

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta



Dizertační práce

Praha, 2019

MUDr. Martin Kolář

**Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta**

Dizertační práce

**Patofyziologie poškození mozku
po subarachnoidálním krvácení a
možnosti terapeutického ovlivnění**

Pathophysiology of Brain Injury after Subarachnoid Haemorrhage
and its Management Options

Školitel: Prof. MUDr. Jan Pachtl, CSc.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28. 5. 2019

Martin Kolář

Podpis

Identifikační záznam:

KOLÁŘ, Martin. *Patofyziologie poškození mozku po subarachnoidálním krvácení a možnosti terapeutického ovlivnění. [Pathophysiology of Brain Injury after Subarachnoid Haemorrhage and its Management Options]*. Praha, 2019. Počet stran 111, počet příloh 3. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Klinika anesteziologie a resuscitace 3. LF UK 2019. Školitel: Prof. MUDr. Jan Pachl, CSc.

Klíčová slova: subarachnoidální krvácení; oxid dusnatý; NO-syntáza, časné poškození mozku, vazospasmus

Key words: subarachnoid hemorrhage, nitric oxide, NO-synthase, early brain injury, vasospasm

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce – především svému školiteli prof. MUDr. Janu Pachlovi, CSc., za pedagogické vedení, a doc. MUDr. Janu Marešovi, CSc. za cenné komentáře a kritické připomínky. MUDr. Kateryně Nohejlové, Ph.D. děkuji za zaučení do laboratorní praxe, pomoc s provedením pokusů a supervizi. Za pomoc s přípravou histologických preparátů a jejich hodnocením děkuji prof. MUDr. Jaroslavu Pokornému, DrSc. a Radce Siblíkové. Prof. MUDr. Richardu Rokytovi, DrSc a Ing. Pavlu Stopkovi, CSc. děkuji za pomoc s analýzou volných radikálů. Za pomoc při statistické analýze děkuji Ing. Veronice Konrádové.

Svojí manželce a dětem děkuji za nekonečnou trpělivost, kterou se mnou po dobu psaní článků i dizertace měli.

Na závěr děkuji i laboratorním potkanům, bez kterých by neexistovala věda v podobě, v jaké ji známe.

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Souhrn..... | 7 |
| 2 | Summary | 10 |
| 3 | Seznam zkratek..... | 13 |
| 4 | Úvod..... | 14 |
| 4.1 | Historie..... | 14 |
| 4.2 | Epidemiologie SAK..... | 15 |
| 4.3 | Patofyziologie poškození mozku po SAK..... | 16 |
| 4.3.1 | Role oxidu dusnatého a NO-syntázy..... | 17 |
| 4.3.2 | Role zánětlivé reakce | 21 |
| 4.3.3 | Role volných radikálů..... | 22 |
| 4.3.4 | Časné poškození mozku | 23 |
| 4.4 | Pozdní ischemie mozku | 25 |
| 4.4.1 | Mechanismy pozdního ischemického poškození | 26 |
| 4.5 | Možnosti terapeutického ovlivnění perfuzních poruch | 27 |
| 4.5.1 | Farmakoterapie | 28 |
| 4.5.2 | Vazodilatancia | 28 |
| 4.5.3 | Chirurgická terapie | 31 |
| 4.5.4 | Endovaskulární techniky..... | 32 |
| 4.6 | Současné kontroverze v patofyziologii a terapii SAK..... | 33 |
| 5 | Hypotézy | 34 |
| 6 | Metodika..... | 35 |
| 6.1 | Pokusná zvířata | 35 |
| 6.2 | Anestezie | 35 |
| 6.3 | Navození subarachnoidálního krvácení | 36 |
| 6.4 | Měření mozkové perfuze | 37 |
| 6.5 | Farmakoterapie..... | 38 |
| 6.6 | Dekompresní kraniektomie | 41 |
| 6.7 | Preemptivní podání melatoninu a volné radikály v modelu SAK..... | 42 |
| 6.7.1 | Behaviorální testy | 44 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 6.7.2 | Morfologické hodnocení..... | 47 |
| 6.8 | Statistické vyhodnocení | 47 |
| 7 | Výsledky..... | 49 |
| 7.1 | Důsledky subarachnoidálního podání krve / IR..... | 49 |
| 7.1.1 | Změny mozkové perfuze | 49 |
| 7.1.2 | Změny nitrolebního tlaku a mozkového perfuzního tlaku | 52 |
| 7.1.3 | Hladiny volných radikálů | 55 |
| 7.2 | Terapeutické intervence..... | 56 |
| 7.2.1 | Efekt intrathekálního podání nitroprussidu sodného..... | 56 |
| 7.2.2 | Dekompresní kraniektomie | 66 |
| 7.2.3 | Melatonin..... | 72 |
| 8 | Diskuse..... | 78 |
| 8.1 | Modely navození SAK..... | 78 |
| 8.2 | Změny mozkové perfuze po SAK..... | 81 |
| 8.3 | Efekt dekompresní kraniektomie..... | 82 |
| 8.4 | Efekt intracerebroventrikulárního podání nitroprussidu sodného | 85 |
| 8.5 | Neurologický deficit po experimentálním SAK a efekt preemptivně podaného melatoninu | 89 |
| 8.6 | Limitace studie..... | 91 |
| 8.7 | Přesah do klinické medicíny | 93 |
| 9 | Závěry | 94 |
| 10 | Literatura..... | 95 |
| 11 | Publikace autora | 109 |
| 12 | Přílohy..... | 112 |

1 Souhrn

Neúrazové subarachnoidální krvácení (SAK) způsobené rupturou aneurysmatu je cévní mozková příhoda s vysokou mortalitou. Důsledky SAK jsou akutní i dlouhodobé. Na rozvoji neurologického poškození při SAK se podílí nitrolební hypertenze, časná i pozdní vazokonstrikce mozkových tepen i zánětlivá odpověď. Významnou roli bezprostředně i dlouhodobě po SAK hraje oxid dusnatý (NO) a jím zprostředkovaná vazodilatace.

Prvotním inzultem při ruptuře aneurysmatu je prudký vzestup nitrolebního tlaku (intracranial pressure, ICP) a pokles mozkového perfuzního tlaku (cerebral perfusion pressure, CPP). Iniciální pokles mozkové perfuze (cerebral blood flow, CBF) však souvisí nejen s nitrolební hypertenzí, ale i s časnou vazokonstrikcí mozkových tepen. Za příčiny této vazokonstrikce se považuje snížená koncentrace oxidu dusnatého způsobená jeho vychytáváním (scavengingem) a dysfunkce endotelu, kvůli které cévy ztrácí schopnost NO-zprostředkované vazodilatace. Vylití krve do subarachnoidálního prostoru vede rovněž k aktivaci zánětlivé odpovědi: dochází k aktivaci mikroglie, k narušení integrity bazální membrány endotelu, k průniku imunitních buněk do subarachnoidálního prostoru a ke zvýšené syntéze prozánětlivých mediátorů. Dalším mechanismem je poškození volnými radikály: iniciální ischemie vede k nadprodukci superoxidových aniontů, které sloučením s oxidem dusnatým tvoří prudce reaktivní peroxynitrit.

Uvedené mechanismy se podílejí i na rozvoji pozdního ischemického neurologického deficitu. Volný hemoglobin penetrující do cévní stěny zde může sloužit jako vychytávač NO a negativně ovlivňovat funkci endoteliální NO-syntázy, spontánní oxidace oxyhemoglobinu vede ke vzniku volných kyslíkových radikálů.

Cílem práce bylo na zvířecím modelu otestovat následující hypotézy:

1. Subarachnoidální krvácení způsobí pokles perfuze mozku mechanismem nitrolební hypertenze i časnou vazokonstrikcí,
2. Časné perfuzní změny mohou být ovlivněny podáváním vazodilatancia – donoru NO, i eliminací nitrolební hypertenze,
3. V důsledku SAK dochází ke vzniku volných radikálů,
- 4.

Důsledky poškození volnými radikály lze zmírnit podáním antioxidantu (melatonin).

Metodika: Experimenty byly provedeny na samcích laboratorních potkanů kmene Wistar. K navození SAK byl použit model injekce arteriální krve do prechiasmatické cisterny. Perfuze mozkové kůry byla měřena metodou Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA).

V prvním experimentu bylo navozeno SAK a podle vývoje změn perfuze mozkové kůry byl do postranní mozkové komory podáván nitroprussid sodný (SNP; 10 μg / 5 μl) ve 2 fázích: (1) všem zvířatům 3 minuty po navození SAK, (2) po dosažení vyrovnaného stavu, pokud došlo k poklesu perfuze po předchozím vzestupu (průběh „vrchol – plateau“). Kontrolním zvířatům bylo stejným způsobem podáváno rozpouštědlo (vehikulum, V) nitroprussidu sodného.

K odlišení vlivu nitrolební hypertenze a vazokonstrikce na hypoperfuzi byl dále testován vliv dekompresní kraniektomie (DK) na perfuzní poruchy v časně fázi SAK. Pokusným zvířatům byla provedena rozsáhlá oboustranná fronto-temporo-parietální kraniektomie a durotomie, k měření ICP bylo zavedeno intraparenchymové čidlo. Z hodnot arteriálního krevního tlaku a ICP byla vypočtena hodnota CPP a jakožto výraz míry vazokonstrikce byla stanovena mozková cévní rezistence jako podíl CPP a změny mozkové perfuze v procentech výchozích hodnot ($R = \text{CPP} / \Delta \text{perfuze}$).

Ve třetí části experimentu byla nejprve metodou EPR/ESR měřena hladina volných radikálů po navození SAK a u kontrolní skupiny. Následně bylo hodnoceno podání melatoninu, který se uplatňuje jako antioxidant i jako scavenger volných radikálů, na dlouhodobý neurologický deficit. Melatonin (100 mg / kg *i.p.*) byl podán 1 hod. před navozením SAK. Neurologické změny byly sledovány pomocí behaviorálních testů (rotarod, beam balance a učení v Morrisově vodním bludišti). Na závěr proběhlo morfologické hodnocení počtu odumřelých neuronů v hilu hippocampu zaslepeným hodnotitelem.

Výsledky: U necelé poloviny zvířat léčených SNP došlo k závažné systémové hypotenzi a signifikantnímu poklesu mozkové perfuze, u zbylých

zvířat se změny perfuze nelišily od kontrolních skupin. Podání druhé dávky SNP vedlo k mírnému vzestupu perfuze mozkové kůry ve srovnání s hodnotami před podáním SNP, nicméně v porovnání se skupinou bez farmakointervence nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl.

Dekompresní kraniektomie sice vedla k signifikantnímu snížení ICP a snížení okamžité mortality, nicméně časnou hypoperfuzi po SAK nezlepšila – samotná dekompresní kraniektomie vedla ke snížení perfuze ve srovnání se zvířaty bez DK a ke vzestupu rezistence mozkových cév.

Metodou EPR/ESR bylo prokázáno zvýšení hydroxylových i nitroxylových radikálů jak u zvířat s navozeným SAK, tak u falešně operovaných zvířat. Podání melatoninu signifikantně snížilo počet odumřelých buněk v hippocampu, nicméně mezi jednotlivými skupinami nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v sensorimotorických testech (rotarod ani beam balance). I přes výraznou vizuální rozdílnost výsledků jsme neprokázali statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami v učení v Morrisově vodním bludišti.

Závěr: V rozvoji perfuzních poruch se převážně uplatňuje mechanismus nitrolební hypertenze a poklesu mozkového perfuzního tlaku. Eliminace nitrolební hypertenze dekompresní kraniektomií snížila bezprostřední mortalitu pokusných zvířat, nicméně nezlepšila perfuzi mozku, naopak vedla ke zvýšení mozkové cévní rezistence. Intracerebroventrikulární podání nitroprussidu sodného po subarachnoidálním krvácení zlepšuje v použité dávce mozkovou perfuzi jen minimálně, kromě toho má závažné systémové nežádoucí účinky (hypotenze), které mohou perfuzi naopak zhoršit. Z hlediska dlouhodobého neurologického deficitu preemptivní podání melatoninu snížilo množství odumřelých neuronů v hippocampu, nicméně nevedlo k signifikantnímu zlepšení výsledků v neurobehaviorálních testech.

Klíčová slova: subarachnoidální krvácení; oxid dusnatý; NO-syntáza, časné poškození mozku, vazospasmus, kortikální perfuze

2 Summary

Aneurismal subarachnoid hemorrhage (SAK) is a cerebrovascular accident with high mortality. It carries both short and long term consequences. Mechanisms of neurologic damage after SAK include intracranial hypertension, early and delayed brain vasoconstriction, as well as inflammatory response. Vasoconstriction is a crucial phenomenon in both phases and nitric oxide (NO) plays the key role.

Rapid increase of intracranial pressure (ICP) and decrease of cerebral perfusion pressure (CPP) are the initial insults in aneurysm rupture. Subsequent drop of cerebral blood flow (CBF) is related not only to the intracranial hypertension, but also to the early brain vasoconstriction. Possible mechanisms of the early vasoconstriction are decreased amount of nitric oxide caused by scavenging of NO and endothelial dysfunction leading to loss of NO-mediated vasodilation in cerebral vessels. Extravasation of blood into subarachnoidal space also triggers inflammatory response: it leads to activation of microglia, disruption of endothelial basal membrane, infiltration of immune cells into the subarachnoidal space and increased synthesis of proinflammatory mediators. Another mechanism of neurologic damage involves free radicals. Initial ischemia leads to overproduction of superoxide anion which reacts with NO creating highly reactive peroxynitrite.

These mechanisms promote the development of delayed ischemic neurologic deficit as well. Free hemoglobin penetrating vascular wall can scavenge NO as well as impair function of endothelial NO-synthase. Spontaneous oxidation of oxyhemoglobin leads to free radicals generation.

Aim of the study was to test following hypotheses in animal model:

1. Subarachnoid hemorrhage causes decrease of brain perfusion by mechanism of intracranial hypertension and early vasoconstriction,
2. Both administration of vasodilator – NO donor, and elimination of intracranial hypertension can reverse the early hypoperfusion,
3. SAH leads to generation of free radicals,
4. Administration of antioxidant (melatonin) can attenuate the free radical damage.

Methods: Adult male Wistar rats were used for all the experiments. SAH was induced by injection of arterial blood into prechiasmatic cistern. Perfusion of brain cortex was measured by Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA).

In the first experiment, SAH was induced and sodium nitroprusside (SNP, 10 μ g / 5 μ l) was administered into the lateral ventricle in 2 phases according to the dynamics of perfusion changes: (1) all animals received SNP 3 mins after SAH induction, (2) after reaching plateau of perfusion, in occurrence of “peak – plateau” pattern. Control animals received only vehicle (V) of SNP.

In the second experiment, we tested the effect of decompressive craniectomy (DC) on perfusion, in order to distinguish between the influence of intracranial hypertension and vasoconstriction on the early hypoperfusion after SAH. The animals underwent extensive bilateral fronto-temporo-parietal craniectomy and durotomy and the intracranial pressure (ICP) probe was inserted. We counted cerebral perfusion pressure (CPP) as a difference between mean arterial pressure and ICP ($CPP = MAP - ICP$) and cerebral vascular resistance (CPP divided by change of brain perfusion in per cent of baseline values, $R = CPP / \Delta \text{perfusion}$) as a measure of cerebral vasoconstriction.

In the third experiment, we measured levels of free radicals in both SAH and sham groups using the EPR/ESR method. Then we evaluated the effect of melatonin, as antioxidant and free radicals scavenger, on long-time neurologic deficit. Melatonin (100 mg / kg *i.p.*) was administered 1 hour before SAH induction or sham procedure. Neurologic deficit was evaluated by behavioral tests (rotarod, beam balance and place navigation in Morris Water Maze). At the end, a blinded evaluator counted the number of dead neurons in slices of hippocampal hilus.

Results: Approximately one half of SNP-treated animals developed serious systemic hypotension and significant decrease of brain perfusion; perfusion in the other animals did not differ from control group. Second dose

of SNP slightly increased the brain perfusion; nevertheless, this increase was insignificant compared to animals without pharmacointervention.

Despite DC significantly decreased ICP and reduced immediate mortality, it did not improve the early hypoperfusion after SAH. DC itself increased cerebral vascular resistance and decreased brain perfusion, compared to non-DC groups.

EPR/ESR method showed increase of hydroxyl and nitroxyl radicals in both, SAH and sham-operated, groups. The administration of melatonin significantly decreased the amount of dead neurons in hippocampus; nevertheless, we observed no significant difference between groups in either sensorimotor tests (rotarod and beam balance) or in test of learning and memory in Morris Water Maze.

Conclusions: Perfusion impairment after SAH is caused mainly by intracranial hypertension and decrease of cerebral perfusion pressure. Decompressive craniectomy eliminated the intracranial hypertension and decreased the immediate mortality of experimental animals; on the other hand, it did not improve the cortical perfusion and increased cerebral vascular resistance. Intracerebroventricular administration of sodium nitroprusside improved the brain perfusion only minimally, besides, it had serious side effects (hypotension) that worsened the perfusion.

Preemptive administration of melatonin decreased the amount of dead neurons in hippocampus; nevertheless no beneficial effect in neurobehavioral tests was detected.

Key words: subarachnoid hemorrhage, nitric oxide, NO-synthase, early brain injury, vasospasm, cortical perfusion

3 Seznam zkratek

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| CBF | cerebral blood flow |
| CPP | cerebral perfusion pressure |
| DCI | delayed cerebral ischemia |
| DIND | delayed ischemic neurologic deficit |
| DK | dekompresní kraniektomie |
| EBI | early brain injury |
| eNOS | endoteliální NO-syntáza |
| EPM | endovascular puncture model |
| GSH-Px | glutathion-peroxidáza |
| Hb | hemoglobin |
| ICP | intracranial pressure |
| ICV | intracerebroventrikulární |
| IL | interleukin |
| iNOS | inducibilní NO-syntáza |
| IR | izotonický roztok |
| LASCA | laser speckle contrast analysis |
| MWM | ..Morris water maze |
| nNOS | neuronální NO-syntáza |
| NO | oxid dusnatý |
| NOS | NO-syntáza |
| PU | perfusion unit |
| ROI | region of interest |
| SAK | subarachnoidální krvácení |
| SOD | superoxid-dismutáza |
| TNF | tumor-nekrotizující faktor |
| V | vehikulum |

4 Úvod

Subarachnoidální krvácení (SAK) představuje pouhých 5% všech cévních mozkových příhod; protože však postihuje mladší pacienty a má závažné neurologické následky, má zároveň značný socioekonomický dopad (de Rooij *et al.* 2007). Z tohoto důvodu je subarachnoidální krvácení v centru zájmu jak kliniků, tak i experimentální medicíny, což dosvědčuje i počet publikací na toto téma – do současnosti (květen 2019) bylo publikováno více než 29 850 článků a počet publikací na toto téma má setrvale rostoucí trend (zdroj: PubMed, 26. 5. 2019).

4.1 Historie

První zmínka o klinickém obrazu subarachnoidálního krvácení je připisována Hippokratovi (460 př. n. l. – cca 377 př. n. l.): „Lidé, kteří jsou zdraví, náhle však pocítí bolesti v hlavě, okamžitě ztratí řeč, i leží chroptíce, hynou v sedmi dnech“ (Hippokrates, podle (Schrutz 1899)).

Přestože arteriální aneurysmata byla známa už od starověku (první zmínka pravděpodobně v Ebersově papyru, kolem r. 1550 př. n. l.) (Milinis *et al.* 2017), existence aneurysmat intrakraniálních tepen unikala pozornosti až do 18. století - první popis aneurysmat karotid přinesl roku 1761 Giovanni Battista Morgagni (Milinis *et al.* 2017). Začátkem 19. století John Blackall popsal u 20-leté pacientky klinické příznaky SAK a následně na sekčním nálezu rupturu aneurysmatu *a. basilaris* jako příčinu její smrti (Blackall 1814). Zároveň identifikoval rupturu intrakraniálního aneurysmatu jako příčinu smrti švédského korunního prince Karla Augusta roku 1810 (událost, která přivedla na švédský trůn současnou vládnoucí dynastií Bernadotte) (Milinis *et al.* 2017).

Prvním chirurgickým přístupem k léčbě intrakraniálních aneurysmat byl podvaz *a. carotis* – poprvé provedený britským chirurgem Victorem Horsleyem r. 1885 (Milinis *et al.* 2017; Tan a Black 2002). Vzhledem k vysoké četnosti závažných pooperačních komplikací byla tato metoda považována od počátku za nevyhovující. Další krok v chirurgické léčbě učinil

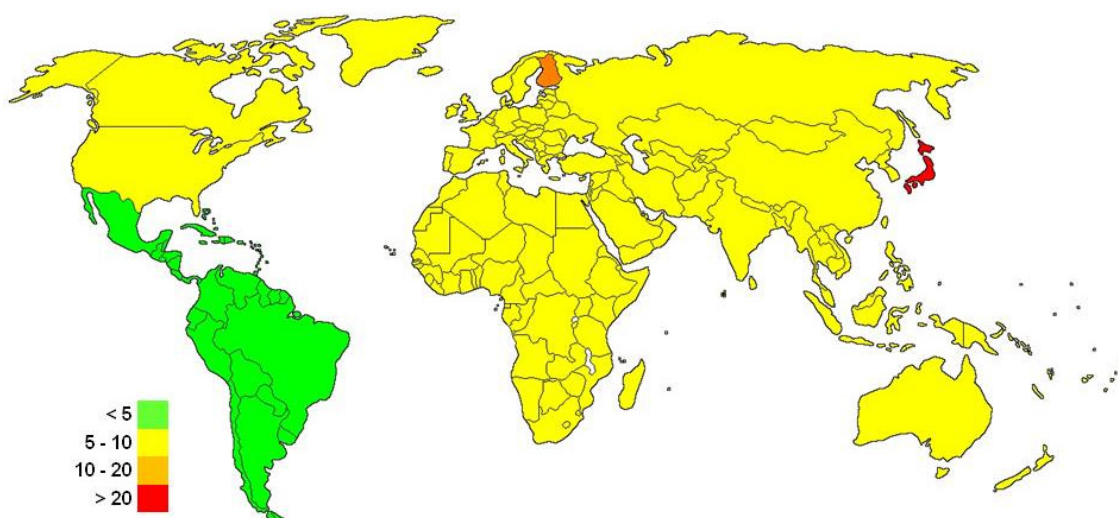
Harvey Cushing, který poprvé roku 1925 použil překrytí vaku aneurysmatu svalem k zástavě krvácení a k usnadnění trombotizace aneurysmatu. Cushing rovněž navrhl cévní svorku, původně určenou ke clippingu cév při operacích mozkových nádorů (Cohen-Gadol a Spencer 2004). Modifikovanou Cushingovu svorku pak použil roku 1937 Walter Dandy k uzavření (clippingu) aneurysmatu (Dandy 1938).

První pokusy o katetrizační řešení mozkových aneurysmat provedl v 70. letech 20. století sovětský neurochirurg F. A. Serbinenko, který podával do vaku aneurysmatu trombotizující látky nebo lumen aneurysmatu obturoval balónkem (Serbinenko 1974). Tato metoda byla pak roku 1990 nahrazena výplní aneurysmatu kovovou spirálkou – tzv. coiling (Guglielmi *et al.* 1991a; Guglielmi *et al.* 1991b).

4.2 Epidemiologie SAK

V klinické praxi se objevuje SAK při úrazech mozku nebo netraumatické etiologie. Nejčastější příčinou netraumatického SAK je krvácení z aneurysmatu mozkových tepen (85%), v 10 % se jedná o tzv. perimesencefalické krvácení neznámé etiologie, zbylých 5 % je způsobeno vrozeným nebo získaným poškozením mozkových arterií nebo systémovými poruchami (např. srpkovitá anémie) (Sehba *et al.* 2012). Netraumatickým SAK je postiženo každoročně průměrně 9 ze 100 000 osob, s určitými regionálními rozdíly (Finsko – 19,7, Japonsko 22,7, Střední a Jižní Amerika – 4,2 / 100 000) (de Rooij *et al.* 2007). Incidence SAK stoupá s věkem, nejčastěji je postižena věková kategorie 40 – 60 let, asi 1,6-krát častěji jsou postiženy ženy (Bederson *et al.* 2009). Z těchto postižených cca 65 % zemře do 1 roku od krvácení (Steiner *et al.* 2013), 12% pacientů umírá před dosažením lékařské pomoci (Huang a van Gelder 2002). Asi 50 % přeživších trpí dlouhodobým kognitivním deficitem a 30 % přeživších zůstává odkázáno na pomoc okolí (Ciurea *et al.* 2013). I u pacientů, u nichž byla kvalita přežití hodnocena jako dobrá (4 – 5 bodů na stupnici Glasgow Outcome Scale, tedy mírné nebo střední postižení) byly pozorovány poruchy verbální a vizuální paměti, poru-

chy exekutivních funkcí, řeči, trpí deficitem v aktivitách denního života (sebeobsluha, hygiena, ...), často nejsou schopni návratu do práce, trpí úzkostí a depresí, zvýšenou únavou a poruchami spánku (Al-Khindi *et al.* 2010). Neurologický deficit koreloval s NMR nálezem úbytku šedé i bílé hmoty a výraznější byl u starších pacientů (Bendel *et al.* 2010).



Obr. 1 Geografická distribuce SAK podle incidence (počet případů / 100 000 obyvatel / rok; podle de Rooij *et al.* 2007)

4.3 Patofyziologie poškození mozku po SAK

Důsledky subarachnoidálního krvácení jsou akutní i dlouhodobé. V současné době se používá dělení na časně poškození mozku (early brain injury, EBI) a pozdní ischemický neurologický deficit (delayed ischemic neurologic deficit, DIND) nebo pozdní mozkovou ischemii (delayed cerebral ischemia, DCI). Časným poškozením mozku se rozumí poškození mozku vzniklé v prvních 72 hodinách po zakrvácení a považuje se za hlavní příčinu mortality a morbidit po SAK (Cahill *et al.* 2006). Pozdní důsledky SAK vznikají v rámci DCI po více než 3 dnech od primárního inzultu. Zatímco dříve byla většina pozornosti soustředěna na pozdní komplikace (především va-

zospasmy), v posledních několika letech narůstá počet publikací věnujících se důležitosti a mechanismům poškození mozku časně po SAK.

4.3.1 Role oxidu dusnatého a NO-syntázy

Ovlivnění perfuze mozku je multifaktoriální a odehrává se na úrovni jak arterií a arteriol, tak kapilár. CBF je významně ovlivněn parciálním tlakem CO_2 a O_2 v arteriální krvi, lokálním metabolismem mozku a neuronální aktivitou (Attwell *et al.* 2010; Iadecola a Nedergaard 2007; Itoh a Suzuki 2012; Willie *et al.* 2014). Na regulaci CBF se podílí nejen hladká svalovina v cévních stěnách, ale i pericyty ve stěně kapilár (Hall *et al.* 2014). Zásadní význam v regulaci mozkové perfuze má funkce neurovaskulární jednotky (Attwell *et al.* 2010; Iadecola a Nedergaard 2007). Neurotransmitter glutamát vede v buňkách neurovaskulární jednotky (neuronech, astrocytech a hladké svalovině arteriol) k syntéze celé řady vazoaktivních látek – prostaglandinu E_2 a dalších derivátů kyseliny arachidonové (kys. 20-hydroxy-eicosatetraenová – 20-HETE, epoxyeicosatrienové kyseliny – EETs) a oxidu dusnatého (NO). Dosavadní výzkumy ukazují, že právě oxid dusnatý a jím zprostředkovaná vazodilatace hrají významnou roli v patofyziologických změnách následujících bezprostředně i dlouhodobě po SAK (Sehba *et al.* 2012).

Vazodilatační účinky NO byly poprvé zcela náhodně pozorovány v 19. století u zaměstnanců Nobelových továren na výrobu dynamitu, jehož hlavní složkou je nitroglycerin, ze kterého se v organismu odštěpuje NO. Zatímco zdraví zaměstnanci si stěžovali zejména začátkem pracovního týdne na bolesti hlavy, které zmizely o víkendu (tzv. „pondělní nemoc“), zaměstnanci s ischemickou chorobou srdeční pociťovali během pracovních dní úlevu od potíží a jejich zhoršení o víkendech („nedělní srdeční záchvat“) (Ferreira a Mochly-Rosen 2012; Ignarro 2002a). Již koncem 19. století začal být nitroglycerin používán k léčbě anginy pectoris (Ferreira a Mochly-Rosen 2012). Teprve v 70. letech 20. století byl vazodilatační efekt připsán oxidu dusnatému (Ferreira a Mochly-Rosen 2012), a v roce 1987 byl endoteliální relaxační

faktor (endotelium-derived relaxing factor, EDRF) identifikován jako NO (Ignarro *et al.* 1987). V následujících letech byl NO popsán nejen jako potentní vazodilatátor v různých tkáních, ale i jako jeden z efektorů zánětlivé odpovědi (Ignarro 2002b; Wink *et al.* 2011).

NO je za normálních podmínek plynná sloučenina, v organismu má krátký biologický poločas (6 – 30 sec) a uplatňuje se jako signální molekula; vzhledem k jednomu nepárovému elektronu má i vlastnosti volného radikálu (Kroncke *et al.* 1997; Tousoulis *et al.* 2012). NO je syntetizován z L-argininu účinkem enzymu NO-syntázy (NOS) (Andrew a Mayer 1999). Byly popsány 3 izoformy NO-syntázy – 2 konstitutivně exprimované Ca^{2+} -dependentní (endoteliální – eNOS a neuronální - nNOS) a Ca^{2+} -independentní indukibilní NOS (iNOS). Endoteliální NOS je aktivována střížnými silami působícími na cévní stěnu a jejím účinkem dochází ke kontinuální syntéze NO v bazální dávce (Dormanns *et al.* 2016; Toda *et al.* 2009; Tousoulis *et al.* 2012). Neuronální NOS je aktivována neuronální stimulací a podílí se na správném fungování neurovaskulární jednotky (Attwell *et al.* 2010; Dormanns *et al.* 2016; Munoz *et al.* 2015). Inducibilní NOS je exprimována v endotelu (i v dalších buňkách - hladká svalovina cév, makrofágy, glie, fibroblasty, neurony) (Suzuki *et al.* 1995) pouze po stimulaci zánětlivými mediátory (Andrew a Mayer 1999; Tousoulis *et al.* 2012). Účinek NO je za fyziologických podmínek ukončen reakcí s oxyhemoglobinem za vzniku methemoglobinu a dusičnanového aniontu (Helms a Kim-Shapiro 2013).

V mozku hraje NO roli v regulaci krevního průtoku - působí vazodilataci, zvyšuje krevní průtok, inhibuje adhezi a agregaci trombocytů, adhezi leukocytů a apoptózu endoteliálních buněk, snižuje proliferaci hladkého svalstva cévní stěny a je účinný jako zametač (scavenger) volných radikálů (Andrew a Mayer 1999; Toda *et al.* 2009; Tousoulis *et al.* 2012). Mimo jiné se podílí i na kognitivních funkcích nebo neuronální plasticitě (Calabrese *et al.* 2007).

NO se uplatňuje i v dalších orgánech: v myokardu urychluje relaxaci kardiomyocytů, ovlivňuje uvolňování a reuptake kalcia ze sarkoplazmatické-

ho retikula a má antiaterogenní efekt (Umar a van der Laarse 2010). V plicích se za fyziologických podmínek NO podílí na postnatálních změnách plicní vaskulární rezistence fetálních plic (Hampl a Herget 2000). V dospělosti je produkce NO zvýšená při zvýšené plicní rezistenci (chronická plicní hypertenze, akutní plicní vazokonstrikce). Podle Hampla a Hergeta (2000) se pravděpodobně jedná o obranný mechanismus chránící cévní stěnu před dalším mechanickým poškozením, ovšem za cenu toxického účinku vysokých hladin NO na cévní stěnu. V ledvinách NO ovlivňuje cévní tonus a tím i glomerulární filtraci, prostřednictvím buněk *macula densa* reguluje natriurézu (Palm *et al.* 2009). Relaxací cév v *corpus cavernosum* umožňuje NO erekci (Ignarro 2002b).

Účinek NO v organismu je závislý na jeho hladině. Zatímco při nízkých hladinách je NO účinný ve výše zmíněných fyziologických funkcích, při vyšších hladinách byly pozorovány škodlivé účinky související s radikálovou podstatou molekuly NO. V prooxidačním prostředí může docházet ke vzniku dusíkových radikálů (reactive nitrogen species, RNS) a k poškození buněk tzv. „nitrosativním stresem“; tento jev je dáván do souvislosti s patogenezí například neurodegenerativních onemocnění (Calabrese *et al.* 2007; Iadecola 1997).

V experimentech na zvířatech s navozeným subarachnoidálním krvácením byl pozorován trifazický průběh hladin NO v mozku. V prvních 10 minutách dochází k poklesu hladiny NO, během dalších 3 hodin následuje vzestup na bazální hodnoty a po 24 hodinách elevace nad normální hodnoty (Sabri *et al.* 2013; Sehba *et al.* 2011). Trifazický průběh hladin NO po SAK může mít dvojí efekt – nedostatek NO v iniciální fázi způsobí vazokonstrikci a pokles CBF, nadbytek NO v pozdější fázi přispívá k poškození tkání volnými radikály (Sehba *et al.* 2011; Suzuki *et al.* 1995).

