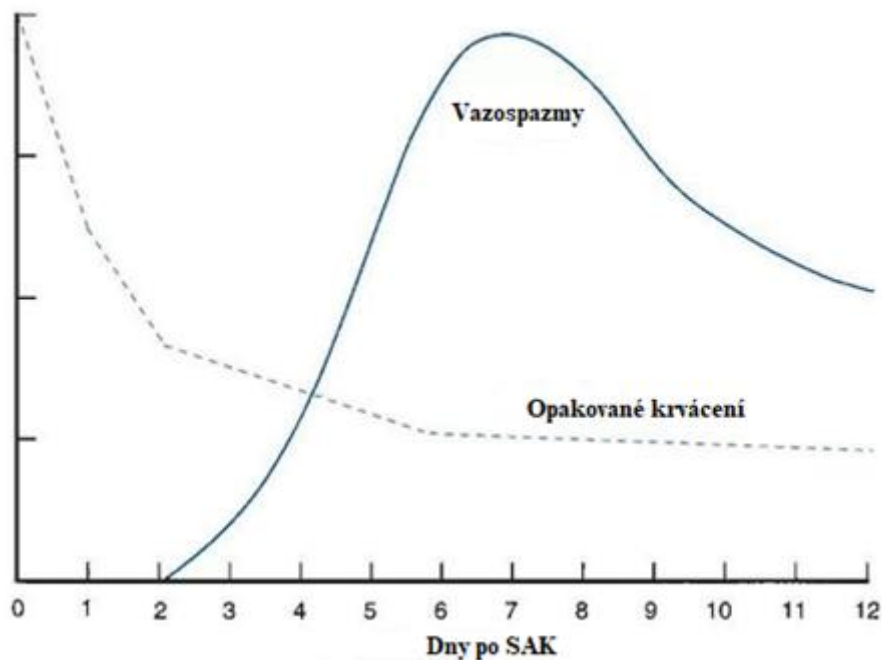
Mozek se skládá asi přibližně ze 100 miliard neuronů, tyto buňky jsou vysoce specifické a odlišné od ostatních buněk těla. Svědčí tomu i to, že například mozková tkáň, a hlavně neurony bohužel umírají mnohem rychleji než buňky ostatní. Mozková tkáň je závislá na kontinuální perfuzi. Už při první minutě od přerušení zásobení krví odumírá 2-12 mil buněk (von Bartheld et al. 2016). SAK je velmi nebezpečné onemocnění, protože může vést k velkému množství komplikací a problémů. Poruchy HEB se dostávají velmi rychle. HEB se začíná „rozpadat“ už 3-6 hodin po iktu. Tím začíná prosakovat a ztrácí svoji semiperbeabilitu. V tomto momentu se některé látky, které se v intersticiální tekutině nenachází (např. albumin) do intersticia dostanou. Tyto látky jsou osmoticky aktivní – do intersticia nasají vodu a způsobí intersticiální vazogenní edém. Vazogenní edém začíná v horizontu 3 až 6 hodin po iktu a vrcholí mezi 3. až 5. dnem (Jha et al. 2019). Další komplikací je vznik cytotoxického edému, který se rozvíjí tehdy, když se v buňkách začne hromadit nadměrné množství sodíku. Dochází k tomu proto, že kvůli nedostatku ATP není sodno-draselná pumpa schopna měnit 3 Na⁺ za 2 K⁺. Tím se koncentrace sodíku intracelulárně zvýší a začne nasávat vodu do buněk čímž způsobí cytotoxický edém (Liang et al. 2007).

Hlavní a nepochybně nejzávažnější příčinou mortality SAK jsou cerebrální vazospasmy (CVS). Jedná se o děj způsobený vniknutím rozpadlých krevních produktů extravaskulárně do subarachnoidálního prostoru. Postižené cévy reagují vazokonstrikcí – dojde ke spazmu (stažení a zúžení cévy), který způsobí hypoperfuzi určité části mozku. Zajímavé ale je, že u některých typů mozkových hemoragií se vazospasmy vyskytují méně často (kupř. intraparenchymální hemoragie). Pro subarachnoidální krvácení je ale přítomnost masivních vazospasmů vždy typická. Vazospasmus způsobí nedokrvení a ischemii mozku, ke které dojde v oblastech, které jsou zásobeny těmito tepnami. Velmi často tedy přítomností vazospasmů dojde k pozdní mozkové ischemie (Delayed Cerebral Ischemia, DCI), nebo dokonce sekundárnímu iktu. Všechny tyto komplikace mohou mít fatální účinky pro mozkovou tkáň (Qureshi et al. 2000).

3.5.1.5 Incidence po SAK

Všechny výše zmíněné komplikace mají jednu věc společnou. Vedou k mozkovému edému. Při narušení funkce HEB dochází k vyšší vaskulární prostupnosti větších proteinů do plazmy s následným přítokem vody, který způsobí hydrocefalus. Lebka je pevná schránka, mozek je tedy utlačován a nemá místo. Otoku mozku se lékaři snaží zabránit pomocí otevření lebky (tzv. dekompresivní kraniotomie) čímž se sníží intrakraniální tlak.

Nejvíce pacientů je postihnuto tímto onemocněním mezi 50 a 60 rokem života. U dětí je SAK spíše vzácné, ale i v této věkové skupině už bylo popsáno (Jordan et al. 2009). Celkově tedy můžeme říct, že incidence stoupá s věkem lineárně. U žen popisujeme vyšší incidenci než u mužů. Důvodem bude nejspíše postupné snižování koncentrace estrogenu v krvi, které vede k riziku vzniku výdutě a tím vyšší prevalenci aneurysmat u ženského pohlaví (Harrod et al. 2006) (de Rooij et al. 2007). Celková incidence je popsána v rozmezí 6-10 případů pro 100 000 obyvatel na rok (Linn et al. 1996). Se zvyšující se průměrnou délkou života se podle Hankeye bude incidence CMP obecně jen zvyšovat (Hankey 2006).



Graf 1: Pravděpodobnost výskytu vazospazmů v závislosti na dnech po SAK. Komplikace vazospazmy vrcholí 7. až 8. dnem po SAK. Pro zmiřnění rozsahu vazospazmů se podávají léky (např. antagonisty kalciového kanálu II. generace Nimodipin) ideálně do 48 hod. po krvácení (upraveno, převzato z Themes 2016).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Zvířata a biologický materiál

Výzkum jsem provedl na 35 dospělých samcích potkana kmene Wistar (200-250 g; Animal Breeding Facility of Masaryk University, Czech Republic). Zvířata byla sledována ve sterilních podmínkách při teplotě 22° C a při konstantním dvanáctihodinovém režimu světlo/tma s Pavilonu biomodelu na Masarykově Univerzitě. Potrava a voda byla zvířatům poskytnuta *ad libitum*. Všechny experimenty se zvířaty byla prováděny ve sterilním prostředí a podle protokolu schváleného Odbornou komisí pro zajištění dobrého životního standardu pokusných zvířat Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a oblastní komisí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v České republice.

4.2 Chirurgické zákroky

Zvířatům byla provedena intramuskulární anestezie směsí 5% ketaminu (40 mg/ml) a 2% xylazinu (4 mg/ml) (0,2 ml/100 g tělesné hmotnosti) podávaných intraperitoneálně. Následně byl proveden podélný řez v šíjové krajině s rozvolněním svalů. Dále byla odhalena atlanto-okcipitální membrána, skrze kterou bylo aplikováno 100 µl arteriální krve z *arteria caudalis* do *cisterna magna* (zvířata skupiny SAK) a 100 µl umělého mozkomíšního moku (zvířata skupiny ACSF) do subarachnoidálního prostoru. K aplikaci pod úhlem 60° byla použita stříkačka s 30G jehlou (Solár et al. 2020). Aplikace proběhla standardizovanou metodou původně publikovanou Solomonem a kol. (Solomon R A et al. 1985). Následně byl odebrán mozek a hemisféry mozku byly rozděleny do tří částí na frontální lalok, okcipitální lalok a parietální s temporálním lalokem. Vzorky se následně vložily do tekutého dusíku a byly skladovány při teplotě -80° C (Sehba 2015).

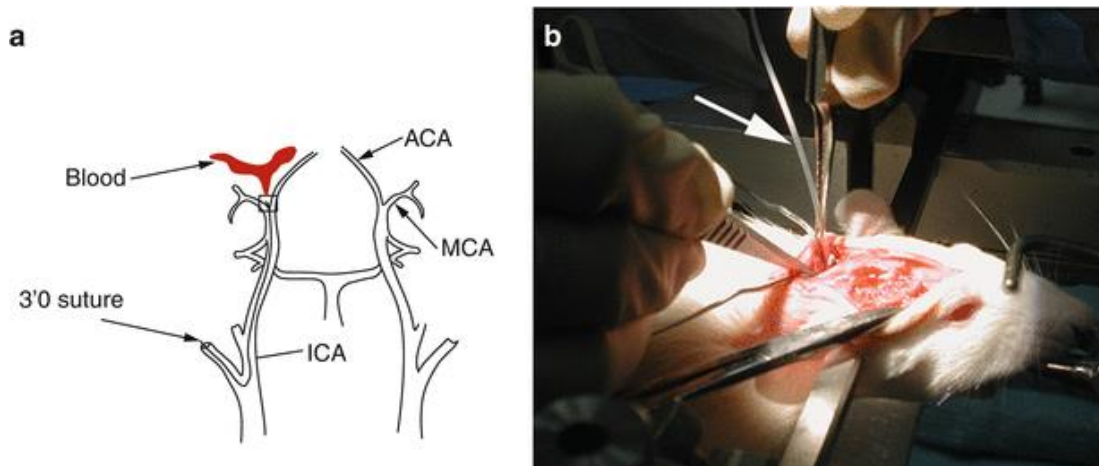
Skupina zvířat ACSF a SAK přežívala 1 den (ACSF: n=4; SAK: n=5), 3 dny (ACSF: n=4; SAK: n=5), 7 dní (ACSF: n=4; SAK: n=5) a 14 dní (ACSF: n=2; SAK: n=3). Za účelem kontroly byla do výzkumu zařazena intaktní zvířata s (n=4).

