

**Univerzita Karlova v Praze, Fakulta tělesné výchovy a sportu**  
**Katedra fyzioterapie**



**Poškození neuronů, hematoencefalické bariéry a  
následné imunitní reakce během ischemické cévní  
mozkové příhody po aplikaci endotelinu-1**

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Jakub Otáhal, PhD.

Vypracovala:

Bc. Jana Lutovská

Praha, září 2008

## ABSTRAKT

**Název práce:** Poškození neuronů, hematoencefalické bariéry a následné imunitní reakce během ischemické cévní mozkové příhody po aplikaci endotelinu-1

**Cíl práce:** Cílem diplomové práce bylo seznámení se s metodami mikroskopické identifikace jednotlivých buněčných typů CNS, metodami detekce propustnosti hematoencefalické bariéry a detekce „umírajících“ neuronů. Zajímá nás, jak ovlivní ischemie v mozku určité buněčné elementy - neurony a astrocyty - a zda dojde k narušení hematoencefalické bariéry.

**Metoda:** Jedná se o experimentální studii. U 17ti laboratorních zvířat (potkanů rodu Wistar, postnatálního věku 12 a 25 dní) jsme injekčně aplikovali vazokonstrikční endotelin-1 do levé mozkové hemisféry k navození lokální ischemie. Zvířata se nechala 24 hodin přežít a poté byla anestezována uretanem v letální dávce. Mozky byly nařezány na koronální řezy silné 50 $\mu$ m. Přílehlající série řezů byly barveny pomocí Fluoro-Jade B pro detekci degenerativních neuronů, pomocí Evans Blue pro znázornění propustnosti hematoencefalické bariéry, imunohistochemicky na znázornění IgG a GFAP. Byla provedena běžná observace mozku pod upřide mikroskopem s fluorescencí.

**Výsledky:** Výsledky našeho experimentu ukazují, že mozková ischemie navozená pomocí aplikace endotelinu-1, vede k poškození mozkové tkáně. Dochází k degeneraci neuronů v zasažené oblasti. Dále je porušena hematoencefalická bariéra, v rozsahu, který odpovídá oblasti poškození neuronů. V ischemické oblasti jsme také pozorovali aktivní buňky astrocyty, které pomáhají odstraňovat nekrotickou tkáň a dále syntetizují prozánětlivé cytokiny. Znakem zánětlivé odpovědi je infiltrace leukocytů (neutrofilů) do ischemického regionu mozku, a zvýší se propustnost hematoencefalické bariéry díky které dojde k infiltraci IgG do oblasti poškozené tkáně.

**Klíčová slova:** CNS, neuron, astrocyt, hematoencefalická bariéra, cévní mozková příhoda

## SUMMARY

**Work title:** Damage of neurons, blood-brain barrier and following immune reaction during ischemic stroke after endothelin-1 application

**Work objectives:** The aim of this diploma work was taking up with microscopic identification methods of particular cell types of CNS, detection of blood-brain-barrier permeability and "dying" neurons. We are interested how the cellular elements - neurons and astrocyte - are affected by cerebral ischemia and if the permeability of the blood-brain barrier is disrupted.

**Methodology:** Experiments were performed in Wistar rats on postnatal day 12 or 25 (17 together). Cannula for vasoconstrictor Endothelin-1 infusion was inserted into left hemisphere to induce focal cerebral ischemia. Animals were let to live for 24 hours and then all rats were deeply anesthetized with urethane injection. The brains were sectioned in the coronal plane 50 $\mu$ m thick. Adjacent series of sections were processed for Fluoro-Jade B to detect degenerating neurons, blood-brain barrier disruption was investigated using Evans Blue dye. Immunohistochemical labeling was used for IgG and visualization of hypertrophic astrocytes by GFAP. Common observation of brain was performed under upright microscope with fluorescence.

**Results:** Our findings demonstrate that focal cerebral ischemia generates induced by ET-1 into cerebral tissue damage. Degenerating neurons were observed in affected areas. Blood-brain barrier is disturbed in the same area as degenerating neurons. We also observed active astrocyte in ischemic area which help to eliminate necrotic tissue and also synthesize proinflammatory cytokines. Sign of the inflammatory response is infiltration of leukocytes (neutrophils) into ischemic brain region. Permeability of blood-brain barrier increases due to infiltration of IgG into damage tissue.

**Key words:** CNS, neuron, astrocyte, blood-brain barrier, stroke

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat všem, kteří mi pomohli při shromažďování potřebného materiálu ke zpracování bakalářské práce. Zvláště bych touto cestou ráda poděkovala MUDr. Jakobovi Otáhalovi, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení při psaní diplomové práce, za cenné rady a připomínky.

Děkuji Bc. Lucii Aronové za pomoc při anglické překlady abstraktu a za mluvnickou úpravu textu.

Tato práce vznikla za podpory grantu AVČR č. 1QS501210509.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji.

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům s tím, že veškeré (i přejaté) informace budou řádně citovány.

.....

## OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
<b>1 ÚVODNÍ SLOVO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>13</b>
2.1 Buňky centrálního nervového systému.....	13
2.1.1 Neurony.....	13
2.1.1.1 Tělo neuronu.....	14
2.1.1.2 Dendrit.....	14
2.1.1.3 Axon.....	15
2.1.1.4 Synapse.....	15
2.1.2 Gliové buňky.....	17
2.1.2.1 Mikroglie.....	17
2.1.2.2 Makroglie.....	18
2.1.2.2.1 Astrocyty.....	18
2.1.2.2.1.1 Funkce astrocytů.....	19
2.1.2.2.1.2 Spojení astrocytů.....	20
2.1.2.2.1.3 Základní typy astrocytů.....	21
2.1.2.2.2 Oligodendrocyty.....	21
2.1.2.2.3 Ependymální buňky.....	22
2.1.3 Extracelulární prostor.....	22
2.2 Mozková kůra.....	23
2.2.1 Neocortex.....	23
2.2.1.1 Stavba neocortexu.....	24
2.3 Hematoencefalická bariéra.....	25
2.4 Cévní mozková příhoda.....	27
2.4.1 Úvod.....	27
2.4.2 Ischemická cévní mozková příhoda.....	28
2.4.3 Statistické údaje.....	29
2.4.4 Patofyziologie mozkové ischemie.....	29
2.4.4.1 Biochemické změny.....	30

2.4.4.2	Histologické změny.....	31
2.4.4.3	Zánět.....	33
2.4.4.4	Role astrocytů během ischemie.....	34
2.4.4.5	Aktivace mikroglie.....	35
2.4.4.6	Změny propustnosti hematoencefalické bariéry.....	36
2.4.5	Klinický obraz cévní mozkové příhody.....	36
2.4.6	Terapie náhlých mozkových příhod.....	38
2.4.6.1	Terapie akutního stádia ischemické CMP.....	38
2.4.6.2	Rehabilitace po cévní mozkové příhodě.....	39
<b>3</b>	<b>CÍLE A HYPOTÉZY.....</b>	<b>40</b>
3.1	Cíle.....	40
3.2	Hypotézy.....	40
<b>4</b>	<b>VÝZKUMNÁ ČÁST.....</b>	<b>41</b>
4.1	Metody.....	41
4.1.1	Experimentální zvířata.....	41
4.1.2	Fokální mozková ischemie.....	41
4.2	Histologie.....	42
4.2.1	Fixace.....	42
4.2.2	Přehledná barvení.....	43
4.2.2.1	Fluoro-Jade B.....	43
4.2.2.2	Evans Blue.....	44
4.2.2.3	Imunohistochemické barvení.....	44
4.2.2.3.1	GFAP.....	45
4.2.2.3.2	IgG.....	46
4.3	Analýza.....	47
4.4	Výsledky experimentu.....	48
4.4.1	Poškození v oblasti šedé hmoty mozkové.....	50
4.4.2	Porušení hematoencefalické bariéry.....	52
4.4.3	Reaktivní glióza.....	56

<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>59</b>
5.1	Diskuze - metodika.....	64
<b>6</b>	<b>ZÁVĚREČNÉ SHRUTÍ.....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>74</b>
	PŘÍLOHA Č. 1 Přehled všech použitých typů barvení .....	74
	PŘÍLOHA Č. 2 IgG pozitivní buňky.....	75
	Seznam obrázků.....	76



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

**a.** - arteria

**AMPA** -  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové receptory

**ATP** - adenosintrifosfát

**BBB** - Blood Brain Barrier - hematoencefalická bariéra

**CA1-3** - region 1-3 Cornu Amomnis

**CBF** - cerebral blood flow - mozkový krevní průtok

**CNS** - centrální nervová soustava

**CT** - počítačová tomografie

**EB** - Evans Blue

**EBA** - Evans Blue vázaný na albuminovou proteinovou frakci

**ECP** - extracelulární prostor

**ET-1** - Endotelin-1

**FJ-B** - Fluoro Jade B

**GFAP** - kyselý gliální fibrilární protein

**GABA** -  $\gamma$ -aminomáselná kyselina

**IgG** - Imunoglobulin G

**IL-1** - Interleukin-1

**NMDA** - N-methyl-D-aspartátové receptory

**MRI** - magnetická rezonance

**P12 / P25** - postnatální věk 12 / 25 dní

**PBS** - fosfátový pufr

**TNF- $\alpha$**  - tumor necrosis faktor

## I. ÚVODNÍ SLOVO

Cévní mozková příhoda je důvodem značného počtu hospitalizací a bohužel i častou příčinou úmrtí. [3] Je to náhle vzniklá mozková porucha, která je způsobena poruchou cerebrální cirkulace ischemií nebo hemoragií. [1] V této diplomové práci se zabýváme ischemickou CMP.

CMP je velmi časté onemocnění. Je druhou (ev. třetí) příčinou smrti ve světě, vedoucí příčinou invalidity, jednou z nejčastějších příčin demence a vede k depresi jak u pacientů, tak u jejich opatrovatelů. [20] Výsledný zdravotní stav pacientů závisí na závažnosti, lokalizaci, velikosti ischemického ložiska a intenzitě zánětlivé reakce, která následuje. [3] Zánětlivá reakce v mozku může zvětšit neuronovou dráždivost, narušit životnost buňky a zvýšit propustnost BBB pro krevní buňky. [60]

Mozek má pro svoji biologickou potřebu a realizaci informační funkce neuronů značné metabolické nároky. Jeho metabolismus je téměř zcela závislý na dodávkách kyslíku a glukózy. [20] Energetická spotřeba mozku je vysoká. V dospělosti má u člověka 2 procenta hmotnosti těla (a to je devětkrát více než bychom u savců naší velikosti očekávali) a spotřebovává pětinu energie z potravy, 15% kyslíku a 40% krevní glukózy. Jeho bazální metabolismus je 20x větší než u kosterní svaloviny v klidu. [62]

Patofyziologickým podkladem vzniku mozkové ischemie je lokální porucha perfuze mozkové tkáně s následným poškozením neuronů a mozkové glie. [20] Ischemické poškození CNS představuje komplexní dynamicky se měnící proces sestávající z mnoha složitě provázaných dějů. [27] K udržení dynamické stability vlastností vnitřního prostředí nervové tkáně přispívá reakce vaskulárního systému spočívající ve změnách perfúze a řízení permeability hematoencefalické bariéry. Toto rozhraní mezi vnitřním prostředím nervové tkáně a jinými kompartmenty tělesných tekutin spoluvytváří a aktivně udržuje specifické složení vnitřního prostředí nervového systému. [38] Mnoho signálů uvolňovaných během časné excitotoxické fáze jsou účinnými induktory zánětu. [60] Mozkové buňky, jako neurony, astrocyty a mikroglie, jsou schopné syntetizovat mediátory, jako jsou cytokiny a chemokiny. [48] Zánětlivé mediátory a indukce zánětu dále poškozuje ischemickou tkáň. [20]

Hematoencefalická bariéra představuje multiceulární membránové rozhraní, které významně omezuje přestup většiny látek z krve do intersticiální tekutiny mozku. [54] Anatomicky definovaná struktura BBB a níže uvedené mechanismy maximálně selektivní pasáže látek mezi krví a mozkiem, zajišťují za fyziologických podmínek optimálně kontrolovanou homeostázu vnitřního prostředí mozku. [25] Za patologických podmínek probíhají na BBB strukturální a funkční změny. V případech jako je ischemie nebo zánět mozku dochází k otevření bariéry. [25]

Astrocyty hrají centrální úlohu v regulaci extracelulárního prostředí neuronů CNS. [20] Výběžky astrocytů jsou přiloženy k tělům i výběžkům nervových buněk, pro které udržují homeostatickými mechanismy vhodné prostředí, zejména zajišťují iontovou rovnováhu okolí neuronů, izolují od okolí neurony a synapse na nervových buňkách, přijímají a uvolňují některé látky s funkcí mediátorů (GABA, glutamát). [8]

Imunitní systém ochraňuje organismus před vnějšími patogeny (baktérie, viry atd.) a pomáhá regeneraci tkání. Astrocyty mají též funkce imunobiologické tím, že mohou produkovat faktor, který má podobné funkce jako lymfokiny pomáhajících T-buněk. Samy pak reagují na určité lymfokiny zmnožením a stupňováním proteosyntézy. [8] V CNS jsou nositelem imunity buňky mikroglie. Tyto buňky se aktivují řadou podnětů, např. při masivním vyplavení glutamátu, které je běžné u mozkové ischemie, traumatu, epilepsie atd., kontaktem s patogeny, kontaktem s enzymy cytosolu nervových buněk, kolem mozkových nádorů atd. Po aktivaci dochází k silné aktivaci genové exprese mikroglie, která vede ke změně morfologie a vlastností těchto buněk. Cílem je vyčištění tkáně od zničených částí fagocytózou a „přivolání“ dalších imunitních pomocníků z krevního oběhu. Proto látky, které v mikroglii vznikají (oxid dusnatý), regulují průtok krve daným místem, otevírají hematoencefalickou bariéru a vytvářejí řadu modulátorů zánětlivé reakce (interleukiny a cytokiny). Oxid dusnatý způsobuje vážné problémy mitochondriálnímu metabolismu nervových buněk, protože blokuje dýchací řetězec. [36]

Léčebné postupy závisí na stupni závažnosti. [37] Léčitelnost časné fáze iktu odpovídá současným znalostem molekulární patofyziologie cévní mozkové příhody a závěrům řady klinických i experimentálních studií. Farmakoterapie je v současnosti možná léky obnovujícími makrocirkulaci a mikrocirkulaci v oblasti ložiskové ischemie,

neuroprotektivními léky a snižováním nitrolebního tlaku. Oblast penumbry - oblast mozku, kde jsou buňky ohroženy progredující ischemií - kde 95% buněčných elementů má naději na strukturální i funkční úpravu, je hlavní cílovou oblastí pro léčebné ovlivnění ischemického iktu. Indukce zánětu poškozuje ischemickou tkáň. Je prokázáno, že protizánětlivá léčba u experimentálního iktu působí protektivně. Na druhé straně musí být protizánětlivá léčba vybírána uvážlivě, protože zánět je i přirozeným ochranným procesem. [20]

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 BUŇKY CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

Buňky centrálního nervového systému jsou neurony a neuroglie. Gliové buňky CNS se dělí na makroglie a mikroglie. Makroglie tvoří tři typy buněk - astrocyty, ependimální buňky a oligodendrocyty. Společně s neurony jsou to hlavní elementy tvořící strukturu CNS. [55]

V dřívější době se na gliové buňky pohlíželo jako na typ pojivové tkáně centrálního nervového systému, jehož hlavní funkcí je poskytovat podporu pravým funkčním buňkám mozku, neuronům. [4] V poslední době roste zájem neurobiologů o porozumění významu vzájemného ovlivňování neuronů a gliových buněk v CNS. Zejména co se týče patologických procesů, které mají velký dopad na společnost, jako je mozkové trauma, CMP a neurodegenerativní onemocnění. [12] Nyní jsou gliové buňky uznané za blízké partnery neuronů v souvislosti s každou funkcí mozku i jako účastníci patofysiologické dysfunkce nebo onemocnění mozku. [4] Bylo zjištěno, že neurony jsou závislé na gliových buňkách kvůli jejich metabolické a strukturální podpoře. Díky gliovým buňkám jsou neurony chráněny před degenerací po úrazu a onemocnění CNS. [12]

#### 2.1.1 Neurony

Neurony jsou hlavní strukturální a funkční jednotkou nervového systému. Lidský nervový systém sestává z více než  $10^{10}$  neuronů. Neurony vytvářejí síť, která zodpovídá za paměťové procesy, emocionální prožívání i abstraktní myšlení, stejně jako za základní fyziologické reflexy.

Na své funkce jsou nervové buňky tak vysoce specializované, že jiné nutné funkce v nervové tkáni, tj. výživu, oporné funkce, tvorbu nervových obalů a odstranění produktů rozpadu, zajišťuje další buněčná složka nervové soustavy, zvaná neuroglie. [8]

Neuron má buněčné tělo a dva druhy výběžků, dendrity a axon (neurit). [52,57] Aferentních výběžků - dendritů - je několik, eferentní výběžek je jen jeden a označuje se jako neurit nebo axon. Buněčné tělo neuronu má proměnlivou velikost. Nejmenší neurony jsou v rozmezí 6-10  $\mu\text{m}$ , největší dosahují okolo 100  $\mu\text{m}$ . [62]

#### 2.1.1.1 Tělo neuronu

Buněčné tělo je zvětšená část neuronu. Tato část se nejvíce podobá ostatním buňkám. Na povrchu buněčného těla a výběžků je buněčná membrána, která se podobně jako u jiných buněk skládá z dvojvrstvy fosfolipidů, oddělených vrstvou proteinů. Buněčná membrána je dynamická struktura, která je v průběhu života neuronu stále obměňována. [62] Membrána obsahuje receptory a buněčné kanály. [57]

Zpravidla uprostřed buněčného těla je jádro, které je obklopené zdvojenou jadernou membránou. Jádro obsahuje genetický materiál, DNA. Mimo jádra obsahuje tělo neuronu řadu dalších organel, které koordinují metabolickou aktivitu (Golgiho aparát, lysozomy, endoplazmatické retikulum, ribozomy, mitochondrie). Endoplazmatické retikulum je systém cisteren a tubulů, který komunikuje s extracelulárním prostorem. Na vnější povrch endoplazmatického retikula jsou navázány ribozomy. Endoplazmatické retikulum s navázanými ribozomy se považuje za "hrubé endoplazmatické retikulum" a je hlavním proteosyntetickým aparátem neuronu. Mitochondrie jsou oválné útvary uložené v buněčném těle i v jeho výběžcích. Na vnitřních membránách mitochondrií jsou lokalizovány enzymy zajišťující energii pro metabolismus neuronu. Tyto enzymy se také označují jako respirační enzymy. V mitochondriích vzniká ATP, kterou buňka následně může využívat ke svým životním pochodům. [57,62]

#### 2.1.1.2 Dendrit

Prostřednictvím dendritů přijímá neuron aferentní signály od jiných neuronů, které se na buněčné membráně somatu sčítají. Dendritů má neuron zpravidla větší počet; jsou kratší a bohatě se větví. Na povrchu dendritů jsou přítomny dendritické trny. Jejich počet je

u jednotlivých typů nervových buněk variabilní a liší se i s ohledem na vzdálenost od somatu a síly dendritické větve. Základní funkcí dendritických trnů je modulace postsynaptického potenciálu při jeho přechodu ze synapse na dendrit. [52,57]

### 2.1.1.3 Axon

Jako neurit (axon) označujeme výběžek vedoucí vzruch směrem od těla neuronu. Axon, který vychází z axonálního hrbolku somatu, převádí eferentní nervový signál na často velmi vzdálené efekторы a na návazně zapojené neurony. Z funkčního hlediska není však axon pouze strukturou vedoucí vzruch. Jeho další velmi důležitou funkcí je transport některých látek z buněčného těla do distálních částí axonu. Během svého průběhu axon často vysílá kolaterály, které se na konci ještě dále větví.