Z hlediska významu NO po SAK se v současnosti uvažuje o dvou mechanismech poškození mozku – nedostatek NO způsobený jeho **vychytává-**

ním (scavenging), a **dysfunkce endotelu** vedoucí ke snížené produkci NO. V experimentu na laboratorním potkanovi byl bezprostředně po SAK pozorován pokles hladiny metabolitů NO v mozku (Sehba *et al.* 2004; Sehba *et al.* 2000). Je však zachována schopnost mozkové cirkulace reagovat na externí přívod NO vazodilatací (Sehba *et al.* 1999). Tento jev je vysvětlitelný vylučováním oxidu dusnatého (Sehba *et al.* 2012; Schwartz *et al.* 2000b). Za scavenger NO je považován zejména hemoglobin (Hb), který se za fyziologických podmínek podílí na metabolismu NO (Beckman a Koppenol 1996) a který je po SAK přítomen v subarachnoidálním prostoru (Clark a Sharp 2006; Sehba *et al.* 2000). Dalším známým scavengerem NO, který může hrát roli v rozvoji EBI, je superoxidový aniont (O_2^-), volný kyslíkový radikál, k jehož tvorbě dochází po SAK (Kajita *et al.* 1994; Shishido *et al.* 1994; Schwartz *et al.* 2000b) a jehož přítomnost byla v experimentu na zvířecím modelu v mozku pozorována 1 hodinu po navození SAK (Endo *et al.* 2007). Za podmínek ischemie během vzestupu nitrolebního tlaku (intracranial pressure, ICP) a poklesu mozkového perfuzního tlaku (cerebral perfusion pressure, CPP) dochází k poruše elektronového transportního řetězce v mitochondriích, která vede k nadprodukcí superoxidových aniontů (Marzatico *et al.* 1988). Oxid dusnatý se slučuje se superoxidovým aniontem za vzniku prudce reaktivního a toxického peroxynitritu ($ONOO^-$), který dále reaguje s nenasycenými mastnými kyselinami, tyrosylovými skupinami proteinů nebo DNA (Beckman a Koppenol 1996; Kalyanaraman 2013). Popsaným mechanismem dojde za přítomnosti O_2^- jednak k poklesu hladiny NO a jednak k dalšímu poškození buněk toxickým efektem peroxynitritu.

Druhým uvažovaným mechanismem je endoteliální dysfunkce, která je charakterizována morfologickými i funkčními změnami endotelu a vede k poruše NO-zprostředkované vazodilatace (Friedrich *et al.* 2011; Sehba *et al.* 2012). Spouštěcím mechanismem tohoto procesu je pravděpodobně ischemie při iniciálním vzestupu ICP a poklesu průtoku krve mozkem (cerebral blood flow, CBF) (Sehba *et al.* 2005). Už 10 minut po SAK lze pozorovat agregaci trombocytů v lumen cév, adhezi neutrofilů k cévní stěně, aktiva-

ci kolagenáz a degradaci kolagenu IV – základní komponenty bazální membrány endotelu (Friedrich *et al.* 2011; Sehba *et al.* 2007; Sehba *et al.* 2005). Destrukce bazální membrány vede k odloučení endotelu od *lamina media* (Friedrich *et al.* 2010). Dysfunkce poškozeného endotelu v cerebrovaskulárním řečišti následně způsobí poruchu vazodilatace zprostředkované endotelem (Park *et al.* 2001), zničení bazální membrány vede k poruše hematoencefalické bariéry (Scholler *et al.* 2007).

4.3.2 Role zánětlivé reakce

Zánětlivá odpověď se podílí na patofyziologii časného i pozdního poškození mozku po SAK (Lucke-Wold *et al.* 2016). Vylití krve do subarachnoidálního prostoru vede k aktivaci mikroglie. Aktivace těchto buněk spouští syntézu adhezních molekul v endoteliích, což vede k zvýšenému průniku imunitních buněk do subarachnoidálního prostoru. Neutrofilů a makrofágů fagocytují rozpadající se erythrocyty; z erythrocytů uvolněný hem, hemin a methemoglobin mohou interagovat s toll-like receptory mikroglíí, jejichž aktivace vede k sekreci prozánětlivých cytokinů (Lucke-Wold *et al.* 2016). Samotné fagocytující buňky pak dále přispívají k rozvoji poškození mozku uvolňováním volných kyslíkových radikálů nebo enzymu myeloperoxidázy, schopného vázat NO (Provencio *et al.* 2010).

U pacientů po SAK byly zaznamenány zvýšené hladiny interleukinu (IL)-1 β , IL-6 a TNF- α ; elevace jejich hladin časově korelovaly s výskytem pozdních vazospasmů, vyšší hladiny těchto cytokinů byly pozorovány u pacientů s horší kvalitou přežití (Fassbender *et al.* 2001). Další skupina studovaných látek byly proteinázy, zejména pak matrix-metalloproteináza 9 (MMP-9; alt. gelatináza B) – enzym rozkládající jednu ze základních složek bazální membrány kolagen IV. Narušení integrity bazální membrány endotelu umožňuje průnik neutrofilů skrze cévní stěnu, narušení hematoencefalické bariéry přispívá k rozvoji edému mozku (Delclaux *et al.* 1996; Feiler *et al.* 2011).

4.3.3 Role volných radikálů

Další mechanismus, který se podílí na časném i pozdním poškození mozku po SAK, je poškození volnými kyslíkovými radikály – superoxidový aniont, hydroxylový radikál, peroxid vodíku, NO, peroxyinitrit (Ayer a Zhang 2008; Sehba a Bederson 2006; Sehba *et al.* 2012). Vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin, které mohou být snadno oxidovány volnými radikály, činí mozek vysoce citlivým na působení volných radikálů (Facchinetti *et al.* 1998; Sehba a Bederson 2006)

Jedním ze zdrojů volných kyslíkových radikálů jsou mitochondrie. Při ischemii způsobené nitrolební hypertenzí dochází k poruše elektronového transportního řetězce v mitochondriích, která vede k nadprodukci superoxidových aniontů (Marzatico *et al.* 1988). Ke vzniku superoxidových aniontů dochází i za normálních podmínek, ale vzniklý superoxid je rychle eliminován enzymem superoxid-dismutázou (SOD). V podmínkách ischemie je však rychle překročena kapacita tohoto mechanismu a nadbytkem superoxidu dochází k poškození lipidů, proteinů i DNA (Ayer a Zhang 2008; Shishido *et al.* 1994). Účinkem SOD dochází ke vzniku peroxidu vodíku, který je dále eliminován účinkem glutathion peroxidázy (GSH-Px) a katalázy (Facchinetti *et al.* 1998; Ighodaro a Akinloye 2017). Po SAK dochází ovšem k nepoměru mezi hladinami SOD a GPX a vzniklý H₂O₂ není dostatečně odbouráván, což vede ke vzniku reaktivního hydroxylového radikálu (Ayer a Zhang 2008; Gaetani *et al.* 1998). Dalšími zdroji volných radikálů je například již zmíněné slučování NO se superoxidovým aniontem za vzniku peroxyinitritu (4.3.1), autooxidace hemoglobinu (viz 4.4.1) nebo degranulace neutrofilů (4.3.2).

Účinkem hydroxylového radikálu na polynenasycené mastné kyseliny dochází k lipoperoxidaci (Ayer a Zhang 2008; Facchinetti *et al.* 1998). Při každé reakci volného radikálu s mastnou kyselinou dochází ke vzniku nového radikálu mastné kyseliny a řetězovou reakcí takto může vzniknout značné množství lipoperoxidů. Velké množství lipoperoxidů v buněčné membráně může zhoršit její fluiditu i integritu. Řetězová reakce může být ukončena například reakcí radikálu s antioxidantem (Facchinetti *et al.* 1998). Volné radiká-

ly mohou reagovat i s aminokyselinami a tím ovlivňovat funkci enzymů a membránových receptorů (Facchinetti *et al.* 1998).

4.3.4 Časné poškození mozku

Vzhledem k akutní povaze onemocnění pochází informace o dějích bezprostředně následujících krvácení především ze studií na zvířatech. Časné poškození mozku je komplexní proces; po prvotním inzultu se rozvíjí celá kaskáda mechanismů podílejících se na EBI – porucha permeability hematoencefalické bariéry, vazogenní a cytotoxický mozkový edém, apoptóza a nekróza neuronů, endotelií i gliových buněk, Leãoova šířící se deprese (cortical spreading depression), porucha homeostázy kalcia a magnézia (Sehba *et al.* 2012), kontrakce pericytů v podmínkách ischemie nebo za přítomnosti hemoglobinu (Hall *et al.* 2014; Li *et al.* 2016).

Iniciálním inzultem je prudký vzestup nitrolebního tlaku (Voldby a Enevoldsen 1982). V okamžiku ruptury aneurysmatu dochází k vniknutí krve do subarachnoidálního prostoru pod tlakem rovnajícím se arteriálnímu krevnímu tlaku. To způsobí nitrolební hypertenzi, v jejímž důsledku dochází k poklesu CPP a CBF (Cai *et al.* 2012) a tím k rozvoji časného ischemického poškození (Bederson *et al.* 1995). Část pacientů postižených SAK v tomto okamžiku umírá v důsledku zástavy dechu a / nebo oběhu (Hijdra a van Gijn 1982), přeživší pacienti pak tuto zkušenost popisují jako „nejhorší bolest hlavy v životě“ – tedy náhle vzniklou bolest hlavy s extrémně vysokou intenzitou (tzv. „thunderclap headache“) (Sehba *et al.* 2012; Schwedt 2007). Během dalších minut až desítek minut po SAK dochází k poklesu ICP (který zůstává nad fyziologickou hodnotou) a vzestupu CPP. Trvá však pokles CBF, který je do jisté míry nezávislý na hodnotě ICP nebo CPP a je připisován časné vazokonstrikci (Bederson *et al.* 1995; Bederson *et al.* 1998; Schubert *et al.* 2009; Tateyama *et al.* 2013). U pacientů postižených SAK trvá tento pokles CBF až několik desítek hodin po zakrvácení (Hayashi *et al.* 2000) a koreluje s neurologickým stavem a kvalitou přežití (Schubert *et al.* 2009; Tateyama *et al.* 2013). Časná hypoperfuze tak není podmíněna pouze vze-

stupem ICP, ale i vazokonstrikčním efektem arteriální krve na cévy Willisova okruhu (Bederson *et al.* 1998).

Vazokonstrikční efekt arteriální krve je připisován poruše vazodilatace zprostředkované oxidem dusnatým. Jedním z uvažovaných mechanismů je výše zmíněný scavenging NO hemoglobinem. NO volně prostupuje buněčnými membránami a může tudíž vstupovat do erytrocytů a reagovat s oxyhemoglobinem za vzniku methemoglobinu a dusičnanového aniontu (Beckman a Koppenol 1996). Vazokonstrikční efekt hemoglobinu byl opakovaně demonstrován – v experimentu na izolované *a. basilaris* byla pozorována inhibice vazodilatačních mechanismů za přítomnosti hemoglobinu a průnik hemoglobinu do hladké svaloviny cévní stěny během 10 minut po extraluminální aplikaci hemoglobinu (Hongo *et al.* 1988), *in vivo* byla angiograficky potvrzena vazokonstrikce 15 minut po intrathekální aplikaci hemoglobinu (Byrne *et al.* 1989). Zda je však přítomnost hemoglobinu v subarachnoidálním prostoru zodpovědná za rozvoj časného poškození mozku v prvních minutách až desítkách minut po vzniku SAK, je sporné. V případě SAK je hemoglobin v subarachnoidálním prostoru zprvu přítomen v erytrocytech, jejichž hemolýza začíná až za 16 – 32 hod. po SAK a vrcholí 7. den (Pluta *et al.* 1998). Bylo pozorováno, že NO reaguje s hemoglobinem obsaženým v erytrocytech 500 – 1000x pomaleji než s volným Hb (Liu *et al.* 1998; Vaughn *et al.* 2000), v experimentu byl vazokonstrikční efekt na izolované mozkové tepny pozorován pouze po podání hemolyzované krve a nikoliv po podání plné krve s intaktními erytrocyty (Vecchione *et al.* 2009).

Dalším scavengerem NO, který může hrát roli při časném postižení mozku, je superoxidový anion, který byl v mozku po SAK pozorován ve zvýšeném množství (Kajita *et al.* 1994; Shishido *et al.* 1994). Jiný možný mechanismus, který je zodpovědný za časně poškození mozku, je dysfunkce endotelu, charakterizovaná funkčními a morfologickými změnami endotelu (Sehba *et al.* 2012), v jejichž důsledku dochází k selhání endotelem zprostředkované vazodilatace (Park *et al.* 2001).

4.4 Pozdní ischemie mozku

Častou komplikací netraumatického SAK, která se vyskytuje v prvních 2 týdnech po inzultu, je pozdní ischemie mozku (DCI). Tento termín byl zaveden kvůli nejasnostem v patofyziologii pozdního ischemického poškození mozku a vztahu DCI k pozdním vazospasmům. Pozdní ischemií mozku se rozumí zhoršení fokálního neurologického nálezu (např. hemiparéza, afázie) nebo zhoršení Glasgow Coma Score o aspoň 2 body, které se pomocí klinického vyšetření nebo zobrazovacích metod nedá vysvětlit jinou příčinou (Vergouwen *et al.* 2010).

Dlouhou dobu byly za hlavní příčinu zhoršení neurologického stavu pacientů po SAK považovány pozdní vazospasmy. K vzniku pozdních vazospasmů dochází od 3. dne po SAK, jejich závažnost vrcholí 7. den a odeznívají obvykle během 3. týdne (Pluta 2005). Zobrazovacími metodami jsou vazospasmy prokazatelné u cca 50 – 70 % pacientů (Kassell *et al.* 1985). Kauzální souvislost mezi vazospasmy a DCI není zcela přesvědčivá (Sehba *et al.* 2011; Vergouwen *et al.* 2010). Klinické příznaky jsou pozorovatelné jen u zhruba poloviny pacientů postižených vazospasmem (Bederson *et al.* 2009), terapeutické intervence zvyšující regionální CBF nevedou k ovlivnění samotného vazospasmu (Pluta *et al.* 2000), naopak vazospasmus sám o sobě nevede k rozvoji DCI a u některých pacientů se hypoperfundovaná oblast mozku nenachází v povodí spastické tepny (Dankbaar *et al.* 2009; Dhar *et al.* 2012). Samotné zmírnění vazospasmu neovlivňuje další patologické procesy probíhající v mozkové cirkulaci (Sabri *et al.* 2011b). To vyplývá i ze studie CONSCIOUS-2, ve které clazosentan, antagonist endotelinového receptoru, vedl ke zmírnění vazospasmů a DCI, nicméně nesnížil mortalitu pacientů po SAK ani nezlepšil jejich kvalitu přežití (Wang *et al.* 2012).

Z těchto důvodů je v současnosti uvažováno i o jiných příčinách rozvoje DCI – spasmus nebo trombóza na úrovni mikrocirkulace, zánětlivá reakce, Leãova šířící se deprese (Vergouwen *et al.* 2008). Ke zhoršení neurologického stavu v této fázi mohou ovšem přispívat i další mechanismy – například opožděná neuronální smrt (delayed neuronal death) (Kirino 2000).

4.4.1 Mechanismy pozdního ischemického poškození

Rozvoj pozdních vazospasmů a pozdní mozkové ischemie je pravděpodobně rovněž multifaktoriální proces. Za hlavní faktor v patogenezi mozkových vazospasmů a DCI je považován zejména hemoglobin a jeho metabolity (Mayberg *et al.* 1990); jejich role v rozvoji pozdních změn perfuze je zdokumentovaná lépe než v případě časného poškození mozku a souvisí s vazodilatací zprostředkovanou NO i s radikálovým poškozením.

Po SAK dochází k hemolýze erytrocytů v subarachnoidálním prostoru a tedy k uvolnění hemoglobinu do likvoru (Pluta 2005; Pluta *et al.* 1998). Protože vazebný systém haptoglobin-hemoglobin v SA prostoru má výrazně menší kapacitu než v krvi a je záhy vyčerpán, dosahuje hemoglobin v mozkomíšním moku vysokých koncentrací (Galea *et al.* 2012). Za fagocytózu erytrocytů a fibrinu jsou zodpovědné makrofágy a T-lymfocyty, které infiltrují subarachnoidální prostor; maximum této infiltrace bylo u pokusných zvířat pozorováno 2. a 3. den po SAK (Jackowski *et al.* 1990), kdy byly pozorovány i největší strukturální změny na mozkových arteriích (ztluštění medie a adventicie, zvrásnění intimy) (Kubota *et al.* 1993), i nejvýraznější změny angiografické (Delgado *et al.* 1985).

Mechanismů, kterými může hemoglobin působit vazokonstrikci, je několik. Po hemolýze erytrocytů dochází k penetraci hemoglobinu do cévní stěny, jeho přítomnost po experimentálním SAK byla pozorována v adventicii, hladké svalovině a endotelu a závažnost vazokonstrikce korelovala s množstvím Hb v cévní stěně (Foley *et al.* 1993). Zde může Hb výše popsaným mechanismem fungovat jako scavenger NO.

Dalším uvažovaným mechanismem je autooxidace hemoglobinu penetrujícího cévní stěnu, která vede ke vzniku volných kyslíkových radikálů. Oxyhemoglobin (obsahující atom železa ve formě Fe^{2+}) podléhá spontánní oxidaci na methemoglobin (obsahující železo ve formě Fe^{3+}) za vzniku superoxidového aniontu O_2^- a sekundárně dalších kyslíkových radikálů, což v experimentu *ex vivo* vedlo ke kontrakci buněk hladké svaloviny cévní stěny

(Asano a Matsui 1999; Steele *et al.* 1991). Výše popsáným mechanismem pak může docházet k dalšímu poškození účinkem peroxynitritu.

Přítomnost oxyhemoglobinu může mít i vliv na funkci endoteliální NO-syntázy. Za četných patologických okolností (např. hypertenze, diabetes mellitus, hypercholesterolemie, kouření) dochází k dysfunkci eNOS a ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů na úkor tvorby NO (Forstermann a Munzel 2006). Tento jev byl popsán i na zvířecím modelu SAK; snížená syntéza NO a zvýšená produkce kyslíkových radikálů pak mohou přispět k pozdnímu neurologickému poškození (Sabri *et al.* 2011a). Statiny, inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reductázy běžně používané jako hypolipidemika, zlepšují tuto dysfunkci endoteliální NOS a posouvají rovnováhu zpět k produkci NO - za experimentálních podmínek vedlo podávání simvastatinu ke zvýšení produkce NO, zmírnění vazospasmů a agregace trombocytů v mikrocirkulaci a snížení produkce volných kyslíkových radikálů (Sabri *et al.* 2011a).

4.5 Možnosti terapeutického ovlivnění perfuzních poruch

V současné době je možné rozdělit intervence do tří oblastí. První skupinou jsou intervence farmakologické. Sem spadají intervence zaměřené na oblast cévní, tedy ovlivnění perfuzních poruch, pomocí **vazodilatačně** působících látek a podávání **antioxidantů** s cílem ovlivnění radikálového poškození endotelu i cytotoxického edému. Další skupina zahrnuje chirurgické intervence - **dekompresní kraniektomie** (DK) příznivě ovlivňující perfúzní poruchy snížením nitrolebečního tlaku s následným navýšením průtoku a mozkového perfúzního tlaku. Na pomezí mezi farmakologickou a chirurgickou terapií se pohybují metody **endovaskulární**, které umožňují nejen dilataci spastické cévy, ale i cílené intraarteriální podávání vazodilatačně působících látek.

4.5.1 Farmakoterapie

4.5.2 Vazodilatancia

Základem léčby pozdních vazospasmů v klinické medicíně jsou v současnosti kalciové blokátory, především nimodipin (Bederson *et al.*, 2009), nicméně za experimentálních podmínek je testována řada dalších látek. Z uvedeného vyplývá, že procesy probíhající po SAK mohou být příznivě ovlivněny podáváním látek odštěpujících NO. Vazodilatační efekt NO je předmětem výzkumů v situacích časných i pozdních perfuzních změn.

4.5.2.1.1 L-arginin

Jednou z účinných látek úspěšně použitou v experimentech, byl L-arginin, substrát NO-syntázy. Kromě chybějícího vazodilatačního efektu NO při nedostatku substrátu NOS může deplece L-argininu vést ke zvýšené produkci superoxidového aniontu neuronální NO-syntázou a tím přispívat k oxidativnímu stresu (Costa *et al.* 2016).

Podávání L-argininu pokusným zvířatům zlepšilo CBF v prvních 24 hodinách po SAK (Sun *et al.* 2003), což může být způsobeno vyšší syntézou NO inducibilní NO-syntázou, jejíž exprese je v prvních 24 hodinách po SAK rovněž zvýšena (Sehba *et al.* 2004). Aplikace L-argininu byla s úspěchem použita i k ovlivnění pozdního vazospasmu, vazodilatační efekt na spastické tepny i zvýšení CBF bylo pozorováno již během prvních 10 minut od zahájení intracisternální a intrakarotické aplikace (Goksel *et al.* 2001; Hirose *et al.* 1995; Ozum *et al.* 2007). Naproti tomu Pluta *et al.* (Pluta *et al.* 2000) pozorovali po intraarteriální aplikaci L-argininu zvýšení regionálního CBF, avšak bez ovlivnění samotného angiograficky prokázaného vazospasmu.

4.5.2.1.2 Donory NO

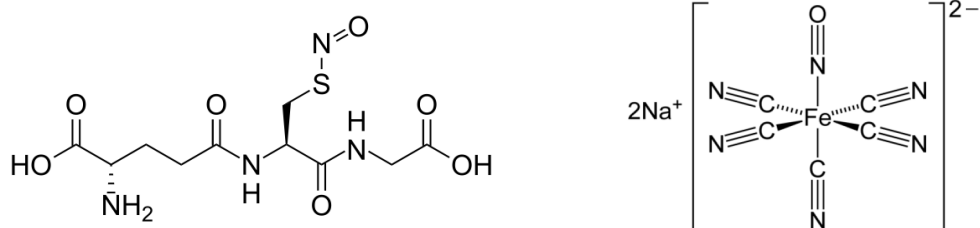
Donory NO, sloučeniny odštěpující ze své molekuly oxid dusnatý, nevyžadují na rozdíl od L-argininu enzymatickou reakci, jejich efekt je tudíž nezávislý na aktivitě NO-syntázy. Účinek NO na mozkovou cirkulaci je multifak-

torialní – má nejen vazodilatační efekt, ale i brání agregaci trombocytů (Sehba *et al.* 1999) a inhibuje degradaci kolagenu IV matrix-metalloproteinázou 9 (Sehba *et al.* 2007). Při exogenním podávání NO jsou tepny i v případě vazospazmu schopny reagovat vazodilatací (Vatter *et al.* 2007).

Jednou z látek použitých v experimentu je S-nitrosoglutathion. Jeho intravenózní podávání zmírnilo u pokusných zvířat vazokonstrikci mozkových tepen v rámci časného poškození, zvýšilo CBF a snížilo rozsah degradace kolagenu IV (Sehba *et al.* 1999; Sehba *et al.* 2007).

Další ze studovaných látek je běžnější a dostupnější nitroprussid sodný (pentakyano-nitrosylželezitan sodný; sodium nitroprusside, SNP; obr. 2). Jeho vazodilatační efekt na pozdní vazospasmus po SAK byl prokázán v experimentech *ex vivo*, kdy byla pozorována relaxace spastických tepen (Dizdarevic 2008; Vatter *et al.* 2007). Protože je SNP potentní vazodilatátor a očekávatelným nežádoucím účinkem jeho podání je systémová hypotenze, v experimentech *in vivo* byla používána intratekální cesta podání. Studie na zvířecím modelu i studie klinické poskytují nejednoznačné výsledky. Zatímco v experimentu na primátech (Macdonald *et al.* 2002) nebyl pozorován žádný efekt na vazospasmus, podobný experiment na potkanech ukázal dobrý účinek SNP (Egemen *et al.* 1993). V klinických studiích bylo popsáno zlepšení parametrů perfuze mozku nebo klinického stavu u všech pacientů po bolusovém podání SNP (Agrawal *et al.* 2009) nebo pouze u části studovaného vzorku (Pachl *et al.* 2005; Raabe *et al.* 2002; Thomas a McGinnis 2002). Lepšího výsledku bylo dosaženo při kontinuálním podávání, výsledky však nejsou reprezentativní pro nízký počet studovaných pacientů (Raabe *et al.* 2002).

SNP byl testován pouze v podmínkách pozdního vazospasmu, jak je uvedeno výše; v rámci časného poškození mozku nebyl jeho efekt dosud studován.



Obr. 2 Strukturální vzorce S-nitrosogluthionu (vlevo) a nitroprussidu sodného.

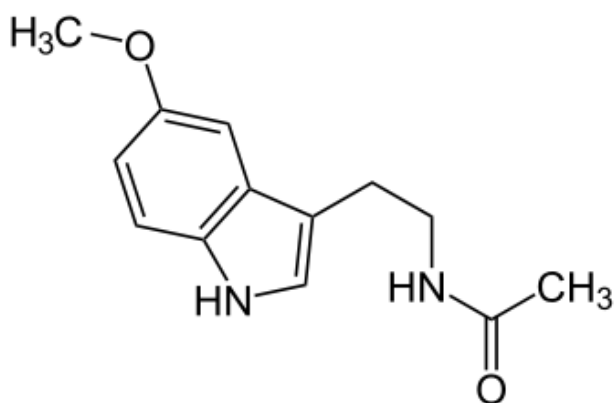
4.5.2.2 Antioxidanty

Po subarachnoidálním krvácení byla pozorována vyšší tvorba volných radikálů (Ayer a Zhang 2008). Volné radikály mohou dále přispívat k rozvoji vazospazmu a mikrotrombózy a tím k dalšímu funkčnímu poškození mozku.

Podávání antioxidantů po SAK příznivě ovlivnilo výskyt vazospazmů a snížilo oxidační stres. Jedním z používaných antioxidantů je melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin; obr. 3), hormon produkováný převážně epifýzou (corpus pineale), zodpovědný za regulaci cirkadiánních rytmů; zároveň se ovšem jedná o potentní vychytávač (scavenger) volných radikálů a látku s efektem antioxidantním, antiapoptotickým, neuroprotektivním a protizánětlivým (Hardeland *et al.* 2006). Melatonin snadno prostupuje hematoencefalickou bariérou a je netoxický i ve vysokých dávkách (Ayer *et al.* 2008; Cheung *et al.* 2006). Antioxidanční efekt melatoninu je způsoben vychytáváním volných radikálů (především díky schopnosti odštěpovat elektron), ale i downregulací prooxidačních enzymů (např. NO-syntázy, lipoxygenázy) a stimulací genové exprese enzymů antioxidantních (např. superoxid dismutáza, kataláza, peroxidázy). Na rozdíl od vychytávání volných radikálů, ke kterému dochází při vysokých dávkách melatoninu, je efekt na hladinu antioxidantních enzymů pozorovatelný už při fyziologických hladinách (Hardeland 2005). Melatonin rovněž snižuje tvorbu volných radikálů v mitochondriích svojí interakcí

s dýchacím řetězcem (Hardeland 2005; Rodriguez *et al.* 2004; Wu *et al.* 2017).

Melatonin byl s úspěchem použit ve zvířecích modelech různých intrakraniálních patologií – např. úrazy mozku, ischemické CMP, Alzheimerova demence (Wu *et al.* 2017). Podání melatoninu v dávce 10 mg/kg/den vedlo ke snížení permeability hematoencefalické bariéry a ke zmírnění rozvoje mozkového edému a zánětlivé odpovědi v mozkové tkáni (Ersahin *et al.* 2009; Fang *et al.* 2009). Pět dní podávání melatoninu v dávce 20 mg/kg/den vedlo ke zmírnění pozdních vazospasmů mechanismem zvýšení hladiny NO a superoxid-dismutázy – jednoho z antioxidačních enzymů (Aladag *et al.* 2009). Ve vyšších dávkách (150 mg/kg) došlo ke zmírnění edému mozku a snížení mortality (Ayer *et al.* 2008), dále melatonin snížil expresi zánětlivých mediátorů (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6) a iNOS a zabránil nekróze a apoptóze neuronů (Wang *et al.* 2013).



Obr. 3: Strukturní vzorec melatoninu (N-acetyl-5-methoxytryptamin).

4.5.3 Chirurgická terapie

Clipping (zasvorkování) aneurysmatu nebo jeho endovaskulární alternativa coiling (vyplnění lumina aneurysmatu kovovou spirálkou) slouží k vyřazení vaku aneurysmatu z cirkulace. Nejedná se tedy o techniky, které by ovlivňovaly výskyt perfuzních poruch, brání však recidivě krvácení, která

významně zvyšuje mortalitu a zhoršuje neurologické poškození u přeživších (Larsen a Astrup 2013; van Donkelaar *et al.* 2015).

4.5.3.1 Dekompresní kraniektomie

Dekompresní kraniektomie (DK) je běžnou součástí neurointenzivní péče. Používá se ke snížení ICP u jinak neovlivnitelné nitrolební hypertenze, jejím cílem je zabránit mozkovým herniacím a zlepšit perfuzi mozku. Dekompresní kraniektomie vede ke snížení ICP, zvýšení CBF a zlepšení oxygenace mozkové tkáně (Lazaridis a Czosnyka 2012). Význam DK v klinické medicíně je nicméně stále kontroverzní. Pozitivní efekt byl pozorován v případech infarktu *a. cerebri media* (Vahedi *et al.* 2007) nebo netraumatického intracerebrálního krvácení (Fung *et al.* 2012). Naproti tomu nedávno publikované studie DECRA (Cooper *et al.* 2011) a RESCUEicp (Hutchinson *et al.* 2016) zpochybnilly přínos DK pro pacienty po úrazu mozku. Role DK po SAK je stále nejasná – přestože bylo popsáno promptní snížení ICP a vzestup parciálního tlaku O_2 v mozkové tkáni (Jaeger *et al.* 2003), korelace těchto efektů s prognózou pacientů je pouze slabá (Uozumi *et al.* 2014). Indikace, načasování a rozsah DK u pacientů se SAK nejsou dosud plně stanoveny (Buschmann *et al.* 2007; Dorfer *et al.* 2010; Mak *et al.* 2013; Otani *et al.* 2008) a v literatuře je v současnosti popsáno pouze minimum výsledků experimentů na zvířecím modelu (Buhler *et al.* 2015).

4.5.4 Endovaskulární techniky

Coiling vaku aneurysmatu je endovaskulární způsob vyřazení aneurysmatu z cirkulace a představuje alternativu ke clippingu. Z hlediska mortality i další kvality života dosahuje coiling lepších výsledků než clipping aneurysmatu (Molyneux *et al.* 2002; van der Schaaf *et al.* 2005).

Endovaskulární metody jsou používány i v situaci pozdních komplikací. U pozdních vazospasmů refrakterních ke konzervativní terapii lze provést balónkovou angioplastiku. Další možností je intraarteriální podávání vazodilancií. Tento postup je oproti balónkové angioplastice bezpečnější a zajišťuje

lepší efekt v periferní cirkulaci, nevýhodou je ovšem kratší trvání účinku způsobené krátkým biologickým poločasem většiny používaných farmak. V současnosti je za tímto účelem používán nejčastěji nicardipin a verapamil (Francoeur a Mayer 2016).

4.6 Současné kontroverze v patofyziologii a terapii SAK

Přes velké množství prací na téma patofyziologie subarachnoidálního krvácení nemáme stále odpovědi na některé otázky.

Ačkoliv je dobře zdokumentován rozvoj zánětlivé odpovědi v mozku po SAK, klinické studie na použití imunosuprese nepřinesly žádné výsledky a v praxi se žádná léčba ovlivňující zánětlivou odpověď nepoužívá (de Oliveira Manoel a Macdonald 2018; van Lieshout *et al.* 2018). Je zjevné, že imunosupresní léčba s sebou nese značné riziko infekčních komplikací, nicméně protizánětlivý a imunomodulační účinek byl popsán i u melatoninu (Favero *et al.* 2017). V laboratorních pokusech byl protizánětlivý efekt melatoninu po SAK skutečně pozorován v rámci EBI (Ayer *et al.* 2008; Ersahin *et al.* 2009), bylo pozorováno i zlepšení výsledků v neurobehaviorálních testech (Wang *et al.* 2013), do klinické praxe ovšem melatonin nepronikl. Otázkou rovněž je optimální načasování podání melatoninu k dosažení maximálního efektu.

Není jisté, zda existuje kauzalita mezi časným a pozdním poškozením mozku, nicméně zdá se, že závažnost EBI a následného DCI spolu souvisí (van der Schaaf *et al.* 2006; van Lieshout *et al.* 2018). Tato souvislost mezi časnými a pozdními patofyziologickými procesy by znamenala, že zacílení léčby – například podávání vazodilatancí nebo melatoninu - na EBI může přinést zlepšení i ve fázi pozdní ischemie.