4.3 Zpracování vzorků

Zvířata skupin ACSF a SAK přežívající 1, 3, 7 a 14 dnů byla usmrcena společně s intaktními zvířaty v CO₂. Následně jsme provedli transkardniální perfuzi Zamboniho fixačním roztokem a roztokem PBS. Mozek byl po makroskopickém pohledu odebrán a postfixován v Zamboniho fixačním roztoku po 3 dny, následně byly mozky promyty 10% sacharózou a zality do směsi Tissue-Tek OCT (Miles, Elkhart, IN, USA).

Po dobu 5 minut působila na řezy směs acetonu a methanolu za teploty -20° C s následným oplachem ve směsi PBS-BSA-Tween. Dále byly provedeny karyostatem koronální řezy o tloušťce 20 μm (kryostat Leica 1800; Leica Microsystem, Wetzlar, Německo).

U řezů proběhla inkubace s monoklonální myší protilátkou proti RECA (1:100; Serotec) při pokojové teplotě po dobu 16 hodin. Sekundární anti-myší protilátka působila proti FITC (1:100; Chemicon) po dobu 90 minut. Poslední imunohistochemickou reakcí byla aplikace polyklonální králičí protilátky proti Klaudinu-5 a protilátky proti TNF- α . Následně byly řezy montovány v médiu Mowiol. Tyto řezy byly aplikovány na podložní sklíčka mikroskopu pokrytá chromem (Solár et al. 2020).

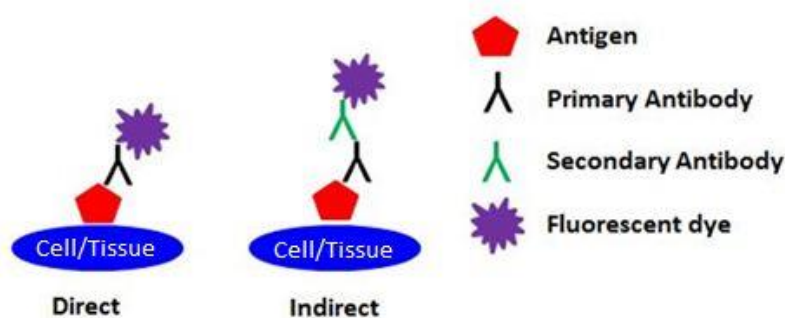


Obrázek 12: Aplikace krve a ACSF do subarachnoidálního prostoru podle perforačního modelu. Převzato z (Sehba 2015).

4.3.1 Imunofluorescenční barvení

Imunohistochemie je laboratorní metoda, která spočívá v imunologické vazbě protilátky (antibody – Ab) s antigenem (Ag) mechanismem „klíče a zámku“. Konkrétní antigeny ve tkáních a buňkách tedy touto metodou dokážeme lokalizovat aplikací specifických značených protilátek (Delcambre et al. 2016). Jako antigen funguje jakákoliv cizorodá makromolekulární látka, která vnikne do extracelulární tekutiny. Některé molekuly se přesouvají do lymfatických uzlin, kde dojde ke kontaktu s B-lymfocyty a tvorbě protilátek (Beranová a Tonar 2002).

Imunofluorescenční metody jsou realizovatelné díky fluorochromům – barvivům vykazující vlastnost absorbovat a vyzářit světlo o určité vlnové délce (tj. vykazující fluorescenci). Chromogeny, které byly použity v této práci byly fluoresceinisothiokyanát (FITC, zelená barva) a tetramethyl-rodamin-isothiokyanát (TRITC, červená barva). Tato metoda jde provádět jen na speciálním fluorescenčním mikroskopu (Ramos-Vara 2011).



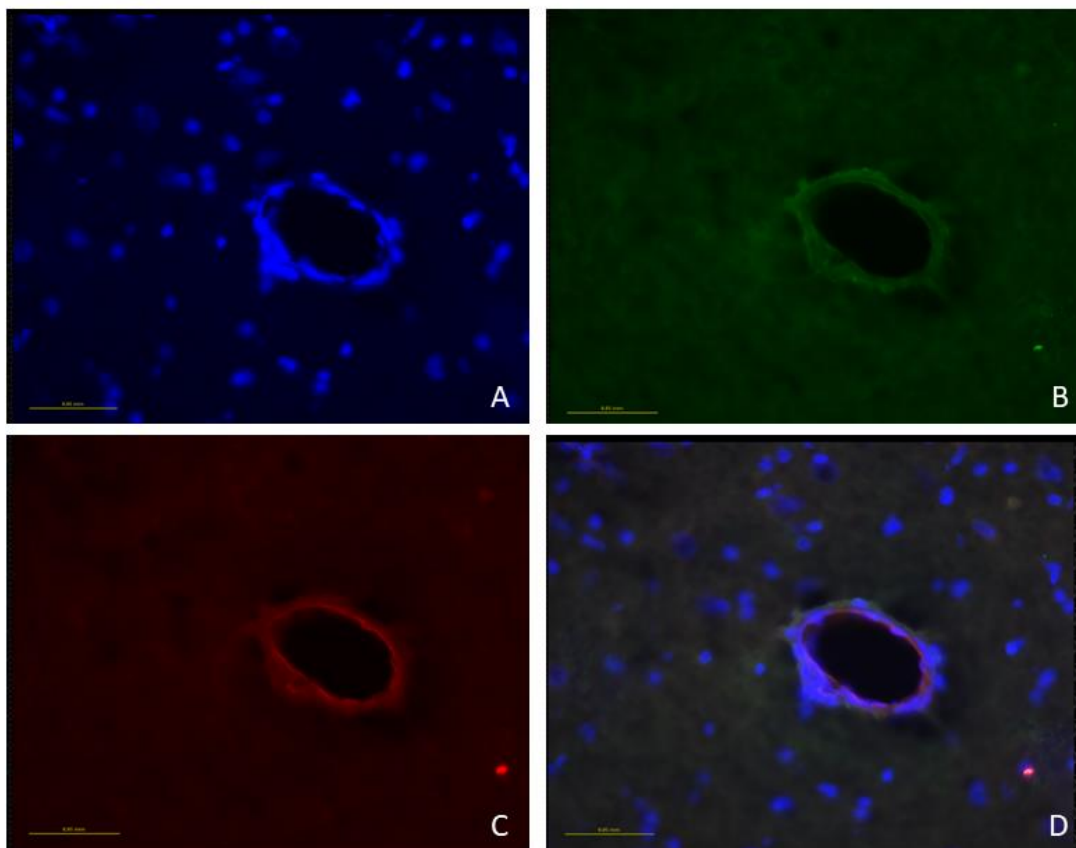
Obrázek 13: Princip imunohistochemie, upraveno z (Kellie Johnson 2016).

4.4 Analýza obrazu

Analýza byla provedena vždy na více než 10 řezech o tloušťce 60 μm přes mozkové komory pro každou skupinu zvířat. Vyhledal jsem transversálně řezané kapiláry mozku a pomocí kamery fluorescenčního mikroskopu jsem vyfotil vždy minimálně 12 snímků pro tři druhy fluorescenčních spekter (DAPI, FIC, TRIC) pro každý z preparátů. Následně jsem provedl kolokalizaci fluorescenčních spekter a ohraničení RECA pozitivních oblastí kapilár ve spektru TRIC. Analýza imunofluorescenční intenzity Klaudinu a $\text{TNF}\alpha$ RECA pozitivních oblastí buněk endotelií cév byla po manuálním označení pozitivních oblastí provedena programem NIS-Elements AR Analysis (verze 4.20.00 Nikon, Brno, Česká republika.)

4.5 Statistické vyhodnocení

Data intenzity imunofluorescence získaná programem NIS-Elements AR Analysis byla statisticky vyhodnocena Mann-Whitneyho U-testem v programu Statistica 13.5 (TIBCO Software Inc., Tulsa, USA). Pro skupiny SAK i ACSF byla vyhodnocována průměrná intenzita a průměrná relativní intenzita imunofluorescence pozitivních oblastí. Pro průměrnou relativní intenzitu byla měřena koncentrace v cévě vůči obarvenosti pozadí. Tato veličina je přesnější, protože musíme brát v Extrémní plusové i minusové hodnoty byly vyřazeny programem Statistica. Data byla porovnávána s průměrnou relativní intenzitou fluorescence tkáně intaktních zvířat. Hodnoty průměrné relativní intenzity fluorescence byly zpracovány programem Statistica v grafy.