Místo odstupu axonu, tzv. axonový hrbolok, má spolu s iniciálním segmentem neuritu rozhodující význam pro vznik vzruchu v neuronu. Ve většině případů jsou axony v celém rozsahu obaleny myelinovou pochvou. Výjimku tvoří pouze začátek axonu a tenké větve terminálního větvení. Myelinová pochva se významně podílí na přenosu vzruchu. Čím je nervové vlákno a myelinová pochva silnější, tím rychleji vede vzruchy. Myelinová pochva nepokrývá axon zcela souvisle. Je přerušována Ranvierovými zářezy. [52,57] Mezi Ranvierovými zářezy se nervový vzruch šíří „skoky“ (saltatorní vedení), což vede k jeho zrychlení. [61]

### 2.1.1.4 Synapse

Synapse je funkčním kontaktem neuronů. Synapse jsou na začátku dendritů a na konci neuritů. [9,38] Toto spojení se uskutečňuje mezi dvěma neurony, z nichž jeden vytváří presynaptickou a druhý postsynaptickou část synapse. [41] Synapse obecně přenáší signály jen jedním směrem: terminální část axonu presynaptické buňky posílá signály do synaptické štěrbiny, a ty jsou vyzvednuty postsynaptickou buňkou. [30] Předávání vzruchů v synapsi je jednosměrné, zatímco předávání trofických signálů může být obousměrné, postsynaptický neuron posílá signály k presynaptickému. Mezi těmito

retrográdními signály mohou být plyny, jako oxid dusnatý a kyslíčník uhelnatý, nebo některé hormony. [8,30]

Synapse je podle mechanismu působení dvojitá. Chemická synapse představuje převažující typ synapsí a funguje prostřednictvím uvolňování mediátorů. Elektrická synapse představuje těsný kontakt presynaptické a postsynaptické membrány, který umožňuje přímý elektrický přenos nervového vzruchu na další neuron. [8]

### **Chemické synapse**

Příchod akčního potenciálu na presynaptickou membránu způsobí její depolarizaci a tím umožní vstup iontů  $Ca^{2+}$  do cytoplasmy presynaptického konce axonu, odkud je uvolněn mediátor do synaptické štěrbině. Mediátor vyvolá změny iontové permeability a tím změny polarizace membrány, což vyvolá tzv. excitační postsynaptický potenciál. Je-li tento potenciál dostatečně velký, vyvolá na membráně ovlivněné buňky akční potenciál, který se pak šíří až na další synapsi. [8] Jestliže je postsynaptickou buňkou sval, změny membránového potenciálu vedou ke kontrakci. [4]

Po proběhnutí polarizačních změn na membráně je mediátor inaktivován enzymem a celý děj se může opakovat. Doba, která uplyne od doběhnutí akčního potenciálu na presynaptickou membránu do vzniku excitačního postsynaptického potenciálu, se nazývá synaptické zpoždění a činí 0,5 ms. Je způsobeno dobou difúze mediátoru. [8]

Kromě excitačních synapsí nacházíme v CNS i inhibiční synapse. Jejich projevem je hyperpolarizace a vznik inhibičního postsynaptického potenciálu. Inhibiční postsynaptický potenciál je zprostředkován hlavně interneurony při reciproční inervaci na motoneuronech antagonistických svalů. [41]

### **Elektrické synapse**

Jejich podstatou je buněčné spojení typu nexus, tj. těsné přiblížení presynaptické a postsynaptické membrány. Elektrické synapse jsou charakterizovány oblastí velmi blízkého spojení mezi membránami pre- a postsynaptické buňky. Uvnitř těchto membrán jsou gap junction. [8,28]



Gap junction jsou vodní kanály velkého průměru, které sahají od jedné buňky napříč extracelulárním prostorem do přiléhající buňky. Je zde možný volný pohyb anorganických iontů a malých organických molekul z jedné buňky do druhé. [4,28]

Z tohoto způsobu přenosu vyplývají dvě důležité funkční vlastnosti. První, že přenos informací může být obousměrný. Druhá, že elektrické synapse jsou velmi rychlé. Není zde žádné zpoždění jako je tomu u chemické synapse. [4]

### 2.1.2. Gliové buňky

Buněčná populace CNS je tvořena kromě neuronů buňkami neurogliálními. [57] Jsou to drobné, bohatě větvené buňky různého tvaru vyplňující prostory mezi nervovými buňkami centrální nervové soustavy. Tvoří "kostru" nervové tkáně a nevedou vzruchy. Zahrnují mikroglie a makroglie. [21]

Gliové buňky mají různou formu a řadu funkcí. Mají významnou roli v transportu látek pro nervové buňky z krevních kapilár a zpět do kapilár, mají funkci podpůrnou, vytvářejí obaly nervových vláken a mají funkci obranou a fagocytární. [7,53]

#### 2.1.2.1. Mikroglie

Mikroglie jsou gliové buňky vyskytující se ve všech částech nervového systému. Zahrnují buňky podobné astrocytům a oligodendrocytům. Jsou však podstatně menší, s dlouhými, eventuelně vlnovitými výběžky. [21] Jako ostatní gliové buňky podporují funkce neuronů, ale zároveň jsou jedinečné tím, že tvoří endogenní imunitní systém CNS. Hrají klíčovou roli za patologických podmínek. Role mikroglie je podobná roli buněk imunitního systému, jako makrofágů a lymfocytů, ve zbytku těla. Mikroglie vyrovnává rozdíl mezi nepřítomností leukocytů v mozku a schopností mozku bránit se proti infekci, zranění a onemocnění. Díky mikroglii našla evoluce způsob jak dosáhnout kompatibility mezi destruktivní silou imunitního systému a relativní bezbranností CNS vůči zranění a nemoci. [12]

Mikroglie vznikají v kostní dřeni a do CNS se dostávají podél cév. Od cévních stěn pak vstupují do nervové tkáně a tam se dále množí. Početně činí asi 10% všech buněk glie. Jsou hojně přítomny v celé tkáni CNS, včetně nervu optiku a retiny. Ve zdravém mozku jsou mikroglie charakterizovány rozvětvenou morfologií a jsou označovány za "odpočívající" mikroglie. Při každé poruše v oblasti mozku se mikroglie rychle transformují do aktivovaného stádia charakterizovaného ameboidní morfologií. Aktivované mikroglie mohou migrovat do místa poranění, proliferovat a uvolňovat různé druhy faktorů jako jsou cytokiny a oxid dusnatý. [12,21]

### 2.1.2.2. Makroglie

Makroglie zahrnují oligodendrocyty, astrocyty a ependymogliální buňky. Mohou být klasifikovány podle tvaru a kontaktů jejich těl a výběžků. Na rozdíl od oligodendrocytů, astroglie a ependymogliální buňky jsou charakteristické zakončeními, která jsou v kontaktu s bazální membránou krevních vlásečnic a/nebo pii mater. Ependymální buňky mají bipolární tvar a navíc kontaktují ventrikulární povrch. Astrocyty v kontaktu s ventrikulárním povrchem nejsou. [21]

#### 2.1.2.2.1. Astrocyty

Astrocyty se vyskytují v celém CNS. Jsou to rozvětvené makroglie hvězdicovitého tvaru. Výběžky astrocytů hvězdicovitě vyzařují na všechny strany z poměrně malého buněčného těla obsahujícího jádro. Tělo astrocytů je poměrně chudé na organely ve srovnání s neurony. Výběžky se mohou dále větvit. Až k periférii přecházejí tenká plochá rozšíření. [8,53] Jednotlivé oblasti šedé hmoty se od sebe liší denzitou výběžků astrocytů. V kůře mozkové je výběžků astrocytů poměrně málo, zatímco v hipokampu je jejich denzita až čtyřikrát větší. [55]

Ještě relativně nedávno se předpokládalo, že astrocyty společně s dalšími gliovými buňkami jsou převážně strukturální buňky a jejich hlavní funkcí je udržovat neurony pohromadě. Nyní víme, že astrocyty mají mnoho funkcí včetně udržování extracelulárního prostředí v rámci CNS. [32]

### 2.1.2.2.1.1 Funkce astrocytů

Astrocyty jsou většinou orientovány tak, že jedním výběžkem naléhají na stěnu kapiláry a druhým se dotýkají povrchu neuronu. Existence gliových nožek na povrchu kapilár a těsné vztahy ostatních výběžků astrocytů k neuronům svědčí o tom, že astrocyty mají nutritivní funkci. Obstarávají živiny pro nervovou tkáň. [56] Na kapilárách pokrývají až 85% jejich zevní plochy jakožto membrana limitans glie perivaskularis. Astrocyty hrají klíčovou roli v mozkovém metabolismu. Jsou nejdůležitější v katabolismu určitých aminokyselin v mozku, stejně jako v syntéze nových aminokyselin. Obsahují většinu glykogenu v mozkové tkáni. Přemění glukózu na kyselinu mléčnou, která je následně vzata do neuronů a převedená na pyruvát pro energetický metabolismus neuronů. [32]

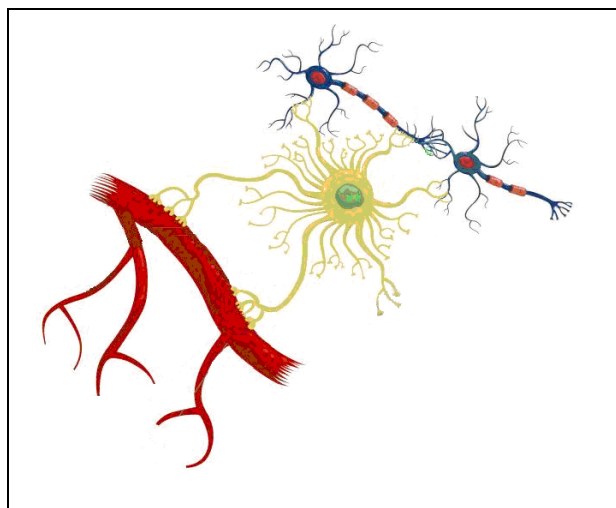
Mají důležitou roli v regulaci iontové koncentrace v intracelulárním a extracelulárním prostředí mozkové tkáně. Homeostatickými mechanismy udržují vhodné prostředí neuronů, zajišťují iontovou rovnováhu, řídí acidobazickou rovnováhu. Izolují od okolí neurony a synapse na nervových buňkách, přijímají a uvolňují některé látky s funkcí mediátorů (GABA, glutamát). [8]

Astrocyty jsou relativně rezistentní vůči poruchám jako je ischemie a jiné poškození. Mohou přechodně zajišťovat anaerobní metabolismus a podporovat tak integritu neuronů v oblasti ischemického polostínu. [21,32]

Astrocyty zajišťují též imunobiologické funkce tím, že produkují faktor, který má podobné funkce jako lymfokiny pomáhajících T-buněk. Samy pak reagují na určité lymfokiny zmnožením a stupňováním proteosyntézy. Astrocyty jsou hlavní buňky jizvy, která se formuje kolem léze přibližně týden po traumatické události. Astrocyty přitahují mikroglie / monocyty na pročištění a remodelaci poškozené tkáně a podílejí se na angiogenezi. (viz. níže) Ochranná funkce astrocytů je patrná i na povrchu CNS, kde výběžky a těla astrocytů tvoří tzv. membrana limitans glie superficialis, která odděluje neurony na vnějším povrchu mozku od pia mater. [8,57]

Astrocyty mají funkci vodiče pro migrující neuroblasty a navigují růst axonů během vývoje CNS. Ve vyvíjecím se mozku byl popsán speciální typ neuroglie, nazvaný „radiální glie“. Rozprostírá se od stěn komor až k povrchu mozkové kůry. Zdá se,

že neurony tvořící se v blízkosti komor migrují podél radiální glie do své definitivní pozice v kortexu. [56]



Obr.1 Astrocyt, který částí svých výběžků obsazuje stěny cév, jinými výběžky obkládá nervovou buňku a přispívá její látkové výměně (schematický pohled) (upraveno podle [13] )

#### 2.1.2.2.1.2 Spojení astrocytů

Astrocyty jsou navzájem spojeny prostřednictvím gap junctions a vytvářejí tak intercelulární síť. Jsou to navzájem propojené kanály umožňující difúzi iontů a prostup relativně velkých molekul z jednoho astrocytu do druhého. Gap junctions jsou otevřené během stavu ischemie a můžou spojit ischemické astrocyty s okolím, což má protektivní účinky při cerebrální ischemii. Gap junctions byly rovněž popsány mezi astrocyty a oligodendrocyty. Oproti tomu nebyly popsány gap junction mezi glií a neurony. [57]

### 2.1.2.2.1.3 Základní typy astrocytů

Morfologie astrocytárních buněk je velmi různorodá. U savců byly pomocí světelné mikroskopie identifikovány tři základní typy astrocytů; radiální glie a fibrilární astrocyty v bílé hmotě a protoplazmatické astrocyty v hmotě šedé. [55]

Radiální astrocyty procházejí celou tloušťkou bílé hmoty, perikaryon je lokalizován buď v těsné blízkosti pia mater, nebo v určité vzdálenosti od ní. Nejvíce se značí na GFAP. Radiální glie vysílá výběžky k axolemě Ranvierových zářezů, výběžky obsahují četné buněčné organely a podílejí se na udržování funkčního stavu membrány axonu a jejího nejbližšího okolí.

Fibrilární astrocyty jsou v bílé hmotě a v optickém nervu. Jejich těla jsou často uspořádána v řadách mezi svazky axonů. Jejich výběžky jsou poměrně hladké a často orientované paralelně s axony. Výběžky fibrilárních astrocytů se rozšiřují do perinodálního prostoru přilehlých axonů.

Protoplazmatické astrocyty jsou to keříčkovité buňky v šedé hmotě s četnými krátkými výběžky vyzařujícími všemi směry. Výběžky jsou vysoce rozvětvené a různých tloušťek. [55]

### 2.1.2.2.2. Oligodendrocyty

Oligodendrocyty jsou buňky menší než astrocyty a mají relativně velké jádro. Tělo těchto buněk vysílá menší počet výběžků větvcích se různými směry.

Oligodendrocyty se vyskytují jako satelitní buňky kolem těl neuronů a jsou s nimi v těsném kontaktu. Rozšířené výběžky těchto buněk se na axony přikládají a za spirálního obtáčení nervových vláken vytvářejí jejich myelinové pochvy. Oligodendrocyty se podílejí na trofice axonu a metabolity mohou přecházet z axonu do myelinové pochvy a naopak. Tím oligodendrocyty vytvářejí a udržují prostředí, ve kterém se axony nacházejí. [8] Moderní studie ukazují, že růst axonů je spojen s myelinovou pochvou. [21]

Rio Hortega v roce 1928 popsal 4 druhy oligodendrocytů, které podle tvaru výběžků označil jako typ I až typ IV, ale k tomuto morfologickému členění nebyl nalezen funkční korelát. [55]

Mori a Leblond v roce 1970 popsal tři třídy oligodendrocytů na základě vzhledu, a to světlé, střední a tmavé oligodendrocyty. Světlé oligodendrocyty jsou největší a tmavé oligodendrocyty jsou nejmenší. Toto rozdělení odráží pořadí zrání oligodendrocytů, kde světlé oligodendrocyty reprezentují nejméně zralé buňky, které se vyvinou v tmavé přes střední-stínový typ. [21]

Funkce oligodendrocytů je zrychlit elektrické potenciály. Hrají tak podobnou roli jako Schwannovy buňky v periferním nervovém systému. Zatímco však jedna Schwannova buňka tvoří myelin pouze pro jeden periferní axon, jedna buňka oligodendroglie vytváří myelin až pro 35 centrálních axonů. Bez oligodendrocytů by byl akční potenciál třicetkrát pomalejší. [21,57]

#### 2.1.2.2.3. Ependymální buňky

Ependymální buňky vystylají dutiny CNS a společně s cévami tvoří plexus choroideus, v němž vzniká mozkomíšní mok. [43] Mnoho těchto epiteloidních buněk má vnější membránu vzájemně spojenou pomocí zonulae adherentes a tight junction formující hematoencefalickou bariéru. [9] V poslední době bylo prokázáno, že tato vrstva je rezervoárem kmenových buněk, které mohou vznikat i v dospělém mozku. [55]

#### 2.1.3 Extracelulární prostor

Buněčné elementy a cévy vyplňují přibližně 80 % celkového objemu CNS a zbývající část, tedy přibližně 20 % celkového objemu tkáně, zaujímá extracelulární prostor. ECP představuje mikroprostředí buněk a důležitý komunikační kanál. Obsahuje nejen ionty, neuropřenašeče, metabolity, hormony a především vodu, ale i molekuly extracelulární matrix. [55]

Velikost extracelulárního prostoru se během neuronální aktivity mění. Iontové přesuny jsou doprovázeny pohybem vody z ECP do buněk a tak nervové a zejména gliové buňky zvětšují svůj objem. Velikost ECP se během normální neuronální aktivity snižuje přibližně na 10 % celkového objemu tkáně. Během patologických stavů, jako je anoxie, dochází k poklesu velikosti ECP až na 4 - 5 % celkového objemu tkáně. [55]

## 2.2 MOZKOVÁ KŮRA

Mozková kůra tvoří největší část mozku. Pokrývá mozkovou hemisféru vrstvou širokou 2 - 5 mm. Je složená z 15 - 25 miliard nervových buněk. Toto číslo vychází z aproximativního odhadu, protože se ví, že 1 mm<sup>3</sup> mozkové kůry obsahuje přibližně 150 000 nervových buněk. [41] Mozková kůra se skládá z množství nervových (gangliových) buněk, z gliových buněk, z nesmírně bohaté sítě nervových vláken, která se mezi buňkami větví. Je zde velmi bohaté cévní zásobení. [55]

Mozková kůra se skládá ze tří druhů neuronů - pyramidových, hvězdicových a vřetenovitých neuronů. Fylogeneticky se dělí na archicortex (allokortex), mesocortex (juxtallocortex), a neocortex (isocortex). [15] Archicortex, fylogeneticky nejstarší, je složen zpravidla ze tří vrstev a je lokalizován v oblasti limbického systému. Obě tyto vývojově starší složky kůry se společně označují jako allocortex. Fylogeneticky mladší mesocortex je složen ze čtyř až šesti vrstev a je lokalizován v oblasti insuly a gyrus cinguli. Většina kůry povrchu hemisfér je vývojově nová - neocortex. [8,15]

Pro lokalizaci funkcí mozkové kůry se používá Brodmannovy cytoarchitektonické mapy. [8]

### 2.2.1. NEOCORTEX

Neocortex člověka zaujímá asi 95,6% plochy mozkové kůry. Má šestivrstevnou základní stavbu, v podstatě všude stejnou (s místními modifikacemi úpravy a rozsahu zastoupení jednotlivých vrstev) a označuje se proto isocortex. [8]