5 Hypotézy

Cílem studie bylo na experimentálním modelu časných perfuzních poruch po subarachnoidálním krvácení testovat následující hypotézy:

1. Prudké zvýšení objemu subarachnoidálního prostoru způsobí akutní pokles kortikální perfuze
2. Subarachnoidální krvácení způsobí pokles mozkové perfuze jak mechanismem nitrolební hypertenze, tak mechanismem časně vazokonstrikce.
3. Eliminace nitrolební hypertenze dekompresní kraniektomií zlepší perfuzi mozku bezprostředně po navození subarachnoidálního krvácení.
4. V důsledku SAK dochází k vzniku signifikantního množství hydroxylových a nitroxylových radikálů.
5. Časné perfuzní změny mohou být ovlivněny podáváním vazodilatancia (nitroprussid sodný).
6. Podání vazodilatancia do komorového systému mozku sníží výskyt systémových nežádoucích účinků.
7. Dlouhodobé následky subarachnoidálního krvácení mohou být zmírněny podáním antioxidantu (melatonin).

6 Metodika

Prvním krokem bylo vytvoření spolehlivého modelu subarachnoidálního krvácení a monitoring mozkové perfuze, dále aplikace terapeutických intervencí (vazodilatans, antioxidant). Efekt vazodilatancí může být limitován nitrolební hypertenzí, která je vždy součástí patofyziologických dějů při vzniku SAK. Proto byly provedeny i experimenty k posouzení významu nitrolební hypertenze pro vznik časně hypoperfuze a ke zhodnocení efektu dekompresní kraniektomie na mozkovou perfuzi.

6.1 Pokusná zvířata

S ohledem na zkušenosti experimentálního pracoviště a technické vybavení projektu byly pokusy prováděny na mladých samcích laboratorního potkana kmene Wistar (AnLab, Česká republika; 220 – 240 g). Zvířata byla ustájena v klecích s volným přístupem k potravě a vodě, s 12-hodinovým cyklem světlo/tma.

Všechny zákroky byly prováděny v souladu s etickými doporučeními 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a v souladu s doporučeními Zákona na ochranu zvířat České republiky, která odpovídají legislativě Evropské unie. Experimentální protokol byl schválen Etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Zvýšená péče byla věnována minimalizaci utrpení pokusných zvířat.

6.2 Anestezie

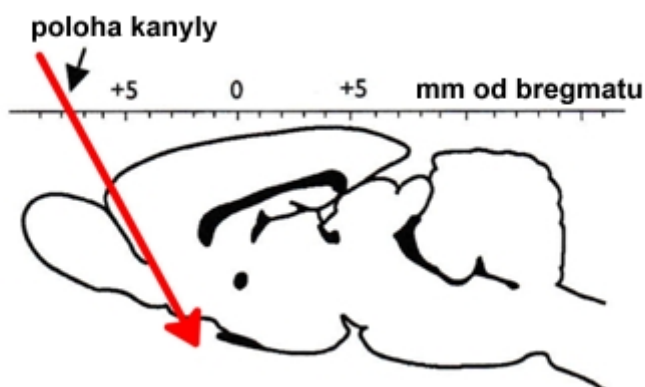
Všechny zákroky byly prováděny v celkové anestezii ketaminem (100 mg/kg) a midazolamem (1,2 mg/kg) *i.p.* doplněné infiltrací měkkých tkání hlavy lokálním anestetikem (trimekain 1% 0,3 ml).

Inhalační anestezie isofluranem 1% za spontánní ventilace neintubovaného zvířete byla v předběžných experimentech zatížena vyšší mortalitou. Kromě toho isofluranová anestezie zvyšuje CBF a ovlivňuje i rozvoj hypoxiko-ischemického poškození (Sosunov *et al.* 2015; Villa *et al.* 2012); oba tyto

efekty by mohly zkreslit výsledky prováděných experimentů, proto byla zvolena anestezie ketamin – midazolam.

6.3 Navození subarachnoidálního krvácení

K navození SAK byl použit model injekce do prechiasmatické cisterny (Prunell *et al.* 2002). Pokusným zvířatům v celkové anestezii byla nejprve kanylována *a. femoralis* k získání arteriální krve. Po doplnění celkové anestezie infiltrační anestezii měkkých tkání hlavy byla odhalena lebka, zbrúšena kalva nad pravou hemisférou a ve střední čáře 7,5 mm rostrálně od bregmatu byl vyvrtán otvor pro zavedení kanyly. Pro kanylací byla použita intravenózní kanyla 26G, jejíž jehla byla skloněna o 30° a zavedena do prechiasmatické cisterny, dokud se hrot jehly nedotknul lebeční baze (obr. 4). Kanyla byla poté fixována ke kosti a jehla byla odstraněna. Následně bylo aplikováno 250 μ l čerstvé autologní neheparinizované arteriální krve během 15 sekund, kontrolní skupině (sham-operated) byl podán stejným způsobem bolus izotonického roztoku (IR; 0,9% roztok NaCl) o tělesné teplotě.

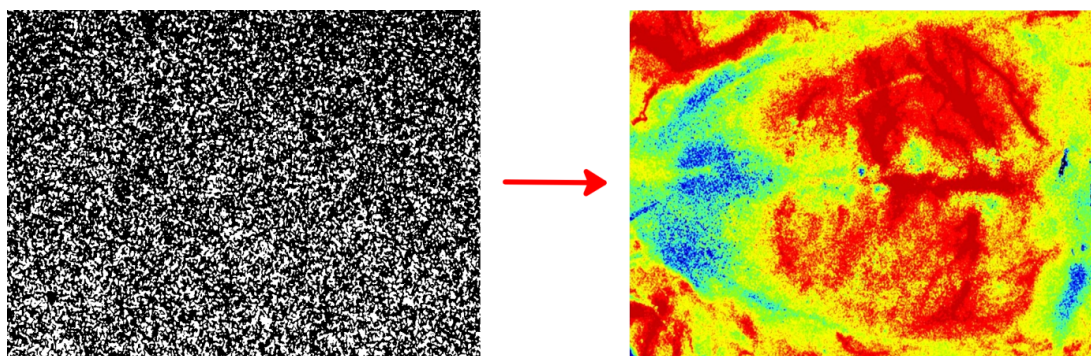


Obr. 4 Schéma navození subarachnoidálního krvácení aplikací krve do prechiasmatické cisterny. Šipka znázorňuje polohu a sklon kanyly. (Modifikace podle Prunell *et al.* 2002.)

6.4 Měření mozkové perfuze

Perfuzze mozkové kůry byla snímána 1 minutu před intracisternální injekcí, během aplikace krve nebo IR a 30 minut po aplikaci.

Kortikální perfuze byla měřena metodou Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA; přístroj PeriCam PSI HR, Perimed Instruments, Švédsko). Tato metoda je odvozena od laserdopplerovského měření průtoku a umožňuje v reálném čase měření mikrocirkulace ve tkáních s vysokým prostorovým i časovým rozlišením. Metoda využívá techniky osvitů tkání laserovým světlem o vlnové délce 785 nm, která v důsledku interference vlnění poskytuje obrazce granulárního vzhledu se střídajícími se světlými a tmavými plochami. Pokud je objekt statický, zůstávají i tyto obrazce neměnné. V přítomnosti pohybujících se elementů (např. erytrocytů v cévách) dochází k fluktuaci obrazu. Rychlost fluktuace závisí na rychlosti pohybu erytrocytů ve tkáních. Tato fluktuace je snímána CCD kamerou a následně počítačově zpracována do podoby dvoudimenzionálních map mozkové perfuze (Ayata *et al.* 2004; Briers 2001; Dunn *et al.* 2001; Shin *et al.* 2007).



Obr. 5 Osvitem tkáně laserovým paprskem vzniká v důsledku interference vlnění zrnitý obrazec. Barevná mapa znázorňuje rychlost fluktuace tohoto obrazu v přítomnosti pohybujících se elementů – v případě prokrvených tkání erytrocytů (modifikace podle Briers 2011).

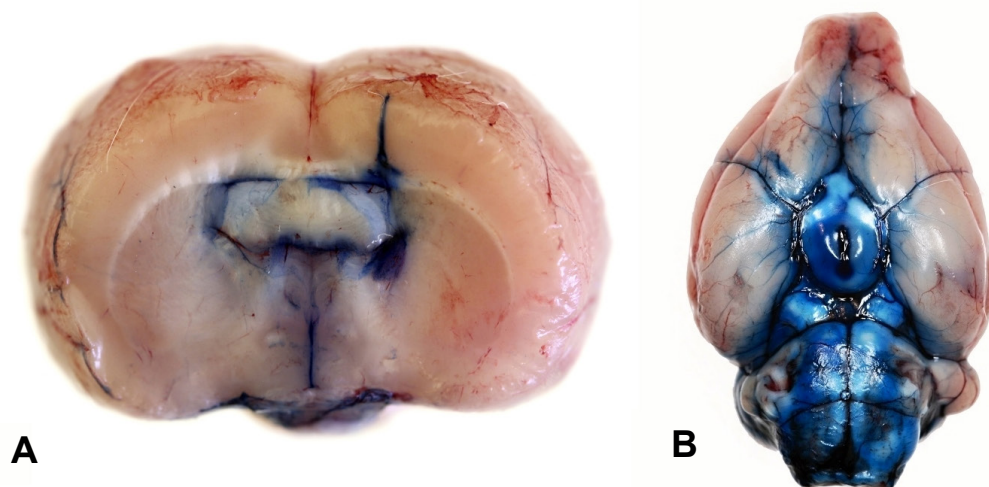
Tkáňová perfuze byla měřena v arbitrárních perfuzních jednotkách (PU). Protože PU nelze konvertovat na ml/min/100 g, byly změny v perfuzi mozku popsány v procentech změny perfuze oproti výchozím hodnotám. Vý-

chozí hodnoty byly získány měřením z každého zvířete 1 minutu před navozením SAK. Pro transkalvární sledování perfuze mozkové kůry je zapotřebí provést mechanickou abrazi kalvy pokusného zvířete, z důvodu nízké penetrace laserového paprsku do tkáně – cca 500 μm (Shin *et al.* 2007). Přístroj umožňuje měření v předdefinovaných zájmových oblastech (region of interest, ROI). U zvířat bez dekompresní kraniektomie byl ROI umístěn v oblasti pravé hemisféry, kde byla předtím ztenčena kost, u zvířat s DK byla perfuze měřena v oblasti kraniektomií.

6.5 Farmakoterapie

Intracerebroventrikulární aplikace farmak

Pro aplikaci farmak do postranní mozkové komory byla levá postranní komora kanylována 2 mm kaudálně a 2 mm laterálně od bregmatu, katetr (Brain Infusion Kit 2, Alzet, USA) byl zaveden do hloubky 3 mm (Paxinos a Watson 2006). V předběžných pokusech byla poloha katetru v komoře ověřena aplikací Evansovy modři, distribuce modři v subarachnoidálním prostoru byla zjišťována po 30 minutách od aplikace (obr. 6).



Obr. 6 Při kanylaci laterální komory a aplikaci isotonického roztoku zbarveného kontrastní látkou (Evansova modř) je kontrastní látka patrná v komorovém systému mozku (A). Po 30 minutách dochází k distribuci roztoku na mozkovou bazi a tedy do oblasti Willisova okruhu, místa, kde očekáváme vazokonstrikční efekt arteriální krve při modelu SAK (B).

Intracerebroventrikulární podání nitroprussidu sodného

Vzhledem k omezeným zkušenostem s experimenty na potkanech není z dosud publikovaných prací na toto téma nejvhodnější dávka SNP pro intrathekální podání patrná. Dávka v tomto experimentu byla vypočtena na základě předchozích laboratorních i klinických pokusů a adjustovaná na hmotnost potkana a jeho objem likvoru. V předběžných pokusech se jako nejefektivnější dávka při bolusovém podání ukázalo 10 μg SNP. Podáván byl bolus 10 μg nitroprussidu sodného (Sigma – Aldrich® Inc., Czech Republic) rozpuštěný v 5 μl 5% roztoku glukózy (vehikulum, V) do postranní komory mozkové (intracerebroventrikulárně, ICV). Během přípravy a po celou dobu experimentu byl roztok SNP důsledně chráněn před světlem.

Zvířata byla rozdělena do těchto skupin:

- zvířata s navozeným SAK a podáváním nitroprussidu sodného intra-cerebroventrikulárně (skupina SAK-SNP; n = 18)
- zvířata s navozeným SAK a ICV podáváním vehikula (SAK-V; n = 10)
- zvířata pouze s navozením SAK (SAK, n = 12)

a 3 kontrolní skupiny:

- falešně operovaná zvířata bez SAK, bolus izotonického roztoku do prechiasmatické cisterny + ICV podání SNP (sham-SNP; n = 8)
- falešně operovaná zvířata + ICV podání vehikula (sham-V; n = 8)
- falešně operovaná zvířata bez farmakologické intervence (sham; n = 8)

Zvířatům se SAK léčeným SNP bylo podáno 10 µg SNP. První dávka byla podána 3 minuty po navození SAK, pokud u pokusného zvířete došlo k sekundárnímu poklesu perfuze po dosažení vrcholu, byla podána další dávka. Sekundární pokles byl pro účely této studie definován jako snížení perfuze o 10% oproti vrcholové hodnotě. Kontrolní skupiny se SAK dostaly pouze bolus 5 µl vehikula podle stejného schématu.

Protože SNP je potentní vazodilatátor a při jeho podání lze očekávat i změny systémového krevního tlaku, byla pokusným zvířatům kanylována *a. femoralis* k měření arteriálního krevního tlaku. Arteriální přístup byl rovněž použit k získání krve, pomocí které bylo navozeno SAK.

V této části experimentu nebyl měřen nitrolební tlak, aby nebylo ovlivněno šíření farmaka v subarachnoidálním prostoru přítomností intraparenchymového čidla.

6.6 Dekompresní kraniektomie

Vzhledem k tomu, že na časné hypoperfuzi se může podílet i vzestup ICP způsobený expanzí subarachnoidálního prostoru, byla v dalším experimentu testována účinnost DK na perfuzní poruchy v časné fázi SAK.

Zvířata byla rozdělena do následujících skupin:

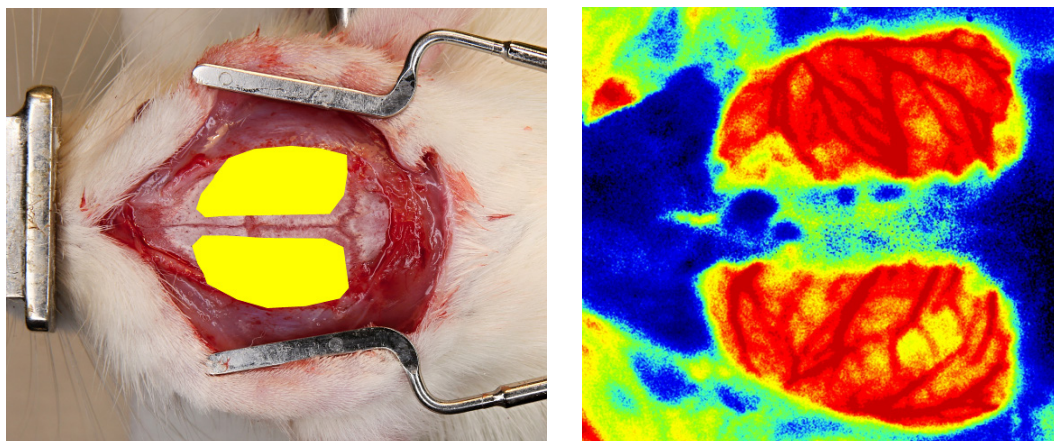
- zvířata s navozeným subarachnoidálním krvácením (SAK; n = 12)
- zvířata s dekompresní kraniektomií a následně subarachnoidálním krvácením (DK-SAK; n = 8);

a dvě kontrolní skupiny:

- falešně operovaná (sham-operated) zvířata, kterým byl podán izotonický roztok místo arteriální krve (sham; n = 8);
- sham-operated s dekompresní kraniektomií (DK-sham; n = 8).

Zvířatům v obou skupinách s DK byla provedena rozsáhlá oboustranná fronto-temporo-parietální kraniektomie a durotomie. Kraniektomie byla ohraničena rhomboidním švem v zadní části, v přední části přesahovala koronární šev. Mediální hranici tvořil sagitální šev a na laterální hranici dosahovala kraniektomie baze střední jámy lební (obr. 7). Durotomie byla provedena rozsáhlou křížovou incizí. Ve skupinách bez DK byla kost nad levou hemisférou mechanicky ztenčena tak, aby bylo možno provést měření perfuze mozku.

Pro měření nitrolebního tlaku bylo zavedeno ICP čidlo (Codman Micro-sensor ICP transducer, Johnson & Johnson Health Care Systems, USA) do levé mozečkové hemisféry (Rooker *et al.* 2002). *Arteria femoralis* byla kanylována k měření invazivního krevního tlaku a k získání krve k navození SAK. Nitrolební a arteriální krevní tlak byly monitorovány kontinuálně (ICP Express, Johnson & Johnson Health Care Systems, USA and Spacelabs Healthcare, USA) po celou dobu měření (30 minut). CPP byl vypočítán pomocí rovnice: $CPP = MAP - ICP$.



Obr. 7 Rozsah dekompresní kraniektomie (vlevo znázorněn žlutou barvou, vpravo snímek získaný přístrojem PeriCam PSI HR)

V tomto experimentu byl ICP měřen pomocí intraparenchymového čidla zavedeného do mozečkové hemisféry. Přestože ICP čidlo je obvykle zaváděno do mozkového parenchymu, v experimentech, které zahrnují měření CBF, může být vhodnější se tomuto postupu vyhnout, neboť samotné zavedení intraparenchymového čidla může vést k vzniku šířící se deprese a změnám CBF (Verhaegen *et al.* 1992). Tlaky v mozku a v mozečku byly jak za normálních, tak patologických podmínek srovnatelné (Rooker *et al.* 2002).

6.7 Preemptivní podání melatoninu a volné radikály v modelu SAK

V průběhu rozvoje SAK se výrazně mění intrakraniální tlak a tím i perfuze mozkové kůry. Prvotní hypoperfuze je následována reperfuzí. Tyto děje jsou ve všech tkáních provázeny oxidačním stresem, který obecně vede ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů (Pandya *et al.* 2013).

Jednou z našich pracovních hypotéz je to, že významnou roli v patogenezi rozvoje pozdních změn po SAK hrají kyslíkových radikály, vznikající důsledkem oxidačního stresu v časných fázích SAK. Pro testování této hypotézy byl preventivně (1 hodinu před navozením SAK) podán melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamin; Sigma – Aldrich® Inc., Czech Republic) jako

antioxidant a scavenger volných kyslíkových radikálů v dávce 100 mg/kg i.p. ve 2 ml 2% roztoku Tween 80 (polyoxyethylenesorbitan monooleát).

Předpokládané změny jsme sledovali pomocí behaviorálních testů (viz dále) a morfologicky.

Zvířata byla rozdělena do následujících skupin:

- zvířata s navozeným subarachnoidálním krvácením (SAK, n = 10);
- falešně operovaná (sham-operated) zvířata, kterým byl podán izotonický roztok místo arteriální krve (Sham, n = 8);
- zvířata se SAK s preventivně podaným melatoninem (M-SAK, n = 8);
- falešně operovaná zvířata s preventivně podaným melatoninem (M-Sham, n = 8);
- naivní kontroly bez jakéhokoliv experimentálního zásahu (n = 8).

Vzhledem k dlouhodobému designu pokusu a sledování neurologického deficitu nebyla kanylována *a. femoralis* a k navození SAK byla použita alogenní krev místo autologní.

Ve všech skupinách mimo naivních kontrol byla měřena mozková perfuze výše uvedeným způsobem.

Před behaviorálními a morfologickými testy byl měřen nárůst volných radikálů v použitém modelu SAK. Hladiny kyslíkových radikálů (hydroxylových a nitroxidových) byly měřeny v tkáni mozku odebrané 2 hodiny po SAK. Použita byla metoda Electron Paramagnetic (Spin) Resonance (EPR/ESR), která umožňuje přímé měření hladin volných radikálů v homogenizované tkáni. Tato metoda je založena na schopnosti některých chemických sloučenin absorbovat mikrovlnnou energii v silném magnetickém poli. K záznamu vlnových spekter byl použit přístroj Elexsys E-540 Bruker-Biospin (Rheinstetten, Germany) EPR spektrometr na Ústavu jaderné fyziky AV ČR v Řeži. Výsledky byly znázorněny v arbitrárních jednotkách (Mares *et al.* 2013; Rokyta *et al.* 2004).

Ke stanovení hladin volných radikálů byla zvířata rozdělena do těchto skupin:

- zvířata s navozeným subarachnoidálním krvácením (SAK, n = 9);
- falešně operovaná (sham-operated) zvířata (sham, n = 7);
- naivní kontroly bez jakéhokoliv experimentálního zásahu (n = 9).

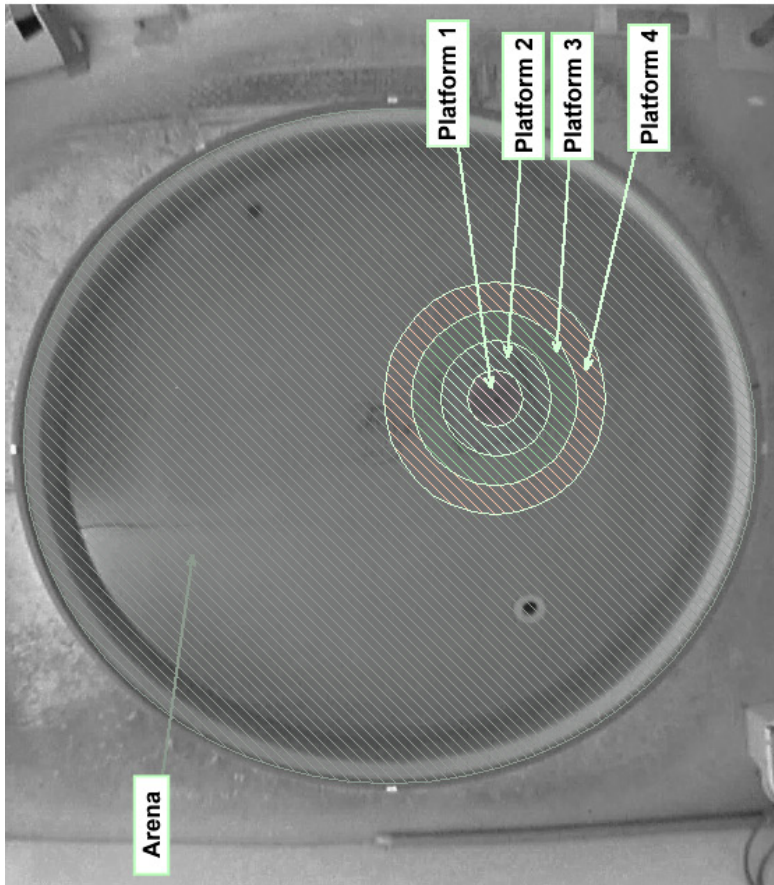
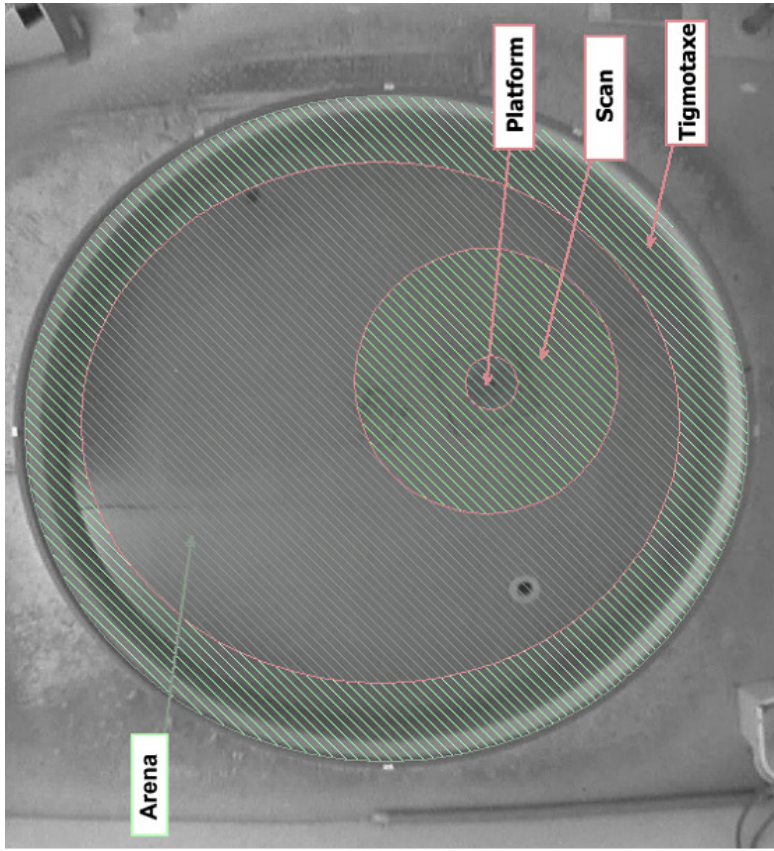
6.7.1 Behaviorální testy

Testy byly zaměřeny na změny senzomotoriky a prostorového učení a paměti u zvířat uvedených v předchozím bodě. Všechny byly zahájeny 24 hodin po SAK nebo „sham“ zásazích. Senzomotorické funkce pokusných zvířat byly sledovány dvěma testy za 24 hodin po iniciálním inzultu: pohyb na rotujícím válci (rotarod) a výdrž na horizontální hrazdě (beam balance). Rotarod hodnotí motorický deficit a vestibulomotorické a taktilní funkce. Zvířata byla umístěna na otáčející se válec (115 mm v průměru, rychlost otáček 6 / min) proti směru rotace válce, hodnocena byla schopnost zvířete vyhnout se pádu a udržet se na rotujícím válci 120 sec, zaznamenáván byl počet pádů do splnění cíle (max. 3 pokusy) (Deykun *et al.* 2011). Beam balance testuje vestibulární a motorické schopnosti zvířat, hodnotí se schopnost zvířete udržet se na úzké horizontální hrazdě. Zvířata byla umístěna na dřevěnou hrazdu (délka 400 mm, průměr 10 mm, ve výšce 800 mm nad povrchem), cílem bylo udržet rovnováhu na hrazdě po dobu 120 sec. (maximálně 3 pokusy), zaznamenávalo se trvání prvního pokusu (Deykun *et al.* 2011).

Následovalo učení v Morrisově vodním bludišti (Morris Water Maze, MWM), což je kognitivní test měřící schopnost prostorové orientace potkanů a jejich schopnosti naučit se polohu ostrůvku umístěného pod hladinou vody (Terry 2009). Zvířata byla umístěna do nádrže s vodou (průměr 1,98 m, teplota vody 19 – 20°C), ve které byl v hloubce 20 mm pod vodní hladinou ponořen průhledný ostrůvek. Měřila se doba do dosažení ostrůvku, celková uplavaná vzdálenost, průměrná rychlost plavání a vzdálenost dráhy plavání od ostrůvku během pokusu – „search error“. Byla provedena série 8 opakova-

ných pokusů během šesti dnů. Poslední den učení byla na závěr testována retence paměti pomocí „probe testu“ (memory retrieval test). V tomto testu se hned po ukončení učení vyjme ostrůvek z bludiště a zvířata jej pak marně hledají během 60 sec. Následující den byl probe test zopakován. Sledována byla doba, po níž se zdržují v oblasti, kde ostrůvek byl a četnost návratů do ní. Použití programu EthoVision XT10 (Noldus, Nizozemí) umožňuje tuto aktivitu znázornit v podobě záznamu trajektorie pohybů zvířete. Seskupením trajektorií jednotlivých skupin zvířat je možné vytvořit tzv. „heat maps“, které charakterizují způsoby hledání ztraceného ostrůvku celými jednotlivými skupinami zvířat (strategie hledání).

Parametry byly vyhodnocené v oblastech vodního bludiště definovaných pomocí programu EthoVision XT10. Pro hodnocení fáze učení byla použita celá oblast plavání bez ostrůvku, pro hodnocení strategií byly použity oblasti thigmotaxe – plocha 20 cm od okraje bludiště, a scan – rozšířená oblast kolem ostrůvku, tj. trojnásobek jeho velikosti (průměr ostrůvku – 15 cm, scan – 45 cm). Pro hodnocení paměti pomocí probe testu byly použity parametry Time a Frequency Platform 1 – čas strávený v oblasti a počet vstupu do oblasti původního ostrůvku a Time a Frequency in Zone – čas a počet vstupu do definovaných oblastí – 3 mezikružích kolem ostrůvku o šířce 2 – 4 poloměry ostrůvku (Platform 2 – 4) (obr. 8)



Obr. 8 Rozdělení Morrisova vodního bludiště na zóny pro hodnocení strategie hledání a probe testu.

6.7.2 Morfologické hodnocení

Z každé skupiny byli náhodně vybráni 3 jedinci, u kterých bylo 7. den po navození SAK provedeno histologické vyšetření mozku. Po transkardiální perfuzi formalinem byl odebrán mozek a fixován ve formalinu po dobu jednoho týdne. Mozkové řezy pak byly obarveny metodou podle Nissla (Pilati *et al.* 2008). U každého řezu byly při stejném zvětšení spočítány zaniklé neurony v oblasti hilu hippocampu. Pro každou skupinu byl stanoven jejich průměrný počet v jednom řezu. Hodnotitel byl zaslepen vůči skupině, kterou hodnotil.

6.8 Statistické vyhodnocení

Mozkový perfuzní tlak byl vypočten podle vzorce $CPP = MAP - ICP$. Mozková cévní rezistence jakožto výraz míry vazokonstrikce byla stanovena v analogii s Ohmovým zákonem jako podíl CPP a změny mozkové perfuze v procentech výchozích hodnot ($R = CPP / \Delta \text{ perfuze}$).

Pro statistickou analýzu byl použit program Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Software, Inc., USA). Rozdíly ICP, CPP, změny mozkové perfuze a mozkové cévní rezistence mezi skupinami byly porovnány pomocí dvouvýběrové ANOVA s Bonferroniho *post-hoc* testem.

Změny perfuze ve skupinách se SAK, maximum perfuze dosažené po počátečním poklesu způsobeném aplikací krve do prechiasmatické cisterny, hodnoty perfuze při sekundárním poklesu po dosažení maximální hodnoty, a změny krevního tlaku ve skupinách léčených nitroprussidem sodným byly porovnány pomocí ANOVA pro opakovaná měření.

U hladin volných radikálů a senzomotorických testů byla data nejprve testována na normalitu a poté byl proveden buď Kruskal – Wallis test s Dunnovým *post-hoc* testem, nebo jednofaktorová ANOVA.

Pro hodnocení prostorového učení a paměti byly použity následující parametry: latence plavání, celková uplavaná vzdálenost, průměrná rychlost plavání a „search error“.

Data byla hodnocena pomocí dvoufaktorové ANOVA (Treatment vs. Den plavání) pro opakovaná měření s následným Tukeyho *post-hoc* testem.

Při hodnocení korelace mezi CPP a perfuzí byl vypočten Spearmanův korelační koeficient.

Data jsou znázorněna jako průměr \pm SEM. Za signifikantní je považováno $p < 0,05$.

7 Výsledky

7.1 Důsledky subarachnoidálního podání krve / IR

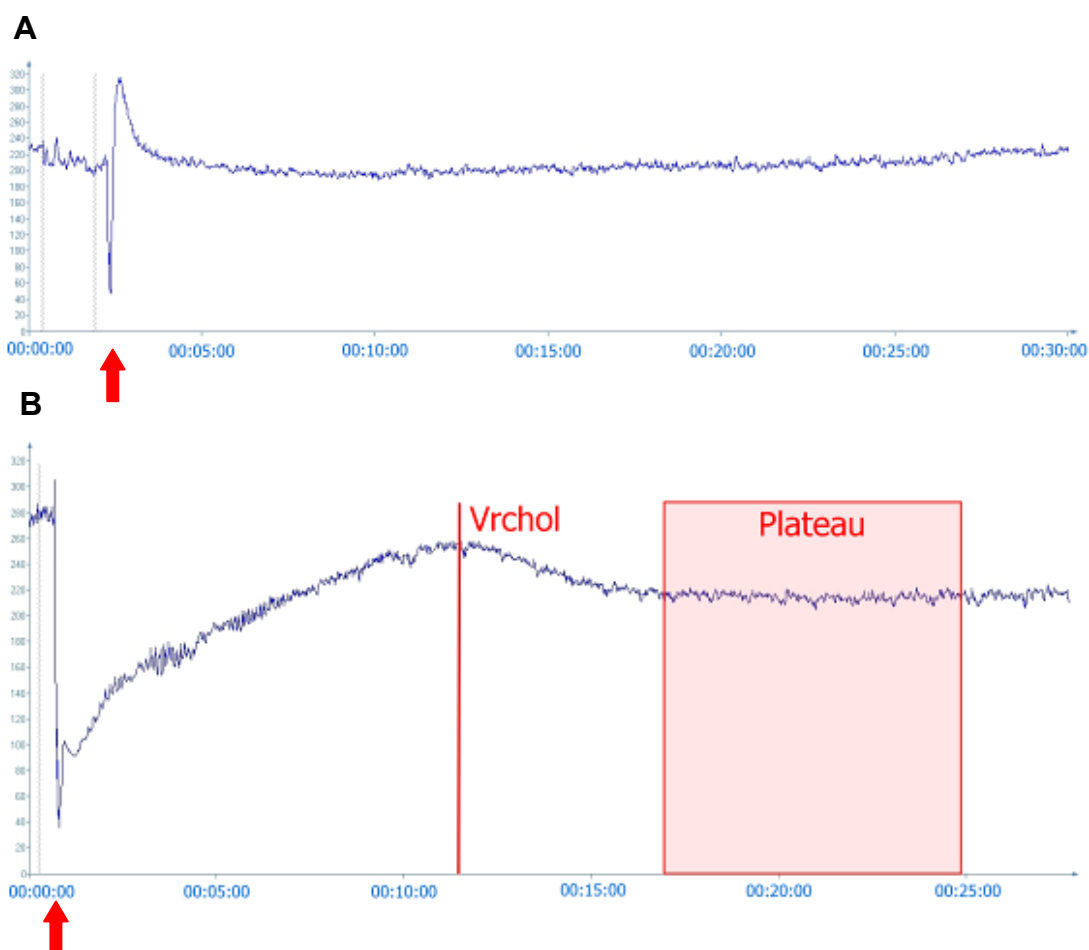
7.1.1 Změny mozkové perfuze

Podání krve i izotonického roztoku do prechiasmatické cisterny bylo spojeno s významným poklesem mozkové perfuze.