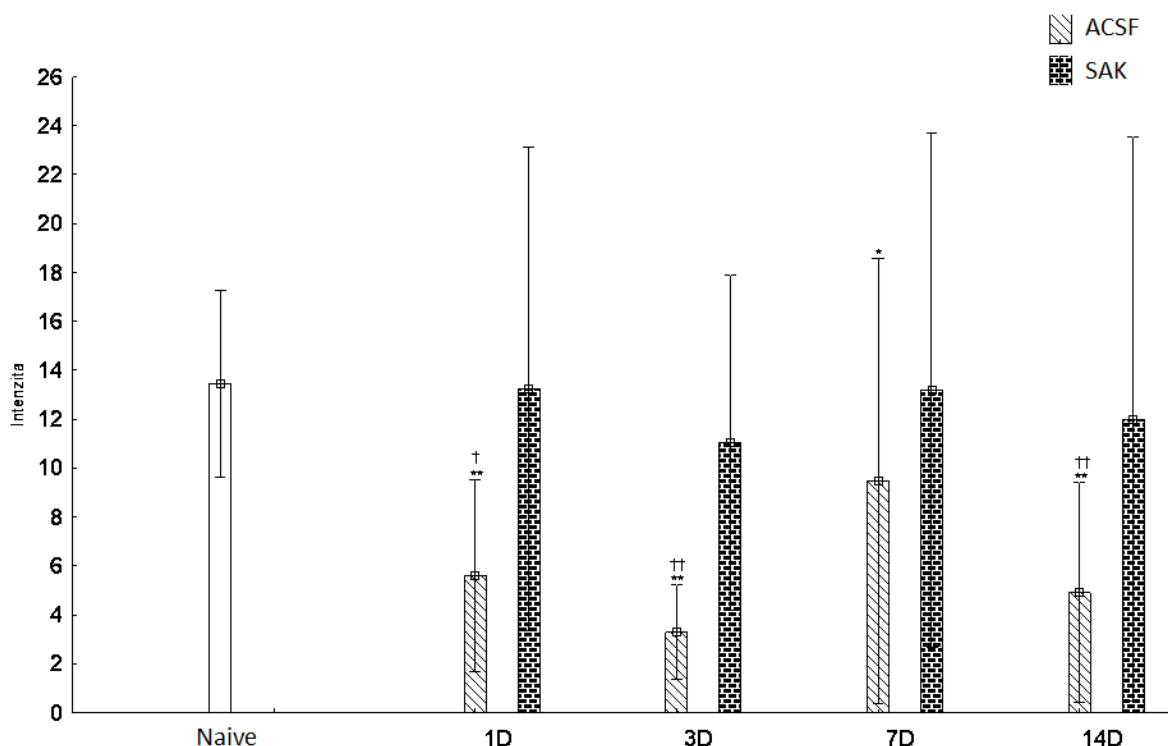
Obrázek 14: Transverzální řez kapilárou mozku v různých typech fluorescenčních spekter A – DAPI, B – FIC, C – TRIC (RECA pozitivní oblasti endotélií cév), D – kolokalizace fluorescenčních spekter.

5 VÝSLEDKY

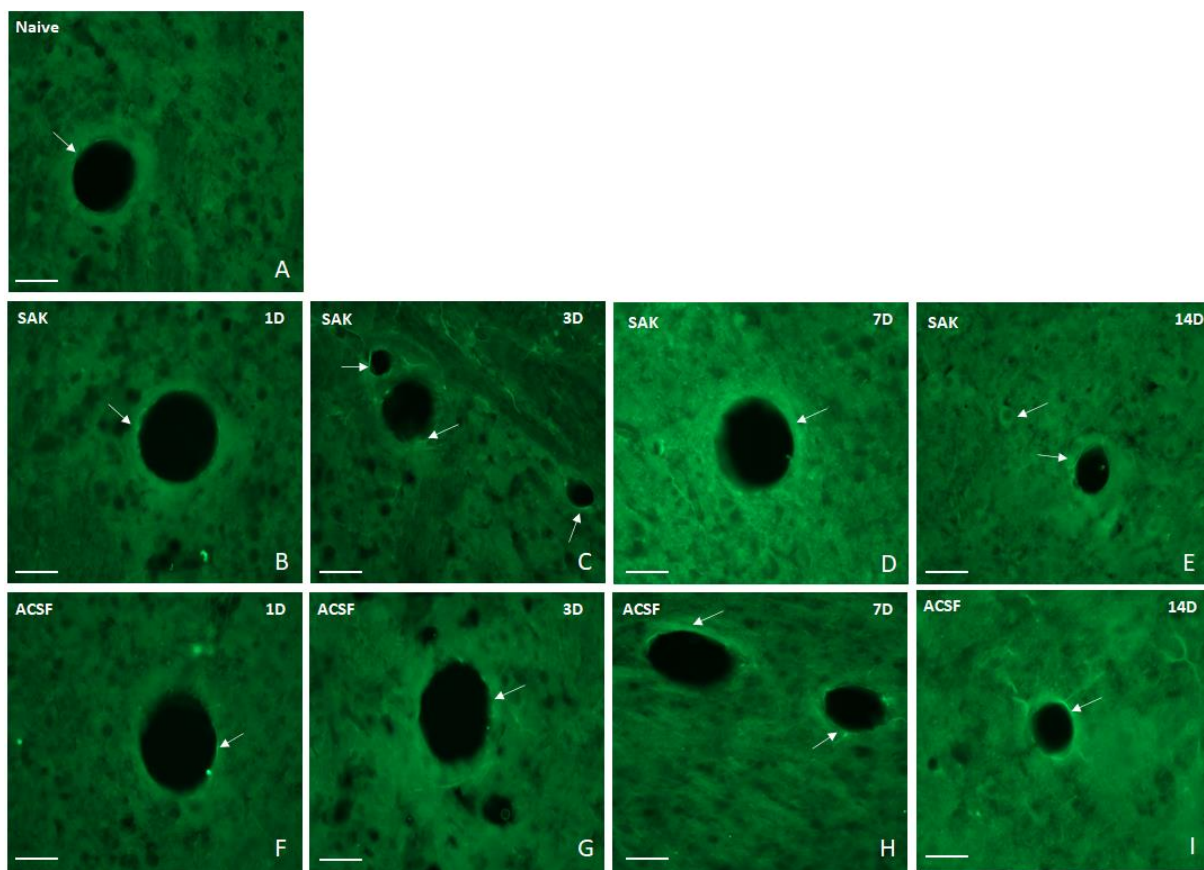
5.1 Exprese Klaudinu-5 v endoteliích po SAK

Výsledky prokázaly, že po prodělání SAK nedošlo ve srovnání se skupinou intaktních zvířat k výraznému poklesu exprese Klaudinu-5. Pouze ve 3. dnu byl zaznamenán mírný pokles relativní intenzity Klaudinu-5 oproti ostatním dnům ve skupině SAK i ACSF. Z tohoto poklesu intenzity je zřejmé, že došlo k úbytku Klaudinu-5 v těsných spojkách, z čehož vyplývá, že HEB v tento den mírně zvýšila svoji propustnost. Naopak růst relativní intenzity tohoto proteinu v 7. dnu prokazuje, že HEB spustila opravné a kompenzační mechanismy, kterými se snaží obnovit a opravit svoji strukturu. Je zajímavé, že po aplikaci ACSF došlo ve srovnání s intaktem i skupinou SAK k signifikantnímu poklesu Klaudinu-5 ve všech periodách. Z toho můžeme konstatovat, že je prostupnost HEB poškozena i vlivem zvýšeného intrakraniálního tlaku. Stejně jako ve skupině SAK i u zvířat s ACSF došlo v 7. dnu k růstu Klaudinu-5 oproti předchozí periodě měření. HEB tedy při narušení své integrity dokáže efektivně opravit svoji strukturu.

Průměrná relativní intenzita Klaudinu-5



Graf 2: Průměrná relativní intenzita imunofluorescence Klaudinu-5 v endoteliích mozkových cév intaktních zvířat, zvířat po aplikaci ACSF a zvířat po prodělání SAK přežívajících 1, 3, 7, a 14 dní. * - signifikantní ve srovnání s intaktními zvířaty; † - signifikantní ve srovnání se SAK.



Obrázek 15: Reprezentativní obrázky imunofluorescence Klaudinu-5 v endoteliích mozkových kapilár. Šipky směřují na pozitivní oblasti cév. Měřítko: 15 μ m.

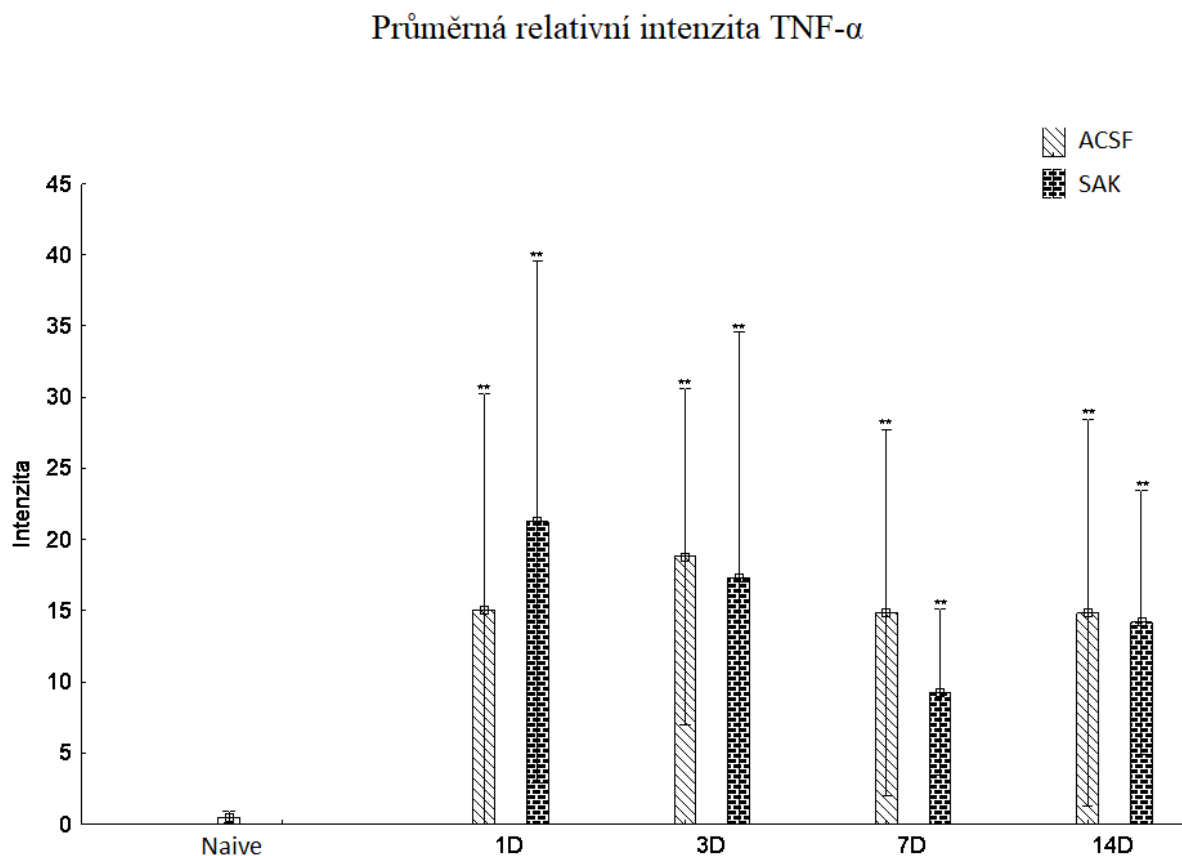
Naive – intaktní zvířata bez SAK – fyziologické hladiny Klaudinu-5 (A)