Je substrátem, do něhož klademe vědomí a v němž se odehrává dění duševní. To je umožněno aktivitou vzájemně propojených neuronů vytvářejících polygonální síť

v neocortexu. Zahnuje celou vyšší úroveň smyslového vnímání a psychofyzických funkcí; probíhá zde prezentace předmětů a událostí; je to centrum plánování a procesu rozhodování. [37,64]

Glie a nonneurogliové elementy tvoří téměř 70% objemu neocortexu. Zbytek je z 22% tvořen axony a dendrity; těla neuronů tvoří pouze 8%. [40]

I když základní stavba neocortexu je v podstatě všude stejná, existují významné lokální rozdíly v tloušťce celé kůry, dále v tloušťce jednotlivých vrstev, v zastoupení buněčných typů v jednotlivých vrstvách, v uspořádání vláken jednotlivých vrstev, v množství a úpravě aferentních a eferentních vláken, v mediátorové a enzymové výbavě a ve funkčních vlastnostech neuronů. Dále se vyskytují lokální rozdíly v uspořádání glií, cév, množství pigmentu aj. [8] Vrstva šedé hmoty při vnějším okraji mozku vytváří záhyby (sulci). Tato část mozku se u člověka vyvinula v takovém rozsahu, že jen jejím poskládáním v mnoha přehybech přes sebe, je možné její přizpůsobení tvaru a velikosti lebky. Bez složení do záhybů by pokryla mozková kůra plochu 30krát větší. Kromě většiny mělčích záhybů jsou určité rýhy tak hluboké, aby rozdělily každou z obou hemisfér mozkové kůry na 4 laloky, z nichž každý slouží jedné nebo více specifickým funkcím. [69]

#### 2.2.1.1. Stavba neocortexu

Jednotlivé vrstvy neocortexu mají své cytoarchitektonické uspořádání. Jsou charakterizovány šesti vrstvami, které obsahují buňky lišící se tvarem, hustotou a vzájemnými vztahy. [9]

Lamina I - lamina molekularis - je nej povrchovější vrstva s malým množstvím horizontálních buněk (někdy se používá poněkud klamný název - bezbuněčná vrstva). Celá vrstva je chudá na buňky, bohatá na vlákna a glii. Buňky jsou zde drobné, rovnoběžně s povrchem kůry uloženy a rozvětvené, s četnými dendrity a axonem, které jdou rovnoběžně s povrchem kůry do značné vzdálenosti. [8,40]

Lamina II - lamina granularis externa - je charakterizována četnými perikaryi hvězdovitých (granulárních) buněk a malých pyramidových buněk. Tato vrstva je



na buňky bohatá. Jsou zde četné svazečky nervových vláken, které probíhají většinou paralelně s povrchem kůry. A jsou tu dendrity pyramidových buněk, jejichž buněčné tělo leží v V. a VI. vrstvě. [8,40]

Lamina III - lamina pyramidalis externa - je tvořena převážně těly menších pyramidových neuronů (s apikálními neurony dosahujícími až do lamina I). [8]

Lamina IV - lamina granularis interna - je vrsta s převahou granulárních buněk a s menší účastí buněk jiných typů. V této vrstvě končí bohatým rozvětvením většina vláken přicházející do kůry z thalamu, zejména z jeho specifických jader. Proto je také tloušťka této vrstvy velmi variabilní. Vrstva téměř chybí v motorických okřscích kůry a je naopak silná v místech senzitivních okřsků.

Lamina V - lamina pyramidalis interna - obsahuje hlavně velké pyramidové buňky, které se označují jako Betzovy buňky. Jejich apikální dendrity dosahují až do I. vrstvy. Tato vrstva je hlavním zdrojem axonů, které jdou z kůry do podkorových šedých hmot. Axony Betzových buněk z motorické korové oblasti tvoří asi 3,5% vláken pyramidové dráhy. [7] Pyramidové neurony V. vrstvy jsou dlouhé neurony, jejichž axony tvoří kortikospinální, pyramidové, kortikobulbární, kortikopontinní a kortikorubrální mozkové dráhy, a jsou spojeny s hlavovými nervy, senzorickými a motorickými neurony. [40]

Lamina VI - lamina multiformis - obsahuje neurony s perikaryi různých tvarů, převážně vřetenovité, orientované dlouhou osou kolmo k povrchu kůry. Axony vřetenovitých buněk jdou do bílé hmoty. Touto vrstvou kůry procházejí všechna do kůry vstupující a z kůry vystupující vlákna. [64]

## **2.3 HEMATOENCEFALICKÁ BARIÉRA**

Na počátku 20. století byly provedeny první studie podporující pravděpodobnost existence hematoencefalické bariéry. Bylo zjištěno, že intravenózně aplikované barvivo obarví prakticky všechny tkáně v těle kromě mozku. [25]

Hematoencefalická bariéra (blood brain barrier) představuje multiceulární membránové rozhraní, které významně omezuje přestup většiny látek z krve do intersticiální tekutiny

mozku. [54] Zamezuje prostup v krvi rozpuštěných substancí (elektrolytů, proteinů) nebo buněk. Extracelulární prostředí mozku je tímto způsobem odděleno od krve, což má zabránit vystavení nervových buněk kolísání elektrolytů, transmiterů, hormonů, růstových faktorů a imunitních reakcí v krvi. Může se otevřít za patologických podmínek. [52]

Hematoencefalická bariéra omezuje výměnu látek mezi krví a mozkiem převážně na kyslík, oxid uhličitý a vodu. Některé jiné látky (např. aminokyseliny a glukosa) procházejí touto bariérou pomocí zvláštních transportních mechanismů, zatímco makromolekulární látky (např. bílkoviny) neprojdou vůbec. [8]

Buněčný základ BBB je na mikrovaskulární úrovni CNS a sestává z endoteliálních buněk spojených pomocí tight junctions mezi endoteliálními buňkami (tight junctions je velmi těsné spojení pomocí zonulae occludens, čili dvojic plazmatických membrán se spojenou vnější membránou). [60] Tyto membrány tvoří pásy kolem endotelových buněk a zabraňují difúzní výměně molekul větších než 20 nm. [26,55] Navíc udržování funkce BBB je závislé na optimální funkci perivaskulárních mikroglíí, astrocytů a bazální membrány, které jsou připojeny ke kapilárám a postkapilárním venulám v CNS. [60]

Za normálních fyziologických podmínek BBB poskytuje ochranu CNS přísnou regulací vstupu buněk plazmy a imunitních buněk do nervové tkáně. [60] Centrální nervový systém je imunologicky odlišný, což je dáno anatomickou a histochemickou odlišností nervové tkáně. Za normálních okolností hematoencefalická bariéra nepropouští cirkulující elementy imunitního systému, a také nebyla nalezena lymfatická drenáž, kterou by se antigeny z CNS dostávaly do různých imunitních kompartmentů v periférii. [42] Různorodá zranění CNS, zahrnující epileptické záchvaty, infekce, traumatické a ischemické změny, způsobují přechodné změny ve fyziologii i struktuře BBB. [60] Jako hlavní struktura BBB zajišťuje iontovou homeostázu v centrálním nervovém systému. Permeabilita pro jednotlivé molekuly je regulována několika mechanismy a cestami transportu [53]: 1) paracelulárně skrze tight junctions pro vodě rozpustné látky s molekulovou vahou menší než 180; 2) transcelulární difúzí lipofilních substancí; 3) transcelulární cestou na transportních proteinech, např. pro glukózu a některé aminokyseliny; 4) přenos zprostředkovaný endocytózou pomocí specifických receptorů

např. pro inzulin a transferin; 5) Adsorptivní endocytóza a transcytóza pro kationizované plazmatické proteiny pomocí transportních vezikulů. [26,55]

Vrstva endotelových buněk je ze zevního povrchu obalena kapilárními výběžky astrocytů, které jsou propojeny pomocí gap junctions, ale látky mezi nimi procházet mohou, takže přestože se astrocyty na formování hematoencefalické bariéry účastní, hlavní mechanickou překážku tvoří buňky endotelu. [55]

BBB velmi efektivně ochraňuje mozek před běžnými infekcemi, a tak jsou mozkové infekce velmi vzácné. Nicméně protilátky neprostupují BBB a proto je mozková infekce velmi vážná a složitá na léčbu.

Výjimkou jsou oblasti tvořící tzv. cirkumventrikulární orgán (lamina terminalis, subfornikální a subkomisurální orgán, epifýza, eminencia mediana, neurohypofýza a chorioidální plexy), kde není hematoencefalická bariéra vytvořena. V těchto několika oblastech mozku proto látky, včetně neuropeptidů a bílkovin, přestupují z krve do intersticiální tekutiny mozku a mozkomíšního moku téměř bez omezení. [54]

## **2.4 CÉVNÍ MOZKOVÁ PŘÍHODA**

### **2.4.1 Úvod**

Cévní mozková příhoda (iktus) je jeden z hlavních důvodů invalidity a morbidity, zvláště mezi starší populací a poměr počtu nemocných k počtu obyvatel rychle roste zejména v západních zemích. [47]

Cévní mozková příhoda je náhle vzniklá mozková porucha, která je způsobena poruchou cerebrální cirkulace ischemií nebo hemoragií. [1] Během ischemické mozkové příhody, která reprezentuje většinu (88%) iktů, dojde ke snížení nebo zastavení cirkulace krve, což zbavuje neurony nezbytných substrátů. Neustálý přísun kyslíku a glukózy je nezbytnou podmínkou zachování všech funkcí mozkové tkáně, jelikož rezervní energetické kapacity centrální nervové soustavy jsou mizivé. [13] Efekt

ischémie se dostavuje velmi rychle, protože v mozku nedochází ke skladování glukózy, hlavního energetického substrátu, a mozková tkáň není uzpůsobená k anaerobnímu metabolismu. [51] Další etiologií je hemoragie, která vzniká z hlubokých penetrujících cév, a příčinou poškození mozkové tkáně je přerušení propojovacích cest a způsobuje lokalizované tlakové poškození. [51] Intracerebrální krvácení představuje okolo 9% a subarachnoidální krvácení 3%. [45]

CMP je urgentní stav vyžadující rychlou diagnostiku a včasné zahájení terapie. Nemocní s CMP jsou v prvních 24 hodinách ohroženi infarktem myokardu, arytmií, akutním přetížením srdce, poruchami vnitřního prostředí. Včasná detekce a léčba těchto komplikací výrazně zlepšuje prognózu a výsledný stav nemocných. [36]

#### 2.4.2 Ischemická cévní mozková příhoda

Ischemická cévní mozková příhoda je důsledkem reverzibilního nebo permanentního deficitu mozkové artérie v určité oblasti mozkové tkáně s následným poškozením neuronů a mozkové glie až jejich nekrotizací. Poškození krevního průtoku postihne buď celý mozek (globální ischémie) nebo je lokalizována do určité části (fokální ischémie). Globální cerebrální ischemie je například při kardiálním selhání, což způsobí nedostatečné dodání kyslíku a glukózy mozku a vede k neuronálnímu poškození. Fokální ischemie je způsobena embolem nebo lokální trombózou, které uzavřou mozkové cévní řečiště některé hlavní tepny, nejčastěji arteria cerebri media. Symptomy CMP závisí na zasažené vaskulární oblasti (zahrnují hemiparézu, afázii a poruchy zraku). [21]

Ke klinické manifestaci ložiskového poškození mozku ischemií dochází až po vyčerpání autoregulačních mechanismů, které zajišťují konstantnost dodávky kyslíku a glukózy mozkovým řečištěm. [36] Absolutní průtok krve mozkovou tkání je přibližně 800ml/min. [54] Při poklesu mozkového průtoku na  $\frac{1}{3}$  normy (tj. na 20ml/100g/min) se manifestuje klinický obraz CMP, protože neurony ztrácejí informační funkci, ale jsou nadále životaschopné. [37] Pro tento stav se vžilo označení ischemický polostín (penumbra) a včasným zvýšením průtoku lze funkci neuronů obnovit. Při dalším poklesu regionální perfuze mozkové tkáně (pod 12ml/100g/min) dochází k ischemické

kolikvační nekróze. Časový interval, kdy je možné obnovou cirkulace zachránit ischemií poškozené neurony je asi 3-6 hodin (vzácně až 48 hodin) od vzniku poruchy perfuze. [38,34]

### 2.4.3 Statistické údaje

Cévní onemocnění mozku a míchy jsou nejčastější příčinou hospitalizace. Roční výskyt CMP u nás je 150-200/100 000 obyvatel, zaujímá 3. místo v příčinách smrti po chorobách srdce a rakovině. [46] Celosvětově se incidence odhaduje na 4 mil., z toho více jak 0,5 mil. v Evropě. [1] To znamená roční výskyt CMP mezi 90-160 na 100 000 obyvatel. [20] Statistiky Spojených Států udávají roční výskyt CMP u 700 000 obyvatel ročně. Kolem 500 000 prodělá první ataku a 200 000 opakovanou ataku. [43] Ve Spojených Státech se odhaduje počet přeživších lidí po iktu na 5 miliónů obyvatel a cena péče o lidi postižené iktem za rok 2007 se blíží 62 miliardám dolarů. [43]

Ačkoliv po prodělání cévní mozkové příhody (CMP) přežívá v průměru osm z deseti pacientů, je velice pravděpodobné, že dobu delší než 10 let přežijí jen čtyři z nich. Po prodělání CMP je totiž do deseti let zhruba 15 % nemocných postiženo další (tentokrát již smrtelnou) cévní mozkovou příhodou a 40% postižených do 10 let umírá na infarkt myokardu. CMP je totiž jen jedním z možných projevů onemocnění cév. [56]

CMP však s sebou nese jen velké riziko úmrtí, ale též velkou pravděpodobnost dlouhodobé invalidity. 50% přeživších nemocných má určitý stupeň hemiparézy, 30% není schopna chodit bez pomoci/opory, 20% postižených potřebuje pomoc při běžných denních úkonech. [43,56] Proto má velký význam aktivní vyhledávání rizikových osob a preventivní ovlivňování všech zjištěných rizikových faktorů. [1]

### 2.4.4 Patofyziologie cerebrální ischemie

Dřívější pozorování mechanismů ischemického poškození bylo zaměřeno na relativně jednoduché biochemické a fyziologické změny, které vyplývaly z přerušení cirkulace. Těmito změnami jsou ztráta vysokoenergetických sloučenin, acidóza vzhledem k anaerobnímu vytváření laktátu, nemožnost obnovení průtoku kvůli otoku astrocytů

s kompresí mozkových kapilár. Poslední výzkumy však ukazují, že problém je daleko více komplexnější než se předpokládalo a závisí na mnoha faktorech. [9]

Mozek se chová za normálních okolností jako vysokoprůtokový nízkoodporový systém. Nízkým cerebrovaskulárním odporem je umožněno zachování toku krve v průběhu diastolické fáze pulzové vlny. Výše průtoku krve mozkem je dána poměrem perfuzního tlaku a cerebrovaskulárního odporu. Dalšími faktory, které ovlivňují mozkovou perfuzi, jsou reologické vlastnosti krve, především viskozita a průsvit mozkových cév. Autoregulací mozek zachovává konstantní perfuzi během výkyvů systémového krevního tlaku a srdečního výdeje přibližně v rozmezích středního arteriálního tlaku 60–150 mm Hg. Autoregulačními mechanismy jsou komplexní změny neurogení, myogenní a metabolické povahy. Patří mezi ně kontrakce a relaxace hladké svaloviny v arteriolách, uvolňování vazoaktivních látek –  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , adenosinu a endoteliálních faktorů, především oxidů dusíku. [54]

Výzkum se dále posunul směrem k biochemickým a celulárním mechanismům, molekulárním a genetickým aspektům. Je evidentní, že musí být zvažovány oběhové, metabolické, celulární a molekulární mechanismy, jestliže chceme porozumět, léčit a předcházet následkům fokální cerebrální ischemie. Je stále více uznávána účast nonneuronálních buněk, zvláště gliových buněk. [21]

Hlavními patogenními mechanismy ischemické kaskády jsou excitotoxicita (s rozvojem od desítek minut do 1-2 hodin od vzniku příhody), zánět (rozvoj po hodinách až dnech) a nekróza a apoptóza (s maximem rozvoje po dnech). [20]

Odpověď mozkové tkáně na ischemii je uniformní. Pokud dojde ke snížení perfuze pod kritickou hodnotu, odumírají nejprve neurony, pak astrocyty, poté oligodendroglie a jako poslední mikroglie. [54]

#### 2.4.4.1 Biochemické změny

Během 20 vteřin po přerušení krevního toku mozkem, za podmínek normotermie, mizí EEG, pravděpodobně následkem nedostatku látkové výměny. Během pěti minut dojde k vyčerpání ATP, která je potřebná k udržování iontové homeostázy. [9,21]

Po okluzi přívodné tepny se zvyšuje extracelulární koncentrace excitačních neurotransmiterů, zejména glutamátu, a jím zprostředkovaná toxicita je klíčovým procesem vedoucím ke smrti neuronů po ischemii. [20] Vyčerpání energie kvůli nedostatku energetického substrátu (kyslíku, glukózy) vede k depolarizaci neuronů. [21] Extrémní excitabilita neuronu s depolarizovanou membránou, vede k frekventním výbojům s prohlubujícím se energetickým kolapsem buňky, k excitotoxickému poškození, na jehož konci je apoptóza nebo nekróza. [19] Dochází také k depolarizaci astroglie, vedoucí k uvolnění glutamátu do extracelulárního prostoru. V ten samý čas je energeticky závislá reabsorpce glutamátu pomocí astrocytárních buněk zastavena, což vede k jeho dále rostoucí koncentraci v extracelulárním prostoru. [21] Dochází k masivní aktivaci glutamátových receptorů, což je jeden ze základních spouštěčů biochemické kaskády. [19] Extracelulární glutamát po depolarizaci membrán aktivuje postsynaptické N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA receptory) a  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové receptory (AMPA receptory). Dochází k masivnímu vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$  do buněk a zvýšení koncentrace  $\text{K}^+$ . Zvýšením hladiny intracelulárního natria se prohloubí depolarizace, vzniká otok buněk a otevřou se napěťově řízené kalciové kanály. Zvýšený obsah kalcia v buňce během několika minut aktivuje cytotoxické kaskády. [20,52] Hladina extracelulárního kalcia má zásadní význam pro integritu buněčných junkcí. Pokles extracelulárního kalcia poruší buněčné adheze i těsné junkce endotelu kapilár, poruší se také cytoskeletální integrita, a to způsobí poruchu integrity a funkce BBB. [20]

Nejčasnějšími změnami vznikajícími již kolem 20. minuty od vzniku ischemie je zhroucení sodíko-draslíkové pumpy závislé na ATP. Zánikem její funkce dochází k intracelulárnímu hromadění vody. Intracelulární hromadění vody dále stupňuje zvyšující se koncentraci glutamátu, která zablokuje kalciové kanály. Intracelulární cytotoxický edém je první známkou zobrazitelnou na morfologických obrazech MRI a CT. [54]

#### 2.4.4.2 Histologické změny

Ischemické změny v architektuře buňky začnou téměř tak rychle jako biochemické ischemické změny. Během několika sekund od počátku ischemie téměř úplně vymizí

mozkový intersticiální prostor. Ztráta intersticiálního prostoru je následkem otoku buněk, který vzniká v důsledku nadměrného průniku sodíku a selháním iontové regulace buněčné membrány.