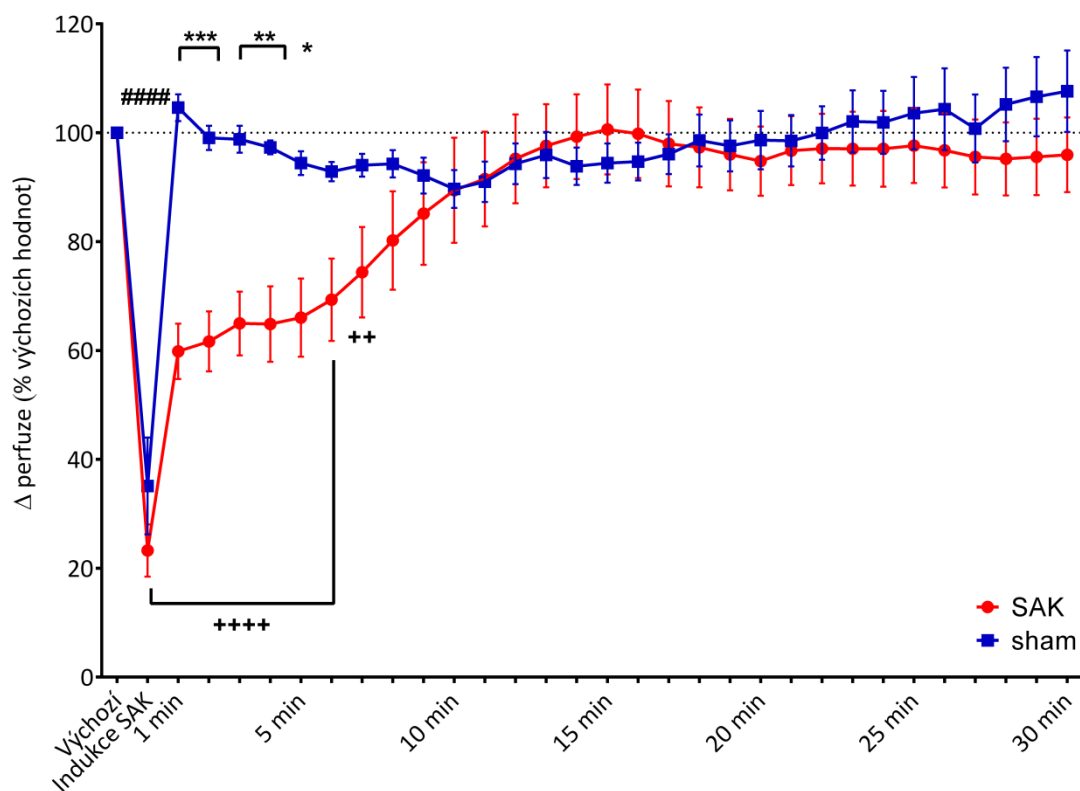
Subarachnoidální aplikace IR způsobila významný pokles perfuze na $31,9 \% \pm 5,9 \%$ výchozích hodnot (průměr \pm SEM, $p < 0,0001$ oproti výchozím hodnotám). Počáteční hypoperfuze byla následována krátkou (cca 1 minuta) fází hyperperfuze a poté návratem k výchozím hodnotám (obr. 9A).

Během podání krve došlo k poklesu perfuze mozku na $28,4 \% \pm 4,7 \%$ ($p < 0,0001$) výchozích hodnot. U 7 z 24 zvířat vedla hluboká hypoperfuze mozku ke smrti během prvních 5 minut po aplikaci krve (mortalita 29 %), u zbývajících 17 zvířat došlo k pomalému vzestupu perfuze. Ve srovnání s kontrolní skupinou (sham) byl návrat perfuze k výchozím hodnotám výrazně zpomalený a perfuze byla signifikantně snižena prvních 9 minut po navození SAK (obr. 10).

U 14 ze 17 zvířat byl pozorován bifazický průběh změn mozkové perfuze (průběh „vrchol – plateau“, obr. 9B). Po navození SAK a iniciální hypoperfuzi došlo k vzestupu perfuze až do dosažení vrcholu za $10 \text{ min } 25 \text{ sec} \pm 1 \text{ min } 26 \text{ sec}$ na úrovni $108,0 \% \pm 5,4 \%$ výchozích hodnot. Následoval další signifikantní pokles ($p < 0,001$ a $p < 0,01$, ve srovnání s vrcholovými a výchozími hodnotami) a za $18 \text{ min } 14 \text{ sec} \pm 2 \text{ min } 09 \text{ sec}$ bylo dosaženo plateau hodnoty $84,4 \% \pm 1,7 \%$ výchozích hodnot; poté došlo opět k vzestupu perfuze, který pokračoval do konce monitorovaného období (30 min po navození SAK).



Obr. 9 Charakteristický tvar křivky změn perfuze mozku u falešně operovaných zvířat (A) a po navození SAK (B). Změny mozkové perfuze po SAK mají typický tvar vrchol - plateau. Osa x: čas (min), osa y: perfuze (PU), šipka: aplikace IR nebo krve.

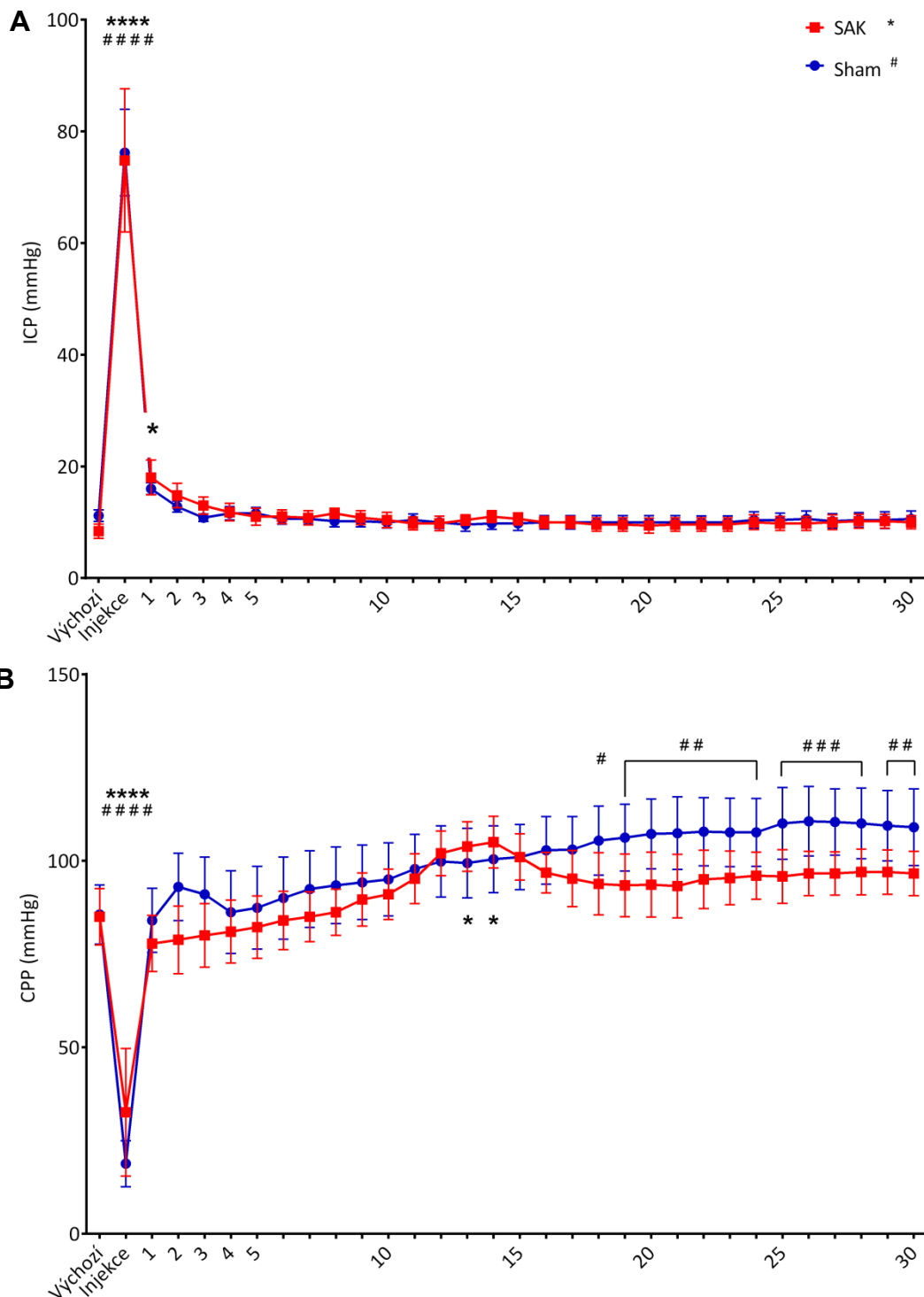


Obr. 10 Změny perfuze u zvířat po subarachnoidální injekci arteriální krve (SAK) a IR (sham). Návrat perfuze k výchozím hodnotám byl u zvířat se SAK zpomalený, perfuze byla oproti výchozím hodnotám signifikantně nižší v okamžiku navození SAK a v prvních 7 minutách po navození SAK (++ $p < 0,01$, ++++ $p < 0,001$). Ve srovnání s kontrolní skupinou byla perfuze signifikantně nižší prvních 5 minut po navození SAK (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Po podání IR došlo k výraznému poklesu perfuze oproti výchozí hodnotě a následně k rychlému návratu k normě (##### $p < 0,0001$).

7.1.2 Změny nitrolebního tlaku a mozkového perfuzního tlaku

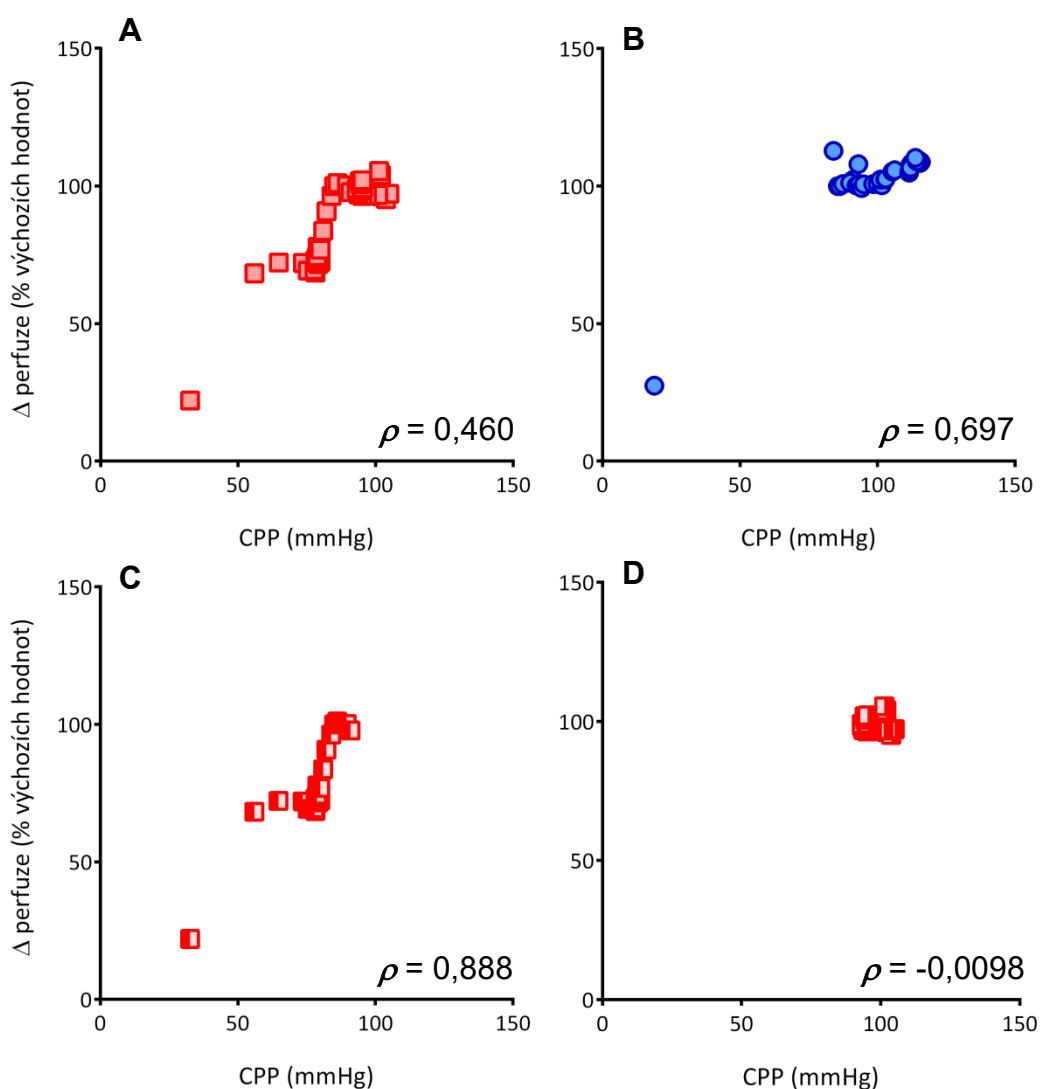
Před aplikací krve nebo IR do prechiasmatické cisterny byl ICP $8,4 \pm 1,3$ mmHg (SAK) a $11,2 \pm 1,0$ mmHg (sham); CPP před aplikací byl $85,0 \pm 7,6$ mmHg (SAK) a $58,6 \pm 7,9$ mmHg (sham).

Během podání arteriální krve do prechiasmatické cisterny došlo k významnému vzestupu ICP ($74,8 \pm 12,8$ mmHg, $p < 0,001$, obr. 11A) a poklesu CPP oproti výchozím hodnotám ($32,6 \pm 17,1$ mmHg, $p < 0,001$; obr. 11B). Po podání IR došlo k zvýšení ICP na $76,2 \pm 7,8$ mmHg ($p < 0,001$, obr. 11A), CPP klesl na $18,8 \pm 6,2$ mmHg ($p < 0,001$, obr. 11B). S vzestupem ICP a poklesem CPP korespondoval i pokles mozkové perfuze. K návratu ICP k fyziologickým hodnotám došlo během 4 minut po aplikaci arteriální krve a za 2 minuty po aplikaci IR. U zvířat se SAK došlo mezi 13. a 14. minutou k vzestupu CPP na $105 \pm 6,9$ mmHg ($p < 0,05$, obr. 11B), v druhé polovině monitorovaného období došlo k vzestupu CPP i ve skupině sham až na $110 \pm 9,6$ mmHg ($p < 0,001$, obr. 11B); vzhledem ke konstantnímu nitrolebnímu tlaku tento vzestup CPP odpovídal vzestupu tlaku arteriálního.



Obr. 11 Intracisternální injekce krve i IR způsobila signifikantní vzestup ICP (A) a pokles CPP (B). Vzestup arteriálního krevního tlaku následně vedl k vzestupu CPP (B) (*, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, ****, ##### $p < 0,0001$ oproti výchozím hodnotám).

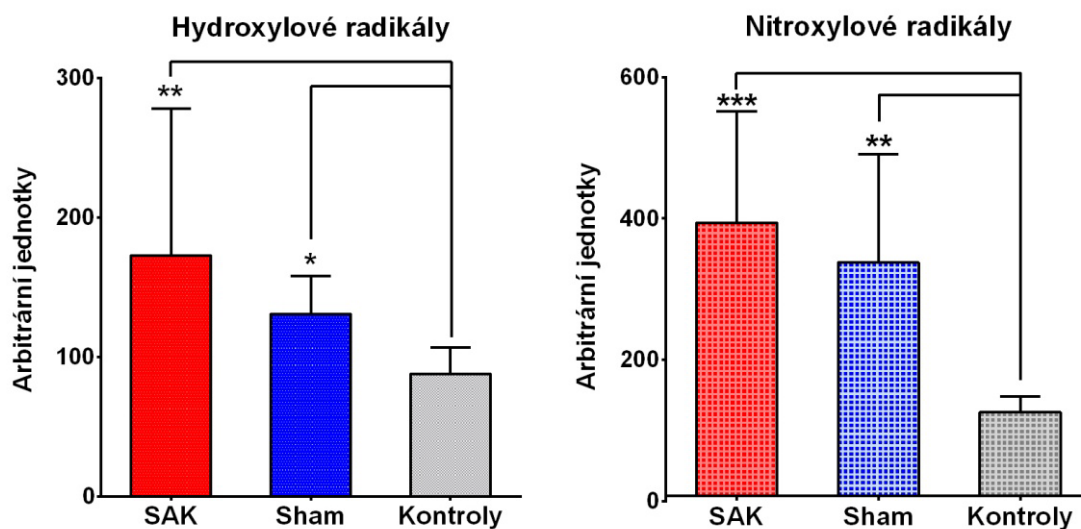
Na základě zjištěných hodnot CPP a změny perfuze byla vypočítána korelace mezi těmito veličinami: pro SAK $\rho = 0,460$ ($p < 0,01$) a pro sham $\rho = 0,697$ ($p < 0,0001$). V případě skupiny SAK byla však korelace mezi perfuzí a CPP výraznější do dosažení vrcholové hodnoty perfuze (cca 10. minuta) - $\rho = 0,888$ ($p < 0,0001$), poté byla perfuze mozku na CPP nezávislá ($\rho = -0,0098$).



Obr. 12 Korelace mezi CPP a změnou mozkové perfuze u SAK (A) a sham (B) skupin. Perfuze nejvíc korelovala s CPP bezprostředně po navození SAK (do dosažení vrcholu perfuze, C), poté se již závislost perfuze na CPP vytrácí (D).

7.1.3 Hladiny volných radikálů

Přímým měřením metodou EPR/EPs jsme po navození SAK prokázali zvýšení hladin obou měřených radikálů. V porovnání s kontrolami (bez jakékoliv chirurgické intervence) byly ve skupinách operovaných zvířat oba radikály zvýšeny bez ohledu na přítomnost SAK. Výraznější vzestup hladin byl pozorován u nitroxylových radikálů.



Obr. 13 Subarachnoidální injekce krve i IR způsobila vzestup hladin volných radikálů oproti naivním kontrolám (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$), mezi skupinami SAK a Sham však nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl.

7.2 Terapeutické intervence

7.2.1 Efekt intratekálního podání nitroprussidu sodného

Nitroprussid sodný byl pokusným zvířatům podáván po navození SAK ve dvou fázích: první dávka po 3 minutách od navození SAK, druhá dávka podle aktuálního průběhu změn perfuze mezi 11. a 25. minutou, v okamžiku dosažení „plateau“ stavu. Jedno z 18 zvířat uhynulo před podáním SNP, dvě uhynula po podání první dávky SNP.

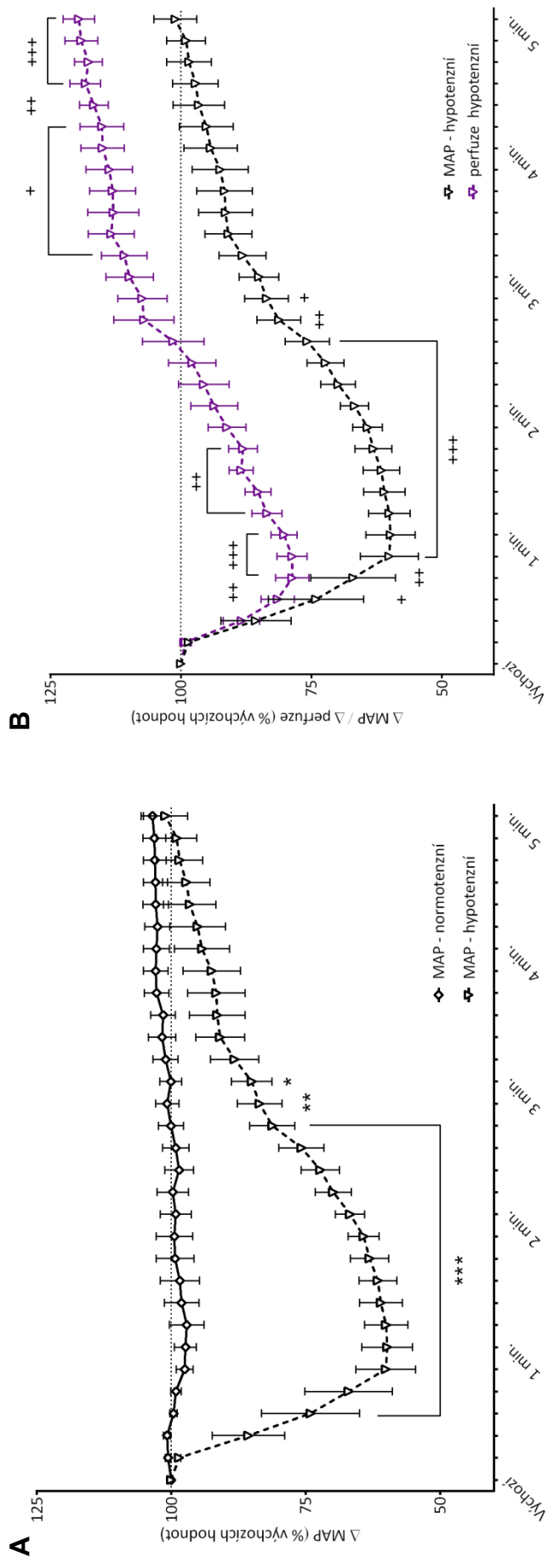
U zbývajících 15 zvířat byly pozorovány 2 odlišné reakce na podání SNP. U 8 zvířat nedošlo k žádné změně arteriálního krevního tlaku a časový průběh změn mozkové perfuze se nijak nelišil od vývoje mozkové perfuze u zvířat ve skupinách SAK-SNP a SAK-V. U zbývajících 7 zvířat se vyvinula závažná systémová hypotenze (pokles MAP až o 50 % oproti výchozím hodnotám) doprovázená poklesem mozkové perfuze (obr. 14). Ve srovnání s normotenzními zvířaty byla v této podskupině mozková perfuze signifikantně nižší mezi 30. sec a 1 min 40 sec po podání SNP (obr. 14C a 15).

Za 3 minuty po podání SNP byl u normotenzních i hypotenzních zvířat pozorován vzestup perfuze, z porovnání se skupinou SAK-V i SAK bez farmakointervence však vyplývá, že k vzestupu perfuze dochází nezávisle na podání SNP a jedná se o přirozený trend.

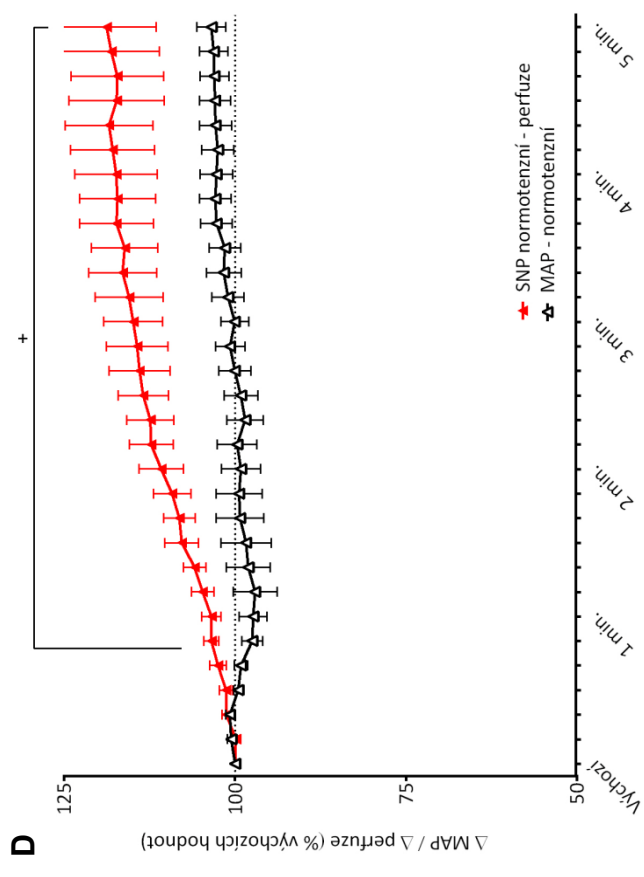
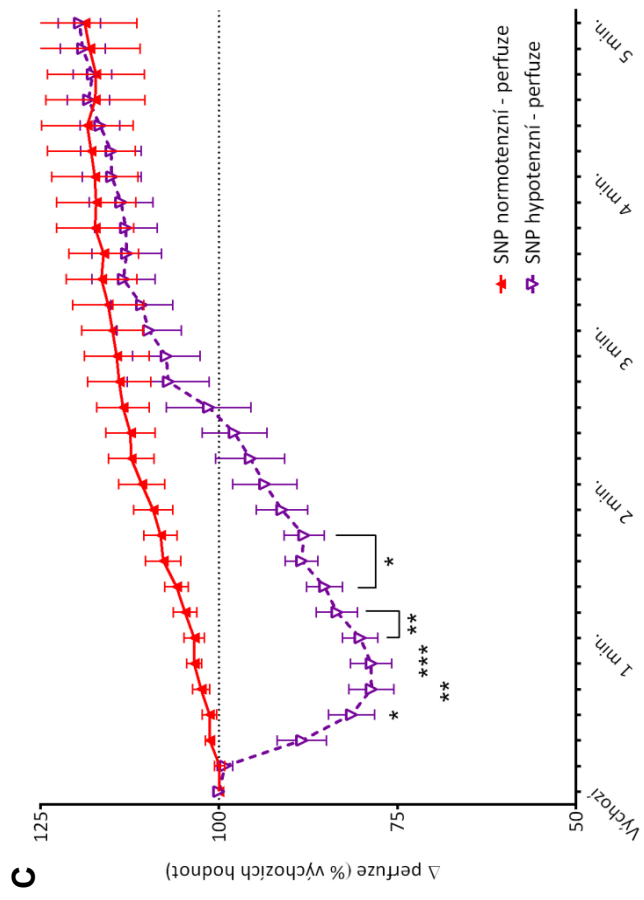
U 8 zvířat léčených nitroprussidem došlo k sekundárnímu poklesu perfuze po předchozím dosažení vrcholu (bifazický průběh tvaru „vrchol – plateau“, viz výše). Těmto zvířatům byla podána další dávka 10 μ g SNP ICV. Po podání této dávky došlo k poklesu krevního tlaku, s nesignifikantním poklesem perfuze. Po 2 minutách po podání 2. dávky SNP došlo k návratu mozkové perfuze k výchozím hodnotám a poté k nesignifikantnímu vzestupu perfuze (obr. 17A). Tento vzestup perfuze nedosáhl hodnot pozorovaných ve skupině *sham*-SNP.

Ve srovnání se skupinou SAK nebyl u zvířat léčených SNP pozorován signifikantní vzestup perfuze. Rovněž nebyly pozorovány rozdíly mezi zvířaty, kterým byly podány 1 a 2 dávky SNP.

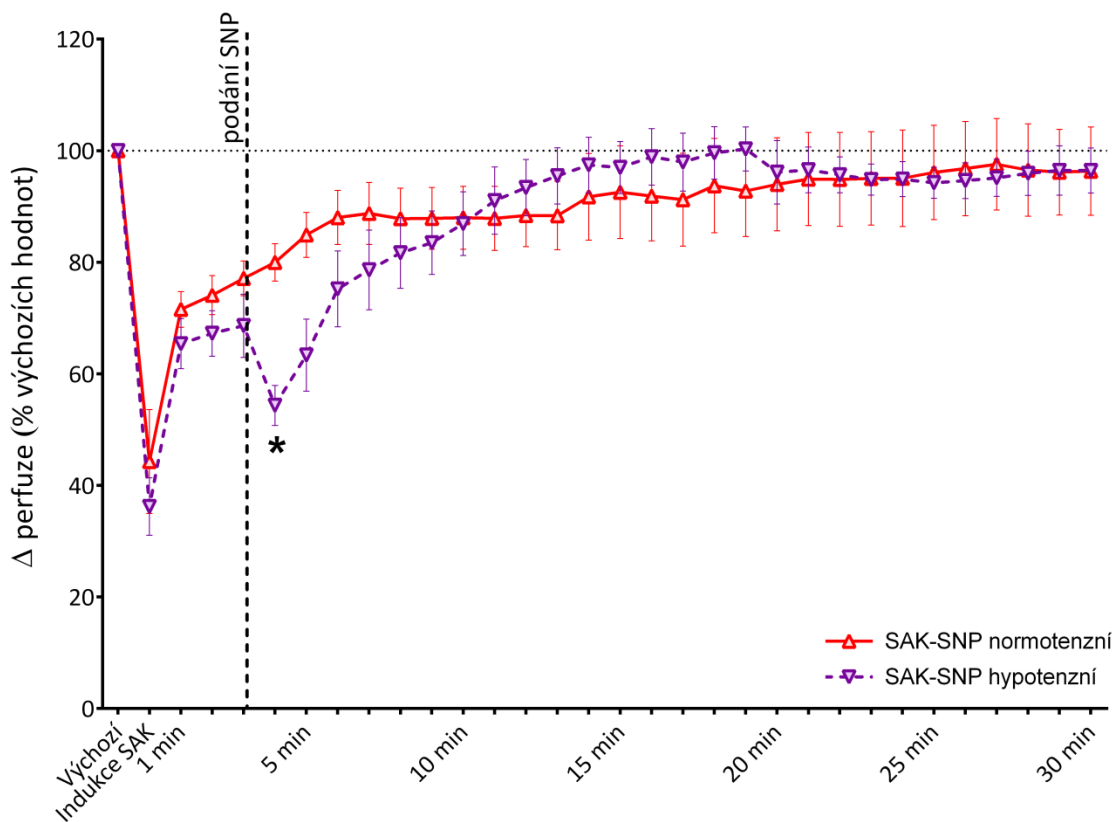
Úmrtnost ve skupině SAK-SNP byla 3 zvířata z 18 (17 %). Dvě zvířata uhynula po podání 1. dávky SNP; vzhledem k očekávané mortalitě, která se u tohoto modelu pohybuje kolem 25%, se však nelze validně vyjádřit k souvislosti s nežádoucími účinky SNP.



Obr. 14 U 7 z 15 zvířat došlo po podání SNP k závažné hypotenzii (A), která korespondovala s mozkovou hypoperfúzí (B). (+ p < 0,05, ++ p < 0,01, +++ p < 0,001, porovnání vůči výchozí hodnotě; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, porovnání mezi skupinami)



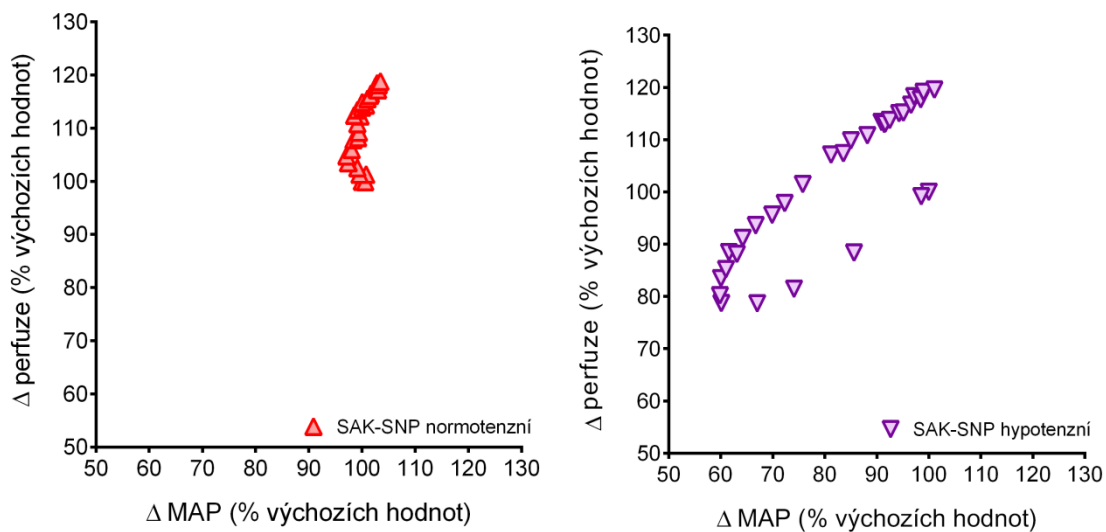
Obr. 14 Perfuze mozku byla u hypotenzních zvířat signifikantně nižší než u normotenzních (C). U normotenzních zvířat došlo k plynulému nárůstu perfuze nad výchozí hodnoty (D). (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$, porovnání vůči výchozí hodnotě; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, porovnání mezi skupinami)



Obr. 15 Tři minuty po navození SAK byl zvířatům podán ICV bolus SNP. Perfuze mozku byla signifikantně nižší 1 minutu po podání SNP u zvířat, u kterých došlo k rozvoji hypotenze, než u zvířat bez hemodynamické odpovědi.