SAK – zvířata s aplikovanou krví přežívající 1, 3, 7 a 14 dnů (B-E)

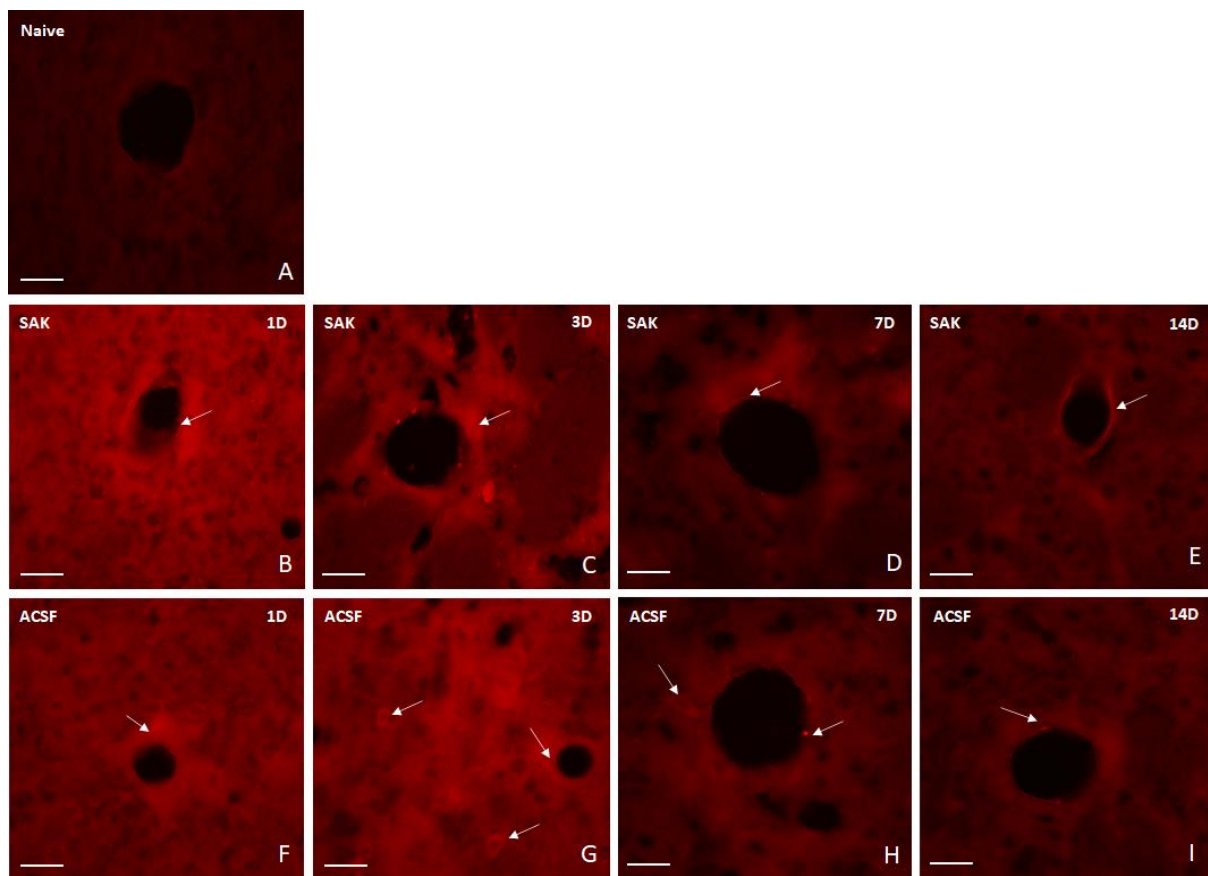
ACSF – zvířata s aplikovaným umělým mozkomíšním mokem přežívající 1, 3, 7 a 14 dnů (F-I)

5.2 Exprese TNF α po SAK

Dvojitou imunohistochemickou fluorescenční analýzou jsem prokázal, že po SAK dochází ke zvýšení exprese pro-inflamačního cytokinu TNF- α . Vysoké hladiny tohoto cytokinu svědčí o přítomnosti masivní zánětlivé reakce. Ke zvýšené expresi dochází reakcí na přítomnost krevních produktů a jejich následný rozpad v subarachnoidálním prostoru a mozkových cisternách. Nejvyšší exprese byla zaznamenána u skupiny SAK první den po aplikaci krve. Naopak k nejnižší expresi u zvířat se SAK došlo za sedm dní od zákroku, kdy zaznamenáváme signifikantní rozdíl se všemi sledovanými periodami. U skupiny zvířat, kterým bylo aplikováno ACSF dosáhly hladiny cytokinu TNF- α nejvyšších hodnot ve třetím dnu od aplikace. Pro tuto skupinu jsem zaznamenal v ostatních dnech (1D, 7D a 14D) signifikantní rozdíl ve srovnání s intaktními zvířaty, nikoli však významný rozdíl v rámci těchto skupin. Vysoké hladiny TNF- α ve skupině ACSF prokázaly, že je tento cytokin aktivován také zvýšeným nitrolebním tlakem.



Graf 3: Průměrná relativní intenzita imunofluorescence TNF- α v RECA+ oblastech endotelií mozkových cév intaktních zvířat, zvířat po aplikaci ACSF a zvířat po SAK a přežívajících 1, 3, 7 a 14 dní (1D, 2D, 3D, 4D). * - signifikantní ve srovnání s intaktními zvířaty.



Obrázek 16: Reprezentativní obrázky imunofluorescence TNF- α v endoteliích mozkových kapilár. Šipky směřují na pozitivní oblasti cév. Měřítko: 15 μ m.

Naive – intaktní zvířata bez SAK (A) – cytokin TNF- α zde nebyl detekován

SAK – zvířata s aplikovanou krví přežívající 1, 3, 7 a 14 dnů (B-E)

ACSF – zvířata s aplikovaným umělým mozkomíšním mokem přežívající 1, 3, 7 a 14 dnů (F-I)

6 DISKUZE

V této práci bylo cílem zjistit, k jakým změnám mozkové tkáně a mozkových bariér dochází při hemoragické mozkové mrtvici. Tyto procesy změn hematoencefalické bariéry jsou dlouhou dobu sledovány a zkoumány. Demonstrace na experimentech se zvířaty věrně pomáhá k lepšímu pochopení patofyziologie poškození mozku jak při ischemické, tak při hemoragické cévní mozkové příhodě, na kterou je tato práce zaměřena. Klíčové pro tuto práci bylo navodit podmínky, které se při patologických stavech v mozkové tkáni dají kontrolovaně monitorovat v souvislosti s funkcí hematoencefalické bariéry.

Poprvé byla přítomnost HEB naznačena pokusy německého vědce Paula Ehrlicha roku 1885. Jeho pokusy prokázaly specifickou vlastnost CNS – přítomnost bariéry mezi krví a tkání CNS. Existenci této bariéry dokázal Paul Ehrlich při podání různých ve vodě rozpustných barviv do krevního oběhu. Došlo k obarvení všech periferních orgánů, ale mozek a mícha zůstali neobarveny (Ribatti et al. 2006). S nástupem elektronové mikroskopie v minulém století byla odhalena také vnitřní struktura této bariéry. Vědci Reese a Karnovsky dokázali přítomnost těsných spojů mezi buňkami cévních endotelií a prokázali, že tyto struktury zásadně napomáhají pro udržení homeostázy mozku. Na konci minulého století zjistili vědci Brown a Oldendorf, že na příčném řezu cerebrální kapilárou krysy je dokonce 5krát více mitochondrií než v kapiláře kosterního svalstva. To nám napovídá o strukturální odlišnosti mozkových kapilár a poukazuje nám na to, že v mozkové tkáni je výměna látek mnohem náročnější na energii než v periférii (Ribatti et al. 2006; Otani a Furuse 2020).