Hemodynamické, iontové a metabolické změny neovlivňují ischemickou oblast stejně. V centru ischemické oblasti je krevní průtok menší než 10% normy a buňky této oblasti rychle zaniknou důsledkem nekrózy. Tato oblast je nazývána jádrem ischemie (core). Mezi centrem ischemické oblasti a normální mozkovou tkání leží tkáň, která dosud nepropadá nekróze a je nazývána polostínem ischemie (penumbra). Je to místo s redukovaným krevním průtokem (20-60% normy), obsahující funkčně oslabené, ale živé buňky s udržovanou iontovou homeostázou. Jestliže je krevní průtok v této oblasti snížen na dlouhou dobu a energetické zásoby jsou vyčerpány, pak se rozsah infarktového ložiska rozšíří i na tuto oblast. Ischemická penumbra je potenciálně záchrany schopná farmakologickým zásahem. [13,21,23] Mezi oblastí normální perfuze a oblastí penumbry je různě široká oblast oligémie, kde perfuze dosud stačí nejen na zachování integrity tkáně, ale i na zachování neuronální aktivity. [13] I v této oblasti se v prvních několika hodinách po okluzi intermitentně nalézá přechodná depolarizace, která negativně ovlivňuje mikrocirkulaci v penumbře, protože depolarizace zvyšuje krevní proud pouze v tkáni, kde je perfúze minimálně poškozena, tj. na periferii ischemické penumbry. [20]

Asi po 4 až 6 hodinách je ischemie dokončena, počíná se svrašťování neuronů a dochází k rozrušení synaptických spojení. Do 24 hodin je morfologicko-funkční dezintegrace mozkové tkáně zcela dokončena a z periferie do centra začíná úklidová fáze vývoje ischemie. Současně s úklidovou reakcí se vyvíjí porucha hematoencefalické bariéry, která umožňuje pronikání látek z intravaskulárního prostoru přímo do mozkové tkáně. K restituci hematoencefalické bariéry dochází až po 7 až 14 dnech. [54]

Obnovení průtoku se může v postižené oblasti objevit spontánně – zvýšením perfuzního tlaku nebo samovolnou trombolýzou vnitřními mechanismy. Druhou možností je podání trombolytika ať již systémově intravenózním přístupem, nebo lokálně intraarteriálním endovaskulárním přístupem. Pokud nedojde k obnovení perfuze, pak se vlivem selhání autoregulačních mechanismů postupně šíří ischemická nekróza do celé oblasti s kritickou perfuzí a jádro ischemie se zvětšuje na úkor polostínu. [13]



Reperfuze po rekanalizaci uzavřené cévy je jednak korelátem nejefektivnější léčby, ale může být spojena s reperfúzním poraněním s poškozením BBB. Ischemie a reperfuze spouští rozdílné intracelulární pochody. Během reperfuze nejsou poškozené mitochondrie schopny využít kyslík, pokračuje pokles nitrobuněčné ATP, produkce volných kyslíkových radikálů, aktivace proapoptotických signálů a rozvíjí se zánět. [20] I zánik buněk je příčinou zánětu, který také poškozuje buňky v ischemické oblasti. [53]

Úprava krevního toku po ischémii způsobí paradoxně reperfúzní poškození. [20] Při plné reperfuzi do těžce poškozené tkáně masivně imigrují leukocyty, spustí se zánětlivá kaskáda za masivní produkce volných radikálů. [19] Volné kyslíkové radikály jsou příčinou nadměrné destrukce buněčných membrán, proteinů a DNA a vedou k smrti buněk. Dochází ke stavu označovanému jako oxidační stres. Reperfuze iniciuje postischemickou zánětlivou reakci, která je hlavním spoluúčastníkem sekundárního poškození ischemické tkáně. [20]

#### 2.4.4.3 Zánět

Zánět je obranná reakce organismu a jeho tkání proti škodlivým podnětům. Cílem je poškození odstranit nebo je přinejmenším lokálně ohraničit a kromě toho jeho příčinu eliminovat. Zánětlivé reakce se objevují v mozku při různých postižení CNS, včetně autoimunitních, neurodegenerativních a epilepsie. [53,60]

Zánět v mozku je stav, který je charakterizován přítomností řady molekul (cytokinů a mediátorů zánětu), které nejsou nebo jsou jen stěží zjistitelné za fyziologických podmínek. Tyto molekuly jsou produkovány buňkami imunitního systému jako odpověď na infekci nebo jiný druh patologie. Mnoho signálů uvolňovaných během časné excitotoxické fáze jsou účinnými induktory zánětu. [60] Mozkové buňky, jako neurony, astrocyty a mikroglie, jsou schopné syntetizovat mediátory jako jsou cytokiny a chemokiny. [48] Zánětlivá reakce je jedním z hlavních mechanismů reperfuzního poškození, při němž je definitivně narušena hematoencefalická bariéra. [19] Hlavními rysy zánětu jsou poškození cévní stěny, tvorba edému, infiltrace ischemické tkáně makrofágy.

Zánětlivou odpověď výrazně akcentuje nekrotický rozpad buňky. [19] K buněčné nekróze dochází při ischemii, kdy dojde k ireverzibilnímu poškození buněčné membrány s následnou poruchou osmotické rovnováhy buňky s výslednou vnitřní aktivací proteáz, které buňku dále rozrušují. Na uvolnění obsahu buňky reaguje okolí zánětlivou reakcí. [30]

Prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny a související molekuly byly popsány v CNS a plazmě, v experimentálních modelech epileptického záchvatu a v klinických případech epilepsie. Zánět vyžaduje vrozený i získaný imunitní systém. [60]

Zánětlivá odpověď na poškození tkáně je zahájena rychlou produkcí mnohočetných zánětlivých mediátorů [53] Interleukin IL-1 a TNF- $\alpha$  (tumor necrosis faktor alpha) jsou dva klíčové prozánětlivé cytokiny v nastavení cerebrální ischemie. Jsou primárně tvořeny aktivovanými mikroglie a makrofágy. Mikroglie a makrofágy jsou nepochybně klíčovými buňkami postischemické zánětlivé odpovědi. [20] IL-1 a TNF- $\alpha$  zvyšují adhezivitu neutrofilů pro leukocyty. Leukocyty se významně podílejí na destrukčních změnách provázejících reperfuční fázi ischemie. [20] V akutní fázi zánětu jsou to především monocyty, které pronikají do mozkové tkáně, následované neutrofilními granulocyty a T-buňkami. [54]

Je stále více jasné, že konečný výsledek zánětlivé reakce na přežití buňky a její funkce, je vysoce závislý na rozsahu, ve kterém jsou vyprodukovány cytokiny, na času, po který je tkáň vystavena zánětu a na rovnováze mezi neutrofickými a zánětlivými faktory produkovány buňkami. [60]

#### 2.4.4.4 Role astrocytů během ischemie

Astrocyty mají centrální úlohu v regulaci extracelulárního prostředí neuronů CNS. [20] Jsou poměrně odolné vůči nedostatku živin a jsou zaktivovány velmi brzy po ischemii uvnitř ložiska a v okolí. [21] Odstraňují za normální situace glutamát, který je neurotoxický, protože je zodpovědný za vzestup intracelulárního obsahu  $\text{Ca}^{2+}$ . Během ischemie zvyšující se extracelulární koncentrace  $\text{K}^+$  inhibuje absorpci glutamátu na 10%. Nedostatek živin a kyslíku vedou k navození proliferace a hypertrofie astrocytů a mikroglie. [60] Astrocyty v časně fázi zduří, protože nasávají  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  a vodu,

a tak regulují extracelulární prostředí a podporují extracelulární homeostázu. Podílejí se na odstraňování volných kyslíkových radikálů. [20] V aktivním stádiu jsou astrocyty metabolicky hyperaktivní se zvětšeným počtem mitochondrií a zvětšením ribozomů a Golgiho komplexu. Reaktivní astrocyty zvětšují produkci mnoha mediátorů, receptorů a kanálů, které jsou zodpovědné za změněný funkční stav těchto buněk během ischemie. Zvláště důležitá funkce astrocytů po CMP zahrnuje udržování iontové a vodní homeostázy. Zeslabují excitotoxické podmínky v poškozeném parenchymu. [21]

Astrocyty jsou schopny podporovat funkci nervové tkáně během ischemie tím, že umějí po limitovanou dobu produkovat glykolyticky ATP. Astrocyty obsahují glykogen, jsou schopny jej využívat anaerobní cestou k tvorbě ATP. Tato podpora tvorby ATP může být významná pro oblast penumbry, protože se do této tkáně dopraví reziduálním CBF více glukózy než extrahovatelného kyslíku. Tvorba ATP taky umožňuje astrocytům, aby byly schopny v období časně hypoxie absorbovat glutamát. Anaerobní produkce ATP v astrocytech je ovlivněná úrovní pH tkáně (lokální acidózou) a jakmile klesne pod 6,6, dochází k její blokádě a následnému ireverzibilnímu poškození astrocytů a masivnímu vyplavení glutamátu. Ne všechny funkce astrocytů během ischemie jsou neuroprotektivní. Během hypoxie mohou také trvale tvořit a uvolňovat glutamát. [20] Reaktivní astrocyty jsou hypertrofické a hyperplastické a můžou být identifikovány zvětšenou expresí GFAP. [21] (viz. obr.11)

#### 2.4.4.5 Aktivace mikroglie

Mikroglie jsou buňky monocytomakrofágového původu se schopností fagocytovat. Vyskytující se ve všech částech nervového systému. Hrají klíčovou roli za patologických podmínek. [68]

Osídlují nervový systém z krevního řečiště před uzavřením hematoencefalické bariéry a jako jediné buněčné elementy zajišťují imunitní reakce v CNS. Aktivace mikroglie je charakteristickým znakem mozkové patologie. [10] Při poranění CNS se aktivují a fagocytózou odstraňují buněčné zbytky z extracelulárního prostoru. V dospělosti v případě porušení hematoencefalické bariéry se na těchto procesech podílejí makrofágy vstupující do extracelulárního prostředí z cévního řečiště. [55]

#### 2.4.4.6 Změny propustnosti hematoencefalické bariéry

Cévní patofyziologie v akutní fázi je charakterizována hemodynamickými a metabolickými změnami, které vyústí v poškození BBB a poškození cévního tonu. [20]

Různé druhy poškození CNS (ischemické a traumatické změny, infekce) způsobují přechodné změny v BBB. Během zánětu, zvětšená produkce cytokinů endoteliálními buňkami BBB, cirkulující imunitní buňky a mozkový parenchym mikroglíí a astrocytů mají za následek aktivaci metaloproteinázy a katabolismus kyseliny arachidonové na úrovni mozkové mikrocirkulace. To přispěje ke zvýšení propustnosti BBB. [60] V regulaci cévního tonu a cévní struktury jsou dále významné kyslíkové radikály, oxid dusnatý, endotelin-1. Způsobují vazodilataci po reperfúzi, zvyšují agregabilitu destiček, poškozuje endotelie se zvýšením permeability BBB. Dochází k extravazaci albuminu a ostatních vysokomolekulárních složek plasmy, rozvíjí se vazogenní edém a zvyšuje se intrakraniální tlak. [20]

Hladina extracelulárního kalcia má zásadní význam pro integritu mezibuněčných junkcí. Pokles extracelulárního kalcia poruší těsné junkce endotelu kapilár, poruší se cytoskeletální integrita a to způsobí poruchu integrity a funkce BBB. [20]

Signály z ničených buněk nebo pocházející z molekul vstupujících do mozku skrz zničenou BBB mohou zahájit zánětlivou reakci. CNS ukazuje silnou zánětlivou reakci nejen na infekční agens, ale také na široké spektrum poškození jako je ischemie, trauma nebo toxické poškození mozku, nebo na epileptický záchvat. [60]

#### 2.4.5 Klinický obraz cévní mozkové příhody

Klinická symptomatologie ischemických příhod je velmi variabilní. Od velmi lehkých až po těžké smrtelné stavy. Záleží na rozsahu, tíži a trvání ischemie. Vlastní ischemické ložisko může být částečně zásobeno kolaterálním oběhem ze sousedních anastomozujících arteriol, takže různý stupeň metabolismu kyslíku může být zachován. [1] Symptomatika je dána lokalizací poruchy krevního průtoku, tj. podle oblasti zásobované příslušnou cévou. [53]

Ischemické ikty postihují především starší osoby. Při postupně vznikajícím trombotickém uzávěru je rozvoj neurologické symptomatologie postupný. Nemocný má např. pocit, že jej polovina těla neposlouchá, že jsou končetiny těžké, neobratné. Vývoj může mít dokonce kolísavý průběh, stav se upraví, opět zhorší, až se nakonec celý klinický obraz vyvine. Velmi často dojde ke vzniku malacie ve spánku, kdy je krevní oběh zpomalen. [1,18]

Dříve se přisuzoval velký význam cévě, která byla uzavřená. Dnes víme, že je poměrně velká variabilita v kompenzačních mechanismech cévního řečiště a existují i relativně velké variability cév. Užívá se proto častější označení ischemických syndromů podle topiky léze. Přesto je však nutno znát symptomatologii jednotlivých cév. [38]

#### Syndrom uzávěru a. cerebri media

Jde o nejčastěji se vyskytující syndrom uzávěru mozkové tepny. Hlavní příznakem je kontralaterální centrální hemiplegie, to znamená těžké postižení horní končetiny, je tendence k flekční kontraktuře v lokti a v ruce, k addukci v kloubu ramenním, k extenzní kontraktuře dolní končetiny s ekvinovarózním postavením nohy. [38] Dochází k výpadkům citlivosti (hemianestezii). Dalšími výpadky jsou stočení očí (déviation conjugée), hemianopsie, motorické a senzorické poruchy řeči, poruchy prostorového vnímání, apraxie a hemineglect syndrom. [53]

#### Syndrom uzávěru a. cerebri anterior

Syndrom se projevuje výraznou parézou kontralaterální dolní končetiny a poměrně lehkou parézou horní končetiny. Přítomná je psychická alterace frontálního typu, velmi často agitovanost a zmatenost, která může připomínat až počínající psychózu. [38]

#### Syndrom uzávěru a. cerebri posterior

Hlavní příznakem je homonymní anopsie kontralaterálně. Je porušena fixace pohledu a chybí sledující pohyby očních bulbů k hemianopické straně, jako jsou automatické pohyby očních bulbů při čtení. Dochází k prostorové dezorientaci spojené s prostorovým vnímáním. Při poruše dominantní hemisféry vzniká alexie, ztráta schopnosti poznat zrakem písmena, slova, ale i jiné znaky. U poruch v nedominantní hemisféře si postižení poruchu zorného pole ani neuvědomují. [38] Při oboustranném uzávěru nastává úplné oslepnutí. [53]

### Syndrom uzávěru a. choroidea anterior

Uzávěr této artérie způsobí kontralaterální hemiparézu, hemihypestezii a hemianopsii a někdy talamický syndrom. Bývá celková hyperpatie, poněvadž talamus dodává aferentním podnětům afektivní obsah nebo „citový náboj“. [38] Jsou-li postižena bazální ganglia, vzniká hypokineze. [53]

### Syndrom uzávěru a. basalis

Pokud je uzávěr úplný, stav není slučitelný se životem. Nastává obrna všech končetin (tetraplegie) a očních svalů, porucha dechu a kóma. Částečný uzávěr je charakterizován poruchou vědomí různého stupně, poruchou zraku, někdy optickou gnostickou poruchou až kortikální slepotou. Vždy se objevuje vertigo, nauzea, vomitus. Infarkty větví a. basilaris mohou poškodit mozeček, střední mozek, Varolův most a prodlouženou míchu. [38,53]

## 2.4.6 Terapie náhlých mozkových příhod

### 2.4.6.1 Terapie akutního stádia ischemické CMP

Výsledný efekt léčby záleží na rozsahu vlastní léze a možnostech kolaterálního oběhu. Kolem vlastního infarktu je vždy zóna funkčního deficitu, ischemie nebo edém, která je schopná reparace a kterou můžeme léčbou ovlivnit. Důležitý je časový faktor: začít s léčbou co nejdříve, ve fázi, kdy ještě nedošlo ke strukturálním změnám a je zachován metabolismus. Původně funkční reverzibilní deficit se může po určité době (která je individuální - několik hodin, ale i dnů) změnit na irreverzibilní strukturální lézi. [1]

Farmakoterapie akutního ischemického iktu je v současnosti možná léky obnovujícími makrocirkulaci a mikrocirkulaci v oblasti ložiskové ischemie, neuroprotektivními léky a snižováním nitrolebního tlaku. [20] Optimální lék, který by prokazatelně zajistil všechna kritéria léčby akutního ischemického iktu, dosud neexistuje. Těžiště léčby je v komplexu celé řady opatření. [1]

Neuroprotektivní terapie je aplikace léků, které pomáhají k normální činnosti neuronů omezených chorobným stavem v nejširším slova smyslu. [38] Neuroprotektce má ovlivňovat ischemickou kaskádu a zabránit její progresi a zvýšit šanci na přežití

neuronů a gliových buněk v oblasti penumbry. Základní předpokladem neuroprotektivního působení a tím ovlivnění ischemie je zachování zbytkového krevního proudu v ischemickém ložisku, který umožní dodávku léku do této oblasti. [20]

Protitrombotická léčba se používá s cílem ovlivnění tvorby a následné embolizace trombu na aterosklerotickém plátu a ovlivnění agregace trombocytů. Léčbu zahajujeme co nejdříve po vzniku iktu, přestože její význam je více profylaktický a slouží k zábraně další progresse nebo recidivy.

Trombolytická léčba kvůli rozpuštění trombu pomocí trombolyticky aktivní substance a recirkulace. Je nutné ji zahájit do 3 hodin po vzniku iktu. Hlavním rizikem této léčby je možnost krvácení.

Vazoaktivní látky vazodilatací zlepšují celkovou i regionální cirkulaci. Nepůsobí však v ischemickém ložisku s vazoparalýzou, proto jejich význam je spíše v chronickém stádiu. [1]

#### 2.4.6.2 Rehabilitace po cévní mozkové příhodě

Cévní mozkové příhody jsou jedním z nejčastějších neurologických onemocnění. Ačkoli pokroky v diagnostice a léčbě nesporně zlepšily přežití po iktu, je málo prokázaných metod léčby, které výrazně ovlivní neurologické postižení. Zlepšená kvalita léčby v akutní fázi CMP snížila mortalitu a prodloužila délku života postižených, ale disabilita zůstává významným problémem zdravotní péče. [59]

Doba zotavení se z ischemického iktu je relativně variabilní, ale největší zlepšení nastává během 1-6 měsíců. [4] Návrat postižených funkcí závisí na rozsahu poškození a kvalitě rehabilitační péče. Díky soustavné a časně rehabilitaci se klinický obraz a zvláště průběh z hlediska stupně trvalých následků podstatně změnil. Cílem je dosáhnout maximálního stupně fyzické a psychické nezávislosti. [18,46,66] Vhodná léčebná rehabilitace může zlepšit stav nemocného. Minimalizuje poruchu, kompenzuje omezení v denních činnostech a usnadní návrat do běžného života. [59]

V akutním stadiu se zaměřujeme na prevenci dekubitů, kontraktur a udržení co nejlepší pohyblivosti v jednotlivých kloubech. Léčba chronického stadia se řídí neurologickým deficitem, který je dán především poruchou hybnosti, řeči, někdy závratěmi a poruchou rovnováhy. Léčba musí být včasná, intenzivní a opakovaná. Důraz na včasnou léčbu znamená prevenci rozvoje abnormálních pohybových vzorů, aby se pacient nenaučil kompenzovat postiženou stranu pomocí nepostižené. [46,66]

### **3 CÍLE A HYPOTÉZY**

#### **3.1 CÍLE**

Cílem diplomové práce bylo popsat změny, které se dějí v oblasti ischemické mozkové tkáně u potkanů postnatálního věku 12 a 25 dní, která byla navozena aplikací endotelinu-1.