Korelace mezi MAP a perfuzí po aplikaci SNP

U normotenzních zvířat byla pozorována korelace mezi změnou MAP a změnou perfuze – $\rho = 0,773$ ($p < 0,0001$). U hypotenzních zvířat byla tato korelace ještě výraznější – $\rho = 0,844$ ($p < 0,0001$) (obr. 16).



Obr. 16 Perfuze mozku korelovala se změnou CPP (viz obr. 12). V této části experimentu nebyl měřen ICP a tudíž ani počítán CPP, nicméně u zvířat, u kterých se vyvinula arteriální hypotenze v důsledku podání SNP, koreloval pokles MAP významně s poklesem mozkové perfuze ($\rho = 0,844$, $p < 0,0001$).

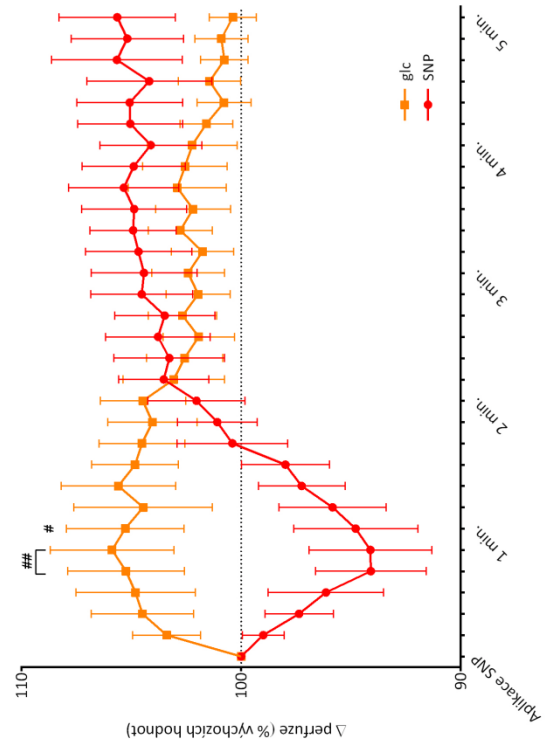
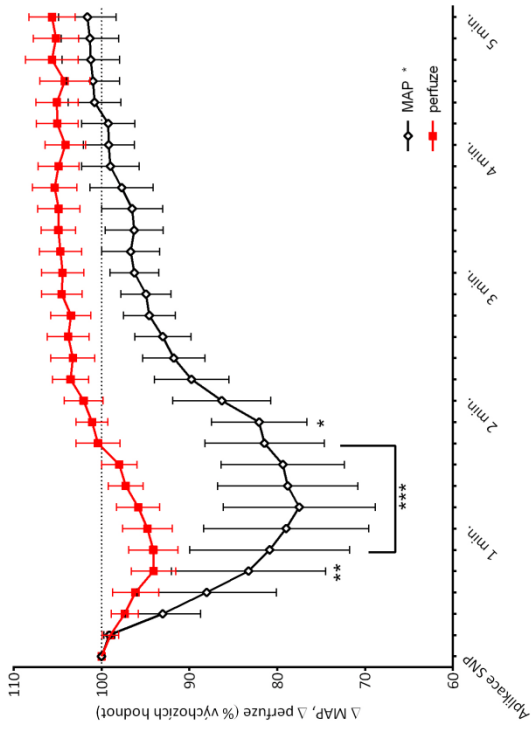
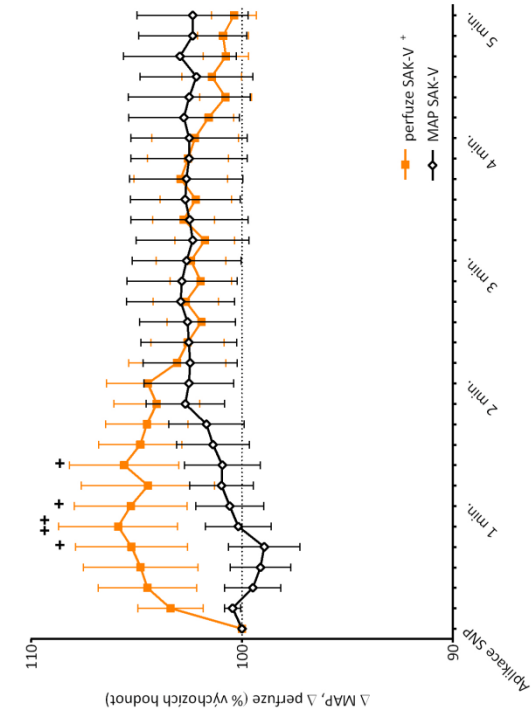
Efekt intracerebroventrikulárního podání vehikula (5% roztoku glukózy)

Mortalita ve skupině SAH-V byla 3 zvířata z 10 (1 zvíře před podáním bolusu vehikula, 2 zvířata po podání vehikula). U zbylých 7 zvířat nebyla ve srovnání se skupinou SAK pozorována žádná změna středního arteriálního tlaku ani mozkové perfuze po ICV podání vehikula 3 minuty po navození SAK.

U všech 7 zvířat došlo po dosažení vrcholu k dalšímu poklesu perfuze a po dosažení vyrovnaného (plateau) stavu jim byla podána 2. dávka vehikula. Po podání vehikula došlo k přechodnému zvýšení perfuze mozku; tento vzestup byl ve srovnání s hodnotami před podáním statisticky významný 1,5 min po podání bolusu vehikula.

Na rozdíl od zvířat, kterým byl podán SNP, došlo k vzestupu perfuze po podání vehikula už v prvních 2 minutách po podání (obr. 17). Ve srovnání se skupinou SAK-SNP byla perfuze po podání vehikula signifikantně vyšší mezi 40 sec a 1 min od podání vehikula.

Intracerebroventrikulární bolus vehikula nezpůsobil žádné změny středního arteriálního tlaku.

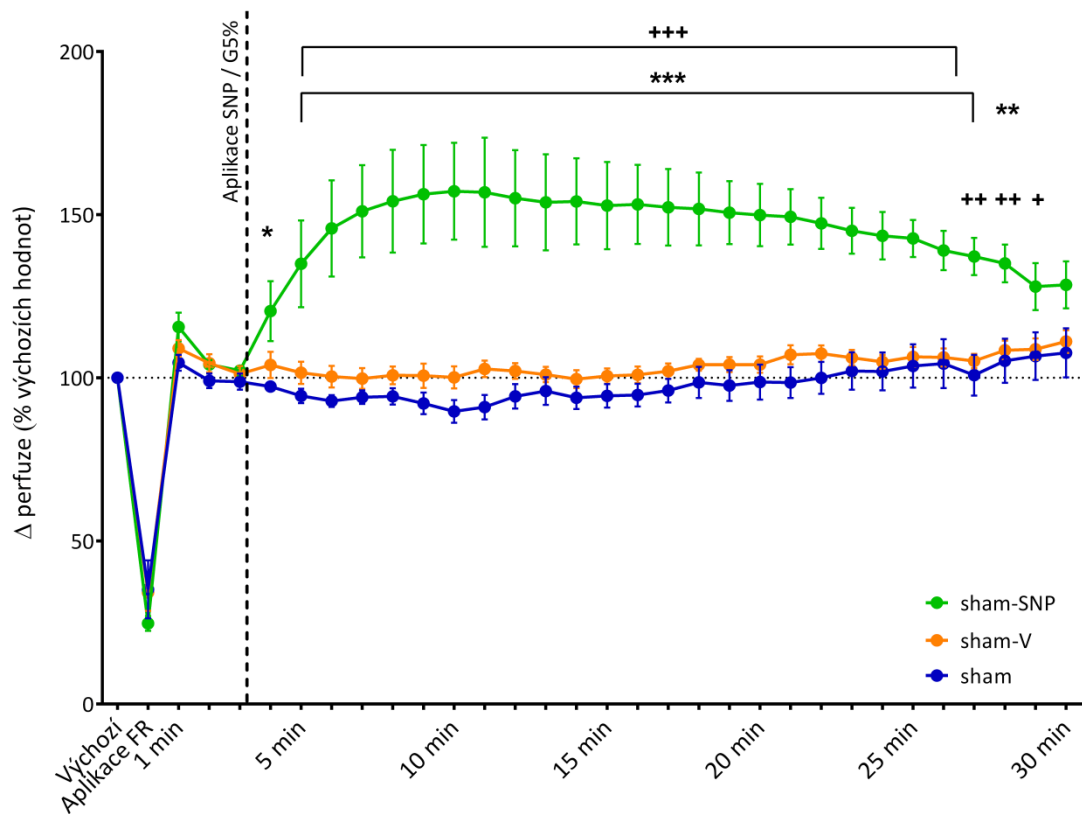


Obr. 17 Sedmi zvířatům byla po dosažení plaveckého stavu podána 2. dávka SNP, po které došlo k hypotenzii, provázené nesignifikantním poklesem perfuze; po návratu MAP k výchozím hodnotám byl pozorován nesignifikantní vzestup perfuze (A). Podání samotného vehikula nemělo efekt na MAP, nicméně vedlo k přechodnému zvýšení perfuze (B). Mozková perfuze byla signifikantně vyšší 40 – 60 sec po podání vehikula než po podání SNP (C). (*, + p < 0,05, **, ++ p < 0,01, *** p < 0,001, porovnání vůči výchozím hodnotám; # p < 0,05, ## p < 0,01, porovnání mezi skupinami)

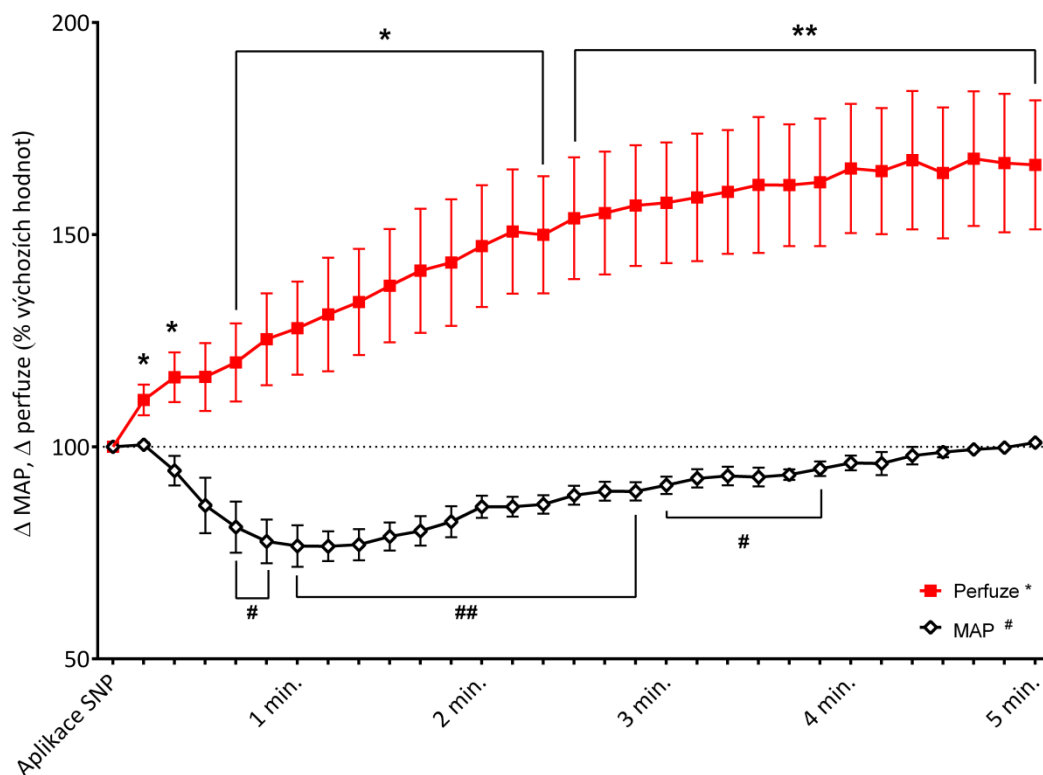
Falešně operovaná (sham-operated) zvířata

Falešně operovaným zvířatům byl místo arteriální krve podán do prechiasmatické cisterny bolus IR. Po 3 minutách bylo do postranní komory injikováno 5 μ l roztoku buď SNP, nebo vehikula; jedné experimentální skupině byla pouze provedena kanylace postranní komory. U 7 z 8 zvířat způsobilo ICV podání SNP signifikantní vzestup mozkové perfuze nad úroveň před podáním SNP (až dvojnásobek výchozích hodnot); tento efekt na perfuzi mozku trval do konce monitorovaného období (obr. 18). V případě 1 zvířete bylo vzestupu perfuze dosaženo podáním další dávky SNP.

Intracerebroventrikulární podání SNP současně se vzestupem perfuze způsobilo mírný pokles MAP (obr. 19). Po ICV podání samotného vehikula nedošlo k žádným změnám perfuze ani krevního tlaku.



Obr. 18 Změny perfúze u falešně operovaných (sham-operated) zvířat. ICV podání SNP signifikantně zvýšilo perfúzi mozku (*, + $p < 0,05$, **, ++ $p < 0,01$, ***, +++ $p < 0,001$; sham-SNP versus sham a sham-V). Podání samotného vehikula nevedlo ke změně mozkové perfúze.



Obr. 19 U kontrolní skupiny sham-SNP došlo po ICV podání SNP k vzestupu mozkové perfuze i přes pokles krevního tlaku (*, # $p < 0,05$, ** , ## $p < 0,01$; porovnání vůči výchozím hodnotám)

7.2.2 Dekompresní kraniektomie

Vlivem dekompresní kraniektomie došlo k signifikantnímu snížení ICP během intracisternální aplikace arteriální krve nebo IR – $74,8 \pm 11,5$ mmHg versus $18,4 \pm 4,6$ mmHg ve skupinách se SAK ($p < 0,01$) a $76,2 \pm 6,9$ mmHg versus $20,0 \pm 1,7$ mmHg v sham skupinách ($p < 0,0001$; obr. 20A). Protože mezi skupinami nebyly signifikantní změny v dynamice MAP, změny CPP odpovídaly změnám ICP (obr. 20B). Ve všech skupinách došlo k návratu ICP a CPP k fyziologickým hodnotám v průběhu 4 minut po intracisternální aplikaci (obr. 20A, B).

Zvýšený ICP v okamžiku intracisternální injekce vedl k výraznému poklesu perfuze ve skupinách SAK i sham ($25,7 \pm 5,0$ % výchozích hodnot, $p < 0,001$, a $35,1 \pm 8,3$ %, $p < 0,001$). Snížená perfuze byla v okamžiku subarachnoidální injekce pozorována i u DK-SAK a DK-sham skupin ($70,2 \pm 3,9$ % výchozích hodnot, $p < 0,001$, a $80,9 \pm 3$ %, $p < 0,001$), nicméně tato hypoperfuze byla v porovnání s odpovídajícími skupinami bez DK méně významná ($p < 0,001$). Ve skupině sham zvířat došlo k návratu mozkové perfuze k výchozím hodnotám během 1 minuty, zatímco ve skupině SAK byla perfuze mozku signifikantně nižší až do 6. minuty po intracisternální injekci ($p < 0,05$, porovnání s výchozími hodnotami; obr. 20C). Překvapivě, u skupiny DK-SAK zůstala mozková perfuze snížená do 28. minuty po navození SAK ($p < 0,05$, porovnání s výchozími hodnotami); tento pokles byl způsoben zvýšenou cévní resistencí (obr. 20C, D). Mírná, ale významná ($p < 0,05$) hypoperfuze trvající 6 minut po subarachnoidální injekci byla pozorována i u DK-sham zvířat (obr. 20C).

I přes redukci ICP však DK nezlepšila časnou hypoperfuzi po SAK, samotná dekompresní kraniektomie vedla ke snížení perfuze ve srovnání se skupinami bez DK (obr. 20C). Ve skupině DK-SAK došlo během navození SAK k mírnému poklesu perfuze ($70,2 \pm 3,6$ % výchozích hodnot, signifikantně vyšší ve srovnání se skupinou se SAK, $p < 0,01$); pokles perfuze pokračoval i po ukončení intracisternální injekce krve, minimálních hodnot ($36,1 \pm 4,26$ % výchozích hodnot) bylo dosaženo přibližně 1 minutu po navození SAK a perfuze zůstala snížena do konce monitorovaného období. Návrat k výchozím hodnotám byl pomalejší než u zvířat ve skupině se SAK a perfuze byla signifikantně nižší v 6. – 16. minutě ve srovnání se zvířaty se SAK ($p < 0,05$).

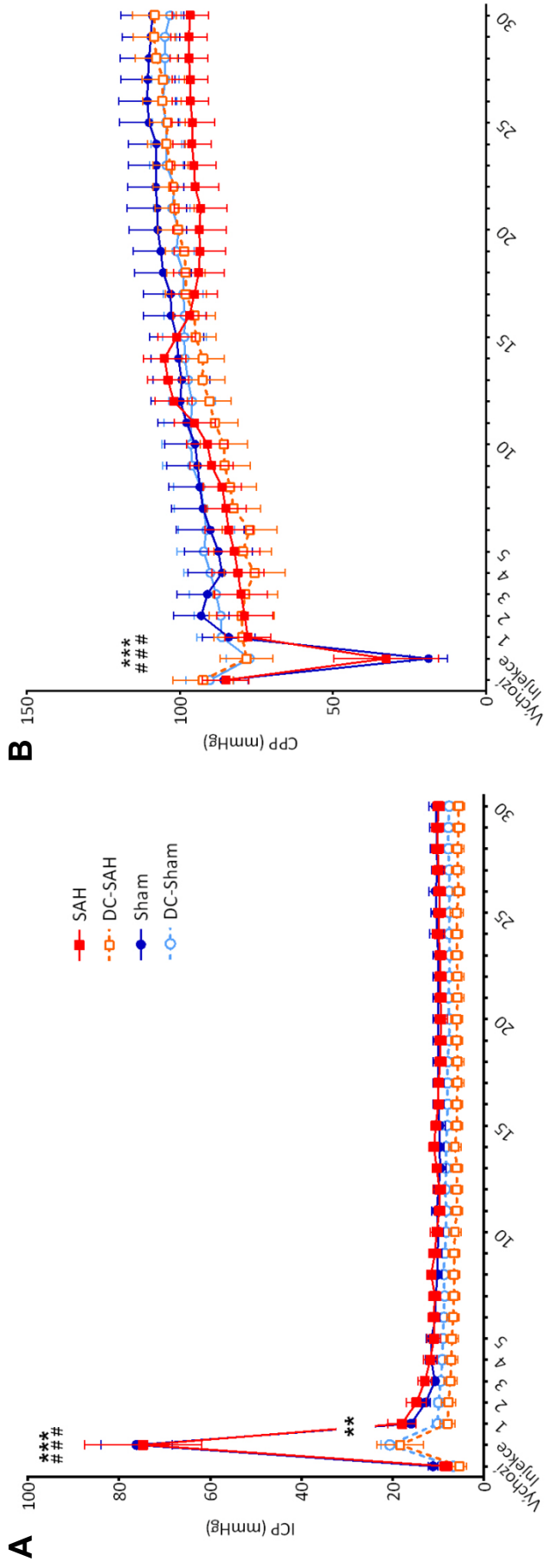
V obou skupinách s dekompresní kraniektomií byl pozorován výrazný mozkový edém s protruzí mozkové tkáně.

Změny mozkové cévní rezistence a efekt DK

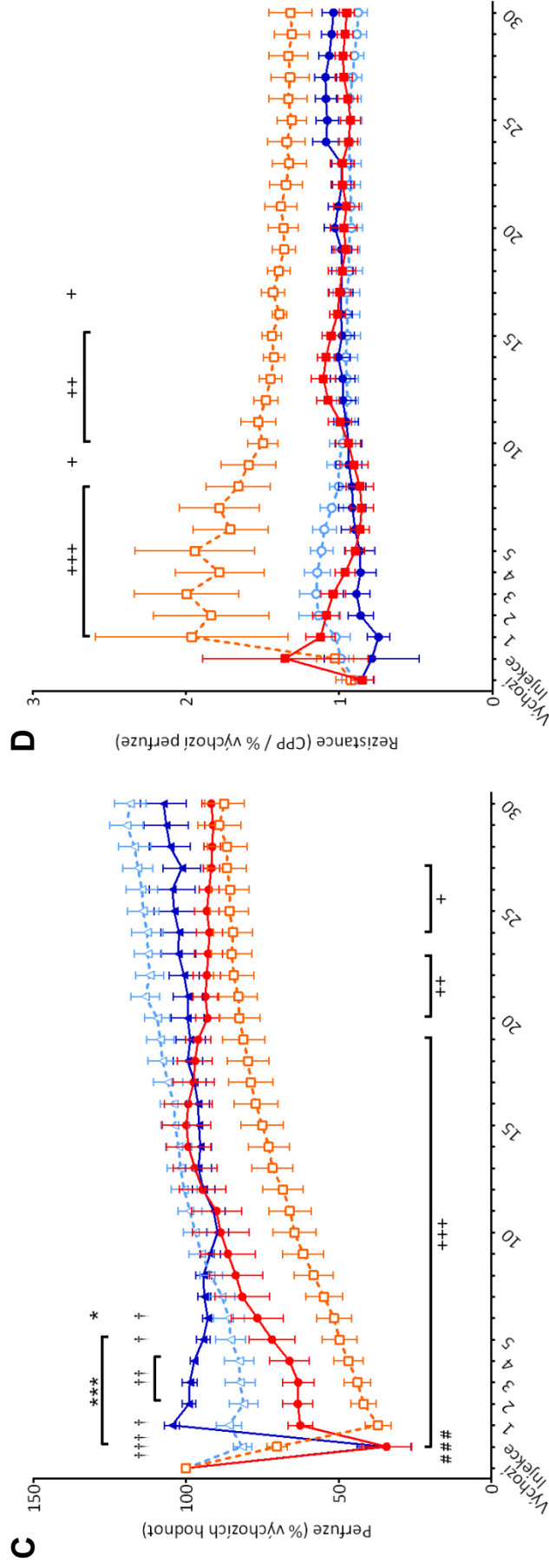
Mozková cévní rezistance se nezměnila u skupiny SAK, sham ani DK-sham, naproti tomu ve skupině DK-SAK vzrostla krátce (20 sekund) po intracisternální aplikaci krve a zůstala zvýšená až do 16. minuty (obr. 20D).

Mortalita

Čtyři zvířata (25 %) ve skupině SAH uhynula v průběhu 2 minut od na-vození SAK. Ve skupině SAK-DK a obou falešně operovaných skupinách přežila všechna zvířata do konce experimentu.

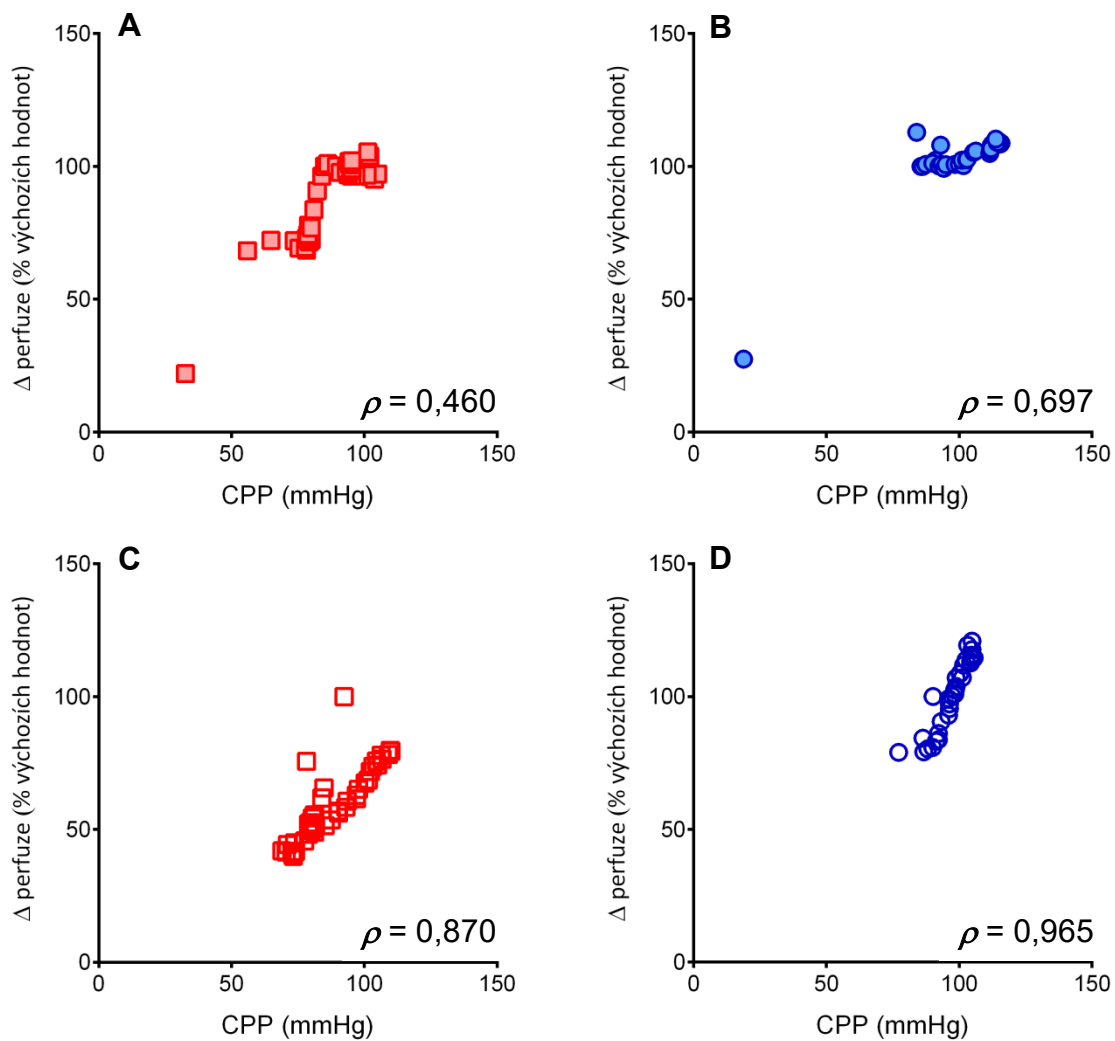


Obr. 20 (A) Preemptivní dekompresní kraniektomie významně snížila ICP po injekci jak krve u skupiny DK-SAH (** p < 0,01, *** p < 0,001), tak IR u skupiny DK-Sham (### p < 0,001). (B) Vzestup ICP byl u skupin SAH a Sham provázen prudkým poklesem CPP (***, ### p < 0,001).



Obr. 20 (C) V porovnání s výchozími hodnotami byla v okamžiku subarachnoidální injekce mozková perfuze významně snížena u všech skupin ($p < 0,001$, všechny skupiny). Ve skupině SAK byla perfuze významně snížena prvních 6 minut (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$), zatímco u skupiny DK-SAK trvala hypoperfuze až do 28. minuty (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$). Hypoperfuze byla pozorována i ve skupině DK-Sham († $p < 0,05$, †† $p < 0,01$, ††† $p < 0,001$). (D) Vzestup rezistence byl pozorován pouze ve skupině DK-SAK a trval do 16. minuty po navození SAK (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$).

Ze změřených hodnot CPP a perfuze byla vypočítána korelace mezi těmito veličinami: ve skupině SAK $\rho = 0,460$ ($p < 0,01$), sham $\rho = 0,697$ ($p < 0,0001$), DK-SAK $\rho = 0,870$ ($p < 0,0001$) a DK-sham $\rho = 0,965$ ($p < 0,0001$).



Obr. 21 Korelace mezi CPP a změnou mozkové perfuze u SAK (A), sham (B), DK-SAK (C) a DK-sham (D) skupin. Především u skupin s dekompresní kraniektomií změny perfuze významně korelovaly s mozkovým perfuzním tlakem.

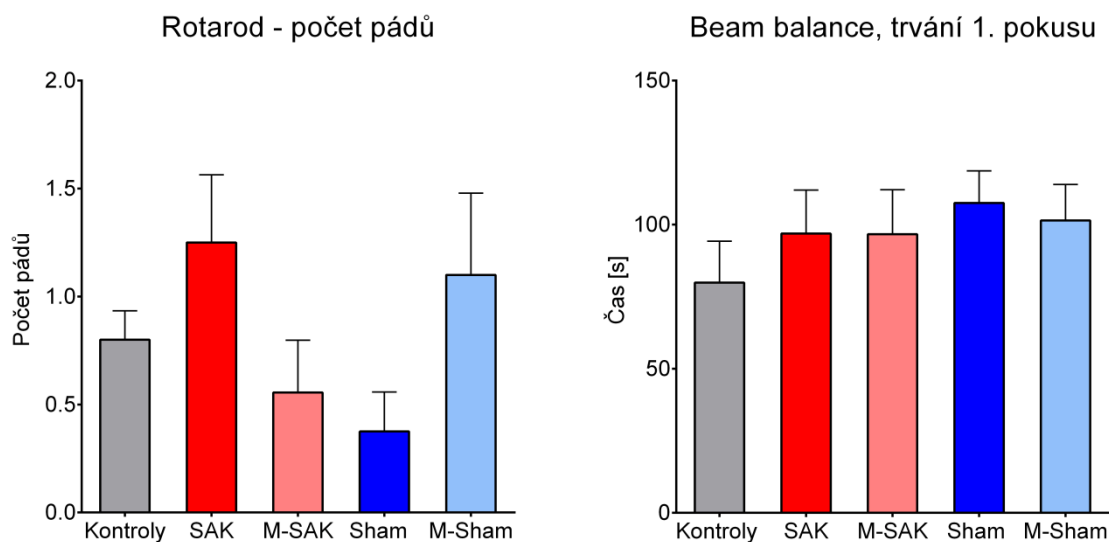
7.2.3 Melatonin

Změny mozkové perfuze po podání melatoninu

U všech skupin mimo naivních kontrol byla měřena mozková perfuze. Mezi navzájem si odpovídajícími skupinami (SAK versus M-SAK a Sham versus M-Sham) nebyly pozorovány rozdíly, samotná porucha perfuze bezprostředně po navození SAK tedy nebyla melatoninem ovlivněna.

Ovlivnění změn v behaviorálních testech preventivním podáním melatoninu

Senzorimotorika: zvířata byla podrobena testu udržení se na rotujícím válci (rotarod) a na horizontální hrazdě (beam balance). Kritériem byla výdrž na válci po dobu 120 sekund, zaznamenával se počet pádů do splnění kritéria s maximem 3 pokusů a délka trvání prvního pokusu. V testu výdrže na horizontální hrazdě ani na rotujícím válci nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi skupinami (obr. 22).

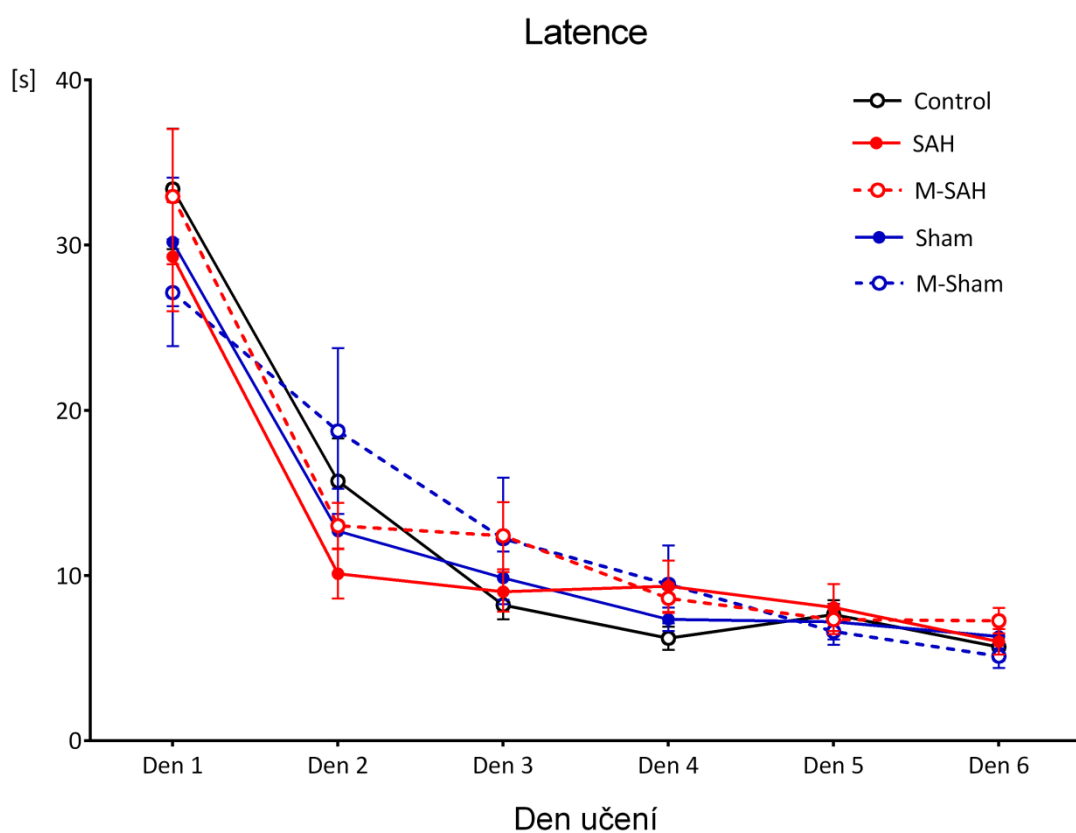


Obr. 22 Senzorimotorické testy: vlevo test na rotujícím válci (rotarod), vpravo na horizontální hrazdě (beam balance). Mezi jednotlivými skupinami nebyly zaznamenány statisticky signifikantní rozdíly.