Pro správnou funkci mozku je klíčové udržet v CNS vysoce regulované a kontrolované prostředí. Hematoencefalická bariéra je tedy pro mozek nejdůležitějším faktorem regulujícím vstup různých látek do mozku. Tato bariéra je umístěna v cerebrálních kapilárách, které v mozkové tkáni zaujímají značný prostor. Nejdůležitějším faktorem omezujícím průnik látek z krevního proudu do tkáně mozku jsou endotelové buňky, a hlavně těsné spoje mezi nimi (Kimura et al. 2020). Primární funkcí HEB je také ochrana mozku před vniknutím cizorodých patogenů. To může vést k myšlence, že jakákoliv neuropatologie mozku mohou poukazovat na poškození či úplnou dysfunkci této bariéry. Mnoho studií jasně prokázalo souvislost patologických stavů CNS s poškozením HEB. Následkem některých patofyziologických stavů organismu, jako je hypertenze, ischemie či probíhající zánět může být HEB poměrně snadno poškozena. Funkce této bariéry působením výše uvedených faktorů klesá a zvyšuje svoji permeabilitu, tím stoupá riziko vstupu potenciálně nechtěných látek. Jako příklad můžeme uvést meningitidu, onemocnění měkkých plen mozkových, které prokazatelně vede ke změnám propustnosti HEB.

Změny v permeabilitě HEB lze zjistit pomocí několika metod, které dokážou vyhodnotit množství složky analyzovaného vzorku. Metodou, která byla použita v této práci byla kvantifikace prostupnosti na laboratorních zvířatech *in vivo*. Tato metoda se nejvěrněji přibližuje realitě.

Subarachnoidální krvácení s sebou nese dva hlavní patofyziologické faktory. Vliv krve a rozpadových produktů hemoglobinu na mozkovou tkáň a následné zvýšení intrakraniálního tlaku kvůli přítomnosti krve v subarachnoidálním prostoru. V této práci byly sledovány faktory oba. Pro skupinu zvířat SAK jsem pozoroval účinky rozpadových produktů hemoglobinu na tkáň současně se zvýšením intrakraniálního tlaku. U skupiny ACSF byl sledován pouze jeden patofyziologický faktor, vliv zvýšení intrakraniálního tlaku nezávisle na přítomnosti krve v mozku.

To, jestli látka dokáže projít skrze HEB či nikoli, je klíčové pro léčiva s léčebným efektem působícím přímo v CNS. Pokud dochází ke změně exprese některého z proteinů těsných spojů, můžeme usuzovat, že došlo k poškození HEB. V několika studiích bylo definováno, že po SAK nastává snížení exprese proteinů Okcludinu a Zonulinu ZO-1, ale k poklesu Klaudinu-5 nedochází (Chen et al. 2012). Výsledky mojí práce potvrzují, že nedošlo k výraznému snížení koncentrace Klaudinu-5, čímž potvrzují práci Chen a kolegů (2012). Prováděné experimenty prokázaly, že po prodělání SAK došlo k mírnému poklesu exprese Klaudinu-5 v počátečních stádiích od krvácení. Ve 3. dnu jsem zaznamenal signifikantní snížení intenzity imunofluorescence Klaudinu-5 oproti ostatním dnům jak pro skupiny SAK, tak pro skupinu zvířat, u které byl aplikován ACSF. Z tohoto poklesu intenzity je zřejmé, že došlo k úbytku Klaudinu-5 v mozkových cévách, z čehož můžeme usuzovat, že HEB zvýšila svoji propustnost. Růstem intenzity tohoto proteinu v 1. a 7. dnu pro obě skupiny zvířat můžeme uvažovat o jakési obranné reakci těsných spojů, které se snaží opravit HEB. V sedmém dnu jsme zaznamenali signifikantní růst ve srovnání s ostatními dny pro skupinu ACSF. Z toho můžeme konstatovat, že také zvýšení intrakraniálního tlaku může spouštět řadu kompenzačních a nápravných mechanismů bránících poškození integrity této důležité bariéry. Při srovnání výsledků skupin SAK a ACSF můžeme říct, že ve všech dnech byla intenzita fluorescence Klaudinu-5 vyšší pro skupinu SAK. Největší rozdíl mezi skupinami byl však zaznamenán 3. dnem. Zajímavé je, že v 7. dni došlo pro skupinu ACSF k masivní nárůstu hodnot imunofluorescence ve srovnání s předchozím dnem měření. Rozdíl mezi těmito dny byl dokonce více než dvojnásobný, z čehož je zřejmé, že HEB v rámci obranných kompenzačních mechanismů posílila svoji strukturu zvýšením koncentrace Klaudinu-5 v reakci na zvýšený intrakraniální tlak.

Druhá část mého výzkumu se zaměřila na signální molekuly, které hrají důležitou roli při zánětlivé reakci. Zánět mozku a proteiny těsných spojů spolu úzce souvisí, protože při zánětu dochází k úbytku proteinů těchto spojení (Ahn et al. 2019). V důsledku krvácení uvolňuje mozek při reakci na poškození mediátory, jako jsou cytokiny, které aktivují zánět a způsobují tak další sekundární poškození mozku. Po ruptuře aneurysmatu a vniknutí krve do subarachnoidálního prostoru uvolňují astrocyty a buňky imunitního systému 3 hlavní typy cytokinů. Jedná se o dva druhy interleukinů (IL-6, IL-1 β) a tumor nekrotizující faktor TNF- α (McKeating a Andrews 1998). Tyto nízkomolekulární polypeptidy fungují jako mezibuněčné komunikační molekuly a stimulují reparativní proces zmnožení gliových buněk, který se nazývá glióza. V této práci jsem se podrobně zaměřil na prozánětlivý cytokin TNF- α , který je spojený s oxidačním stresem souvisejícím se SAK a apoptózou endoteliálních buněk (Kimura

et al. 2003). Předpokládáme také, že TNF- α je jedním z hlavních iniciátorů vzniku obávaných vazospasmů a sekundární mozkové ischemie po SAK. Bylo prokázáno, že TNF- α aktivuje uvolňování dalších cytokinů, včetně IL-6. Aktivací této kaskády se podílí na dalším poškození HEB a mozku. (Aloisi et al. 1992). Role cytokinů je v úzkém kontaktu s hlavním tématem této práce, změnou propustnosti hematoencefalické bariéry. Podle Kelleyho prokázaly výzkumy provedené skupinami vědců, že přímý průchod cytokinů skrze HEB způsobuje značné škody na mozkové tkáni (Dantzer a Kelley 2007). Výsledky této práce prokázaly, že po prodělání SAK došlo ve všech periodách k progresivnímu vzestupu intersticiálních hladin prozánětlivého cytokinu TNF- α . Nejvyšší expresi cytokinu TNF- α jsem zaznamenal u zvířat ze skupiny SAK hned prvním dnem po aplikaci krve. Naopak nejnižší hladiny exprese TNF- α po prodělání SAK byly zaznamenány v 7. dnu. Tento den jsme zaznamenali progresivní pokles koncentrace TNF- α se signifikantním rozdílem oproti prvnímu dnu. To může poukazovat na úspěšný průběh zánětu a pokročilé odbourání rozpadových produktů krve. U zvířat, kterým bylo aplikováno ACSF dosáhly hladiny cytokinu TNF- α nejvyšších hodnot ve třetím dnu od aplikace. V ostatních dnech jsem nezaznamenal signifikantní rozdíly v expresi tohoto cytokinu. Vysoké hladiny cytokinu svědčí o přítomnosti masivní zánětlivé reakce.

Výsledky naznačují, že krev a produkty degradace hemoglobinu přispívají k silné imunitní reakci v počátečním stádiu po SAK. Ve srovnání s aplikací ACSF, můžeme konstatovat, že je vliv intrakraniálního tlaku na zánětlivou reakci nejvyšší sedmým dnem. V důsledku zvýšené hladiny TNF- α a silného zánětu může dojít ke smrti určitých typů buněk, a ke zvýšení tělesné teploty. Je pravděpodobné, že oxidační stres vyvolaný zánětem a zvýšením TNF- α dále zvyšuje expresi IL8 a ostatních cytokinů. Chemické mediátory zánětu následně iniciují tvorbu lokálních koagulačních proteáz krevního séra jako je trombin. V místě zánětu tedy dochází ke zvýšené srážlivosti krve, která může vznikem trombu vyvodit sekundární mozkovou ischemii. Vazospasmy a sekundární mozková ischemie jsou nejčastější a nejzávažnější komplikace SAK. (Ahn et al. 2019).

Prokázal jsem, že přítomnost krve v subarachnoidálním prostoru a postupné odbourání těchto krevních elementů přispívá ke zvýšení prostupnosti mozkových bariér pro molekuly cytokinů. Na zvířecím modelu byla tedy potvrzena práce Rossa a kolegů, kteří sledovali, že u některých pozorovaných pacientů byla zjištěna také zvýšená exprese TNF- α v posthemoragickém CSF a kapilárách mozku (Stahel et al. 2000). Hlavním přínosem mé práce je zjištění, že také zvýšený intrakraniální tlak působí prostřednictvím cytokinu TNF- α jako významný aktivátor zánětlivé reakce.

7 ZÁVĚR

Výsledky mojí práce prokázaly, že po prodělání SAK dochází ve všech periodách k progresivnímu vzestupu intersticiálních hladin pro-inflamačního cytokinu TNF- α . Ke zvýšené expresi došlo jednak reakcí na přítomnost krevních produktů v subarachnoidálním prostoru, ale také vlivem zvýšeného intrakraniálního tlaku. Aplikace krve ve skupině SAK vyvolala masivní imunitní reakci vyjádřenou expanzí TNF- α v prvním dnu po SAK. Závěrem tedy můžeme říct, že krev a produkty degradace hemoglobinu významně přispívají k silné imunitní reakci v počátečním stádiu po krvácení. V této práci jsem zjistil, že také zvýšený intrakraniální tlak významně přispívá k aktivaci TNF- α , čímž ovlivňuje zánětlivou reakci. Ve srovnání s aplikací krve výsledky poukazují na to, že je vliv intrakraniálního tlaku na zánětlivou reakci nižší, než vliv krve a rozpadových produktů, ale není však zanedbatelný. V místě zánětu totiž dochází ke zvýšené srážlivosti krve, která může způsobit vazospasmy či dokonce sekundární mozkovou ischemii, která je nejzávažnější komplikací SAK.