- 1) Provést kvalitativní hodnocení mozkového poškození
- 2) Provést mikroskopickou identifikace poškozených neuronů a hypertrofických astrocytů
- 3) Zjistit, zda a v jakém rozsahu došlo k porušení hematoencefalické bariéry
- 4) Zjistit vzájemný soulad mezi narušením hematoencefalické bariéry, „umírajícími“ neurony, aktivací mikroglie

#### **3.2 HYPOTÉZY**

- 1) Ischemická cévní mozková příhoda má za následek poškození mozkové tkáně. Předpokládáme, že dochází k poškození neuronů v postižené oblasti a k otevření hematoencefalické bariéry.
- 2) Jsou aktivované gliové buňky a dochází k infiltraci poškozeného místa imunitními buňkami, jakožto reakce na ischemické poškození.



## 4. VÝZKUMNÁ ČÁST

### 4.1 METODY

#### 4.1.1 Experimentální zvířata

Tato práce probíhala formou experimentu. Experiment proběhl na potkanech rodu Wistar postnatálního věku 12 (P12; n=8) a 25 dní (P25; n=9). Den narození byl stanovený jako den 0. Zvířata byla držena ve stabilní sociální skupině pod kontrolou vnějšího prostředí (teploty  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  a vlhkosti 50-60%, za 12 hodinového střídání světla a tmy) s volným přístupem ke krmivu a k vodě. Experiment byl schválen etickou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České Republiky. S laboratorními potkany bylo zacházeno v souladu s platnými směnicemi pro práci s laboratorními zvířaty (vyhl. 265/19 Sb.)

#### 4.1.2 Fokální mozková ischemie

V roce 1985 byl popsán vazokonstrikčně působící oligopeptid syntetizovaný endoteliálními buňkami a krátce poté byl tento faktor klonován a podrobně analyzován. Vzhledem ke svému původu dostal jméno endotelin (ET). [27] Endotelin-1 je obecně považován za nejsilnější vazokonstriktor s dlouhotrvajícím účinkem. [58] Buňky hladké svaloviny vazbou s ET-1 zprostředkovávají vazokonstrikční a proliferační odpověď tím, že zvyšují influx  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a dochází k mohutné vazokonstrikci. [20] Několik minut po aplikaci daného množství ET-1 do kůry mozkové dochází k rychlé redukci lokálního krevního průtoku následovanou rozvojem fokální léze. Dochází k tvorbě poměrně uniformních lézí, s výrazným lemem ischemické penumbry. [27,58] Bylo provedeno mnoho studií, kde byl ET-1 aplikován do blízkosti arteria cerebri media. Alternativní přístup k takovýmto modelům je vstříknutí ET-1 přímo do mozkového parenchymu. V takovémto případě rozsah poranění souvisí s dávkou ET-1 a neuronové poškození je více omezené než při okluzi a. cerebri media. Proto fokální injekce do mozkového parenchymu byla navrhována jako možný model lidské CMP. [31]

Operace byla provedena při inhalační anestézií pomocí halotanu. Anestézie byla navozena v indukčním boxu a poté byla zvířata přemístěna do stereotaxického aparátu s dýchací maskou přizpůsobenou neonatálním potkanům pro nepřetržité dodávání anestetik. Celou dobu operace byla zvířata udržována v anestézii 0,8 - 1,5% halothanem. Kanyla pro infúzi endotelinu-1 (PlasticsOne, Bilaney – Německo; vnější průměr 0,2 mm) byla zavedena do levé hemisféry v souřadnicích AP= 0; L= 2; V= 2 u P12 a AP= 0; L= 2; V= 2.5 u P25 (vztaženo k bregmatu).

Endothelin-1 (#E7764, Sigma, St Louis, MO, U.S.A.) byl rozpuštěný v 0,01 M solného fosfátového pufru (PBS, pH 7,4) a aplikoval se použitím infúzní pumpy (KDS210, KD Scientific, Holliston, MA, U.S.A.; 1 $\mu$ l/5min) volně pohybujičím se zvířatům. Kontrolní zvířata dostala 0,01 M PBS odpovídajícího objemu místo roztoku ET-1. Dávka v obou věkových skupinách byla 40 pmol. Po vstříknutí roztoku byla kanyla držená na místě 5 minut, aby se předešlo vzlínání látky do dráhy kanyly.

## 4.2 Histologie

### 4.2.1 Fixace

Histologické zpracování vzorků vyžaduje fixaci tkáně. Po usmrcení zvířat byla provedena fixace tkáně perfúzí. Účelem fixace je rychlá a šetrná denaturace bílkovin protoplazmy buněk a tkání tak, aby byla zachována struktura tkáně.

U laboratorních potkanů došlo k navození ischemické cévní mozkové příhody pomocí endotelinu-1. Zvířata se nechala definovanou dobu přežívat. Poté byla zvířata anestežována uretanem v letální dávce (2,5 g/kg, i.v.). Cévní řečiště zvířete bylo propláchnuto transkardiálně, přes levou komoru do aorty pufrovaným fyziologickým roztokem. Po 10 minutách následoval vlastní fixační roztok, 4% paraformaldehyd rozpuštěný v 0,1 M fosfátového pufru, pH 7.4 (1 ml/ g), +4<sup>0</sup>C, na 10 minut. Po perfúzi byl z lebky mozek vyjmut a mozková tkáň byla dále fixována v roztoku paraformaldehydu další 3 hodiny. Pro přípravu zmražených řezů byla tkáň vložena do kryoprotektivního roztoku sacharózy (10, 20 a 30%) o +4<sup>0</sup>C. Poté byly mozky zmrazeny v suchém ledu a uloženy do -70<sup>0</sup>C.

Mozky byly nařezány na koronální řezy (50  $\mu\text{m}$ , série 1-5) na Cryocutu Leika 1600 a řezy uloženy do kryoprotektivního roztoku (30% ethylen glycol, 25% glycerol v 0.05 M pufru fosforečnanu sodného) v  $-20^{\circ}\text{C}$  do doby zpracování.

Přiléhající série řezů byly barveny pomocí Fluoro-Jade B pro detekci degenerativních neuronů, pomocí Evans Blue pro znázornění propustnosti hematoencefalické bariéry, imunohistochemicky na znázornění IgG a GFAP.

## **4.2.2 PŘEHLEDNÁ BARVENÍ**

### **4.2.2.1 Fluoro-Jade B**

Fluoro-Jade B, je derivát fluoresceinu používaný pro histologické barvení neuronů podléhajících degeneraci. Fluoro-Jade B odhalí odumřelé nebo odumírající nervové buňky bez ohledu na příčinu degenerace. Toto barvení je výhodnější než starší obvyklé histologické barvení jako Nisslovo barvení nebo hematoxylin a eozin, tím, že je specifické pro degenerující nervové buňky. Výhodou je dobrý kontrast a konstantnost, nevýhodou je relativní náročnost na přípravu. [50].

Na podložní skla potažená želatinou byly umístěny nakrájeny řezy a usušeny na vzduchu při teplotě  $50^{\circ}\text{C}$  nejméně půl hodiny. Řezy byly nejprve ponořeny na 5 minut do roztoku obsahující 1% hydroxidu sodného v 80% alkoholu. (20 ml 5% NaOH přidáno do 80 ml čistého alkoholu). Poté byly 2 min v 70% alkoholu a 2 min v destilované vodě. Tato podložní sklíčka s řezy byla poté přenesena na 10 min do 0,006% roztoku manganistanu draselného. Poté byly řezy 2 min proplachované destilovanou vodou.

Barvicí roztok byl připraven z 0,01% zásobního roztoku Fluoro-Jade B, který byl připraven přidáním 10 mg substance FJ-B do 100 ml destilované vody. 100 ml barvicího roztoku se vytvoří přidáním 4 ml zásobního roztoku do 96 ml 0,1% kyseliny octové. To má za následek vznik výsledného 0,0004% barvicího roztoku. Zásobní roztok uložený v mrazáku je stabilní po dobu několika měsíců, zatímco barvicí roztok byl připraven během 10 min před použitím a nebylo možné ho znovu použít. Po 20 min v barvicím roztoku byly řezy promyty destilovanou vodou a sušeny při teplotě do  $50^{\circ}\text{C}$ ,

dokud nebyly řezy zcela suché (asi 5-10 min). [47] Suché řezy byly projasněny krátkým ponořením do xylenu, přikryty krycím sklíčkem, zafixováno kanadským balzámem a prohlíženy pod mikroskopem, vybaveným zdrojem epifluorescenčního světla. [50]

#### 4.2.2.2 Evans Blue

Evans Blue (MW 961) se používá ke stanovení propustnosti BBB pro makromolekuly. [13] Cílem naší studie bylo získat histologický obraz přítomnosti EB v mozku po i.v. aplikaci EB do v.jugularis při změněné propustnosti BBB.

Evans Blue je netoxické nepyrogenní barvivo. [17] V krevním oběhu se stává silně, ačkoli reverzibilně vázané na albuminovou proteinovou frakci a dává vznik makromolekulárnímu komplexu (EBA - MW 68 500 EB vázána na albumin) [26] Evans Blue lze proto aplikovat intravenózně a tak dobře využít pro měření objemu krve a krevní plazmy in vivo, neboť její distribuční prostor odpovídá dosti přesně objemu krevní plazmy [17]. Sérový albumin je bílkovina, která za fyziologických podmínek neprostupuje skrz BBB, proto nepoškozená nervová tkáň zůstává nezbarvená. [14] Sérový albumin vstupuje do mozku až když je zvýšená propustnost BBB následující po mozkové ischemii. Je ukazatel zvětšené propustnosti BBB. [60]

Experimenty ukazují, že EB se váže na bílkovinu minimálně až po pěti minutách po jeho aplikaci do krevního řečiště. Z tohoto důvodu je v experimentálních modelech, které testují propustnost BBB, aplikován EB nejméně 5-10 minut před otevřením BBB. [26] Její koncentraci lze v odstředěné plazmě zjistit poměrně snadno spektrofotometricky. [44]

Porušení BBB bylo stanoveno fluorescenčně jako extravazace albumin-Evans Blue v mozkové tkáni.

#### 4.2.2.3 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ

Tato metoda je používána v mnoha oblastech biologického badání a někdy je užívána v diagnostice histopatologie. Imunohistochemické barvení je založeno na afinitě

antigenu s protilátkou. Afinita je přitažlivá síla mezi molekulami, které se mohou spojit dohromady a zůstat spojené. [22]

Používá se pro značení jednotlivých typů buněk a jejich složek, iontových kanálů, mediátorů nebo bílkovin obsažených v extracelulárním prostoru, jako jsou imunoglobuliny, albuminy, proteoglykany a glykoproteiny.

Pro standardnost provedení se tkáňové řezy nejprve blokují sérovými bílkovinami a pak inkubují primární protilátkou v roztoku s emulgátorem biologických membrán Triton-X. Pak se aplikuje enzymem konjugovaná (značená) sekundární protilátka a specifické barvení je zviditelněno po přidání enzym - specifického substrátu (tzv. nepřímá imunohistochemická; u přímé metody je primární – specifická protilátka přímo značená enzymem, Avidin-Biotin glukózoxydázová reakce).

#### 4.2.2.3.1 GFAP (kyselý gliální fibrilární protein)

GFAP je intracytoplazmatický filamentózní protein, který tvoří část cytoskeletu astrocytů. Bylo prokázáno, že tento protein je nejvíce specifickým markerem buněk astrocytárního původu. Tato protilátka představuje užitečný nástroj při identifikaci astrocytů v centrální nervové soustavě za normálních i patologických podmínek.

Po poškození CNS u lidí, ať již v důsledku poranění, genetických poruch nebo působení chemikálií, astrocyty proliferují a vykazují extrémní hypertrofii buněčného těla a výběžků a produkce GFAP je výrazně zvýšena. [5] Jeho zvýšení následující po zranění nebo astroglióze bylo zjištěno empiricky dlouhodobým pozorováním patologických stavů v oblasti CNS. [32] Naopak se vzrůstající malignitou astrocytárního původu dochází k progresivní ztrátě produkce GFAP. Proto maligní astrocytomy obsahují méně nádorových buněk, které se barví pozitivně a intenzivně na GFAP než méně maligní astrocytomy a vzorky z normálního mozku.

Přesný přínos GFAP ve fyziologii a funkci astrocytů není zcela jasný [32], je zapojen do četných celulárních procesů jako je buněčná struktura a pohyb buněk a funkce BBB.

Množství GFAP produkovaný buňkami se stanoveno mnoha metodami jako je přítomnost cytokinů a hormonů. Zvýšená produkce tohoto proteinu je v různých

stádiích obvykle označovaných jako "aktivace astrocytů". Astrocyty v této oblasti přechodně zajišťují anaerobní metabolismus a tato oblast je označována jako oblast ischemického polostínu, tzv. penumbra, místo s redukováným krevním průtokem. Jestliže je krevní průtok v této oblasti je snížen dlouhou dobu a energetické zásoby jsou vyčerpány, pak se rozsah infarktového ložiska rozšíří i na tuto oblast. Ischemická penumbra je potenciálně záchrany schopná farmakologickým zásahem.

Imunohistochemické barvení probíhalo na celých volně plovoucích řezech. Řezy byly promyty fyziologickým roztokem, blokujícím roztokem séra dle sekundární protilátky a emulgačním roztokem Triton-X. Inkubace primární protilátkou probíhala 3 dny (1:1000) v chladové komoře. Poté byly řezy přeneseny do čistých misek a inkubovány 1h v sekundární protilátce za pokojové teploty. Řezy byly promyty fosfátovým pufrům a provedena standardní avidin-biotin glukosoxidázová vyvolávací reakce. Takto obarvené řezy byly nataženy na skla předem potažená želatinou, usušena na vzduchu, projasněny v xylenu a po proschnutí zamontovány pod krycí skla s kanadským balzámem.

#### 4.2.2.3.2 IgG

Pro stanovení, zda byla v oblasti mozkové tkáně ovlivněné iktem poškozena hematoencefalická bariéra, jsme zjišťovali přítomnost IgG ve vzorcích mozkové tkáně. To jsme pozorovali imunohistochemicky jako únik IgG z cév do mozkové tkáně.

Protilátky cirkulující v krvi, patřící do  $\gamma$ -globulinové frakce krevní plasmy, jsou známy jako imunoglobuliny. Nejrozšířenějším typem je imunoglobulin G (IgG). IgG je jedním z nejhojnějších proteinů v krevním séru. IgG je důležitý na obranu proti mikroorganismů a jeho molekuly jsou produkovány B lymfocyty jako imunitní odpověď organismu na antigen. [2]

Řezy byly inkubovány přes noc při 4°C v protilátce ředěné v poměru 1:50 směsí 0,1 M fosfátovým pufrům s 0,3% Triton-X detergentem a 2% normálním kozím sérem, poté byly promyty fyziologickým roztokem, provedeno vyvolání dle protokolu GFAP, nataženy na skla předem potažená želatinou, usušena na vzduchu, projasněny v xylenu a po proschnutí zamontovány pod krycí skla s kanadským balzámem.

### 4.3 ANALÝZA

Ke zjištění lokalizace následků ischemické léze jsme analyzovaly mozkové řezy. Šíře poškození byla hodnocena odděleně v jednotlivých oblastech mozku (např. hippocampus, neocortex)

Pro rozpoznání morfologie mozku, byl každý vzorek srovnáván s anatomickým atlasem Paxinosa a Watsona. [54]

Mozková tkáň byla zkoumána použitím epifluorescentního mikroskopu Olympus AX70 s digitálním fotoaparátem Olympus DP70.

Fluoro-Jade B pozitivní neurony se jeví zelené pod modrým světlem excitace. Propustnost hematoencefalické bariéry značená pomocí Evans Blue se jeví červeně pod zeleným světlem excitace. Přítomnost IgG a reaktivních astrocytů, značených GFAP, byla sledována průchozím světlem.

Pro mikroskopické pozorování byly použité čočky se zvětšením 2x, 10x, 20x a 40x.

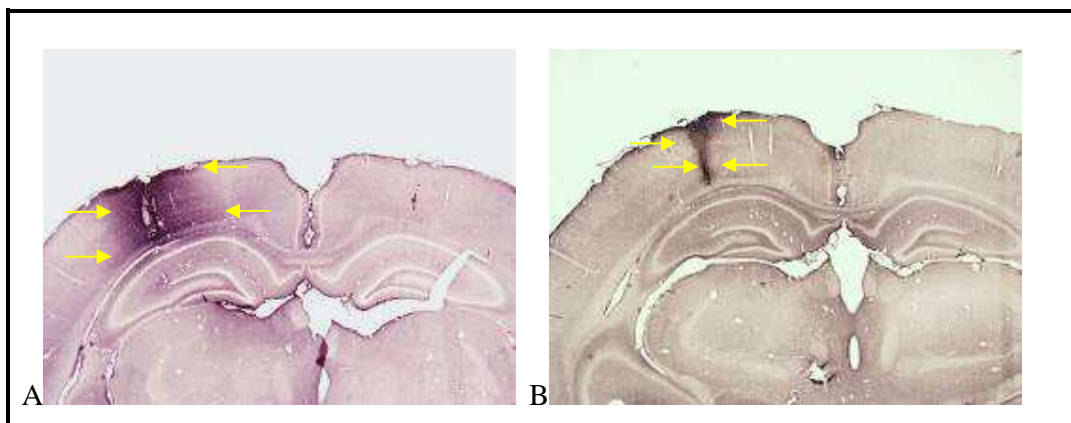
#### 4.4 VÝSLEDKY EXPERIMENTU

Ischemické poškození neuronů bylo sledováno u zvířat s 40 pmol ET-1 a porovnávalo se zvířaty, kde bylo aplikováno stejné množství BPS. Charakter poškození, který byl vyvolán aplikací ET-1, byl podobný u obou věkových skupin zvířat, ale velikost ischemického ložiska byla velmi variabilní. Patologické změny buněk mozkové tkáně byly pozorovány v kortikální oblasti přiléhající místu vpichu u obou skupin, tam kde byl aplikován ET-1 i u kontrolní skupiny. Rozsah oblasti, kde byly pozorovány změny v mozkové tkáni, hematoencefalické bariéry i nervových buněk, se zdá větší v ET-1 skupině než stejný druh poškození u kontrolní skupiny zvířat. Zjevné poškození BBB a nervových buněk bylo pozorováno na ipsilaterální straně kůry mozkové v porovnání s kontralaterální v obou skupinách. Poškození bylo vyjádřené degenerací neuronů, extravazací Evans Blue, přítomností IgG a zvětšenou expresí GFAP.

Kontralaterální hemisféra je považována za typický běžný vzor pro určování příslušných markerů u obou věkových skupin. Buňky obarvené pomocí FJ-B barvení a dalších použitých typů barvení se prakticky nevyskytují v kontralaterální hemisféře ani u jedné z věkových skupin.