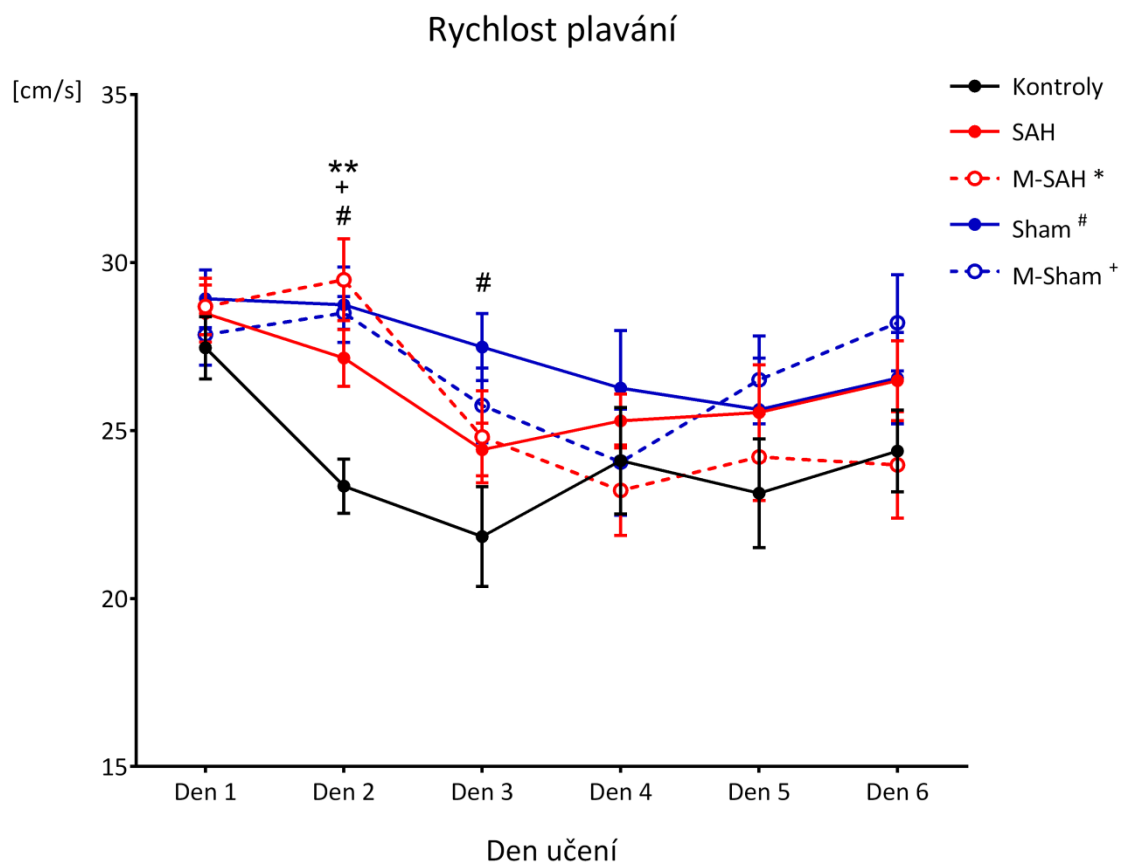
Test prostorové orientace (place navigation)

V Morrisově vodním bludišti (MWM) se všechny skupiny zvířat naučily najít skrytý ostrůvek v daném limitu, proces učení tedy narušen nebyl (obr. 23). V prvních dnech učení byly pozorovány rozdíly v rychlosti plavání při hledání ostrůvku (obr. 24).

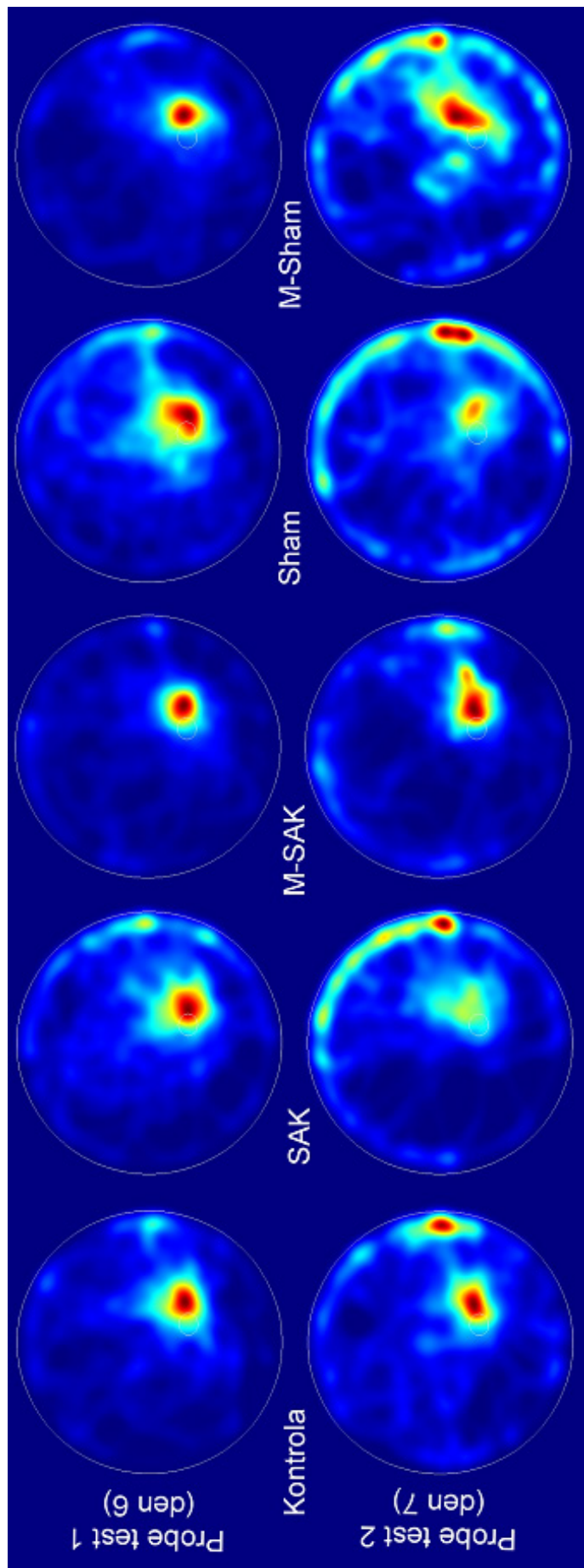
V memory retrieval testu se (i přes vizuální rozdíly v „heat maps“) nepodařilo prokázat statisticky signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami, a to ani v 6., ani v 7. dni po navození SAK (obr. 25 a 26).



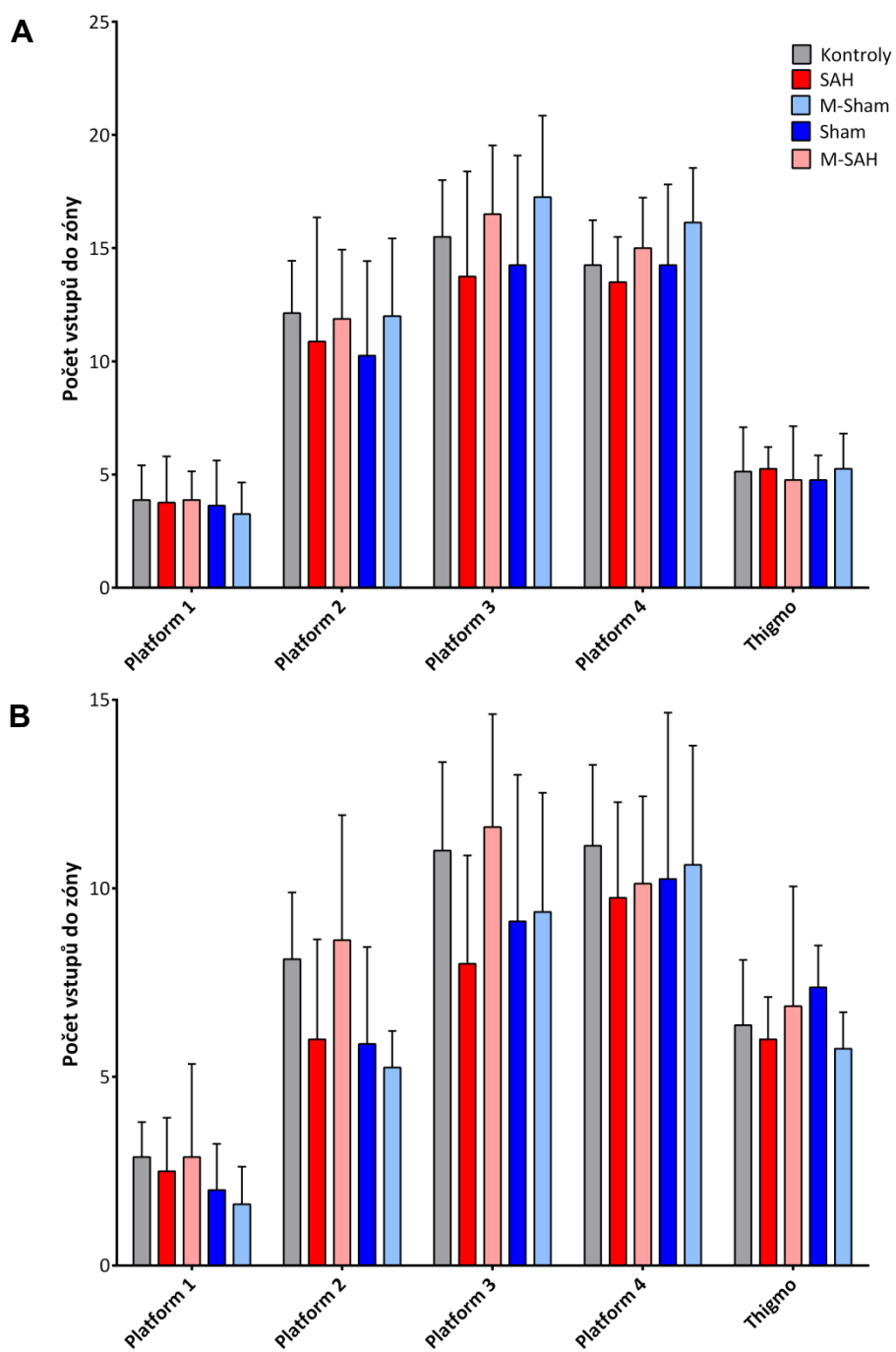
Obr. 23 Křivky učení v MWM vyjádřeny jako latence dosažení ostrůvku. V rychlosti učení nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly mezi skupinami.



Obr. 24 Rychlost plavání během fáze učení. Ve 2. dni byla pozorována vyšší rychlost plavání u skupin M-SAH, Sham a M-Sham, ve 3. dni pak pouze u skupiny Sham (*, +, # $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, v porovnání s kontrolní skupinou).



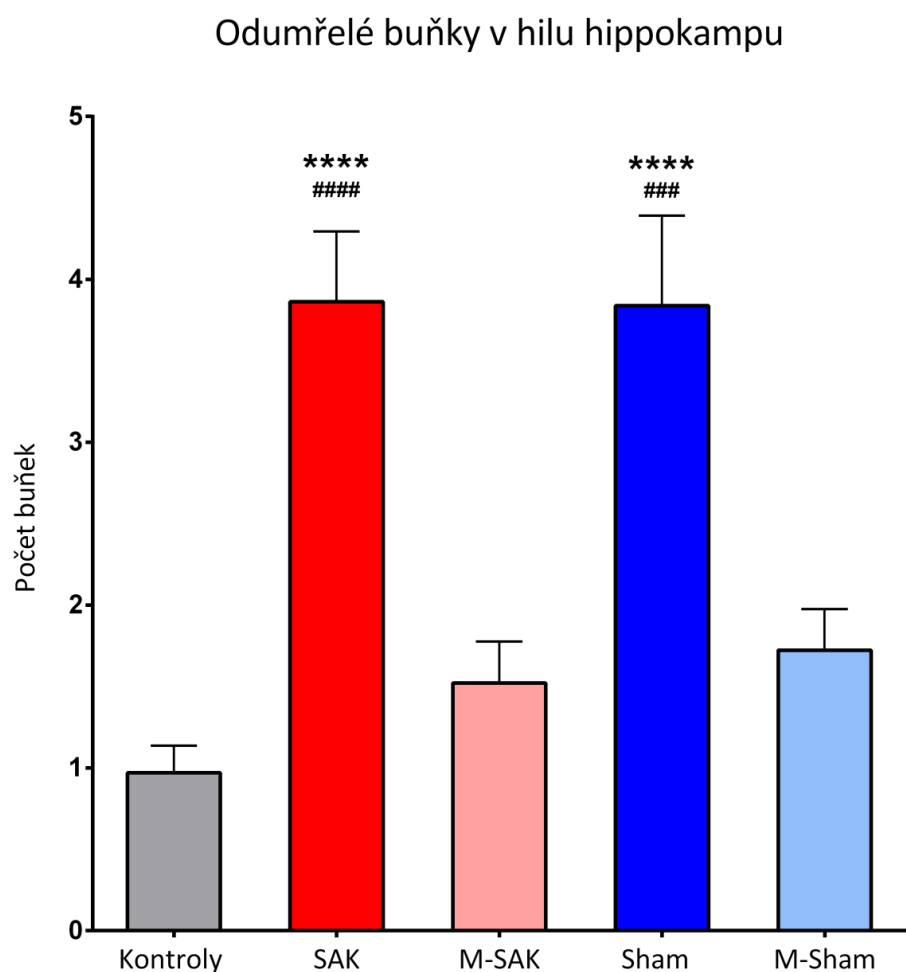
Obr. 25 „Heat maps“ znázorňují pohyb testovaných zvířat po MWM. Barvy, vzestupně od modré přes žlutou až po tmavě červenou, ukazují dobu, po níž se zvířata skupiny nacházejí v dané oblasti. I přes vizuálně patrné rozdíly nebyl mezi skupinami zjištěn statisticky významný rozdíl.



Obr. 26 V prvním (A) ani druhém (B) probe testu nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami v počtu vstupů do zón.

Morfologické hodnocení

V porovnání s kontrolami byl po navození SAK i aplikaci IR (sham) významně vyšší průměrný počet odumřelých neuronů v hilu hippocampu – $3,86 \pm 0,43$ buněk (SAK) a $3,83 \pm 0,55$ buněk (sham) oproti $0,97 \pm 0,17$ buněk na řez (kontroly). Preemptivní aplikace melatoninu snížila počet odumřelých buněk jak po SAK, tak po aplikaci IR (obr. 27).



Obr. 27 Ve skupině SAK i sham byl zaznamenán signifikantně vyšší počet odumřelých buněk v hilu hippocampu v porovnání s naivními kontrolami (*). Podání melatoninu počet odumřelých buněk signifikantně snížilo (#). (### $p < 0.001$, ####, **** $p < 0,0001$)

8 Diskuse

V této studii jsme pozorovali následující:

Subarachnoidální aplikace arteriální krve i izotonického roztoku způsobila prudký pokles mozkové perfuze; hlavním mechanismem uplatňujícím se v časně hypoperfuzi byla nitrolební hypertenze a pokles mozkového perfuzního tlaku. Přestože dekompresní kraniektomie efektivně snížila nitrolební tlak a bezprostřední mortalitu, vedla paradoxně ke zvýšení mozkové cévní rezistence.

Intracerebrovaskulární podání nitroprussidu sodného po subarachnoidálním krvácení zlepšilo mozkovou perfuzi jen minimálně, kromě toho mělo závažné systémové nežádoucí účinky (hypotenze), které mohou perfuzi naopak zhoršit. Tyto nežádoucí účinky souvisí se skutečností, že mozková perfuze v iniciální fázi výrazně korelovala s mozkovým perfuzním tlakem.

Bylo pozorováno zvýšené množství volných radikálů vzniklých v důsledku iniciální hypoperfuze mozku. Z hlediska dlouhodobého neurologického deficitu preemptivní podání melatoninu – antioxidantu a scavengeru volných radikálů – snížilo množství odumřelých neuronů v hippocampu, nicméně nevedlo k signifikantnímu zlepšení výsledků v neurobehaviorálních testech.

8.1 Modely navození SAK

V této práci byl používán model navození SAK aplikací krve do prechiasmatické cisterny. Tato metoda je bezpečná, dostatečně spolehlivá a na rozdíl od jiných metod nevyžaduje manipulaci s pokusným zvířetem ani jeho hlavou, což minimalizuje vznik pohybových artefaktů při použití metody LASCA.

Nejčastěji používané experimentální techniky navození SAK na potkaních spočívají buď přímo v poranění mozkových tepen, a to jak mikrochirurgicky z adventiciálního povrchu tepny, tak transluminálně (endovascular puncture model, EPM), nebo v aplikaci autologní arteriální krve do subarachnoidálního prostoru.

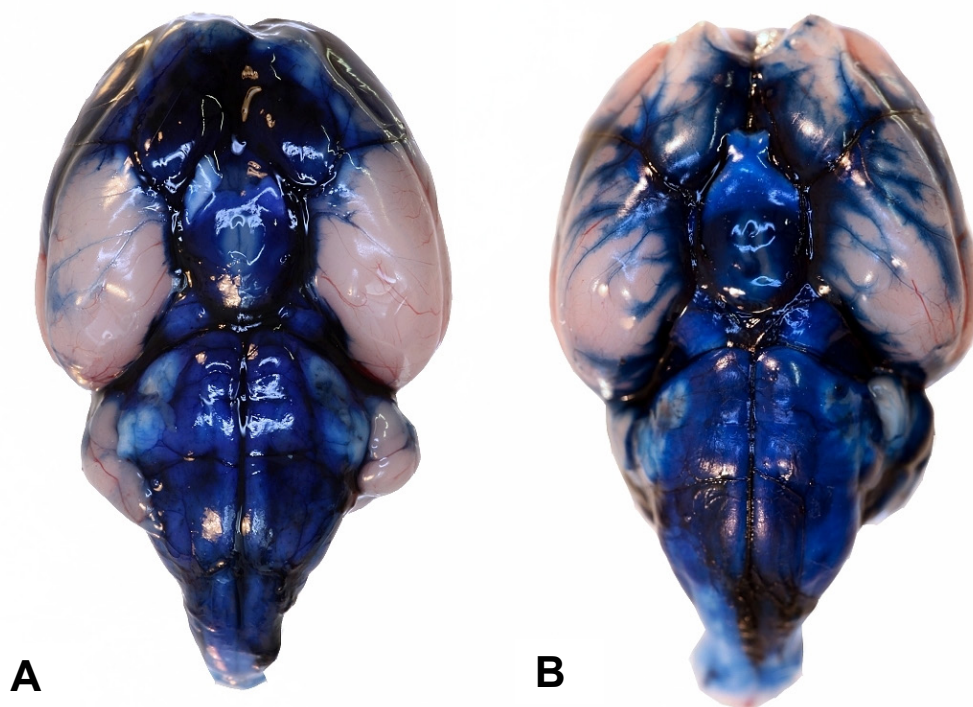
Principem **modelu endovaskulární punkce** je perforace Willisova okruhu vláknem zavedeným cestou *a. carotis interna* do oblasti bifurkace s následným krvácením do subarachnoidálního prostoru (Bederson *et al.* 1995; Veelken *et al.* 1995). Výhodou tohoto modelu je vznik SAK mechanismem bližším vzniku aneurysmatického SAK u člověka – dochází k poškození cévní stěny v oblasti Willisova okruhu, hematoma se nachází na bazi mozku, krev do subarachnoidálního prostoru proniká pod tlakem stejným jako je arteriální krevní tlak. Hlavní nevýhodou EPM je obtížně kvantifikovatelný rozsah krvácení. Tento model je rovněž zatížen vysokou mortalitou pokusných zvířat, která se může blížit až 50 % (Gules *et al.* 2002; Prunell *et al.* 2003). Další omezení tohoto modelu plyne z použité metody pro monitoring mozkové perfuze. Metoda LASCA je vysoce citlivá k pohybovým artefaktům a vzhledem k nutnosti manipulace s hlavou pokusného zvířete nelze spolehlivě porovnat úroveň perfuze před a po navození SAK ani snímat perfuzi v okamžiku vzniku SAK. Vzhledem ke komplikovanosti provedení a výše zmíněným omezením nebyl tento model použit.

Modely založené na **injekční aplikaci arteriální krve do SA prostoru** jsou používané častěji než EPM – ve více než 80 % (Marbacher *et al.* 2010). Oproti předchozímu modelu má injekční aplikace krve výhodu v lepší predikovatelnosti objemu krve v subarachnoidálním prostoru i její lokalizace. Další výhodou oproti EPM je možnost použít kontrolní skupinu s aplikací fyziologického roztoku nebo umělého likvoru. Nevýhodou je absence poškození cévní stěny, ke kterému při ruptuře aneurysmatu dochází vždy.

Pro nácvik a ověření metody jsme použili aplikaci FR 1/1 obarveného Evansovou modří. Porovnávali jsme metodu aplikace do *cisterna magna* s aplikací do prechiasmatické cisterny (obr. 28).

Aplikace do *cisterna magna* se provádí ze zadního kraniocervikálního přístupu. Pokusnému zvířeti je provedena incize subokcipitálně a tupou preparací ozřejměna okcipitální kost, atlas a atlantookcipitální membrána, která je punktována. Po aspiraci likvoru je aplikována čerstvá autologní arteriální

krev. K dosažení optimální distribuce krve je pokusné zvíře nakloněno hlavou dolů v úhlu 20° po dobu 30 minut (Gules *et al.* 2002).



Obr. 28 Při navození SAK aplikací krve (zde znázorněno Evansovou modří) do prechiasmatické cisterny (A) se větší množství podané krve nachází v oblasti Willisova okruhu než v oblasti bazilárního řečiště, což je bližší situaci u člověka při ruptuře aneurysmatu mozkových cév. Při aplikaci do *cisterna magna* (B) se krev nachází z větší části v zadní jámě lební.

V modelu aplikace do prechiasmatické cisterny (Prunell *et al.* 2002) je krev aplikována do subarachnoidálního prostoru před *chiasma opticum* (obr. 4 a 28). Výhodou tohoto modelu je, že distribuce krve v subarachnoidálním prostoru se více blíží distribuci krve při ruptuře aneurysmatu Willisova okruhu, zatímco při aplikaci do *cisterna magna* je krev lokalizována převážně v zadní jámě lebeční (Prunell *et al.* 2003). Aplikace krve do prechiasmatické cisterny způsobuje výraznější vazospasmus na *a. cerebri anterior*, ve srovnání s aplikací do *cisterna magna* (Cai *et al.* 2012). Při použití této metody je minimální riziko poškození mozkové tkáně (Prunell *et al.* 2003). U modelu

používajícího aplikaci do *cisterna magna* byla popsána větší variabilita intrakraniálního objemu podané krve, která může částečně unikat do páteřního kanálu (Prunell *et al.* 2003).

8.2 Změny mozkové perfuze po SAK

V této studii byl pozorován pokles mozkové perfuze po navození SAK. Ve srovnání s předchozími studiemi byl pokles CBF ve skupinách SAK a DK-SAK v našem experimentu méně výrazný (Bederson *et al.* 1995; Prunell *et al.* 2003; Prunell *et al.* 2004; Schubert *et al.* 2008). Příčinou může být technika navození SAK (Prunell *et al.* 2003) nebo metoda měření mozkové perfuze. Zejména při navození SAK pomocí modelu endovaskulární punkce může být měření perfuze zkresleno přítomností krve nad mozkovými konvexitami (Prunell *et al.* 2003). Dále při použití EPM není dosaženo konstantního objemu krve v subarachnoidálním prostoru, může docházet k rebleedingu a na vzniku vazospasmu se může podílet i mechanické poškození cévní stěny punkcí (Buhler *et al.* 2015; Prunell *et al.* 2003). Naproti tomu použití modelu injekce do prechiasmatické cisterny umožňuje se těmto nevýhodám vyhnout.

Při měření mozkové perfuze metodou LASCA dochází ke snímání jak mikrocirkulace, tak velkých cév na povrchu mozku. V předchozích studiích (Bederson *et al.* 1995; Prunell *et al.* 2003; Schubert *et al.* 2008) byla mozková perfuze měřena laser-dopplerovskou flowmetrií, která využívá sond umožňujících měření v zhruba 1 mm³ tkáně (Dirnagl *et al.* 1989). Tyto sondy byly umístěny mimo velké cévy *pia mater*, což umožňuje vyšší citlivost k změnám na úrovni mikrocirkulace, která je funkčně důležitější (Herz *et al.* 1975; Park *et al.* 2001; Schubert *et al.* 2009).

U zvířat s navozeným SAK byl pozorován bifazický průběh změn perfuze. Vrchol perfuze byl pozorován v čase 10 min 25 sec (\pm 1 min 26 sec), poté následoval další pokles. Důvod tohoto časového průběhu není zřejmý. Příčinou může být metoda měření mozkové perfuze, kdy při měření pomocí LASCA jsou do měření zahrnuty jak velké cévy, tak mikrocirkulace. Efekt SAH na vazokonstrikci se může lišit na úrovni makro- a mikrocirkulace

(Sehba *et al.* 2012). Pokles perfuze po předchozím dosažení vrcholu může rovněž odrážet změny koncentrace NO v mozkové cirkulaci (Sehba *et al.* 2000). V předchozích experimentech byl po SAK pozorován v prvních 10 minutách pokles hladiny NO, během dalších 3 hodin následoval vzestup na bazální hodnoty; vzhledem k tomu, že měření byla prováděna v intervalech 10 a 60 min po navození SAK, nemáme o dynamice hladin NO přesnější informace (Sehba *et al.* 2011; Sehba *et al.* 2000). Vzhledem k tomu, že po dosažení vrcholu perfuze přestává korelovat s CPP, pravděpodobně není tento druhotný pokles spojen se změnami v hemodynamických parametrech.

8.3 Efekt dekompresní kraniektomie

Perfuzí mozku (tedy objem krve za čas) je závislá na mozkovém perfuzním tlaku (vypočteném podle vzorce $CPP = MAP - ICP$) a globální rezistencí mozkových cév (analogicky k Ohmovu zákonu vypočtena jako $CPP / \text{průtok}$). V časně fázi po subarachnoidálním krvácení dochází k prudkým změnám obou těchto veličin, což vede k poruše mozkové perfuze. Úvodní pokles perfuze je způsoben zvýšením objemu subarachnoidálního prostoru a tudíž zvýšení ICP a snížení CPP (Bederson *et al.* 1995; Prunell *et al.* 2003; Sehba *et al.* 2012). Ve studiích provedených na zvířecím modelu nicméně tato hypoperfuzie trvala i po vzestupu CPP (Bederson *et al.* 1995; Prunell *et al.* 2003; Prunell *et al.* 2004; Schubert *et al.* 2008) a byla nezávislá na rozvoji mozkového edému i na množství vody obsažené v mozkové tkáni (Westermaier *et al.* 2012). V klinické studii bylo pozorováno signifikantní snížení CBF v prvních 12 hodinách po ruptuře aneurysmatu; tento pokles CBF koreloval s neurologickým stavem pacientů (vyjádřeným pomocí Hunt – Hess skóre), ale nikoliv s ICP nebo CPP (Schubert *et al.* 2009). Příčinou této hypoperfuzie může být časná vazokonstrikce (tedy zvýšená rezistence mozkového cévního řečiště) způsobená vychytáváním (scavengingem) oxidu dusnatého a porušením endoteliem zprostředkované vazodilatace (Sehba *et al.* 2005). Cílem tohoto experimentu bylo oddělit od sebe tyto dva mechanismy,

kteře se podílejí na vzniku časné hypoperfuze (tedy změny CPP a mozkové cévní rezistence) a určit jejich vliv na poruchy mozkové perfuze.

V důsledku provedení dekompresní kraniektomie se přestane uplatňovat Monro – Kellieho doktrína. Navození SAK zvířatům bez DK vedlo k prudkému vzestupu ICP, který vedl k poklesu CPP až téměř k nulovým hodnotám. Pokles CPP je hlavní faktor zhoršující mozkovou perfuzi bezprostředně po subarachnoidální injekci a v tomto experimentu byl provázen 25% mortalitou (4 zvířata z 12). Dekompresní kraniektomie umožnila dostatečnou expanzi intrakraniálního objemu, takže po indukci SAK došlo pouze k mírnému vzestupu ICP a k poklesu bezprostřední mortality z 25 % na 0 %.

Hlavním zjištěním je, že po navození SAK nedošlo k výraznější změně mozkové cévní rezistence, nebyla tedy pozorována jinými autory popisovaná časná vazokonstrikce. Důvodů může být několik. Roli může hrát již zmíněný jiný způsob měření mozkové perfuze (LASCA snímající velký povrch hemisféry versus bodové měření laser-dopplerovskou sondou). Výsledky může ovlivnit i použitá anestezie – v této studii byla používána anestezie ketaminem + midazolamem za spontánní ventilace, v jiných studiích byla používána převážně isofluranová anestezie s řízenou ventilací. Jak ketamin, tak halogenovaná volatilní anestetika mají potenciál ovlivnit CBF, při spontánní ventilaci může kromě toho dojít k hypoventilaci a ovlivnění CBF změnou parciální tenze O₂ i CO₂ v arteriální krvi. Rozdíly mohou být způsobeny i použitým modelem navození SAK – zejména při použití modelu endovaskulární punkce může dojít ke zkreslení z důvodu přítomnosti krve nad konvexitou (Prunell *et al.* 2003). EPM rovněž umožňuje rebleeding a může způsobit vazospasmus přímým poraněním cévní stěny (Buhler *et al.* 2015; Prunell *et al.* 2003).

Dalším důležitým zjištěním je, že ačkoliv preemptivní DK snížila mortalitu po navození SAK, vedla k protražovanému snížení mozkové perfuze, které bylo způsobeno především zvýšenou rezistencí mozkových cév. Příčina tohoto jevu není zcela zřejmá. Snížená perfuze u zvířat s DK provedenou před navozením SAK už byla pozorována ve studii, kde bylo SAK navozeno metodou endovaskulární punkce (Buhler *et al.* 2015). Protože nitrolební hy-

pertenze se podílí na zástavě krvácení po ruptuře aneurysmatu (Nornes 1973), provedení DK před navozením SAK pomocí endovaskulární punkce může vést k většímu objemu hematomu a ztížit tak interpretaci výsledků. Tomuto zkreslení jsme se vyhnuli navozením SAK injekcí konstantního objemu krve, nicméně výsledky v tomto modelu mohou být ovlivněny použitým objemem krve (Bederson *et al.* 1998).

V naší studii byl u obou skupin s DK po subarachnoidální injekci pozorován edém mozku s protruzí mozkové tkáně. Snížená perfuze ve skupině DK-SAK může být způsobena herniací mozkové tkáně, která je častou komplikací dekompresní kraniektomie u člověka (Yang *et al.* 2008). Protruze edematózní tkáně nad úroveň lebky vede ke kompresi cév na okraji kraniektomie a následně k žilní kongesci a okluzi arteriálního zásobení (Huang a Wen 2010; Mitchell *et al.* 2004), k poruše mikrovaskulární regulace a k metabolické deterioraci (Bor-Seng-Shu *et al.* 2013). Herniace mozkové tkáně je pozorována zpravidla v případě nepřiměřeně malé dekompresní kraniektomie; v tomto experimentu byla tedy provedena rozsáhlá fronto-temporo-parietální kraniektomie, která by měla této komplikaci předejít (Forsting *et al.* 1995; Yang *et al.* 2008).

Zvýšená rezistence mozkových cév spolu se snížením perfuze ve skupině DK-Sham naznačuje, že DK sama o sobě může do jisté míry zvýšit mozkovou cévní rezistenci. Expanze edematózní mozkové tkáně a přítomnost erytrocytů v subarachnoidálním prostoru může tyto mechanismy ještě zhoršit a způsobit natažení axonů s následným neurologickým poškozením (Cooper *et al.* 2011).