Přítomnost krve v subarachnoidálním prostor způsobila mírný pokles koncentrace proteinu těsných spojů Klaudinu-5. Zjistil jsem, že k úbytku Klaudinu-5 přispívá také velkou mírou zvýšený nitrolební tlak, který vedl k nárůstu prostupnosti HEB. To, jestli látka dokáže projít skrze HEB, je klíčové pro léčiva s efektem přímo mozku. Proto může moje práce přispět ke změně v léčbě mozkové mrtvice. Závěrem můžeme konstatovat, že veškeré stanovené cíle byly splněny.

8 Seznam použitých zdrojů

ABBOTT, N. Joan, 2002. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability*. *Journal of Anatomy* [online]. **200**(6), 629–638. ISSN 1469-7580. Dostupné z: doi:10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x

ABBOTT, N. Joan, Lars RÖNNBÄCK a Elisabeth HANSSON, 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. **7**(1), 41–53. ISSN 1471-003X, 1471-0048. Dostupné z: doi:10.1038/nrn1824

AGAMANOLIS, Dimitri, 2020. *Neuropathology* [online] [vid. 2020-10-16]. Dostupné z: <https://neuropathology-web.org/chapter14/chapter14CSF.html>

AHN, Sung-Ho, Jude P. J. SAVARRAJ, Kaushik PARSHA, Georgene W. HERGENROEDER, Tiffany R. CHANG, Dong H. KIM, Ryan S. KITAGAWA, Spiros L. BLACKBURN a H. Alex CHOI, 2019. Inflammation in delayed ischemia and functional outcomes after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation* [online]. **16**(1), 213. ISSN 1742-2094. Dostupné z: doi:10.1186/s12974-019-1578-1

ALOISI, F., A. CARÈ, G. BORSELLINO, P. GALLO, S. ROSA, A. BASSANI, A. CABIBBO, U. TESTA, G. LEVI a C. PESCHLE, 1992. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. **149**(7), 2358–2366. ISSN 0022-1767.

AMBLER, Zdeněk, 2011. *Základy neurologie: [učebnice pro lékařské fakulty]*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-707-3.

BALLABH, Praveen, Alex BRAUN a Maiken NEDERGAARD, 2004. The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease* [online]. **16**(1), 1–13. ISSN 0969-9961. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016

BENEŠ, Vladimír a Petr SUCHOMEL, 2017. *Mozková aneuryzmata a subarachnoidální krvácení*. ISBN 978-80-204-4406-6.

BERANOVÁ, MUDr Milena a Mgr Zbyněk TONAR, 2002. Principy a příklady imunohistochemie. 32.

BIAGGIONI, Italo a Horacio KAUFMANN, 2003. Autonomic Nervous System, Overview. In: Michael J. AMINOFF a Robert B. DAROFF, ed. *Encyclopedia of the Neurological Sciences* [online]. New York: Academic Press, s. 318–321 [vid. 2020-07-20]. ISBN 978-0-12-226870-0. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-226870-9/00332-4

BRAMINI, Mattia, Giulio ALBERINI, Elisabetta COLOMBO, Martina CHIACCHIARETTA, Mattia DIFRANCESCO, José Fernando MAYA-VETENCOURT, Luca MARAGLIANO,

Fabio BENFENATI a Fabrizia CESCO, 2018. Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells. *Frontiers in Systems Neuroscience* [online]. **12**. Dostupné z: doi:10.3389/fnsys.2018.00012

BRIAN a MICHAEL, 2015. *Circumventricular Organs - an overview* / *ScienceDirect Topics* [online] [vid. 2020-10-15]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/circumventricular-organs>

BRISMAN, Jonathan L., Joon K. SONG a David W. NEWELL, 2009. Cerebral Aneurysms. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra052760> [online] [vid. 2020-11-20]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra052760

BYRNE, Martha, 2020. Choroid plexus. *Kenhub* [online] [vid. 2020-10-14]. Dostupné z: <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/choroid-plexus>

ČIHÁK, Radomír, Miloš GRIM, Rastislav DRUGA, Milan MED a Ivan HELEKAL, 2001. *Anatomie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-7169-970-5.

DANTZER, Robert a Keith W. KELLEY, 2007. Twenty Years of Research on Cytokine-Induced Sickness Behavior. *Brain, behavior, and immunity* [online]. **21**(2), 153–160. ISSN 0889-1591. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbi.2006.09.006

DASH, Pramod, 2010. *Blood Brain Barrier and Cerebral Metabolism (Section 4, Chapter 11)* *Neuroscience Online: An Electronic Textbook for the Neurosciences* / *Department of Neurobiology and Anatomy - The University of Texas Medical School at Houston* [online] [vid. 2020-10-16]. Dostupné z: <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s4/chapter11.html>

DELCAMBRE, Gretchen H., Junjie LIU, Jenna M. HERRINGTON, Kelsey VALLARIO a Maureen T. LONG, 2016. Immunohistochemistry for the detection of neural and inflammatory cells in equine brain tissue. *PeerJ* [online]. **4** [vid. 2021-01-05]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.1601

DE ROOIJ, N. K., F. H. H. LINN, J. A. VAN DER PLAS, A. ALGRA a G. J. E. RINKEL, 2007. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* [online]. **78**(12), 1365–1372. ISSN 1468-330X. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp.2007.117655

DIRINGER, Michael N., 2009. Management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: *Critical Care Medicine* [online]. **37**(2), 432–440. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/CCM.0b013e318195865a

EDJLALI, M., C. RODRIGUEZ-RÉGENT, J. HODEL, R. ABOUKAIS, D. TRYSTRAM, J. -P. PRUVO, J. -F. MEDER, C. OPPENHEIM, J. -P. LEJEUNE, X. LECLERC a O. NAGGARA, 2015. Subarachnoid hemorrhage in ten questions. *Diagnostic and Interventional Imaging* [online]. **96**(7), Vascular emergencies imaging, 657–666. ISSN 2211-5684. Dostupné z: doi:10.1016/j.diii.2015.06.003

ETMINAN NIMA, DREIER RITA, BUCHHOLZ BRUCE A., BESEOGLU KERIM, BRUCKNER PETER, MATZENAUER CHRISTIAN, TORNER JAMES C., BROWN ROBERT D., STEIGER HANS-JAKOB, HÄNGGI DANIEL, a MACDONALD R. LOCH, 2014. Age of Collagen in Intracranial Saccular Aneurysms. *Stroke* [online]. **45**(6), 1757–1763. Dostupné z: doi:10.1161/STROKEAHA.114.005461

FRIEDLAND, R. P. a C. IADECOLA, 1991. Roy and Sherrington (1890): a centennial reexamination of „On the regulation of the blood-supply of the brain". *Neurology* [online]. **41**(1), 10–14. ISSN 0028-3878. Dostupné z: doi:10.1212/wnl.41.1.10

GONZÁLEZ-MARISCAL, L, A BETANZOS, P NAVA a B. E JARAMILLO, 2003. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [online]. **81**(1), 1–44. ISSN 0079-6107. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6107(02)00037-8

HADDAD-TÓVOLLI, Roberta, Licio VELLOSO, Nathalia DRAGANO a Albina RAMALHO, 2017. Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Frontiers in Neuroscience* [online]. **11**. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2017.00224

HANKEY, Graeme J., 2006. Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential? *Stroke* [online]. **37**(8), 2181–2188. ISSN 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.0000229883.72010.e4

HARDER, David R., Chenyang ZHANG a Debebe GEBREMEDHIN, 2002. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* [online]. **17**, 27–31. ISSN 0886-1714. Dostupné z: doi:10.1152/physiologyonline.2002.17.1.27

HARROD, Christopher G., H. Hunt BATJER a Bernard R. BENDOK, 2006. Deficiencies in estrogen-mediated regulation of cerebrovascular homeostasis may contribute to an increased risk of cerebral aneurysm pathogenesis and rupture in menopausal and postmenopausal women. *Medical Hypotheses* [online]. **66**(4), 736–756. ISSN 0306-9877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2005.09.051

HINDERSIN, Peter, Richard HEIDRICH a Siegfried ENDLER, 1984. *Haemostasis in cerebrospinal fluid: basic concept of antifibrinolytic therapy of subarachnoid haemorrhage* [online] [vid. 2020-11-20]. ISBN 978-3-7091-4047-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-4047-5>

CHEN, Duo, Xiang-tai WEI, Jun-hong GUAN, Jiang-wei YUAN, Yu-tao PENG, Lei SONG a Yun-hui LIU, 2012. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase prevents blood–brain barrier disruption and normalizes the expression of tight junction proteins claudin-5 and ZO-1 in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochirurgica* [online]. **154**(8), 1469–1476. ISSN 0942-0940. Dostupné z: doi:10.1007/s00701-012-1328-y

CHÝLKOVÁ, Alicja, Michal KOLORZ a Ladislava BARTOŠOVÁ, 2010. Tumor necrosis factor: jeho význam v patogenezi a terapii nespecifických střevních zánětů, revmatoidní artritidy a dalších onemocnění souvisejících s poruchami imunitního systému. *Klinická farmakologie a farmacie*. **24**(2), 89–92. ISSN 12127973, 18035353.