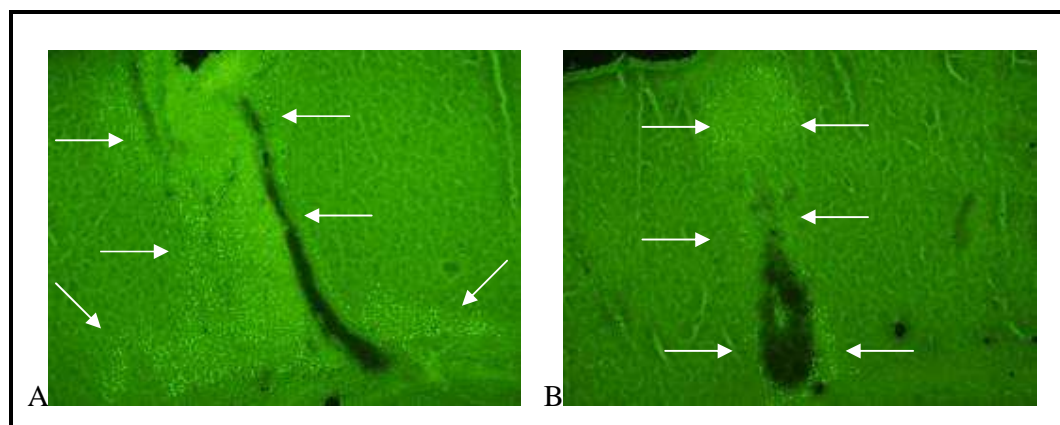
Oblast, kde se vyskytují degenerativní neurony, byla rozsáhlejší u zvířat, kde byl aplikován ET-1, než oblast u kontrolní skupiny zvířat. ET-1 způsobil neuronální degeneraci ve větší oblasti obklopující místo vpichu, signalizované přítomností FJ-B-pozitivních buněk. U kontrolní skupiny se neuronální poškození lokalizuje jen do oblasti bezprostředně blízko vpichu jako důsledek poškození tkáně pronikající kanylou.





**Obr. 2 Přítomnost IgG v poškozené oblasti:**

Pomocí imunohistochemického značení na IgG jsme našli IgG-pozitivní oblast v kortexu na ipsilaterální straně v oblasti vpichu u zvířat, kde byl aplikován ET-1 (A) a u zvířat z kontrolní skupiny (B). Šíře oblasti IgG-pozitivních buněk je větší u zvířat, kde byl aplikován ET-1 (A) v porovnání se zvířaty z kontrolní skupiny (B).



**Obr. 3 Oblast neuronálního poškození:**

Buňky označené pomocí Fluoro-Jade B jsou pozorovány v oblasti penumbry přiléhající k místu aplikace injekce na ipsilaterální straně mozkové kůry u zvířat ošetřených ET-1 (A) a u zvířat z kontrolní skupiny (B) Rozsah oblasti, kde byly pozorovány degenerující neurony (oblast Fluoro-Jade pozitivních buněk) je větší u zvířat, kde byl aplikován ET-1 (A) v porovnání se zvířaty z kontrolní skupiny (B).

#### 4.4.1 Poškození v oblasti šedé hmoty mozkové

Podání ET-1 poškodilo nejen mozkovou kůru, ale v některých případech oblast alveus hippocampi nebo samotný hippocampus na ipsilaterální straně. Pouze u jednoho zvířete došlo k poškození oblasti mozku pod hippocampem, v oblasti nucleus habenulae lateralis.

U všech sledovaných zvířat došlo k neuronálnímu poškození, k porušení hematoencefalické bariéry a ke zvětšené expresi GFAP. Můžeme říci, že poškození v oblasti ischemické tkáně se projevilo třemi způsoby:

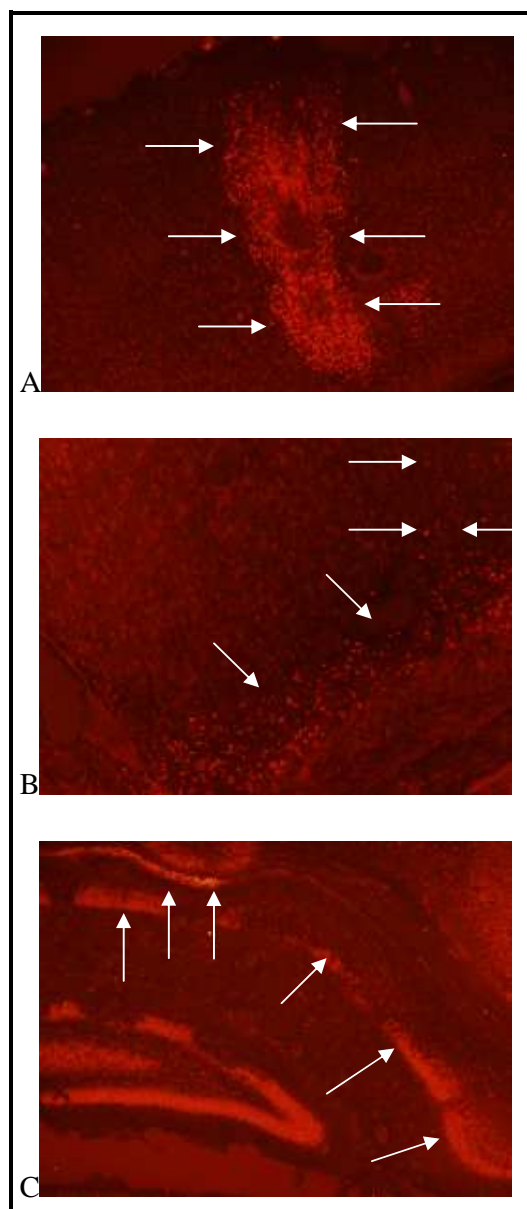
1/ Poškození ischemické oblasti je různého rozsahu, ale lokalizováno pouze do oblasti vpichu. (5 zvířat)

2/ Nižší vrstvy kůry, zvláště V. a VI., jsou poškozeny v mnohem vyšším rozsahu, než povrchnější vrstvy, a to spíše v lokalizaci směrem kaudálně od místa vpichu než rostrálně. (4 zvířata)

3/ Došlo k poškození v oblasti mozkové kůry, ale zároveň je také zasažena podkorová oblast - hippocampus (8 zvířat)

Poškození v oblasti hippocampu bylo objeveno u 8 zvířat z ET-1 skupiny. Bylo lokalizované do horní části ipsilaterálního hippocampu. Nejčastější poškození se zdá být v oblasti CA1 a na rozhraní oblasti CA1 a 2, zatímco CA3 zasažena není vůbec. Dále je zasažena oblast gyrus dentatus a to pouze v případě, kdy je zasaženo i nucleus habenulae lateralis.

Oblast hippocampu byla zasažena častěji u P12 (6 zvířat z 7) než u P25 (2 zvířata z 9). U kontrolní skupiny zvířat jsme nenašli poškození hippocampu ani na ipsilaterální ani na kontralaterální straně.



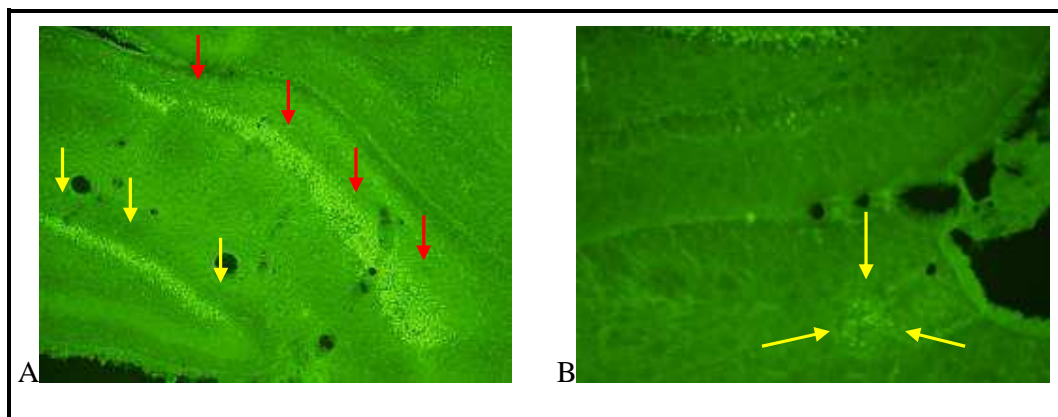
**Obr. 4 Rozdělení rozsahu poškození do tří skupin**

- demonstrováno na porušení hematoencefalické bariéry - barvení Evans Blue

A/ Rozsah léze je koncentrován do oblasti kolem vpichu

B/ Léze postihuje oblast kolem vpichu, velmi výrazně je zasažena V. a IV. vrstva mozkové kůry

C/ Rozsah poškození sahá až do oblasti hippocampu.



**Obr. 5 FJ-B pozitivní oblasti**

Poškozená oblast hippocampu značená pomocí FJ-B. Červené šipky značí FJ-B pozitivní neurony v oblasti CA1 a žluté šipky značí degenerující neurony v oblasti hippocampu v části gyrus dentatus. (A) Distribuce FJ-B pozitivní buněk v oblasti nucleus habenule lateralis. (B)

#### 4.4.2 Porušení hematoencefalické bariéry

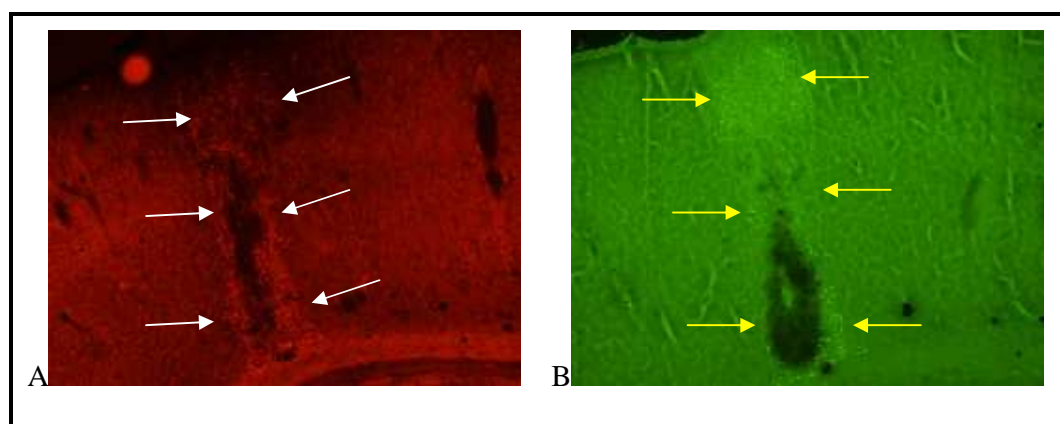
Pro stanovení, zda byla v mozkové tkáni ovlivněné iktem poškozena hematoencefalická bariéra, jsme použili dvojí barvení - imunohistochemické barvení na sledování úniku imunoglobulinu G (IgG) a barvení pomocí Evans Blue na únik sérového albuminu z cév do nervové tkáně. Dvojí barvení na zjištění propustnosti BBB nám dovolilo představit si porušení BBB a přecházení IgG z krve do mozkového parenchymu.

Některé studie udávají, že endotelin-1 vyvolá ischemii bez přítomnosti poruchy hematoencefalické bariéry. V naší studii v ischemickém regionu mozku dochází k poruše integrity BBB ve všech případech, u obou sledovaných skupin zvířat, což je doloženo extravazací albumin-Evans Blue. EBA je přítomna převážně v buňkách, ale i v oblasti extracelulárního prostoru. Velikost oblasti, kde je patrná extravazace EBA koreluje s oblastí, kde jsou přítomné FJ-B-pozitivní neurony. (viz. obr.6) Perfúze mozku s EB umožňuje rychlý, spolehlivý a velmi citlivý odhad propustnosti BBB a mikroskopickou vizualizaci přerušení BBB. [14]

Našli jsme krevní globuliny (IgG) infiltrované do mozkové kůry (příp. hippocampu), zatímco pronikání klasických ukazatelů porušení BBB EB nepozorujeme ve stejně velké oblasti. Velikost oblasti, kde je patrná extravazace EBA je menší, než oblast, kde jsou přítomné IgG-pozitivní neurony.

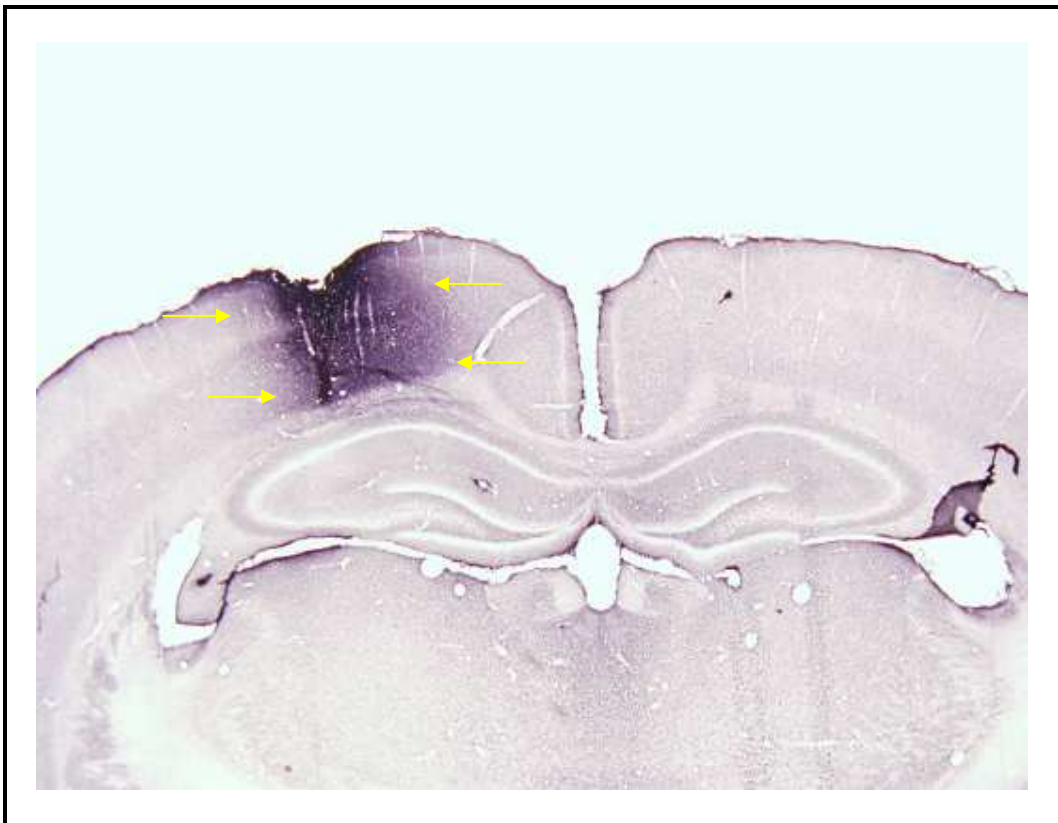
Sledovali jsme koncentraci IgG ve vzorcích mozkové tkáně. Našli jsme intenzivnější a rozsáhlejší barvení na IgG ve vzorcích vzatých z infarktové oblasti ve srovnání s odpovídajícím regionem kontralaterální nepoškozené mozkové hemisféry. Toto bylo potvrzeno imunohistochemicky, což ukázalo vyšší koncentraci IgG v místě zranění ve srovnání s kontralaterální stranou mozku. (viz obr.7 )

Přítomnost IgG byla zjištěna převážně v extracelulárním prostoru. V některých oblastech však byla patrná extravazace IgG i v buňkách, což bylo zhruba u  $\frac{1}{4}$  patrné velmi dobře. Mohli jsme zřetelně pozorovat přítomnost IgG v neuronech v oblasti mozkové kůry ischemické oblasti. (viz obr.8 )



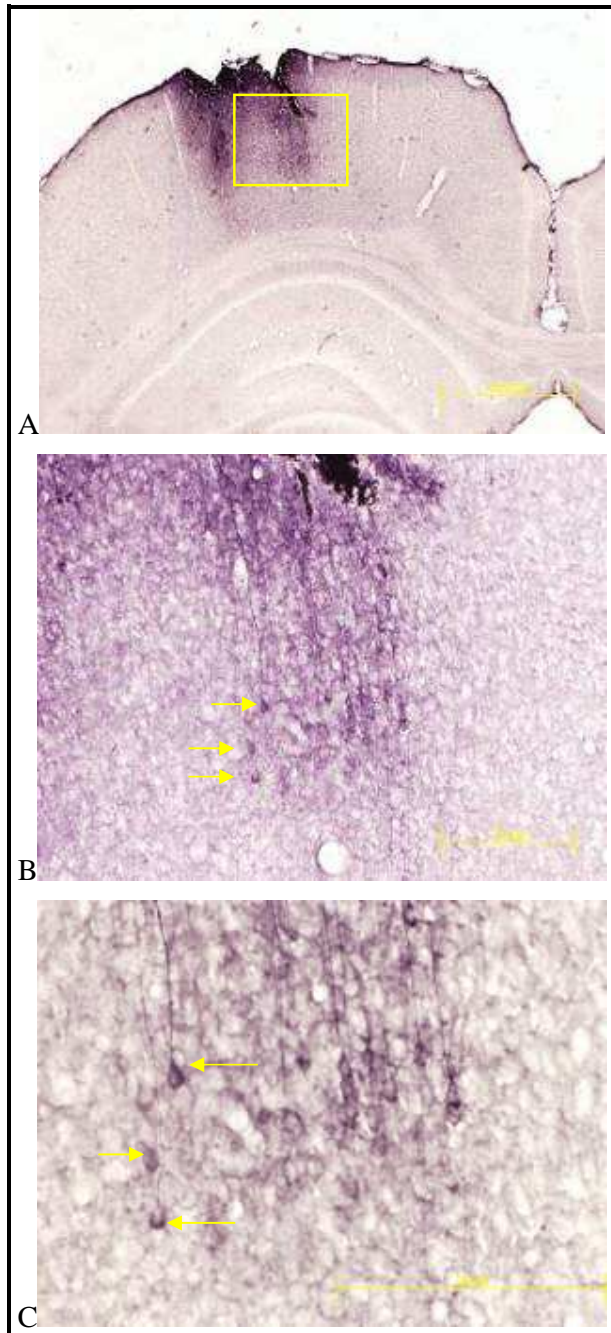
### Obr. 6 Evans Blue versus Fluoro Jade B

Extravazace albumin-Evans Blue označuje přítomnost sérového albuminu a dokazuje porušení hematoencefalické bariéry na ipsilaterální straně (šipky označují přítomnost sérového albuminu v tomto případě v buňkách). (A) Rozsah oblasti, kde je značení EBA patrné, koreluje s oblastí, kde jsou přítomné FJ-B-pozitivní neurony. Barvení Fluoro-Jade B odhaluje přítomnost degenerujících neuronů na ipsilaterální straně kůry mozkové (šipky označují oblast degenerujících neuronů). (B)



**Obr. 7 Přehledný obraz rozdílu ipsilaterální a kontralaterální strany**

Imunohistochemické barvení na zjištění přítomnosti IgG na ipsilaterální (infarktové) straně, ve srovnání s kontralaterální nepoškozenou hemisférou. Cortex ipsilaterální strany vykazuje velkou pozitivitu na přítomnost IgG. V tomto případě je zasažena pouze oblast mozkové kůry, není poškozena oblast hippocampu. (ischemická oblast značená šipkami)