Přestože je zapotřebí značné opatrnosti při uvádění experimentálních dat do klinického kontextu, lze pozorovat jisté analogie.

U pacientů se subarachnoidálním krvácením nejsou indikace, načasování ani rozsah provedení dekompresní kraniektomie jednoznačně stanoveny (Buschmann *et al.* 2007; Otani *et al.* 2008). I když byl popsán promptní pokles ICP a vzestup parciálního tlaku O_2 v mozkové tkáni (Jaeger *et al.* 2003), korelace s kvalitou neurologického zotavení pacientů je pouze slabá

(Uozumi *et al.* 2014). Dekompresní kraniektomie může být prospěšná u některých podskupin pacientů, například při SAK s intracerebrálním hematomem nebo objemným hematomem v Sylviově rýze, což jsou podskupiny, které model SAK použitý v tomto experimentu nezahrnuje. Expanze edematózní tkáně nad úroveň kraniektomie může způsobit protažení axonů a tím přispět k poškození neuronů (Cooper *et al.* 2011). V našem modelu snížila DK mortalitu z 25 % na 0 %, nicméně zhoršila perfuzi mozku. Podobně ve vysoce kvalitní randomizované kontrolované studii dekompresní kraniektomie po úrazu mozku snížila mortalitu, ale zvýšila podíl těžce neurologicky postižených pacientů (Hutchinson *et al.* 2016); podobné výsledky byly pozorovány i u pacientů se SAK (D'Ambrosio *et al.* 2005).

Závěrem lze říci, že příčinou zhoršení mozkové perfuze bezprostředně po navození SAK bylo v této studii především zvýšení nitrolebního tlaku. K normalizaci ICP, CPP a perfuze mozku došlo během 6 minut po navození SAK. Preemptivní DK úspěšně zabránila časnému poklesu CPP, nicméně vedla k protrahovanému snížení mozkové perfuze, téměř výhradně mechanismem zvýšené mozkové cévní rezistence. Příčinou tohoto jevu je pravděpodobně nepříznivá interakce mezi efektem samotné DK a přítomností krve v subarachnoidálním prostoru.

8.4 Efekt intracerebroventrikulárního podání nitroprussidu sodného

Tato studie je první, ve které byl testován efekt intracerebroventrikulárního podání SNP v podmínkách časně hypoperfuze po subarachnoidálním krvácení. Výrazně snížená kortikální perfuze je jeden z důsledků SAK. Primární pokles perfuze po intracisternálním podání jak arteriální krve, tak IR je důsledkem zvýšeného ICP a sníženého CPP (Bederson *et al.* 1995; Sehba *et al.* 2012). Pokusy na zvířecím modelu nicméně ukazují, že perfuze zůstává snížená i po normalizaci CPP (Bederson *et al.* 1995). V klinických podmínkách je pokles CBF patrný v prvních 12 hodinách po ruptuře aneurysmatu; toto snížení CBF koreluje se závažností neurologického stavu (kvantifiko-

váno pomocí Hunt – Hess score), ale ne s ICP nebo CPP (Schubert *et al.* 2009). Pozorovaná protražovaná hypoperfuze po SAK může být způsobena časnou vazokonstrikcí vyskytující se v přítomnosti arteriální krve v subarachnoidálním prostoru (Bederson *et al.* 1995; Schubert *et al.* 2008).

Předpokládá se, že hypoperfuze po SAK je způsobena jak nitrolební hypertenzí, tak poruchou makro- a mikrocirkulace (Buhler *et al.* 2015; Sehba *et al.* 2007). Za příčinu časně vazokonstrikce se považuje deficit NO v mozkové cirkulaci (Sehba *et al.* 2012; Schwartz *et al.* 2000b). V časně fázi po SAK byly v mozkové cirkulaci nalezeny snížené hladiny NO a jeho metabolitů (Sehba *et al.* 2000), mozkovým cévám po SAK zůstává schopnost reagovat na exogenní podání NO (Sehba *et al.* 1999; Sehba *et al.* 2007). Mezi předpokládané vychytávače NO patří hemoglobin (Sehba *et al.* 2000), superoxidový anion (Kajita *et al.* 1994) nebo myeloperoxidáza produkovaná neutrofilly (Friedrich *et al.* 2011). Hemoglobin, potentní vychytávač NO, je schopen difundovat do mozkového parenchymu, dostat se do kontaktu s pericyty a způsobit vazokonstrikci na úrovni mikrovaskulatury (Li *et al.* 2016).

Podávání donorů oxidu dusnatého bylo zkoumáno v několika experimentálních (Egemen *et al.* 1993; Vatter *et al.* 2007) i klinických (Pachl *et al.* 2005; Raabe *et al.* 2002) studiích v podmínkách pozdního vazospasmu. Role donorů NO v prevenci nebo léčbě EBI byla studována pouze v experimentu: podání S-nitrosoglutathionu (GSNO) zvýšilo CBF krátce po navození SAK a uchovalo integritu cévní stěny (Sehba *et al.* 1999; Sehba *et al.* 2007). Další, běžnější a snáze dostupný donor NO je nitroprussid sodný. Jeho intravenózní podání v časně fázi SAK vedlo ke zvýšení perfuze mozku a zmenšení neuronálního poškození (Lilla *et al.* 2016).

Dávka SNP použitá v tomto experimentu byla vypočtena na základě dávek použitých v předchozích laboratorních a klinických studiích a byla upravena podle tělesné hmotnosti a objemu mozkomíšního moku laboratorního potkana. V předběžných experimentech se při bolusovém podání ukázala jako nejefektivnější dávka 10 µg SNP.

V tomto experimentu nebyl pozorován žádný příznivý efekt podání SNP 3 minuty po navození SAK. U poloviny zvířat léčených SNP došlo dokonce k poklesu mozkové perfuze. Toto může být způsobeno buď arteriální hypotenzí, nebo nitrolební hypertenzí. Porucha autoregulace mozkové perfuze je častým průvodním jevem nitrolebních patologií. V podmínkách porušené autoregulace je mozková perfuze závislá na CPP a MAP (Lang *et al.* 2003) a tudíž arteriální hypotenze po podání SNP může vést k snížení mozkové perfuze. K hypoperfuzi mozku může přispět i nitrolební hypertenze. Různé metody navození SAK mohou vést k odlišnému vývoji ICP po navození SAK (Schwartz *et al.* 2000a). Podle našich pozorování je v použitém modelu nitrolební tlak 3 minuty po navození SAK přibližně 15 – 20 mmHg; podobné hodnoty byly pozorovány i v jiných studiích se shodnou metodikou (Prunell *et al.* 2003). Podání dalšího objemu (např. roztoku SNP) může v podmínkách snížené nitrolební compliance významně zvýšit ICP (Marmarou *et al.* 1975). Na druhou stranu, bezprostředně po ICV podání samotného vehikula nebyl pozorován žádný pokles mozkové perfuze.

Po druhé dávce SNP, která byla podána po druhém poklesu perfuze, byl pozorován mírný vzestup perfuze mozku. Tento vzestup však nedosahoval úrovně pozorované ve skupině sham-SNP a při porovnání skupiny SAK-SNP se skupinami SAK nebo SAK-V nebyly pozorovány signifikantní rozdíly perfuze. Naproti tomu ICV podání SNP zvířatům ve skupině sham-SNP vedlo k promptnímu vzestupu perfuze mozku, který trval až do konce experimentu. Tato diskrepance mezi efektem SNP u zvířat se SAK a falešně operovaných může mít více důvodů. Nedostatečný efekt ICV aplikace SNP může být způsoben zhoršenou distribucí léčiva v subarachnoidálním prostoru. Po SAK jsou arterie Willisova okruhu obaleny koagulem, které může bránit difuzi vazodilatancia a tím pádem není dosaženo dostatečné koncentrace NO v cévní stěně (Pluta *et al.* 2009), v důsledku SAK byla rovněž pozorována zpomalená cirkulace likvoru subarachnoidálním prostorem a jeho zhoršený průnik do mozkového parenchymu (Goulay *et al.* 2017).

Další možné vysvětlení je, že dávka vedoucí ke vzestupu perfuze ve skupině sham-SNP může být nedostatečná v situaci, kdy hladina NO je po SAK snížena v důsledku vychytávání. Tuto možnost podporuje skutečnost, že po druhé dávce SNP došlo k mírnému zvýšení perfuze, které však nedosáhlo hodnot pozorovaných ve skupině sham-SNP.

Po podání druhé dávky SNP byl pozorován pokles MAP, přesto však nedošlo k poklesu perfuze. Vzhledem k tomu, že v okamžiku dosažení plateau stavu je perfuze na CPP víceméně nezávislá (viz obr. 12), se lze domnívat, že v situaci zachované autoregulace mozkové perfuze by se mohl při vyšší dávce SNP uplatnit i vazodilatační efekt SNP na mozkovou cirkulaci.

Rozdíly v odpovědi na podání SNP, zejména po jeho první dávce, jsou v souladu s výraznou interindividuální variabilitou, která byla pozorována i v klinických studiích (Agrawal *et al.* 2009; Pachl *et al.* 2005).

Dosud byl SNP úspěšně použit v experimentech prováděných v situaci pozdního vazospasmu – dilatace spastických cév po podání SNP byla pozorována v experimentu na izolovaných arteriích (Vatter *et al.* 2007), u pokusných zvířat (Egemen *et al.* 1993) i v klinické studii (Pachl *et al.* 2005; Raabe *et al.* 2002). Pozorovaný efekt intratekálního podání SNP v situaci pozdního vazospasmu může být vysvětlen degradací krevní sraženiny a zlepšením průniku SNP do cílových struktur. Rychlost rozpadu krevní sraženiny byla stanovena jako 10,8 % objemu koagula za den (Naff *et al.* 2001), takže v okamžiku vzniku pozdního vazospasmu je už výrazná část hematomu rozpadlá. K rozvoji pozdního vazospasmu přispívají právě rozpadové produkty hemoglobinu (Clark a Sharp 2006). Odlišné mechanismy vazokonstrikce v časně a pozdní fázi po SAK mohou vysvětlit rozdílný efekt podání SNP bezprostředně po vzniku SAK a v okamžiku pozdního vazospasmu.

U významného počtu testovaných zvířat byla po ICV podání SNP pozorována arteriální hypotenze. Tento vedlejší účinek byl pozorován i v klinické studii (Agrawal *et al.* 2009). Příčinou může být – kromě vstřebání SNP do systémové cirkulace – přímý efekt nitroprussidu na struktury zodpovědné za

regulaci arteriálního krevního tlaku – např. *organum vasculosum laminae terminalis*, uložené ve třetí mozkové komoře (Chang *et al.* 2001; Lin *et al.* 1999). Předchozí studie ukázaly pokles MAP po ICV podání nitroprussidu (Chang *et al.* 2001), nicméně bylo zapotřebí vyšších dávek než v našem experimentu.

Překvapivý je nález přechodného zvýšení mozkové perfuze po ICV podání samotného vehikula – byl použit 5% roztok glukózy (podle doporučení SPC SÚKL). Je pouze minimum prací věnujících se vztahu mezi CBF a glykemií nebo glykorrhachií, nicméně ve studii (Xu *et al.* 2015) nebyl po p.o. podání glukózy pozorován žádný vzestup CBF, i přes změny ostatních metabolických parametrů (např. CMRO). Pozorovaný jev se tedy dá vysvětlit pravděpodobně jako kompenzatorní reakce po podání bolusu objemu do komorového systému.

8.5 Neurologický deficit po experimentálním SAK a efekt preemptivně podaného melatoninu

Mezi navzájem si odpovídajícími skupinami (SAK versus M-SAK a Sham versus M-Sham) nebyly pozorovány rozdíly v perfuzi v prvních 30 minutách po navození SAK, samotná časná porucha perfuze tedy nebyla melatoninem ovlivněna. Vzhledem ke vzniku volných radikálů v důsledku SAK lze předpokládat, že melatonin může ovlivnit změny v pozdějším průběhu.

Po navození SAK i u kontrolních (sham-operated) zvířat jsme zaznamenali zvýšenou hladinu volných radikálů, a to jak hydroxylových, tak nitroxyllových. Za normálních okolností jsou volné radikály neutralizovány pomocí těla vlastních antioxidantů – zejména superoxid dismutázy. Tento systém antioxidantů však může být po SAK přesycen kvůli nadprodukci volných radikálů (Aladag *et al.* 2009); z tohoto důvodu se jeví podání melatoninu, který má i antioxidační efekt, jako perspektivní terapie. Mechanismus antioxidačního účinku melatoninu je dvojitý: ve fyziologických hladinách se uplatňuje jeho schopnost downregulace prooxidačních enzymů a stimulace exprese enzymů antioxidačních, při supranormálních hladinách melatonin funguje jako

scavenger, neboť se snadno uplatňuje jako donor elektronu (Hardeland 2005).

K hodnocení efektu preemptivně podaného melatoninu jsme použili testy sensorimotorických funkcí, prostorového učení a paměti. Při hodnocení funkčního stavu zvířat po experimentálním SAK bylo v předchozích studiích testováno několik různých neurologických modalit: byla pozorována snížená motorická aktivita (Boettinger *et al.* 2017), horší výkon v testu beam balance (Imperatore *et al.* 2000) i vyšší úzkostnost experimentálních zvířat (Boyko *et al.* 2013). Při testování v Morrisově vodním bludišti byly zaznamenány poruchy prostorového učení (Jeon *et al.* 2010). Maximum neurologického deficitu bylo pozorováno v prvních 48 hodinách od navození SAK a závažnost deficitu korelovala s objemem hematomu (Boettinger *et al.* 2017; Boyko *et al.* 2013). Histologické vyšetření prokázalo u pokusných zvířat nekrózu nebo apoptózu neuronů v hipokampu, kůře i mozečku (Jeon *et al.* 2010; Takata *et al.* 2008), ale i apoptózu astrocytů a oligodendrocytů (Prunell *et al.* 2005).

V této studii jsme zjistili, že preemptivní podání melatoninu ve vysoké dávce (100 mg/kg) efektivně zabránilo odumírání buněk v hippokampu, což je v souladu s předchozími výsledky prováděnými na modelu SAK, tento efekt melatoninu může být připsán jak jeho antioxidantnímu působení, tak downregulaci exprese zánětlivých mediátorů (Wang *et al.* 2013).

Ve srovnání s předchozími pracemi jsme však po SAK nepozorovali významné změny v sensorimotorických testech a testech učení a paměti. Pouze při učení v MWM byla 2. a 3. den pokusu zaznamenána u skupin M-SAK, Sham a M-Sham vyšší rychlost plavání v porovnání s kontrolní skupinou. Tyto výsledky jsou rovněž v souladu s předchozími zjištěními; rychlejší plavání bylo pozorováno i po fokální ischemii (Deykun *et al.* 2011) i v modelu ischemicko-reperfuzního poškození (Cuzzocrea *et al.* 2000). Samotný proces prostorového učení v MWM není narušen, zvířata po SAK se učí stejným tempem jako ostatní skupiny. V druhém probe testu má však skupina SAK větší (byť nesignifikantně) oblast hledání ostrůvku, než naivní kontroly nebo melatoninem léčená zvířata. Jako příčina tohoto nálezu se jeví ztráta neuro-

nů v hippocampu a z toho vyplývající porucha paměti, nicméně v podobné studii nekoreloval kognitivní deficit s histologickými změnami v hippocampu (Jeon *et al.* 2010).

Nesignifikantní rozdíly v senzomotorických testech mohou mít několik vysvětlení:

I přes to, že jsme zaznamenali pokles perfuze po navození SAK / aplikaci IR, byla v tomto pokusu nulová mortalita, SAK se tedy dá hodnotit jako svým rozsahem subletální. Mortalita pokusných zvířat může být ovlivněna nejen rozsahem SAK, ale i učební křivkou experimentátorů nebo rozsahem operačních zákroků (v této části experimentu nebyla prováděna kanylace *a. femoralis* – k navození SAK byla použita alogenní krev, nebyla prováděna kanylace postranní komory ani dekompresní kraniektomie, nebylo zaváděno ICP čidlo). Vzhledem k tomu, že nebyl pozorován statisticky významný neurologický deficit, nebyl pozorován ani případný efekt melatoninu.

Výsledky senzomotorických testů mohou být ovlivněny i stresovou odpovědí na operační zákroky, neboť změny chování byly pozorovány i u zvířat, která podstoupila falešné experimentální zákroky; tento efekt je zdůvodňován aktivací stresové odpovědi a osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny (Slamberova *et al.* 2018). Roli může hrát i opakovaná expozice stresovým situacím (v tomto případě plavání v MWM), která zlepšuje připravenost čelit dalším stresovým situacím (Gomez a Garcia-Garcia 2017).

Nelze vyloučit ani možnost, že použité testy nejsou pro testování neurologického deficitu po SAK dostatečně senzitivní.

8.6 Limitace studie

Použitá anestezie může u experimentálního SAK ovlivnit nejen mozkovou perfuzi, ale i hemodynamické parametry nebo mortalitu (Hockel *et al.* 2012). V našich experimentech byla použita anestezie ketaminem a midazolamem – tento postup byl zvolen proto, že ačkoliv při anestezii ketaminem byl pozorován vzestup CBF, tomuto efektu ketaminu je možné předejít sou-

časným podáváním midazolamu (Strebel *et al.* 1995). Často používaná anestezie inhalační může ovlivnit výsledky experimentálního SAK několika různými způsoby. Halogenovaná inhalační anestetika (tedy halotan, isofluran, sevofluran) vedou ke zvýšení aktivity NOS a koncentrace NO v mozkové kůře (Baumane *et al.* 2002), což může představovat zkreslení ve studiích sledujících hladiny NO nebo zahrnujících podávání donorů NO. Isofluran vede u pokusných zvířat k vzestupu CBF v důsledku snížení mozkové cévní rezistence (Cucchiara *et al.* 1974; Maekawa *et al.* 1986), na druhou stranu isofluranová anestezie vede k poklesu MAP (Hockel *et al.* 2012), což může negativně ovlivnit mozkovou perfuzi v situaci porušené mozkové autoregulace při nitrolebním patologickém procesu.

Další limitací je fakt, že jsme v našich experimentech neměřili koncentrace krevních plynů. U anestetizovaných spontánně ventilujících zvířat nelze spolehlivě vyloučit kolísání parciálního tlaku CO₂ a O₂ v arteriální krvi, které mohou mozkovou perfuzi ovlivnit. Rozsah vazospasmu může být ovlivněn i koncentrací oxyhemoglobinu v arteriální krvi, nicméně v této studii nebyl měřen ani hematokrit, ani saturace hemoglobinu kyslíkem.

Abychom se vyhnuli případnému ovlivnění distribuce farmaka v subarachnoidálním prostoru přítomností intraparenchymového čidla, v pokusu s aplikací SNP jsme neměřili ICP a tudíž ani CPP. Změny perfuze při ICV aplikaci farmak by však bylo vhodnější korelovat se změnami CPP než MAP. Na druhou stranu k největším změnám ICP docházelo před podáním SNP a v dalším průběhu zůstává ICP konstantní.

Způsob navození subarachnoidálního krvácení metodou aplikace do prechiasmatické cisterny neodpovídá mechanismu vzniku SAK u člověka, umožňuje ovšem snadno predikovat rozsah krvácení i provádět měření metodou LASCA, která je vysoce náchylná k pohybovým artefaktům.

Problematické může být i použití alogenní krve místo autologní v jednom z dílčích experimentů. Vzhledem k dlouhodobému designu pokusu a hodnocení neurologického deficitu nebyla prováděna kanylace ani jednorázová punkce *a. femoralis* ani jiné velké tepny (např. ocasní arterie), abychom

se vyhnuli zkreslení neurobehaviorálních pokusů. Protože existence krevních skupin u potkanů byla prokázána (Burhoe 1947), může být podání alogenní krve spojeno s imunitní reakcí. Vliv případného podání nestejnoskupinové krve jsme se pokusili snížit použitím zvířat od stejného dodavatele a ze stejné dodávky. Jak dále Burhoe (1947) uvádí, většina albinotických kmenů včetně kmene Wistar má krevní skupinu A, nemělo by tedy dojít k reakci z podání inkompatibilní krve, i když se jednalo o outbrední zvířata.

8.7 Přesah do klinické medicíny

Přestože tato studie je experimentální, nikoliv klinická, existují zde jisté souvislosti:

Intracerebroventrikulární podání nitroprussidu sodného způsobilo u části pokusných zvířat významnou hypotenzi, jejíž rozvoj koreloval s mozkovou hypoperfuzí. V podmínkách intenzivní péče by bylo na takovouto hypotenzi nepochybně reagováno, například zahájením infuze vazopresorů, a hypotenze by byla promptně korigována. Otázkou ovšem zůstává, zda by intratekální podávání SNP i za podmínek normotenze mohlo zlepšit perfuzi mozku – jedním z možných vysvětlení nedostatečného efektu SNP je přítomnost koagula kolem cév Willisova okruhu, které brání přístupu farmaka k cílovým strukturám; tuto mechanickou překážku samozřejmě nelze podáváním vazopresorů odstranit.

Naproti tomu perspektivní by mohlo být použití melatoninu v humánní medicíně. Jeho schopnost při preemptivním podání snížit počet odumřelých neuronů by bylo možné využít před plánovanými výkony na incidentálním aneurysmatu (coiling i clipping) i před jinými plánovanými neurochirurgickými výkony.

9 Závěry

Subarachnoidální aplikace arteriální krve i izotonického roztoku způsobila prudký pokles mozkové perfuze. V rozvoji perfuzních poruch se převážně uplatňuje mechanismus nitrolební hypertenze a poklesu mozkového perfuzního tlaku, nebyla pozorována zvýšená mozková cévní rezistence. Eliminace nitrolební hypertenze dekompresní kraniektomií snížila bezprostřední mortalitu pokusných zvířat, nicméně nezlepšila perfuzi mozku, naopak vedla ke zvýšení mozkové cévní rezistence.

Intracerebrovaskulární podání nitroprussidu sodného po subarachnoidálním krvácení zlepšilo mozkovou perfuzi jen minimálně, kromě toho má závažné systémové nežádoucí účinky (hypotenze), které mohou perfuzi naopak zhoršit. Tyto nežádoucí účinky souvisí se skutečností, že mozková perfuze v iniciální fázi výrazně koreluje s mozkovým perfuzním tlakem.

V důsledku aplikace objemu (krve i izotonického roztoku) do subarachnoidálního prostoru došlo k vzniku volných kyslíkových radikálů. Z hlediska dlouhodobého neurologického deficitu preemptivní podání melatoninu snížilo množství odumřelých neuronů v hippokampu, nicméně nevedlo k signifikantnímu zlepšení výsledků v neurobehaviorálních testech.

10 Literatura

1. Agrawal A, Patir R, Kato Y, Chopra S, Sano H and Kanno T: Role of intraventricular sodium nitroprusside in vasospasm secondary to aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a 5-year prospective study with review of the literature. *Minim Invasive Neurosurg* **52**: 5-8, 2009.
2. Al-Khindi T, Macdonald RL and Schweizer TA: Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **41**: e519-36, 2010.
3. Aladag MA, Turkoz Y, Parlakpinar H, Ozen H, Egri M and Unal SC: Melatonin ameliorates cerebral vasospasm after experimental subarachnoidal haemorrhage correcting imbalance of nitric oxide levels in rats. *Neurochem Res* **34**: 1935-44, 2009.
4. Andrew PJ and Mayer B: Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **43**: 521-31, 1999.
5. Asano T and Matsui T: Antioxidant therapy against cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol* **19**: 31-44, 1999.
6. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA and Newman EA: Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**: 232-243, 2010.
7. Ayata C, Shin HK, Salomone S, Ozdemir-Gursoy Y, Boas DA, Dunn AK and Moskowitz MA: Pronounced hypoperfusion during spreading depression in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**: 1172-82, 2004.
8. Ayer RE, Sugawara T, Chen W, Tong W and Zhang JH: Melatonin decreases mortality following severe subarachnoid hemorrhage. *J Pineal Res* **44**: 197-204, 2008.
9. Ayer RE and Zhang JH: Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm. *Acta Neurochir Suppl* **104**: 33-41, 2008.
10. Baumann L, Dzintare M, Zvejniece L, Meirena D, Lauberte L, Sile V, Kalvinsh I and Sjakste N: Increased synthesis of nitric oxide in rat brain cortex due to halogenated volatile anesthetics confirmed by EPR spectroscopy. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **46**: 378-383, 2002.
11. Beckman JS and Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424-37, 1996.
12. Bederson JB, Connolly ES, Jr., Batjer HH, Dacey RG, Dion JE, Diringer MN, Duldner JE, Jr., Harbaugh RE, Patel AB and Rosenwasser RH: Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke* **40**: 994-1025, 2009.
13. Bederson JB, Germano IM and Guarino L: Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke* **26**: 1086-91; discussion 1091-2, 1995.
14. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, Diperna CA, Jenkins AL, 3rd and Vallabhajosyula P: Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **42**: 352-60; discussion 360-2, 1998.

- 15.** Bendel P, Koivisto T, Aikia M, Niskanen E, Kononen M, Hanninen T and Vanninen R: Atrophic enlargement of CSF volume after subarachnoid hemorrhage: correlation with neuropsychological outcome. *AJNR Am J Neuroradiol* **31**: 370-6, 2010.
- 16.** Blackall J: *Observations on the Nature and Cure of Dropsies*. London, 1814.
- 17.** Boettinger S, Kolk F, Broessner G, Helbok R, Pfausler B, Schmutzhard E, Beer R and Lackner P: Behavioral characterization of the anterior injection model of subarachnoid hemorrhage. *Behav Brain Res* **323**: 154-161, 2017.
- 18.** Bor-Seng-Shu E, Figueiredo EG, Fonoff ET, Fujimoto Y, Panerai RB and Teixeira MJ: Decompressive craniectomy and head injury: brain morphometry, ICP, cerebral hemodynamics, cerebral microvascular reactivity, and neurochemistry. *Neurosurg Rev* **36**: 361-70, 2013.
- 19.** Boyko M, Azab AN, Kuts R, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Melamed I, Brotfain E, Shapira Y, Cesnulis E and Zlotnik A: The neuro-behavioral profile in rats after subarachnoid hemorrhage. *Brain Res* **1491**: 109-16, 2013.
- 20.** Briers JD: Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas* **22**: R35-66, 2001.
- 21.** Buhler D, Azghandi S, Schuller K and Plesnila N: Effect of decompressive craniectomy on outcome following subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke* **46**: 819-26, 2015.
- 22.** Burhoe SO: Blood Groups of the Rat (*Rattus Norvegicus*) and Their Inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **33**: 102-9, 1947.
- 23.** Buschmann U, Yonekawa Y, Fortunati M, Cesnulis E and Keller E: Decompressive hemicraniectomy in patients with subarachnoid hemorrhage and intractable intracranial hypertension. *Acta Neurochir (Wien)* **149**: 59-65, 2007.
- 24.** Byrne JV, Griffith TM, Edwards DH, Harrison TJ and Johnston KR: Investigation of the vasoconstrictor action of subarachnoid haemoglobin in the pig cerebral circulation in vivo. *Br J Pharmacol* **97**: 669-74, 1989.
- 25.** Cahill J, Calvert JW and Zhang JH: Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 1341-53, 2006.
- 26.** Cai J, Sun Y, Yuan F, Chen L, He C, Bao Y, Chen Z, Lou M, Xia W, Yang GY and Ling F: A novel intravital method to evaluate cerebral vasospasm in rat models of subarachnoid hemorrhage: a study with synchrotron radiation angiography. *PLoS One* **7**: e33366, 2012.
- 27.** Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA and Stella AM: Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* **8**: 766-75, 2007.
- 28.** Ciurea AV, Palade C, Voinescu D and Nica DA: Subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm - literature review. *J Med Life* **6**: 120-5, 2013.
- 29.** Clark JF and Sharp FR: Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**: 1223-33, 2006.
- 30.** Cohen-Gadol AA and Spencer DD: Harvey W. Cushing and cerebrovascular surgery: Part I, Aneurysms. *J Neurosurg* **101**: 547-52, 2004.

- 31.** Cooper DJ, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D'urso P, Kossmann T, Ponsford J, Seppelt I, Reilly P and Wolfe R: Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *N Engl J Med* **364**: 1493-502, 2011.
- 32.** Costa ED, Rezende BA, Cortes SF and Lemos VS: Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol* **7**: 206, 2016.
- 33.** Cucchiara RF, Theye RA and Michenfelder JD: The effects of isoflurane on canine cerebral metabolism and blood flow. *Anesthesiology* **40**: 571-4, 1974.
- 34.** Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Siriwardena D, Costantino G, Fulia F, Cucinotta G, Gitto E, Cordaro S, Barberi I, De Sarro A, Caputi AP and Thiernemann C: Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a gerbil model of brain injury. *Brain Res* **875**: 96-106, 2000.
- 35.** D'ambrosio AL, Sughrue ME, Yorgason JG, Mocco JD, Kreiter KT, Mayer SA, Mckhann GM, 2nd and Connolly ES, Jr.: Decompressive hemicraniectomy for poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients with associated intracerebral hemorrhage: clinical outcome and quality of life assessment. *Neurosurgery* **56**: 12-9; discussion 19-20, 2005.
- 36.** Dandy WE: INTRACRANIAL ANEURYSM OF THE INTERNAL CAROTID ARTERY: CURED BY OPERATION. *Ann Surg* **107**: 654-9, 1938.
- 37.** Dankbaar JW, Rijdsdijk M, Van Der Schaaf IC, Velthuis BK, Wermer MJ and Rinkel GJ: Relationship between vasospasm, cerebral perfusion, and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neuroradiology* **51**: 813-9, 2009.
- 38.** De Oliveira Manoel AL and Macdonald RL: Neuroinflammation as a Target for Intervention in Subarachnoid Hemorrhage. *Front Neurol* **9**: 292, 2018.
- 39.** De Rooij NK, Linn FH, Van Der Plas JA, Algra A and Rinkel GJ: Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **78**: 1365-72, 2007.
- 40.** Delclaux C, Delacourt C, D'ortho MP, Boyer V, Lafuma C and Harf A: Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* **14**: 288-95, 1996.
- 41.** Delgado TJ, Brismar J and Svendgaard NA: Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke* **16**: 595-602, 1985.
- 42.** Deykun K, Pometlova M, Schutova B and Mares J: Modulations of behavioral consequences of minor cortical ischemic lesion by application of free radicals scavengers. *Gen Physiol Biophys* **30**: 263-70, 2011.
- 43.** Dhar R, Scalfani MT, Blackburn S, Zazulia AR, Videen T and Diringer M: Relationship between angiographic vasospasm and regional hypoperfusion in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **43**: 1788-94, 2012.
- 44.** Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M and Pulsinelli W: Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* **9**: 589-96, 1989.

- 45.** Dizdarevic K: The role of nitric oxide in resolution of vasospasm corresponding with cerebral vasospasms after subarachnoid haemorrhage: animal model. *Bosn J Basic Med Sci* **8**: 177-82, 2008.
- 46.** Dorfer C, Frick A, Knosp E and Gruber A: Decompressive hemicraniectomy after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg* **74**: 465-71, 2010.
- 47.** Dormanns K, Brown RG and David T: The role of nitric oxide in neurovascular coupling. *J Theor Biol* **394**: 1-17, 2016.
- 48.** Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA and Boas DA: Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**: 195-201, 2001.
- 49.** Egemen N, Turker RK, Sanlidilek U, Zorlutuna A, Bilgic S, Baskaya M, Unlu A, Caglar S, Spetzler RF and McCormick JM: The effect of intrathecal sodium nitroprusside on severe chronic vasospasm. *Neurol Res* **15**: 310-5, 1993.
- 50.** Endo H, Nito C, Kamada H, Yu F and Chan PH: Reduction in oxidative stress by superoxide dismutase overexpression attenuates acute brain injury after subarachnoid hemorrhage via activation of Akt/glycogen synthase kinase-3beta survival signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**: 975-82, 2007.
- 51.** Ersahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yuksel M, Yegen BC and Sener G: Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. *J Pineal Res* **46**: 324-32, 2009.
- 52.** Facchinetti F, Dawson VL and Dawson TM: Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol* **18**: 667-82, 1998.
- 53.** Fang Q, Chen G, Zhu W, Dong W and Wang Z: Influence of melatonin on cerebrovascular proinflammatory mediators expression and oxidative stress following subarachnoid hemorrhage in rabbits. *Mediators Inflamm* **2009**: 426346, 2009.
- 54.** Fassbender K, Hodapp B, Rossol S, Bertsch T, Schmeck J, Schutt S, Fritzing M, Horn P, Vajkoczy P, Kreisel S, Brunner J, Schmiedek P and Hennerici M: Inflammatory cytokines in subarachnoid haemorrhage: association with abnormal blood flow velocities in basal cerebral arteries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **70**: 534-7, 2001.
- 55.** Favero G, Franceschetti L, Bonomini F, Rodella LF and Rezzani R: Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation. *Int J Endocrinol* **2017**: 1835195, 2017.
- 56.** Feiler S, Plesnila N, Thal SC, Zausinger S and Scholler K: Contribution of matrix metalloproteinase-9 to cerebral edema and functional outcome following experimental subarachnoid hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* **32**: 289-95, 2011.
- 57.** Ferreira JC and Mochly-Rosen D: Nitroglycerin use in myocardial infarction patients. *Circ J* **76**: 15-21, 2012.
- 58.** Foley PL, Kassell NF, Hudson SB and Lee KS: Hemoglobin penetration in the wall of the rabbit basilar artery after subarachnoid hemorrhage and intracisternal hemoglobin injection. *Acta Neurochir (Wien)* **123**: 82-6, 1993.
- 59.** Forstermann U and Munzel T: Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**: 1708-14, 2006.