JHA, Ruchira M., Patrick M. KOCHANEK a J. Marc SIMARD, 2019. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology* [online]. **145**(Pt B), 230–246. ISSN 1873-7064. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2018.08.004

JOHANSON, Conrad E., Edward G. STOPA a Paul N. MCMILLAN, 2011. The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance. In: Sukriti NAG, ed. *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 101–131 [vid. 2020-08-19]. ISBN 978-1-60761-938-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-938-3_4

JORDAN, Lori C., S. Claiborne JOHNSTON, Yvonne W. WU, Stephen SIDNEY a Heather J. FULLERTON, 2009. The importance of cerebral aneurysms in childhood hemorrhagic stroke: a population-based study. *Stroke* [online]. **40**(2), 400–405. ISSN 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/STROKEAHA.108.518761

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa a Anthony L. MESCHER, ed., 2010. *Junqueira's basic histology: text & atlas*. 12. ed. New York: McGraw-Hill Medical. ISBN 978-0-07-160431-4.

KALVACH, Pavel, 2010. *Mozkové ischemie a hemoragie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2765-3.

KIM, Helen, Hua SU, Shantel WEINSHEIMER, Ludmila PAWLIKOWSKA a William L. YOUNG, 2011. Brain Arteriovenous Malformation Pathogenesis: A Response-to-Injury Paradigm. *Acta neurochirurgica. Supplement* [online]. **111**, 83–92. ISSN 0065-1419. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-7091-0693-8_14

KIMURA, Hitoshi, Ilker GULES, Toshinari MEGURO a John H. ZHANG, 2003. Cytotoxicity of cytokines in cerebral microvascular endothelial cell. *Brain Research* [online]. **990**(1–2), 148–156. ISSN 0006-8993. Dostupné z: doi:10.1016/s0006-8993(03)03450-4

KIMURA, Ikuya, Shinya DOHGU, Fuyuko TAKATA, Junichi MATSUMOTO, Takuya WATANABE, Takuro IWAO, Atsushi YAMAUCHI a Yasufumi KATAOKA, 2020. Oligodendrocytes upregulate blood-brain barrier function through mechanisms other than the PDGF-BB/PDGFR α pathway in the barrier-tightening effect of oligodendrocyte progenitor cells. *Neuroscience Letters* [online]. **715**, 134594. ISSN 0304-3940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2019.134594

KNIESEL, U. a H. WOLBURG, 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Neurobiology* [online]. **20**(1), 57–76. ISSN 0272-4340. Dostupné z: doi:10.1023/a:1006995910836

KOJIMA, S., C. RAHNER, S. PENG a L. J. RIZZOLO, 2002. Claudin 5 is transiently expressed during the development of the retinal pigment epithelium. *The Journal of Membrane Biology* [online]. **186**(2), 81–88. ISSN 0022-2631. Dostupné z: doi:10.1007/s00232-001-0137-7

KOTO, Takashi, Keiyo TAKUBO, Susumu ISHIDA, Hajime SHINODA, Makoto INOUE, Kazuo TSUBOTA, Yasunori OKADA a Eiji IKEDA, 2007. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *The American Journal of Pathology* [online]. **170**(4), 1389–1397. ISSN 0002-9440. Dostupné z: doi:10.2353/ajpath.2007.060693

KURTELIUS ARTTU, VÄNTTI NELLI, REZAI JAHROMI BEHNAM, TÄHTINEN OLLI, MANNINEN HANNU, KOSKENVUO JUHA, TULAMO RIIKKA, KOTIKOSKI SATU, NURMONEN HEIDI, KÄMÄRÄINEN OLLI-PEKKA, HUTTUNEN TERHI, HUTTUNEN JUKKA, VON UND ZU FRAUNBERG MIKAEL, KOIVISTO TIMO, JÄÄSKELÄINEN JUHA E., a LINDGREN ANTTI E., 2019. Association of Intracranial Aneurysms With Aortic Aneurysms in 125 Patients With Fusiform and 4253 Patients With Saccular Intracranial Aneurysms and Their Family Members and Population Controls. *Journal of the American Heart Association* [online]. **8**(18), e013277. Dostupné z: doi:10.1161/JAHA.119.013277

KYOUNG, 2017. *Arteriovenous Malformations (for Parents) - Nemours KidsHealth* [online] [vid. 2020-10-16]. Dostupné z: <https://kidshealth.org/en/parents/arteriovenous-malformations.html>

LIANG, Danny, Sergei BHATTA, Volodymyr GERZANICH a J. Marc SIMARD, 2007. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurgical Focus* [online]. **22**(5), E2. ISSN 1092-0684. Dostupné z: doi:10.3171/foc.2007.22.5.3

LINN, F. H., G. J. RINKEL, A. ALGRA a J. VAN GIJN, 1996. Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis. *Stroke* [online]. **27**(4), 625–629. ISSN 0039-2499. Dostupné z: doi:10.1161/01.str.27.4.625

LOK, Josephine, Xiao-Shu WANG, Chang-Hong XING, Taka-Kuni MAKI, Li-Min WU, Shu-Zhen GUO, Natan NOVISKI, Ken ARAI, Michael J. WHALEN, Eng H. LO a Xiao-Ying WANG, 2015. Targeting the Neurovascular Unit in Brain Trauma. *CNS Neuroscience & Therapeutics* [online]. **21**(4), 304–308. ISSN 1755-5949. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/cns.12359>

LUCKE-WOLD, Brandon P., Aric F. LOGSDON, Branavan MANORANJAN, Ryan C. TURNER, Evan MCCONNELL, George Edward VATES, Jason D. HUBER, Charles L. ROSEN a J. Marc SIMARD, 2016. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Neuroinflammation: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **17**(4), 497. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17040497

MARK, Karen S. a Thomas P. DAVIS, 2002. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [online]. **282**(4), H1485–H1494. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00645.2001

MCCORMICK, P. W., J. MCCORMICK, J. M. ZABRAMSKI a R. F. SPETZLER, 1994. Hemodynamics of subarachnoid hemorrhage arrest. *Journal of Neurosurgery* [online]. **80**(4), 710–715. ISSN 0022-3085. Dostupné z: doi:10.3171/jns.1994.80.4.0710

MCKEATING, E. G. a P. J. ANDREWS, 1998. Cytokines and adhesion molecules in acute brain injury. *British Journal of Anaesthesia* [online]. **80**(1), 77–84. ISSN 0007-0912. Dostupné z: doi:10.1093/bja/80.1.77

MILLER, Brandon A., Nefize TURAN, Monica CHAU a Gustavo PRADILLA, 2014. Inflammation, Vasospasm, and Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage. *BioMed Research International* [online]. **2014** [vid. 2021-02-15]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2014/384342

NIELSEN, S., E. A. NAGELHUS, M. AMIRY-MOGHADDAM, C. BOURQUE, P. AGRE a O. P. OTTERSEN, 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **17**(1), 171–180. ISSN 0270-6474.

OLIVERI ET AL., 2018. Figure 1: Structure of the AVM. *ResearchGate* [online] [vid. 2020-10-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-the-AVM_fig1_327165029

OTANI, Tetsuhisa a Mikio FURUSE, 2020. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends in Cell Biology* [online]. **30**(10), 805–817. ISSN 0962-8924, 1879-3088. Dostupné z: doi:10.1016/j.tcb.2020.08.004

PARDRIDGE, William M., 1995. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **15**(1–3), 5–36. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/0169-409X(95)00003-P

PARDRIDGE, William M., 2007. Blood–brain barrier delivery. *Drug Discovery Today* [online]. **12**(1–2), 54–61. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2006.10.013

PAVEL, Kalvach a a KOLEKTIV, 2010. *Mozkové ischemie a hemoragie: 3., přepracované a doplněné vydání*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-7037-6.

PETEREIT, H. F., R. PUKROP, F. FAZEKAS, S. U. BAMBORSCHKE, S. RÖPELE, H. W. KÖLMEL, S. MERKELBACH, G. JAPP, P. J. H. JONGEN, H. P. HARTUNG a O. R. HOMMES, 2003. Low interleukin-10 production is associated with higher disability and MRI lesion load in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*

[online]. **206**(2), 209–214. ISSN 0022-510X. Dostupné z: doi:10.1016/s0022-510x(02)00420-3

PIŤHA, 2014. *Bariéry nervového systému za fyziologických a patologických stavů* [online] [vid. 2020-05-24]. Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2014-5-2/bariery-nervoveho-systemu-za-fyziologickych-a-patologickych-stavu-49671>

PRICE, Anna a Agnieszka KINSNER-OVASKAINEN, 2013. Role of microglia and astrocytes in the process of neuroinflammation. *Glial Cells: Embryonic Development, Types/Functions and Role in Disease*. 55–87.