**Obr. 8 Oblast pozitivní na přítomnost IgG v buňkách - neuronech:**

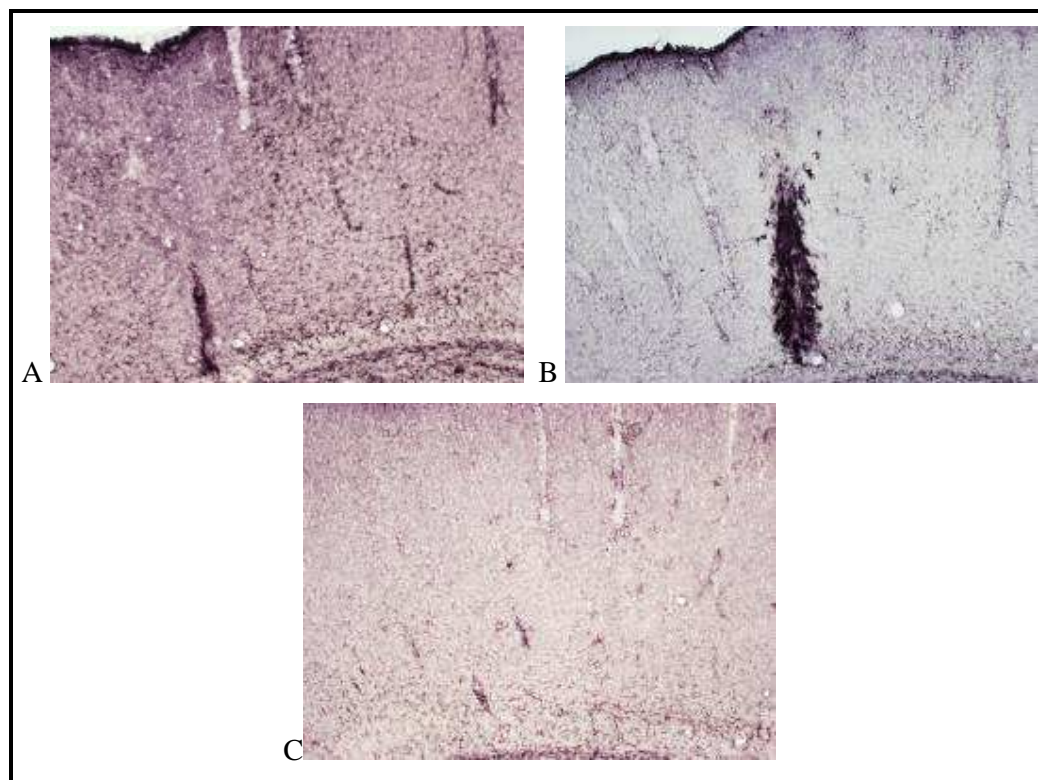
V oblasti mozkové kůry v ischemickém regionu je patrná extravazace IgG. (A) Při větším zvětšení (B,C - naznačený výřez z obr. A) je patrné, že došlo ke vstupu IgG do buněk a to do neuronů, které jsou proto velmi dobře rozlišitelné.

měřítka: A = 1000  $\mu\text{m}$  B = 200  $\mu\text{m}$  C = 200  $\mu\text{m}$

### 4.4.3 Reaktivní glióza

Reaktivní glióza je odpovědí na CNS trauma. Reaktivní astrocyty projdou změnami v morfologii a ve vytváření jejich molekul. Charakteristickým znakem reaktivní gliózy, bez ohledu na její původ, je zvýšená exprese GFAP v reaktivních astrocytech.

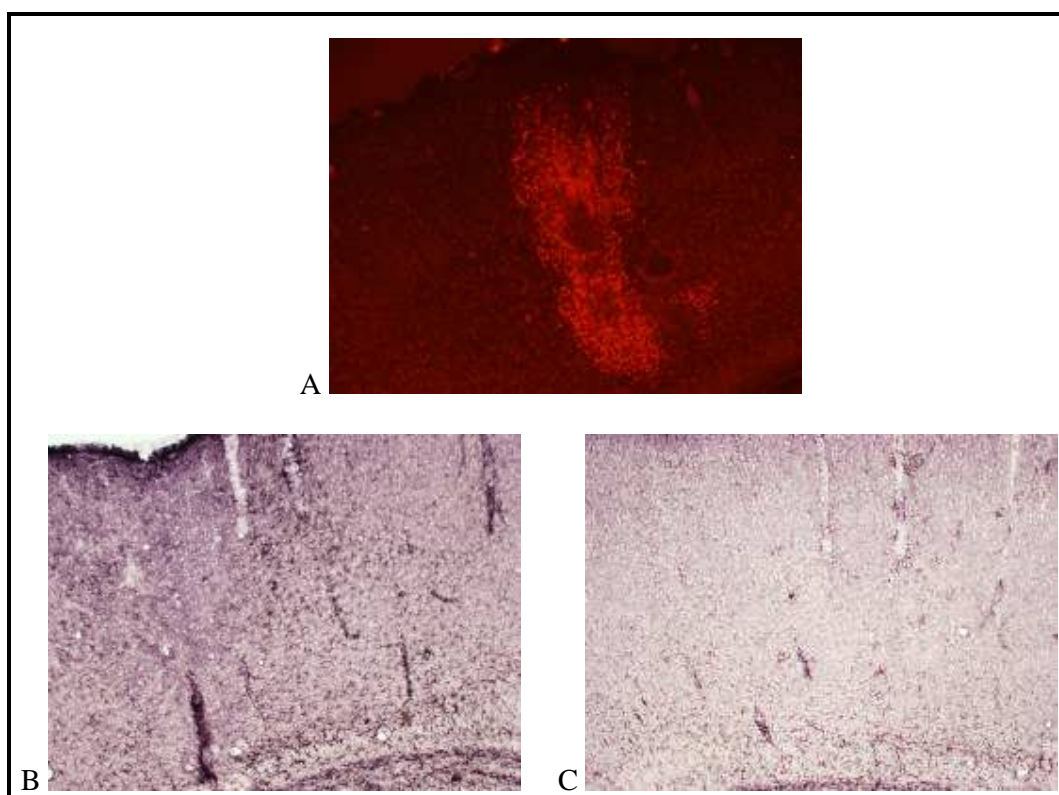
Oblast, která je barvená na GFAP obsahuje reaktivní astrocyty, které proliferují a vykazují extrémní hypertrofii buněčného těla a výběžků. [5] (viz obr.11) Astrocyty v této oblasti přechodně zajišťují anaerobní metabolismus a tato oblast je označována jako oblast ischemického polostínu, tzv. penumbra. Pomocí barvení na GFAP jsme si mohli vytvořit představu, jak rozsáhlá je oblast penumbry. Buňky označené pomocí barvení na GFAP jsou přítomny ve větší oblasti než poškozené buňky, značené FJ-B. Tato oblast obsahuje hypertrofické astrocyty, což znamená, že je to oblast, kde je ještě zachovaná struktura tkáně, ačkoli je v této oblasti mozku již zastavena funkce.



Obr. 9 Barvení na astrocyty protilátkou proti GFAP v kortexu

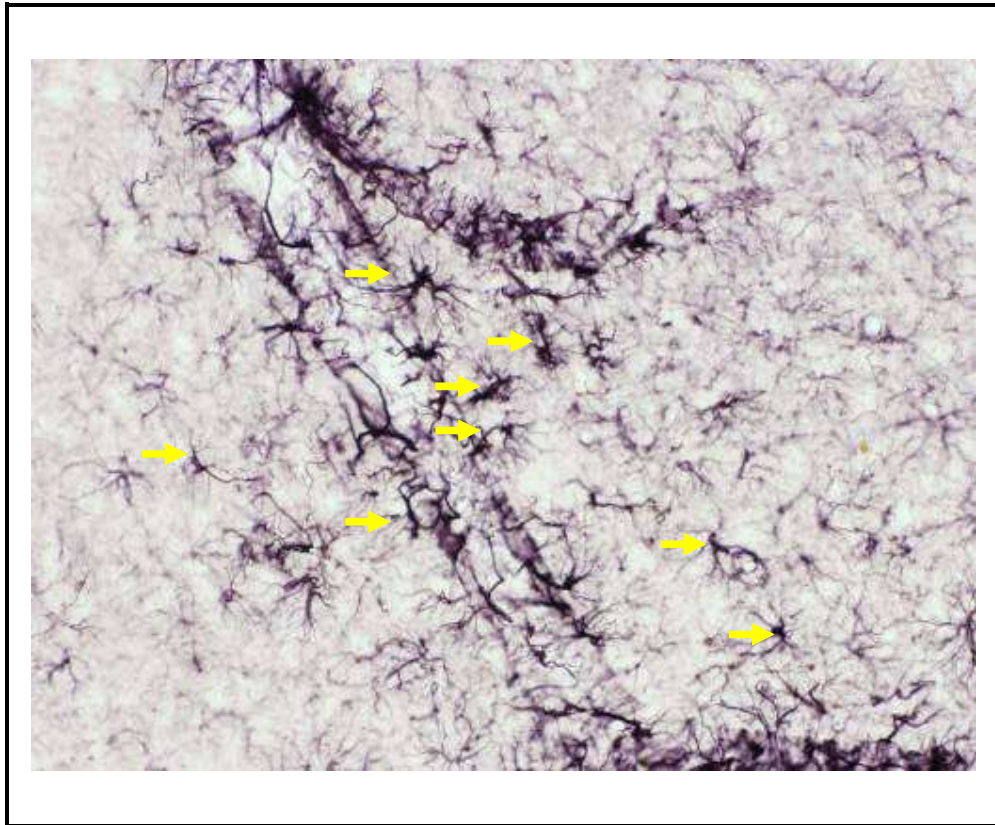


Astroglíóza byla zaznamenána pomocí imunohistochemického značení protilátkou proti GFAP. Značení astrocytů protilátkou proti GFAP je u kontrolních zvířat (B) lokalizováno převážně v oblasti blízko vpichu. U zvířat, kde byl aplikován ET-1 je značená oblast rozsáhlejší (A). C: srovnání s kontralaterální stranou u zvířete A.



### Obr. 10 Srovnání Evans Blue versus GFAP

Rozsah, kde je patrná extravazace albumin-Evans Blue, která značí poškození hematoencefalické bariéry, je menší ve srovnání s rozsahem , kde jsou přítomné reaktivní astrocyty. Extravazace albumin-Evans Blue (A) je lokalizována do oblasti poměrně blízko vpichu. Rozsah oblasti, kde jsou přítomné reaktivní astrocyty (B), je rozsáhlejší a značí rozsah penumbry. Srovnání s kontralaterální stranou (C), kde zvýšená exprese GFAP nalezena nebyla.



**Obr. 11 Morfologie buněk makroglie**

Astrocyty v korové části mozku obarvené imunohistochemicky na GFAP. Imunoreaktivita na GFAP zobrazila jemné hvězdčovitě výběžky astrocytů. Ischemií zasažená oblast obsahuje velké množství GFAP pozitivních astrocytů. Během patologického stavu dochází k zvětšování jejich objemu, proliferaci a hypertrofii.

## 5 DISKUZE

Naším experimentem jsme chtěli zjistit, k jakým změnám dochází v ischemické mozkové tkáni. Ischemické poškození CNS představuje komplexní dynamicky se měnící proces sestávající z mnoho složitě provázaných dějů. Již více než 160 let jsou vytvářeny stále dokonalejší experimentální modely ve snaze o napodobení situace u humánních hypoxicko-ischemických mozkových příhod. Hlavním cílem modelování ischemie byla vždy (kromě možnosti studovat různé aspekty patofyziologie ischemického poškození) možnost testovat v kontrolovaných podmínkách různé neuroprotektivní strategie. [27] Neuroprotektce má ovlivňovat ischemickou kaskádu a zabránit její progresi a zvýšit šanci na přežití neuronů a gliových buněk v zóně oschemického polostínu. Inhibují zejména excitační aminokyseliny, hlavně glutamát, a zabraňují masivnímu vstupu kalcia do buňky v oblasti ischemie. [20]

Navzdory jednoznačně pozitivní účinnosti neuroprotektce ve zvířecím experimentu s fokální ischemií, není použití stejné testované látky v klinických studiích efektivní, anebo je provázeno řadou závažných vedlejších účinků. Nejzávažnější příčinou tohoto konstatování je pozdní zahájení léčby. Vývoj neuroprotektivních látek stále pokračuje a neuroprotektivní léčba u akutního iktu může být velmi prospěšná a lze doufat, že nové probíhající klinické studie prokáží bezpečnost a efektivitu zkoumaných látek. [20]

BBB je studována s ohromnou pozorností. A sice k tomu, aby bylo objeveno více detailů o architektuře, vývoji, biologii a fyziologii, a dále se pátrá po metodách bezpečného reverzibilního otevření BBB pro použití diagnostických a léčebných látek, které jsou neporušenou BBB neproniknutelné. [26]

Otevření hematoencefalické bariéry intraarteriálně aplikovanou látkou bylo nejprve popsáno jako vedlejší, nežádoucí efekt kontrastní látky u mozkové angiografie. V nynějších studiích se pracuje s myšlenkou použít otevření BBB osmotickým inzultem k terapeutickým účelům. Aby bylo možné fenoménu otevřené BBB využívat v praxi při léčbě pacientů, je nutné použít takový způsob otevření, který je rychlý, krátkodobý a stoprocentně reverzibilní. Na základě těchto experimentů je možné testovat tuto metodu otevření BBB osmotickým inzultem k aplikaci léků a jiných látek do mozku

z důvodů terapeutických nebo diagnostických v případech, kdy je BBB normálně pro takovéto látky neprostupná. [25] Umělé zvýšení permeability BBB by mohlo usnadnit průnik látek aktivujících programy obnovy neuronálních okruhů. [39]

Krýsl (2007 [27]) uvádí, že velmi důležitou charakteristikou odlišující model intracerebrální aplikace Endotelinu-1 od ostatních modelů fokální ischemie (např. fototrombotická ischemie), je nepřítomnost poruchy hematoencefalické bariéry. Krýsl však staví na studii, kde ET-1 je aplikován subtemporálně do subarachnoidálního prostoru k a. cerebri media, tudíž je ovlivněna velká arterie. Jedná se v podstatě o jiný model ischemie. V naší studii jsme aplikovali ET-1 přímo do mozkové tkáně a tím ovlivnili arterioly. Také Gartshore (1997 [16]) udává, že mozková ischemie navozená pomocí ET-1 je sdružená s otokem hemisfér, ale není sdružená s porušením BBB. Ke značení propustnosti BBB Gartshore použil aplikaci Evans Blue 1h a 2h po vyvolání ischemie. Proto je tedy možné, že dojde-li pouze k dočasnému otevření BBB během prvních minut po vyvolání ischemie, Gartshore otevření nezachytil. V naší studii aplikujeme EB ještě před ET-1, proto zabezpečíme, že zaznamenáme i dočasné otevření BBB následující krátce po aplikaci ET-1. Naše nálezy ukazují, že endotelinem-1 navozená fokální cerebrální ischemie ve vyvíjejícím se mozku, má za následek neuronové poškození a narušení hematoencefalické bariéry na ipsilaterální straně mozkové kůry u obou věkových skupin potkanů. Nedošlo pouze k porušení mozkové kůry, ale aplikace ET-1 způsobila i zřetelné neuronové poškození subkortikální. Výsledky nás vedou k závěru, že šedá hmota mozková je během ischemie velmi zranitelná. Poškození u kontrolní skupiny zvířat se příliš nešíří, zůstává lokalizováno bezprostředně blízko vpichu a to pouze v oblasti mozkové kůry.

Arteriální okluze představuje 70-80% všech případů iktu a má za následek ischemii, která vede k dysfunkci a smrti neuronů v té části mozku, která je zásobována zasaženými krevními cévami. [20] Kromě poškození buněk, dochází v oblasti mozkové ischemie k zánětlivé odpovědi. V této studii popisujeme zákonitosti týkající se poškození neuronů a dalších změn po mozkové ischemii, způsobené aplikací Endotelinu-1 u mláďat potkanů postnatálního věku 12 a 25 dní.

Nutno však dodat, že permeabilita BBB se mění v období vývoje nervového systému a je adekvátní zralosti a funkčním potřebám nervové tkáně. U novorozenců není

hematoencefalická bariéra ještě dostatečně těsná. [53] Potkaní mláďata P12 prakticky odpovídají novorozencům. Proto nemůžeme s jistotou určit, zda došlo k porušení integrity BBB v důsledku fokální ischemie, nebo zda albumin-Evans Blue, jako marker otevření BBB, je přítomný proto, že BBB není ještě dostatečně vytvořená a proto skrze ni mohou prostupovat látky, které za normálních okolností ve zralém mozku průchozí nejsou. Ale vzhledem k tomu, že porušení BBB koreluje s oblastí, kde došlo k poškození neuronů vlivem ET-1, předpokládáme, že je permeabilita BBB byla narušena ischemií. U mláďat P12 však je extravazace EBA v mnohem větším rozsahu než u mláďat P12. Často je poškozena i oblast hippocampu. Proto usuzujeme, že BBB u P12 je mnohem citlivější na ischemii než u starší skupiny potkanů, kde už je BBB lépe uzavřená a méně zranitelná.

Na astrocyty a mikroglie, stejně jako pronikající leukocyty je pohlíženo jako na klíčové elementy postischemického zánětu. [60] Gliové buňky hrají důležitou roli v patologických procesech. Reaktivní glióza je odpovědí na CNS trauma. [21]

Aktivace astrocytů se zdá být průvodním jevem degenerace neuronů. Přítomnost reaktivních astrocytů v ischemické oblasti mozku naznačuje jejich neuroprotektivní činnost. Astrocyty jsou nejpočetnější buňky v CNS a hrají hlavní roli během patologie v mozku a míše. Ačkoli to nebylo přímo dokázané, myslí se, že astrocyty mají neuroprotektivní efekt během iktu ochranou neuronů před oxidativním stresem. Tato teorie je založena na schopnosti astrocytů transportovat a metabolizovat aminokyseliny, glukózu a další klíčové látky. [29] Hypertrofické astrocyty jsme našli v oblasti, která se překrývala s oblastí degenerativních neuronů, ale tato oblast byla více rozsáhlá. Tato oblast, která obsahuje aktivní astrocyty, je oblast penumbry, kde je ještě zachována struktura tkáně, neurony zde ještě nepodlehli ischemii ve smyslu degenerace, ale je zde již zastavena jejich funkce. Je to oblast, kde při včasném obnovení krevního průtoku dojde k obnovení funkce.