- 60.** Forsting M, Reith W, Schabitz WR, Heiland S, Von Kummer R, Hacke W and Sartor K: Decompressive craniectomy for cerebral infarction. An experimental study in rats. *Stroke* **26**: 259-64, 1995.
- 61.** Francoeur CL and Mayer SA: Management of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care* **20**: 277, 2016.
- 62.** Friedrich V, Flores R, Muller A, Bi W, Peerschke EI and Sehba FA: Reduction of neutrophil activity decreases early microvascular injury after subarachnoid haemorrhage. *J Neuroinflammation* **8**: 103, 2011.
- 63.** Friedrich V, Flores R, Muller A and Sehba FA: Escape of intraluminal platelets into brain parenchyma after subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* **165**: 968-75, 2010.
- 64.** Fung C, Murek M, Z'graggen WJ, Krahenbuhl AK, Gautschi OP, Schucht P, Gralla J, Schaller K, Arnold M, Fischer U, Mattle HP, Raabe A and Beck J: Decompressive hemicraniectomy in patients with supratentorial intracerebral hemorrhage. *Stroke* **43**: 3207-11, 2012.
- 65.** Gaetani P, Pasqualin A, Rodriguez Y Baena R, Borasio E and Marzatico F: Oxidative stress in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **89**: 748-54, 1998.
- 66.** Galea J, Cruickshank G, Teeling JL, Boche D, Garland P, Perry VH and Galea I: The intrathecal CD163-haptoglobin-hemoglobin scavenging system in subarachnoid hemorrhage. *J Neurochem* **121**: 785-92, 2012.
- 67.** Goksel HM, Ozum U and Oztoprak I: The therapeutic effect of continuous intracisternal L-Arginine infusion on experimental cerebral vasospasm. *Acta Neurochir (Wien)* **143**: 277-85, 2001.
- 68.** Gomez F and Garcia-Garcia L: Anxiogenic-like effects of fluoxetine render adult male rats vulnerable to the effects of a novel stress. *Pharmacol Biochem Behav* **153**: 32-44, 2017.
- 69.** Goulay R, Flament J, Gauberti M, Naveau M, Pasquet N, Gakuba C, Emery E, Hantraye P, Vivien D, Aron-Badin R and Gaberel T: Subarachnoid Hemorrhage Severely Impairs Brain Parenchymal Cerebrospinal Fluid Circulation in Nonhuman Primate. *Stroke* **48**: 2301-2305, 2017.
- 70.** Guglielmi G, Vinuela F, Dion J and Duckwiler G: Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience. *J Neurosurg* **75**: 8-14, 1991a.
- 71.** Guglielmi G, Vinuela F, Sepetka I and Macellari V: Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 1: Electrochemical basis, technique, and experimental results. *J Neurosurg* **75**: 1-7, 1991b.
- 72.** Gules I, Satoh M, Clower BR, Nanda A and Zhang JH: Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H2551-9, 2002.
- 73.** Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M and Attwell D: Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* **508**: 55-60, 2014.
- 74.** Hampl V and Herget J: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol Rev* **80**: 1337-72, 2000.

- 75.** Hardeland R: Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* **27**: 119-30, 2005.
- 76.** Hardeland R, Pandi-Perumal SR and Cardinali DP: Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 313-6, 2006.
- 77.** Hayashi T, Suzuki A, Hatazawa J, Kanno I, Shirane R, Yoshimoto T and Yasui N: Cerebral circulation and metabolism in the acute stage of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **93**: 1014-8, 2000.
- 78.** Helms C and Kim-Shapiro DB: Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radic Biol Med* **61**: 464-72, 2013.
- 79.** Herz DA, Baez S and Shulman K: Pial microcirculation in subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **6**: 417-24, 1975.
- 80.** Hijdra A and Van Gijn J: Early death from rupture of an intracranial aneurysm. *J Neurosurg* **57**: 765-8, 1982.
- 81.** Hirose H, Ide K, Sasaki T, Takahashi R, Kobayashi M, Ikemoto F, Yano M and Nishikibe M: The role of endothelin and nitric oxide in modulation of normal and spastic cerebral vascular tone in the dog. *Eur J Pharmacol* **277**: 77-87, 1995.
- 82.** Hockel K, Trabold R, Schöller K, Török E and Plesnila N: Impact of anesthesia on pathophysiology and mortality following subarachnoid hemorrhage in rats. *Experimental & Translational Stroke Medicine* **4**: 5, 2012.
- 83.** Hongo K, Ogawa H, Kassell NF, Nakagomi T, Sasaki T, Tsukahara T and Lehman RM: Comparison of intraluminal and extraluminal inhibitory effects of hemoglobin on endothelium-dependent relaxation of rabbit basilar artery. *Stroke* **19**: 1550-5, 1988.
- 84.** Huang J and Van Gelder JM: The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery* **51**: 1101-5; discussion 1105-7, 2002.
- 85.** Huang X and Wen L: Technical considerations in decompressive craniectomy in the treatment of traumatic brain injury. *Int J Med Sci* **7**: 385-90, 2010.
- 86.** Hutchinson PJ, Koliass AG, Timofeev IS, Corteen EA, Czosnyka M, Timothy J, Anderson I, Bulters DO, Belli A, Eynon CA, Wadley J, Mendelow AD, Mitchell PM, Wilson MH, Critchley G, Sahuquillo J, Unterberg A, Servadei F, Teasdale GM, Pickard JD, Menon DK, Murray GD and Kirkpatrick PJ: Trial of Decompressive Craniectomy for Traumatic Intracranial Hypertension. *N Engl J Med* **375**: 1119-30, 2016.
- 87.** Chang CP, Pan SP and Lin MT: A nitric oxide-dopamine link pathway in organum vasculosum laminae terminalis of rat brain exerts control over blood pressure. *Br J Pharmacol* **132**: 1524-30, 2001.
- 88.** Cheung RT, Tipoe GL, Tam S, Ma ES, Zou LY and Chan PS: Preclinical evaluation of pharmacokinetics and safety of melatonin in propylene glycol for intravenous administration. *J Pineal Res* **41**: 337-43, 2006.
- 89.** Iadecola C: Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* **20**: 132-9, 1997.
- 90.** Iadecola C and Nedergaard M: Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* **10**: 1369-76, 2007.

- 91.** Ighodaro OM and Akinloye OA: First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 2017.
- 92.** Ignarro LJ: After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7816-7, 2002a.
- 93.** Ignarro LJ: Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* **53**: 503-14, 2002b.
- 94.** Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 9265-9, 1987.
- 95.** Imperatore C, Germano A, D'avella D, Tomasello F and Costa G: Effects of the radical scavenger AVS on behavioral and BBB changes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Life Sci* **66**: 779-90, 2000.
- 96.** Itoh Y and Suzuki N: Control of brain capillary blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**: 1167-76, 2012.
- 97.** Jackowski A, Crockard A, Burnstock G, Russell RR and Kristek F: The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **10**: 835-49, 1990.
- 98.** Jaeger M, Soehle M and Meixensberger J: Effects of decompressive craniectomy on brain tissue oxygen in patients with intracranial hypertension. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**: 513-5, 2003.
- 99.** Jeon H, Ai J, Sabri M, Tariq A and Macdonald RL: Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Neuroscience* **169**: 1805-14, 2010.
- 100.** Kajita Y, Suzuki Y, Oyama H, Tanazawa T, Takayasu M, Shibuya M and Sugita K: Combined effect of L-arginine and superoxide dismutase on the spastic basilar artery after subarachnoid hemorrhage in dogs. *J Neurosurg* **80**: 476-83, 1994.
- 101.** Kalyanaraman B: Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* **1**: 244-57, 2013.
- 102.** Kassell NF, Sasaki T, Colohan AR and Nazar G: Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **16**: 562-72, 1985.
- 103.** Kirino T: Delayed neuronal death. *Neuropathology* **20 Suppl**: S95-7, 2000.
- 104.** Kroncke KD, Fehsel K and Kolb-Bachofen V: Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide* **1**: 107-20, 1997.
- 105.** Kubota T, Handa Y, Tsuchida A, Kaneko M, Kobayashi H and Kubota T: The kinetics of lymphocyte subsets and macrophages in subarachnoid space after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* **24**: 1993-2000; discussion 2000-1, 1993.
- 106.** Lang EW, Lagopoulos J, Griffith J, Yip K, Yam A, Mudaliar Y, Mehdorn HM and Dorsch NW: Cerebral vasomotor reactivity testing in head injury: the link between pressure and flow. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**: 1053-9, 2003.

- 107.** Larsen CC and Astrup J: Rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a literature review. *World Neurosurg* **79**: 307-12, 2013.
- 108.** Lazaridis C and Czosnyka M: Cerebral blood flow, brain tissue oxygen, and metabolic effects of decompressive craniectomy. *Neurocrit Care* **16**: 478-84, 2012.
- 109.** Li Q, Chen Y, Li B, Luo C, Zuo S, Liu X, Zhang JH, Ruan H and Feng H: Hemoglobin induced NO/cGMP suppression Deteriorate Microcirculation via Pericyte Phenotype Transformation after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Sci Rep* **6**: 22070, 2016.
- 110.** Lilla N, Hartmann J, Koehler S, Ernestus RI and Westermaier T: Early NO-donor treatment improves acute perfusion deficit and brain damage after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neurol Sci* **370**: 312-319, 2016.
- 111.** Lin MT, Pan SP, Lin JH and Yang YL: Central control of blood pressure by nitrenergic mechanisms in organum vasculosum laminae terminalis of rat brain. *Br J Pharmacol* **127**: 1511-7, 1999.
- 112.** Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA and Lancaster JR, Jr.: Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* **273**: 18709-13, 1998.
- 113.** Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Manoranjan B, Turner RC, Mcconnell E, Vates GE, Huber JD, Rosen CL and Simard JM: Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Neuroinflammation: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* **17**: 497, 2016.
- 114.** Macdonald RL, Zhang ZD, Curry D, Elas M, Aihara Y, Halpern H, Jahromi BS and Johns L: Intracisternal sodium nitroprusside fails to prevent vasospasm in nonhuman primates. *Neurosurgery* **51**: 761-8; discussion 768-70, 2002.
- 115.** Maekawa T, Tommasino C, Shapiro HM, Keifer-Goodman J and Kohlenberger RW: Local cerebral blood flow and glucose utilization during isoflurane anesthesia in the rat. *Anesthesiology* **65**: 144-51, 1986.
- 116.** Mak CH, Lu YY and Wong GK: Review and recommendations on management of refractory raised intracranial pressure in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Vasc Health Risk Manag* **9**: 353-9, 2013.
- 117.** Marbacher S, Fandino J and Kitchen ND: Standard intracranial in vivo animal models of delayed cerebral vasospasm. *Br J Neurosurg* **24**: 415-34, 2010.
- 118.** Mares J, Stopka P, Nohejlova K and Rokyta R: Oxidative stress induced by epileptic seizure and its attenuation by melatonin. *Physiol Res* **62 Suppl 1**: S67-74, 2013.
- 119.** Marmarou A, Shulman K and Lamorgese J: Compartmental analysis of compliance and outflow resistance of the cerebrospinal fluid system. *J Neurosurg* **43**: 523-34, 1975.
- 120.** Marzatico F, Gaetani P, Rodriguez Y Baena R, Silvani V, Paoletti P and Benzi G: Bioenergetics of different brain areas after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* **19**: 378-84, 1988.
- 121.** Mayberg MR, Okada T and Bark DH: The role of hemoglobin in arterial narrowing after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **72**: 634-40, 1990.
- 122.** Milinis K, Thapar A, O'Neill K and Davies AH: History of Aneurysmal Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **48**: e280-e283, 2017.

- 123.** Mitchell P, Tseng M and Mendelow AD: Decompressive craniectomy with lattice duraplasty. *Acta Neurochir (Wien)* **146**: 159-60, 2004.
- 124.** Molyneux A, Kerr R, Stratton I, Sandercock P, Clarke M, Shrimpton J and Holman R: International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet* **360**: 1267-74, 2002.
- 125.** Munoz MF, Puebla M and Figueroa XF: Control of the neurovascular coupling by nitric oxide-dependent regulation of astrocytic Ca(2+) signaling. *Front Cell Neurosci* **9**: 59, 2015.
- 126.** Naff NJ, Williams MA, Rigamonti D, Keyl PM and Hanley DF: Blood clot resolution in human cerebrospinal fluid: evidence of first-order kinetics. *Neurosurgery* **49**: 614-9; discussion 619-21, 2001.
- 127.** Nornes H: The role of intracranial pressure in the arrest of hemorrhage in patients with ruptured intracranial aneurysm. *J Neurosurg* **39**: 226-34, 1973.
- 128.** Otani N, Takasato Y, Masaoka H, Hayakawa T, Yoshino Y, Yatsushige H, Miyawaki H, Sumiyoshi K, Chikashi A, Takeuchi S and Suzuki G: Surgical outcome following decompressive craniectomy for poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage in patients with associated massive intracerebral or Sylvian hematomas. *Cerebrovasc Dis* **26**: 612-7, 2008.
- 129.** Ozum U, Aslan A, Tas A and Kars HZ: Intracarotid L-arginine reverses motor evoked potential changes in experimental cerebral vasospasm. *Turk Neurosurg* **17**: 13-8, 2007.
- 130.** Pachl J, Haninec P, Tencer T, Mizner P, Houst'ava L, Tomas R and Waldauf P: The effect of subarachnoid sodium nitroprusside on the prevention of vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir Suppl* **95**: 141-5, 2005.
- 131.** Palm F, Teerlink T and Hansell P: Nitric oxide and kidney oxygenation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**: 68-73, 2009.
- 132.** Pandya CD, Howell KR and Pillai A: Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **46**: 214-23, 2013.
- 133.** Park KW, Metais C, Dai HB, Comunale ME and Sellke FW: Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Anesth Analg* **92**: 990-6, 2001.
- 134.** Paxinos G and Watson C: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, 2006.
- 135.** Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, Donga R and Hamann M: A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *J Histochem Cytochem* **56**: 539-50, 2008.
- 136.** Pluta RM: Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacol Ther* **105**: 23-56, 2005.
- 137.** Pluta RM, Afshar JK, Boock RJ and Oldfield EH: Temporal changes in perivascular concentrations of oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, and methemoglobin after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **88**: 557-61, 1998.

- 138.** Pluta RM, Afshar JK, Thompson BG, Boock RJ, Harvey-White J and Oldfield EH: Increased cerebral blood flow but no reversal or prevention of vasospasm in response to L-arginine infusion after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **92**: 121-6, 2000.
- 139.** Pluta RM, Butman JA, Schatlo B, Johnson DL and Oldfield EH: Subarachnoid hemorrhage and the distribution of drugs delivered into the cerebrospinal fluid. Laboratory investigation. *J Neurosurg* **111**: 1001-7, 1-4, 2009.
- 140.** Provencio JJ, Fu X, Siu A, Rasmussen PA, Hazen SL and Ransohoff RM: CSF neutrophils are implicated in the development of vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care* **12**: 244-51, 2010.
- 141.** Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH and Svendgaard NA: Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery* **52**: 165-75; discussion 175-6, 2003.
- 142.** Prunell GF, Mathiesen T and Svendgaard NA: A new experimental model in rats for study of the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage. *Neuroreport* **13**: 2553-6, 2002.
- 143.** Prunell GF, Mathiesen T and Svendgaard NA: Experimental subarachnoid hemorrhage: cerebral blood flow and brain metabolism during the acute phase in three different models in the rat. *Neurosurgery* **54**: 426-36; discussion 436-7, 2004.
- 144.** Prunell GF, Svendgaard NA, Alkass K and Mathiesen T: Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. *J Neurosurg* **102**: 1046-54, 2005.
- 145.** Raabe A, Zimmermann M, Setzer M, Vatter H, Berkefeld J and Seifert V: Effect of intraventricular sodium nitroprusside on cerebral hemodynamics and oxygenation in poor-grade aneurysm patients with severe, medically refractory vasospasm. *Neurosurgery* **50**: 1006-13; discussion 1013-4, 2002.
- 146.** Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V and Reiter RJ: Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* **36**: 1-9, 2004.
- 147.** Rokyta R, Stopka P, Holecek V, Krikava K and Pekarkova I: Direct measurement of free radicals in the brain cortex and the blood serum after nociceptive stimulation in rats. *Neuro Endocrinol Lett* **25**: 252-6, 2004.
- 148.** Rooker S, De Visscher G, Van Deuren B, Borgers M, Jorens PG, Reneman RS, Van Rossem K and Verlooy J: Comparison of intracranial pressure measured in the cerebral cortex and the cerebellum of the rat. *J Neurosci Methods* **119**: 83-8, 2002.
- 149.** Sabri M, Ai J, Knight B, Tariq A, Jeon H, Shang X, Marsden PA and Loch Macdonald R: Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**: 190-9, 2011a.
- 150.** Sabri M, Ai J and Macdonald RL: Dissociation of vasospasm and secondary effects of experimental subarachnoid hemorrhage by clazosentan. *Stroke* **42**: 1454-60, 2011b.
- 151.** Sabri M, Lass E and Macdonald RL: Early brain injury: a common mechanism in subarachnoid hemorrhage and global cerebral ischemia. *Stroke Res Treat* **2013**: 394036, 2013.

- 152.** Sehba FA and Bederson JB: Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* **28**: 381-98, 2006.
- 153.** Sehba FA, Ding WH, Chereshev I and Bederson JB: Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **30**: 1955-61, 1999.
- 154.** Sehba FA, Friedrich V, Jr., Makonnen G and Bederson JB: Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor. *J Neurosurg* **106**: 321-9, 2007.
- 155.** Sehba FA, Hou J, Pluta RM and Zhang JH: The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol* **97**: 14-37, 2012.
- 156.** Sehba FA, Chereshev I, Maayani S, Friedrich V, Jr. and Bederson JB: Nitric oxide synthase in acute alteration of nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **55**: 671-7; discussion 677-8, 2004.
- 157.** Sehba FA, Mostafa G, Friedrich V, Jr. and Bederson JB: Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* **102**: 1094-100, 2005.
- 158.** Sehba FA, Pluta RM and Zhang JH: Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol* **43**: 27-40, 2011.
- 159.** Sehba FA, Schwartz AY, Chereshev I and Bederson JB: Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**: 604-11, 2000.
- 160.** Serbinenko FA: Balloon catheterization and occlusion of major cerebral vessels. *J Neurosurg* **41**: 125-45, 1974.
- 161.** Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Lo EH, Moskowitz MA and Ayata C: Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. *Brain* **130**: 1631-42, 2007.
- 162.** Shishido T, Suzuki R, Qian L and Hirakawa K: The role of superoxide anions in the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* **25**: 864-8, 1994.
- 163.** Scholler K, Trinkl A, Klopotoski M, Thal SC, Plesnila N, Trabold R, Hamann GF, Schmid-Elsaesser R and Zausinger S: Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res* **1142**: 237-46, 2007.
- 164.** Schrotz O: Aforismy. *Hippokratovy aforismy*. Dr. Ondřej Schrotz, Praha, 1899, 76.
- 165.** Schubert GA, Seiz M, Hegewald AA, Manville J and Thome C: Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study. *J Neurotrauma* **26**: 2225-31, 2009.
- 166.** Schubert GA, Schilling L and Thome C: Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, prevents early hypoperfusion during the acute phase of massive experimental subarachnoid hemorrhage: a laser Doppler flowmetry study in rats. *J Neurosurg* **109**: 1134-40, 2008.

- 167.** Schwartz AY, Masago A, Sehba FA and Bederson JB: Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J Neurosci Methods* **96**: 161-7, 2000a.
- 168.** Schwartz AY, Sehba FA and Bederson JB: Decreased nitric oxide availability contributes to acute cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **47**: 208-14; discussion 214-5, 2000b.
- 169.** Schwedt TJ: Clinical spectrum of thunderclap headache. *Expert Rev Neurother* **7**: 1135-44, 2007.
- 170.** Slamberova R, Nohejlova K, Ochozkova A and Mihalcikova L: What is the role of subcutaneous single injections on the behavior of adult male rats exposed to drugs? *Physiol Res* **67**: S665-s672, 2018.
- 171.** Sosunov SA, Ameer X, Niatsetskaya ZV, Utkina-Sosunova I, Ratner VI and Ten VS: Isoflurane anesthesia initiated at the onset of reperfusion attenuates oxidative and hypoxic-ischemic brain injury. *PLoS One* **10**: e0120456, 2015.
- 172.** Steele JA, Stockbridge N, Maljkovic G and Weir B: Free radicals mediate actions of oxyhemoglobin on cerebrovascular smooth muscle cells. *Circ Res* **68**: 416-23, 1991.
- 173.** Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M and Rinkel G: European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovasc Dis* **35**: 93-112, 2013.
- 174.** Strebel S, Kaufmann M, Maitre L and Schaefer HG: Effects of ketamine on cerebral blood flow velocity in humans. Influence of pretreatment with midazolam or esmolol. *Anaesthesia* **50**: 223-8, 1995.
- 175.** Sun BL, Zhang SM, Xia ZL, Yang MF, Yuan H, Zhang J and Xiu RJ: L-arginine improves cerebral blood perfusion and vasomotion of microvessels following subarachnoid hemorrhage in rats. *Clin Hemorheol Microcirc* **29**: 391-400, 2003.
- 176.** Suzuki S, Kassell NF and Lee KS: Hemin activation of an inducible isoform of nitric oxide synthase in vascular smooth-muscle cells. *J Neurosurg* **83**: 862-6, 1995.
- 177.** Takata K, Sheng H, Borel CO, Laskowitz DT, Warner DS and Lombard FW: Long-term cognitive dysfunction following experimental subarachnoid hemorrhage: new perspectives. *Exp Neurol* **213**: 336-44, 2008.
- 178.** Tan TC and Black PM: Sir Victor Horsley (1857-1916): pioneer of neurological surgery. *Neurosurgery* **50**: 607-11; discussion 611-2, 2002.
- 179.** Tateyama K, Kobayashi S, Murai Y and Teramoto A: Assessment of cerebral circulation in the acute phase of subarachnoid hemorrhage using perfusion computed tomography. *J Nippon Med Sch* **80**: 110-8, 2013.
- 180.** Terry AV, Jr.: Frontiers in Neuroscience Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Nd and JJ Buccafusco. CRC Press/Taylor & Francis Taylor & Francis Group, LLC., Boca Raton (FL), 2009,
- 181.** Thomas JE and McGinnis G: Safety of intraventricular sodium nitroprusside and thiosulfate for the treatment of cerebral vasospasm in the intensive care unit setting. *Stroke* **33**: 486-92, 2002.

- 182.** Toda N, Ayajiki K and Okamura T: Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev* **61**: 62-97, 2009.
- 183.** Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N and Stefanadis C: The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* **10**: 4-18, 2012.
- 184.** Umar S and Van Der Laarse A: Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem* **333**: 191-201, 2010.
- 185.** Uozumi Y, Sakowitz O, Orakcioglu B, Santos E, Kentar M, Haux D and Unterberg A: Decompressive craniectomy in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a single-center matched-pair analysis. *Cerebrovasc Dis* **37**: 109-15, 2014.
- 186.** Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E, Vicaut E, George B, Algra A, Amelink GJ, Schmiedeck P, Schwab S, Rothwell PM, Boussier MG, Van Der Worp HB and Hacke W: Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol* **6**: 215-22, 2007.
- 187.** Van Der Schaaf I, Algra A, Wermer M, Molyneux A, Clarke M, Van Gijn J and Rinkel G: Endovascular coiling versus neurosurgical clipping for patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*: Cd003085, 2005.
- 188.** Van Der Schaaf I, Wermer MJ, Van Der Graaf Y, Hoff RG, Rinkel GJ and Velthuis BK: CT after subarachnoid hemorrhage: relation of cerebral perfusion to delayed cerebral ischemia. *Neurology* **66**: 1533-8, 2006.
- 189.** Van Donkelaar CE, Bakker NA, Veeger NJ, Uyttenboogaart M, Metzemaekers JD, Luijckx GJ, Groen RJ and Van Dijk JM: Predictive Factors for Rebleeding After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Rebleeding Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Study. *Stroke* **46**: 2100-6, 2015.
- 190.** Van Lieshout JH, Dibue-Adjei M, Cornelius JF, Slotty PJ, Schneider T, Restin T, Boogaarts HD, Steiger HJ, Petridis AK and Kamp MA: An introduction to the pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Rev* **41**: 917-930, 2018.
- 191.** Vatter H, Weidauer S, Dias S, Preibisch C, Ngone S, Raabe A, Zimmermann M and Seifert V: Persistence of the nitric oxide-dependent vasodilator pathway of cerebral vessels after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **60**: 179-87; discussion 187-8, 2007.
- 192.** Vaughn MW, Huang KT, Kuo L and Liao JC: Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem* **275**: 2342-8, 2000.
- 193.** Vecchione C, Frati A, Di Pardo A, Cifelli G, Carnevale D, Gentile MT, Carangi R, Landolfi A, Carullo P, Bettarini U, Antenucci G, Mascio G, Busceti CL, Notte A, Maffei A, Cantore GP and Lembo G: Tumor necrosis factor-alpha mediates hemolysis-induced vasoconstriction and the cerebral vasospasm evoked by subarachnoid hemorrhage. *Hypertension* **54**: 150-6, 2009.
- 194.** Veelken JA, Laing RJ and Jakubowski J: The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* **26**: 1279-83; discussion 1284, 1995.

- 195.** Vergouwen MD, Vermeulen M, Coert BA, Stroes ES and Roos YB: Microthrombosis after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an additional explanation for delayed cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 1761-70, 2008.
- 196.** Vergouwen MD, Vermeulen M, Van Gijn J, Rinkel GJ, Wijdeveld EF, Muizelaar JP, Mendelow AD, Juvela S, Yonas H, Terbrugge KG, Macdonald RL, Diringer MN, Broderick JP, Dreier JP and Roos YB: Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke* **41**: 2391-5, 2010.
- 197.** Verhaegen MJ, Todd MM, Warner DS, James B and Weeks JB: The role of electrode size on the incidence of spreading depression and on cortical cerebral blood flow as measured by H₂ clearance. *J Cereb Blood Flow Metab* **12**: 230-7, 1992.
- 198.** Villa F, Iacca C, Molinari AF, Giussani C, Aletti G, Pesenti A and Citerio G: Inhalation versus endovenous sedation in subarachnoid hemorrhage patients: effects on regional cerebral blood flow. *Crit Care Med* **40**: 2797-804, 2012.
- 199.** Voldby B and Enevoldsen EM: Intracranial pressure changes following aneurysm rupture. Part 3: Recurrent hemorrhage. *J Neurosurg* **56**: 784-9, 1982.
- 200.** Wang X, Li YM, Li WQ, Huang CG, Lu YC and Hou LJ: Effect of clazosentan in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* **7**: e47778, 2012.
- 201.** Wang Z, Wu L, You W, Ji C and Chen G: Melatonin alleviates secondary brain damage and neurobehavioral dysfunction after experimental subarachnoid hemorrhage: possible involvement of TLR4-mediated inflammatory pathway. *J Pineal Res* **55**: 399-408, 2013.
- 202.** Westermaier T, Stetter C, Raslan F, Vince GH and Ernestus RI: Brain edema formation correlates with perfusion deficit during the first six hours after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Transl Stroke Med* **4**: 8, 2012.
- 203.** Willie CK, Tzeng YC, Fisher JA and Ainslie PN: Integrative regulation of human brain blood flow. *J Physiol* **592**: 841-59, 2014.
- 204.** Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA and Colton CA: Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* **89**: 873-91, 2011.
- 205.** Wu HJ, Wu C, Niu HJ, Wang K, Mo LJ, Shao AW, Dixon BJ, Zhang JM, Yang SX and Wang YR: Neuroprotective Mechanisms of Melatonin in Hemorrhagic Stroke. *Cell Mol Neurobiol* **37**: 1173-1185, 2017.
- 206.** Xu F, Liu P, Pascual JM, Xiao G, Huang H and Lu H: Acute effect of glucose on cerebral blood flow, blood oxygenation, and oxidative metabolism. *Hum Brain Mapp* **36**: 707-16, 2015.
- 207.** Yang XF, Wen L, Shen F, Li G, Lou R, Liu WG and Zhan RY: Surgical complications secondary to decompressive craniectomy in patients with a head injury: a series of 108 consecutive cases. *Acta Neurochir (Wien)* **150**: 1241-7; discussion 1248, 2008.

11 Publikace autora

I. Publikace, které jsou podkladem dizertační práce, v časopisech s IF (příloha 1 a 2)

Kolar M, Nohejlova K, Mares J, Pacht J. Early changes of brain perfusion after subarachnoid hemorrhage - the effect of sodium nitroprusside. *Physiol Res.* 2016 Dec 22;65(Supplementum 5):S591-S599. **IF 1,461**

Kolar M, Nohejlova K, Duska F, Mares J, Pacht J. Changes of cortical perfusion in the early phase of subarachnoid bleeding in a rat model and the role of intracranial hypertension. *Physiol Res.* 2017 Dec 30;66(Supplementum 4):S545-S551. **IF 1,324**

II. Publikace, které jsou podkladem dizertační práce, v časopisech bez IF (příloha 3)

Role oxidu dusnatého a NO-syntázy v patofyziologii poškození mozku po subarachnoidálním krvácení; laboratorní modely subarachnoidálního krvácení. **Kolář M**, Nohejlová K. *Československá fyziologie.* 2014;63(1):34-41

III. Prezentace výsledků na mezinárodních konferencích

Kolar M, Nohejlova K, Mares J, Pacht J: Early changes of brain perfusion after subarachnoid hemorrhage. *EuroNeuro 2014*, Istanbul, Turecko, 10. – 12. 4. 2014

Kolar M, Nohejlova K, Polach J, Mares J, Pachi J: Changes of cortical perfusion in early phase of subarachnoid bleeding in a rat model. *Neuroscience* 2014, 15. – 19. 11. 2014, Washington DC, USA

Kolar M, Nohejlova K, Polach J, Mares J, Pachi J: Decompressive craniectomy does not improve cortical hypoperfusion in early phase after subarachnoid hemorrhage. *XXVIIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function*, 27. – 30. 6. 2015, Vancouver, Kanada

Kolar M, Nohejlova K, Mares J, Pachi J: Intracerebroventricular administration of sodium nitroprusside does not improve brain perfusion in the early vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Vasospasm 2015*, 17. – 19. 9. 2015, Karuizawa, Japonsko

Prezentace výsledků na národních konferencích

Kolář M, Nohejlová K, Polách J, Mareš J, Pachi J: Časné změny mozkové perfuze po subarachnoidálním krvácení a jejich ovlivnění dekompresní kraniektomií. *XXI. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny*, Olomouc, ČR, 2. – 4. 10. 2014

Kolář M, Nohejlová K, Polách J, Mareš J, Pachi J: Perfuze mozku po subarachnoidálním krvácení a její ovlivnění dekompresní kraniektomií. *91. Fyziologické dny*, 3. – 5. 2. 2015, Brno, ČR

Kolář M, Nohejlová K, Polách J, Mareš J, Pachi J: Dekompresní kraniektomie zhoršuje perfuzi mozkové kůry v časně fázi po subarachnoidálním krvácení. *XXII. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny*, 24. – 26. 9. 2015, Plzeň, ČR

Kolář M., Nohejlová K., Polách J., Mareš J., Páchl J.: Vliv dekompresní kraniektomie na perfuzi mozkové kůry v časně fázi po subarachnoidálním krvácení. 92. Fyziologické dny, 2. – 4. 2. 2016, České Budějovice, ČR

Kolář M., Nohejlová K., Polách J., Mareš J., Páchl J.: Časné změny mozkové perfuze po subarachnoidálním krvácení - vliv nitrolební hypertenze. 93. Fyziologické dny, 31. 1. – 3. 2. 2017, Košice, Slovensko

IV. Publikace autora, nesouvisející s dizertační prací

Kolář M. Zásady intenzivní péče o pacienty s nitrobřišními katastrofami. In: Gürlich R et al.: Peritonitis, str. 125 – 132, Maxdorf 2018, ISBN: 978-80-7345-584-2

12 Přílohy

Příloha 1:

Kolar M, Nohejlova K, Mares J, Pacht J. Early changes of brain perfusion after subarachnoid hemorrhage - the effect of sodium nitroprusside. *Physiol Res.* 2016 Dec 22;65(Supplementum 5):S591-S599. IF 1,461

Příloha 2:

Kolar M, Nohejlova K, Duska F, Mares J, Pacht J. Changes of cortical perfusion in the early phase of subarachnoid bleeding in a rat model and the role of intracranial hypertension. *Physiol Res.* 2017 Dec 30;66(Supplementum 4):S545-S551. IF 1,324

Příloha 3:

Kolář M, Nohejlová K. Role oxidu dusnatého a NO-syntázy v patofyziologii poškození mozku po subarachnoidálním krvácení; laboratorní modely subarachnoidálního krvácení. *Československá fyziologie.* 2014;63(1):34-41