QURESHI, A. I., G. Y. SUNG, A. Y. RAZUMOVSKY, K. LANE, R. N. STRAW a J. A. ULATOWSKI, 2000. Early identification of patients at risk for symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Critical Care Medicine* [online]. **28**(4), 984–990. ISSN 0090-3493. Dostupné z: doi:10.1097/00003246-200004000-00012

RAMOS-VARA, José A., 2011. Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **691**, 83–96. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60761-849-2_5

RAYMOND, Jean, F GUILLEMIN, F PROUST, Andy MOLYNEUX, A.J. FOX, J.S. CLAIBORNE, Jean MEDER a Isabelle ROULEAU, 2008. Unruptured Intracranial Aneurysms. A Critical Review of the International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms (ISUIA) and of Appropriate Methods to Address the Clinical Problem. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences* [online]. **14**, 85–96. Dostupné z: doi:10.1177/159101990801400111

RIBATTI, Domenico, Beatrice NICO, Enrico CRIVELLATO a Marco ARTICO, 2006. Development of the blood-brain barrier: A historical point of view. *Anatomical record. Part B, New anatomist* [online]. **289**, 3–8. Dostupné z: doi:10.1002/ar.b.20087

ROSENBLUM WILLIAM I., NELSON GUY H., WORMLEY BRANDON, WERNER PAMELA, WANG JIMIN, a SHIH CHARLES C.-Y., 1996. Role of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM) in Platelet Adhesion/Aggregation Over Injured but Not Denuded Endothelium In Vivo and Ex Vivo. *Stroke* [online]. **27**(4), 709–711. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.27.4.709

SEHBA, Fatima A., 2015. The Rat Endovascular Perforation Model of Subarachnoid Hemorrhage. In: Javier FANDINO, Serge MARBACHER, Ali-Reza FATHI, Carl MUROI a Emanuela KELLER, ed. *Neurovascular Events After Subarachnoid Hemorrhage: Towards Experimental and Clinical Standardisation* [online]. Cham: Springer International Publishing, Acta Neurochirurgica Supplement, s. 321–324 [vid. 2021-01-22]. ISBN 978-3-319-04981-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-04981-6_55

SHALIT, M. N., O. M. REINMUTH, S. SHIMOJYO a P. SCHEINBERG, 1967. Carbon Dioxide and Cerebral Circulatory Control: III. The Effects of Brain Stem Lesions. *Archives of Neurology* [online]. **17**(4), 342–353. ISSN 0003-9942. Dostupné z: doi:10.1001/archneur.1967.00470280008002

SOLÁR, Peter, Alemeh ZAMANI, Lucie KUBÍČKOVÁ, Petr DUBOVÝ a Marek JOUKAL, 2020. Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids and Barriers of the CNS* [online]. **17**(1), 35. ISSN 2045-8118. Dostupné z: doi:10.1186/s12987-020-00196-2

SOLOMON R A, ANTUNES J L, CHEN R Y, BLAND L, a CHIEN S, 1985. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke* [online]. **16**(1), 58–64. Dostupné z: doi:10.1161/01.STR.16.1.58

STAHEL, Philip F., Esther SHOHAMI, Firas M. YOUNIS, Karin KARIYA, Viviane I. OTTO, Philipp M. LENZLINGER, Maurice B. GROSJEAN, Hans-Pietro EUGSTER, Otmar TRENTZ, Thomas KOSSMANN a Maria C. MORGANTI-KOSSMANN, 2000. Experimental Closed Head Injury: Analysis of Neurological Outcome, Blood–Brain Barrier Dysfunction, Intracranial Neutrophil Infiltration, and Neuronal Cell Death in Mice Deficient in Genes for Pro-Inflammatory Cytokines. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [online]. **20**(2), 369–380. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1097/00004647-200002000-00019

STEPHEN B HLADKY, 2014. Table 1 Comparison of composition of CSF and blood plasma. *ResearchGate* [online] [vid. 2020-11-16]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-composition-of-CSF-and-blood-plasma_tbl1_270794560

TANG, P., null HUNG M-C a J. KLOSTERGAARD, 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* [online]. **35**(25), 8216–8225. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi952182t

THEMES, U. F. O., 2016. Subarachnoid Hemorrhage. *Neupsy Key* [online]. [vid. 2020-11-21]. Dostupné z: <https://neupsykey.com/subarachnoid-hemorrhage-2/>

TRACEY, Daniel, Lars KLARESKOG, Eric H. SASSO, Jochen G. SALFELD a Paul P. TAK, 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **117**(2), 244–279. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2007.10.001

TROJAN, Stanislav, 2003. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0512-5.

VON BARTHELD, Christopher S., Jami BAHNEY a Suzana HERCULANO-HOUZEL, 2016. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *The Journal of Comparative Neurology* [online]. **524**(18), 3865–3895. ISSN 1096-9861. Dostupné z: doi:10.1002/cne.24040

- W, Pan, Stone KP, Hsuchou H, Manda VK, Zhang Y a Kastin AJ, 2011. Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. *Current Pharmaceutical Design* [online]. **17**(33), 3729–3740. ISSN 1381-6128, 1873-4286. Dostupné z: doi:10.2174/138161211798220918
- WACHTER, R. F., G. P. BRIGGS a C. E. PEDERSEN, 1975. Precipitation of phase I antigen of *Coxiella burnetii* by sodium sulfite. *Acta Virologica*. **19**(6), 500. ISSN 0001-723X.
- WAXMAN, Stephen, 2010. *Ventricles and Coverings of the Brain - Clinical Neuroanatomy*, 27 ed. [online] [vid. 2020-11-16]. Dostupné z: <https://doctorlib.info/anatomy/clinical-neuroanatomy/11.html>
- WITTCHEN, Erika, Julie HASKINS a Bruce STEVENSON, 2000. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *The Journal of biological chemistry* [online]. **274**, 35179–85. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.49.35179
- WOLBURG, Hartwig a Andrea LIPPOLDT, 2002. Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology* [online]. **38**(6), Blood Brain Barrier, 323–337. ISSN 1537-1891. Dostupné z: doi:10.1016/S1537-1891(02)00200-8
- YARLAGADDA, Atmaram, Elizabeth ALFSON a Anita H. CLAYTON, 2009. The Blood Brain Barrier and the Role of Cytokines in Neuropsychiatry. *Psychiatry (Edgmont)*. **6**(11), 18–22. ISSN 1550-5952.
- ZLOKOVIC, Berislav V., 2008. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* [online]. **57**(2), 178–201. ISSN 0896-6273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003

9 Seznam obrázků

Obrázek 1: Leptomeningeální vrstva - Mozkové pleny, perivaskulární prostory navazující na Virchowovy-Robinovy prostory (převzato z Waxman 2010).

Obrázek 2: Umístění sekrečních a sensorických CVO (převzato z Dash 2010).

Obrázek 3: Znárodnění molekulárních interakcí membránových spojů HEB u epitelálních buněk cerebrálních cév.

Obrázek 4: Buněčné složky neurovaskulární jednotky – vtaah mezi buňkami mozku a jejich cévami je pro správnou funkci mozku klíčový (Pullagurla et al. 2015).

Obrázek 5: Různé druhy neuroglií: (převzato z Tabata 2015).

Obrázek 6: Transportní systém hematoencefalické bariéry.: A: paracelulární difuze B: Lipidová difuze C: Přenašečové proteiny D,E: Endocytóza (Bramini et al. 2018).

Obrázek 7: CT snímek po subarachnoidálním krvácení. Převzato z (Edjlali et al. 2015). A – Šipkou označena přítomnost krve v subarachnoidálním prostoru.

Obrázek 8: Nejčastější typy aneurysmat Willisova okruhu - a. vakovitá (*a. saccatum*) obvykle v místech větvení tepen (levá horní část) a aneurysmata větvenovitá (*a. fusiforme*) pravá horní část (Kurtelius Arttu et al. 2019).

Obrázek 9: Rozdílná struktura stěny aneurysmatu (vlevo) a zdravé mozkové cévy (vpravo). Aneurysma postrádá vnitřní elastickou membránu a naopak převládají kolagenní vlákna (Etminan Nima et al. 2014).

Obrázek 10: Aneurysma - nejčastější příčina netraumatikého SAK - výskyt aneurysmat v oblasti Willisova okruhu při větvení tepen (upraveno z Madhukar 1993).

Obrázek 11: Arteriovenózní malformace - Cévní anomálie, při které dochází k absenci kapilárního přechodu mezi tepnami a žilami. Nedochází tedy ke snížení intravaskulárního tlaku a krev proudí z tepen přímo do žil. Spodní část pro srovnání se zdravou cévní tkání (převzato z Oliveri et al. 2018).

Obrázek 12: Aplikace krve a ACSF do subarachnoidálního prostoru podle perforačního modelu. Převzato z (Sehba 2015).

Obrázek 13: Princip imunohistochemie, upraveno z (Kellie Johnson 2016).

Obrázek 14: Transverzální řez kapilárou mozku v různých typech fluorescenčních spekter A – DAPI, B – FIC, C – TRIC (RECA pozitivní oblasti endotelií cév), D – kolokalizace fluorescenčních spekter.

Obrázek 15: Reprezentativní obrázky imunofluorescence Klaudinu-5 v endoteliích mozkových kapilár. Šipky směřují na pozitivní oblasti cév. Měřítka: 15 μ m.

Obrázek 16: Reprezentativní obrázky imunofluorescence TNF- α v endoteliích mozkových kapilár. Šipky směřují na pozitivní oblasti cév. Měřítka: 15 μ m.

10 Seznam grafů

Graf 1: Pravděpodobnost výskytu vazospazmů v závislosti na dnech po SAK. Komplikace vazospazmy vrcholí 7. až 8. dnem po SAK. Pro zmírnění rozsahu vazospazmů se podávají léky (např. antagonisty kalciového kanálu II. generace Nimodipin) ideálně do 48 hod. po krvácení (upraveno, převzato z Themes 2016).

Graf 2: Průměrná relativní intenzita imunofluorescence Claudinu-5 v endoteliích mozkových cév intaktních zvířat, zvířat po aplikaci ACSF a zvířat po prodělání SAK přežívajících 1, 3, 7, a 14 dní (1D, 3D, 7D, 14D).

Graf 3: Průměrná relativní intenzita imunofluorescence TNF α v RECA+ oblastech endotelií mozkových cév intaktních zvířat, zvířat po aplikaci ACSF a zvířat po SAK a přežívajících 1, 3, 7 a 14 dní (1D, 2D, 3D, 4D).

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Složení CSF je klíčové pro homeostázu mozku (Stephen B Hladky 2014, upraveno).

Tabulka 2: Okolnosti vzniku SAK podle Adamse. Výzkum byl proveden celkem na 286 pacientech, z toho u 25% pacientů nebyly okolnosti vzniku SAK zjištěny (Kalvach 2010).