Ačkoli byl CNS v minulosti definován jako imunologicky privilegovaný orgán kvůli jeho oddělení od periferní cirkulace pomocí BBB, výzkumy v posledních letech odhalují, že CNS je bohatým zdrojem zánětlivých mediátorů. Mozkové buňky, jako neurony, astrocyty a mikroglie jsou schopné syntetizovat mediátory jako jsou cytokiny a chemokiny. [48] Dva klíčové prozánětlivé cytokiny v nastavení cerebrální ischemie

jsou interleukin-1 a TNF- $\alpha$  (tumor necrosis faktor alpha), z nichž oba jsou primárně tvořeny aktivovanými gliemi a makrofágy. [60] Charakteristickým znakem zánětlivé odpovědi je počáteční infiltrace leukocytů (neutrofilů) do ischemického regionu mozku. [65] Leukocyty reagují na signály zprostředkovanými IL-1 a TNF- $\alpha$ , které je přitahují do oblasti ischemie a migrují do oblastí zánětu skrz cévní stěnu. Infiltrace leukocytů může přispívat k endoteliální dysfunkci a zvýšit propustnost hematoencefalické bariéry. [20]

Během různých experimentálních pokusů byla zjištěna výrazná dichotomní funkce imunitní / zánětlivé reakce v CNS. Tato reakce může mít účinky jak protektivní, jako je prospěšná adaptivní endogenní odpověď v průběhu klasické imunitní odpovědi na poškození, nebo je přímou nebo nepřímou příčinou neuronové dysfunkce. [59] Pro některé cytokiny byla prokázána přímá neurotoxicita, například pro interleukin-1 nebo tumor nekrotizující faktor alpha. [19] TNF- $\alpha$  a IL-1 a mají schopnost produkovat reaktivní kyslíkové radikály, které mohou přispět k oxidačnímu stresu a následovně k neuronové smrti. [65] Další škodlivý efekt cytokinů na přežívání neuronů je pravděpodobně zprostředkovaný jejich schopností zvýšit extracelulární množství glutamátu a zvýšení produkce mediátorů oxidačního procesu. [54]

Zánětlivá reakce je vedle produkce volných radikálů jedním z hlavních mechanismů reperfučního poškození, při němž je definitivně narušena BBB se všemi důsledky včetně otoku mozku, což je závažný problém u všech mozkových poranění. [19] Imunitní systém CNS je nezbytný pro likvidaci důsledků zánětu. Současně s úklidovou reakcí se vyvíjí porucha hematoencefalické bariéry, která umožňuje pronikání látek z intravaskulárního prostoru přímo do mozkové tkáně. [60]

V našem experimentu jsme sledovali porušení hematoencefalické bariéry přítomností plazmatického albuminu, značeného pomocí Evans Blue. Plazmatický albumin je jeden z důvodů, který vede ke značnému zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách. [21] Masivní vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky má fatální účinek, protože aktivuje řadu autodestrukčních procesů. Jedním z významných je syntéza oxidu dusného. [19] I když za normálních okolností NO zprostředkovává synaptický přenos v podmínkách nadměrné produkce, může být i neurotoxický. Ischemie je jedním z důvodů, kdy se NO tvoří ve zvýšené míře.

NO difunduje do sousedních neuronů a inhibuje v nich životně důležité enzymy. To vede k postupnému odumírání neuronů v CNS. [33]

Pro označení neuronů podléhajících degeneraci jsem užili barvení Fluoro-Jade B, které označí umírající neurony, bez ohledu na mechanismus buněčné smrti. Tam, kde byla ischemií zasažena i oblast hippocampu, byla zasažena vždy část pod ischemickou oblastí kůry. Pouze v jednom z pozorovaných mozků, byly nalezeny následky ischemického poškození i v jiné oblasti, a to v oblasti nucleus habenulae lateralis (viz obr.5).

Poškození šedé hmoty jsme nepozorovali ve všech vrstvách stejně. VI. vrstva a zvláště V. vrstva se zdá být mnohem citlivější na ischemii než ostatní vrstvy. Už některé předchozí studie uvádějí, že určité typy neuronů, zejména neurony V. vrstvy, jsou obzvláště citlivé na ischemické poškození. V. vrstva obsahuje pyramidové buňky s dlouhými apikálními dendrity. Vysvětlením pro zranitelnost buněk v V. vrstvě je to, že větší plocha povrchu a vyšší procento objemu axonálních výběžků, má za následek méně efektivní schopnost výměny iontů než je tomu u jiných nervových buněk, a proto jsou více náchylné na ischemii / excitotoxicitu. [4]

Protože IgG nejsou za normálních okolností přítomny v mozkovém parenchymu, jejich přítomnost signalizuje porušení BBB. [2] Sledovali jsme přítomnost IgG ve vzorcích mozkové tkáně.

IgG působí nespecificky protizánětlivě, ale podstata jejich působení je vykládána různými hypotézami. Patří k nim názor, že imunoglobulin G má schopnost přímo neutralizovat toxiny, modulovat tvorbu cytokinů, snížit činnost lymfocytů B aj. Ale reálný význam žádného z těchto mechanismů in vivo prokázán nebyl. [2]

Statisticky se uvádí, že asi u 10% nemocných po akutní cévní mozkové příhodě dochází ke zvýšení intrathekální syntézy IgG. [34] V našem případě nemůžeme zvýšenou syntézu vyloučit, ale vzhledem k nálezům porušení hematoencefalické bariéry předpokládáme, že došlo k infiltraci IgG do mozkové tkáně z krve.

V klinické praxi se k vyloučení intrathekální syntézy IgG používá tzv. IgG/Albumin index. IgG/Albumin index charakterizuje vztah mezi koncentrací IgG a albuminu ve dvou různých systémech. Nejčastěji se používají pro posouzení přítomnosti

intrathekální syntézy IgG, respektive pro vyloučení poruchy BBB jako příčiny zvýšení IgG v likvoru. Je to ukazatel lokální produkce IgG, přizpůsobený pro průnik IgG, vzniklý kvůli dysfunkci BBB. Tento index je zvětšený při lokální syntéze IgG. Pro výpočet obou indexů se vyšetřuje současně hmotnostní koncentrace IgG a albuminu v mozkomíšním moku a plazmě. Zvýšená intrathekální syntéza IgG je možná také v rámci stavů se současně porušenou hemato-likvorovou bariérou, například při akutních zánětlivých procesech CNS v humorální fázi imunitní odpovědi. [6,34]

Hlavním problémem experimentálních studií s fokální ischemií je obtížné převedení nadějných výsledků do praxe humánní medicíny. Mezi příčiny tohoto neúspěchu patří metodologická nedokonalost některých experimentálních studií, výrazná mezidruhová i vnitrodruhová variabilita experimentálních zvířat, zásadní patofyziologické odlišnosti mezi jednotlivými modely a v neposlední řadě nesmírné (a v současné době nemodelovatelné) rozdíly mezi jednotlivými pacienty s ischemickou centrální mozkovou příhodou, jako jsou věk, komorbidita, léky, genetické faktory a pod. [13]

## **5.1 DISKUZE - METODIKA**

Naše závěry mohou být zatíženy určitou chybou. Chirurgické postupy byly prováděné podle daných protokolů, a proto by zde neměly být závažné chyby. Musí se dávat pozor při implantaci kanyly s ET-1 infuzí ve správných souřadnicích. Vzhledem k tomu, že zvířata jsou velmi mladá, manipulace s nimi a zavedení kanyly musí být prováděno s velkou opatrností, aby se předešlo mechanickému poškození mozkové tkáně. Chyby při přípravě řezů mohou vzniknout během histologických procedur. [24] Degenerace může být také výsledkem kontuzivního účinku kraniotomie nebo mechanických efektů injekce nebo procesu vyjímání mozku. [67] Během fixace, kryoprotekce a mražení se mozková tkáň sráží, což ovlivňuje její pozorování. To však může být opomenuto v případě, že tkáň z experimentální i kontrolní skupiny se sráží podobně. [24]

Výhodou použití ET-1 modelu cerebrální ischemie před dalšími modely je, že použití ET-1 neničí mechanicky mozkovou vaskulaturu, což by mohlo změnit expresi molekulové soudržnosti a přerušit hematoencefalickou bariéru. Ostatní způsoby vyvolání mozkové ischemie mohou ovlivnit průběh iktu mechanickým poškozením



endotelu a přiléhajících struktur. (Weston a kol. 2007, [59] ) Z naší studie však plyne, že i použití ET-1 má za následek porušení BBB, což jsme si potvrdili ve všech sledovaných vzorcích extravazací Evans Blue do mozkové tkáně.

Fluorescenční značení (EB) molekul představuje způsob značení mozkové perfúze in situ, proto umožňuje citlivé měření absorpce. Mikroskopické vyšetření perfundované mozkové tkáně umožňuje představu jednotlivých změn v propustnosti BBB. [61]

Některé provedené studie (Weston a kol. 2007, [59] ) uvádí, že aplikace ET-1 při vědomí potkanů je výhodnější, neboť se tím zabrání možnému vlivu anestetik, což může mít neuroprotektivnější účinky. Model ET-1 možná poskytuje atraktivnější alternativu k jiným existujícím modelům mozkové ischemie a tato situace je pravděpodobně více podobná klinické situaci po iktu. Pro náš experiment jsme kanylu s ET-1 zaváděli během anestézie.

Hodnotili jsme neuronové poškození pomocí kvalitativní morfologické metodiky. V této studii jsme užili k hodnocení neuronové degenerace fluorescenční barvení Fluoro-Jade B. Fluoro-Jade B je docela odolný proti ztrácení barvy. Studie udávají, že nebylo zjištěno žádné vyblednutí v řezech uložených v uzavřené krabici za pokojové teploty během více než dvou let. Blednutí vyplývající z prodloužené doby epifluorescenční zkoušky bylo minimální. Žádné vymizení barvy nebylo zjištěno ani po 30 minutách epiosvětlení při zvětšení 40x. Dlouhodobější pozorování za použití objektivu zvětšující 40x nebo více, mělo za následek malé, ale zjizitelné ztrácení barvy. [49] Proto předpokládáme, že námi sledované barvené řezy nejsou zatíženy tím, že by došlo vyblednutí fluorescence (FJ-B i EB) a tudíž zkreslení výsledků našeho pozorování.

Astrocyty a ependymogliální buňky mohou být označeny a identifikovány pomocí imunocytochemického značení určitého antigenu. Nejvíce specifickým markerem buněk astrocytárního původu je GFAP. Tato stereotypní astrocytární odpověď je nespecifická a může vzniknout za jiných podmínek, dokonce bez přítomnosti jakékoliv patologie. [21] My však předpokládáme, že oblast, která je pomocí GFAP značena, je známkou ischemie, vzhledem k tomu, že tyto oblasti jsou shodná s oblastmi, které jsme vyzorovali pomocí ostatních barvení (EB, FJ-B, IgG) Někteří autoři (Dirnagl, Priller,

2005 [21]) však udávají, že ne všechny buňky určité populace musí vykazovat expresi stejného antigenu. Zatímco je uvedeno, že všechny GFAP-imunopozitivní buňky v mozku jsou astrocyty, je zde mnoho astrocytů, které pomocí GFAP označené nejsou.

## **6 ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ**

Aplikace endotelinu-1 do mozkového parenchymu navodí značnou redukci lokálního krevního průtoku následovanou rozvojem fokální léze. Naším pozorováním můžeme potvrdit hypotézu, že v ischemické oblasti dochází k poškození mozkové tkáně. Zjistili jsme, že aplikace endotelinu-1 má za následek poškození nejen mozkové kůry, kam byl ET-1 vstříknut, ale že dochází k rozšíření poškození na oblast podkorovou. Výraznější četnost, kde se poškození rozšířilo i do podkorové oblasti mozku bylo u P12 potkanů.

Z našeho pozorování vyplývá, že ischemie má za následek tyto patologické změny:

- A) způsobuje degeneraci neuronů
- B) dochází k otevření hematoencefalické bariéry
- C) dochází k proniknutí IgG do poškozené oblasti
- D) způsobuje aktivaci astrocytů - jejich proliferaci a hypertrofii

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AMBLER, Z., Neurologie pro studenty lékařské fakulty, Karolinum, Praha, 2002, 399s, ISBN 80-246-0080-3
2. ARUMUGAM, T.V., *Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death*, PNAS, 2007, roč. 104, č. 35, ISSN 14104-14109
3. BÁLKOVÁ, O., BLAŽEK, R., Roche Diagnostic Forum, Petrohrad, Praha, Labor Actuell, 2007, č. 3, s. 23-25, ISSN 1214 - 7672
4. BROŽÍČKOVÁ, C., *Damage to oligodendrocytes and axons following endothelin 1-induced focal cerebral ischemia*, Praha: Univerzita Karlova, Fakulta tělesné výchovy a sportu, Katedra fyzioterapie, 2008, vedoucí diplomové práce MUDr. Jakub Otáhal Ph.D.
5. DakoCytomation, *Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein*, Kód Z 0334, [on line], ©1993, poslední revize 31.7.2003, [cit. 4.1.2008]. dostupné z <http://dist.dako.com/>
6. DEAN A. SEEHUSEN, M.D, Cerebrospinal Fluid Analysis, American Family Physician, 2003, [online], © 2008, [cit. 12.8.2008], dostupné z <http://www.aafp.org/afp/20030915/1103.html>
7. ČIHÁK, R., *Anatomie 1*, Grada Publishing, Praha, 2001, 516 s., ISBN 80-7169-970-5
8. ČIHÁK, R., *Anatomie 3*, Grada Publishing, Praha, 1997, 672 s., ISBN 80-7169-140-2
9. DARWIN, M., *The Pathophysiology of Ischemic Injury*, [online], © 2008, [cit. 4.1.2008], dostupné z <http://www.alcor.org/Library/html/ischemicinjury.html>
10. DHEEN, S.T., KAUR, C., LING, E.A., *Microglial activation and its implications in the brain diseases*, Current Medicinal Chemistry, 2007, roč. 14, č.11, s. 1189-97, ISSN: 0929-8673

11. FÄRBER, K., KETTENMANN, H., *Physiology of microglial cells*, Brain Research Review, 2005, roč. 48, č.2, s. 133-143, ISSN: 0165-0173
12. FERDA, J., *Zobrazení akutní mozkové ischemie*, Česká radiologie, 2007, roč. 61, č.3, s. 231–241, ISSN 1210-7883
13. Genetic Science Learning Center, The University of Utah, [online], © 2008, [cit.2.6.2008], dostupné z <http://learn.genetics.utah.edu/units/addiction/reward/cells.cfm>
14. HAWKINS, B., T., EGLETON, R., D., *Fluorescence imaginf of blood-brain barrier disruption*, Journal on Neuroscience Method, 2006, roč. 151, č.2, s. 262-267 ISSN 0165-0270
15. *Gross Anatomy* [online]. © 2006 [cit. 17.7.2008]. dostupné z <http://www.blackwellpublishing.com/patestas/chapters/6.pdf>
16. GARTSHORE, G., PATTERSON, J., MACRAE I.M., *Influence of Ischemia and Reperfusion on the Course of Brain Tissue Swelling and Blood–Brain Barrier Permeability in a Rodent Model of Transient Focal Cerebral Ischemia*, Experimental neurology, 1997, roč. 147, č.2, s. 353–360, ISSN: 0014-4886
17. QUIGLEY, JD, DREWRY, JJ, MARTIN, KR, *Estimation of plasma volume in Holstein and Jersey calves*, Journal of Dairy Science, 1998, roč. 81, č.5, s. 1308-1312, ISSN 1525-3198
18. JANDA, V., KRAUS, J., *Neurologie pro rehabilitační pracovníky*, Avicenum, Praha, 1987, 231 s.
19. KALINA, M., *Mechanismy sekundárního cerebrálního poškození*, Neurologie pro praxi, roč. 2007, č.1, s. 10–12, ISSN 1213-1814
20. KALITA a kol., *Akutní cévní mozkové příhody*, Maxdorf, Praha, 2006, 623 s., ISBN 80-85912-26-0
21. KETTENMANN, H., RANSOM, B.R., *Neuroglia*, Oxford University press, New York, 2005, 601 s., ISBN 0-19-515-222-0
22. KIERNAN, J.H., *Histological & histochemical methods, Theory & Practice*, Oxford University Press, New York, 2004, 502 s., ISBN 0-7506-49-364

23. KOISTINAHO, M., KOISTINAHO, J., *Interaction between Alzheimer's disease and cerebral ischemia - focus on inflammation*, Brain Research Review, 2005, roč. 48, č.2, s. 240-250, ISSN: 0165-0173
24. KONOPKOVÁ, R., *Changes in Hippocampal Volume after Application of NMDA*. Praha: Univerzita Karlova, Fakulta tělesné výchovy a sportu, Katedra fyzioterapie, 2005, vedoucí diplomové práce MUDr. Jakub Otáhal Ph.D.
25. KOZLER, P., *Osmotické otevření hematoencefalické bariéry v experimentu. Přehled*, Rozhledy v chirurgii, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, Praha, 2001, roč. 80, č.8, s. 390-396, ISSN 0035-9351
26. KOZLER, P., POKORNÝ, J., *Altered Blood-Brain Barrier Permeability and Its Effect on the Distribution of Evans Blue and Sodium Fluorescein in the Rat Brain Applied by Intracarotid Injection*, Physiological Research, 2003, roč.52, č.5, s. 607-614, ISSN 0862-8406
27. KRÝSL, D., *Současné modely experimentální ischemie CNS: fototrombóza a intracerebrální aplikace endothelinu-1*, Československá fyziologie, 2007, roč. 56, č.1, ISSN 1210-6313
28. LEVITAN, I.B., KACZMAREK, L.K., *The Neuron - Cell and Molecular Biology*, NY and Oxford, Oxford University Press, 1997, 543 p. ISBN 0195100212
29. LI, L., LUNDKVIST, A., a kol., *Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia*, Journal of Cerebral Flow & Metabolism, 2008, č.28, s. 468-481, ISSN 0271-678X
30. LODISH, H., et al. *Molecular Cell Biology*. [online]. © 2000 [cit. 4.5.2008]. dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.TOC>
31. MÁTÉFFYOVÁ, A., OTÁHAL, J., TSENOV, G., et. al., *Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death, development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life*, European Journal of Neuroscience, roč. 24, č.2, s. 351–360, 2006

32. MARAGAKIS, NJ, ROTHSTEIN, JD, Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease, *Nature Clinical Practice Neurology*, 2006, roč. 2, č.12, s. 679-689, ISSN 1745-834X
33. MLČOCH, Z., *Oxid dusnatý jako neurotransmiter*, [online], © 2002, [cit.12.8.2008], dostupné z  
[http://www.zbynekmlcoch.cz/new/inc\\_medic/no\\_jako\\_neurotransmitter.doc](http://www.zbynekmlcoch.cz/new/inc_medic/no_jako_neurotransmitter.doc)
34. MZ ČR, Datový standard - verze 4, [online], © 2008, [cit. 12.8.2008] dostupné z  
<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/>
35. OTRUBA, P., *Neuroprotektivní účinky statinů u cévní mozkové příhody*, *Farmakoterapie*, roč. 6, č.2, s. 593-595, ISSN 1801-1209
36. OTÁHAL, J., ústní podání, 13.3.2007
37. Ottova encyklopedie obecných vědomostí, AION CS, s.r.o. [online], © 2003, poslední revize 14.3.2005, [cit. 20.8.2008], dostupné z  
<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/418359-kura-mozkova>
38. PFEIFFER, J., *Neurologie v rehabilitaci*, Grada Publishing, Praha, 2007, 352 s., ISBN 978-80-247-1135-5
39. POKORNÝ, J., KOZLER, P., TROJAN, S., *Úloha vnitřního prostředí nervové tkáně a hematoencefalické bariéry v procesech reparační neuroplasticity*, *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, Praha, 2002, roč.65/98, č.5, str. 307-312
40. RHAWN, J., *Neocortex*, [online], © 2000-2006, [cit. 2008-02-05], dostupné z  
<http://brainmind.com/Neocortex.html> >
41. ROKYTA, R., *Fyziologie*, ISV nakladatelství, Praha 2000, 358 s., ISBN 80-85866-45-5
42. ROTHWELL, J.N., HOPKINS, S.H., *Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action*, *Trends Neurosciences*, Elsevier, 1995, roč.18, č.3, s. 130-136, ISSN 0166-2236

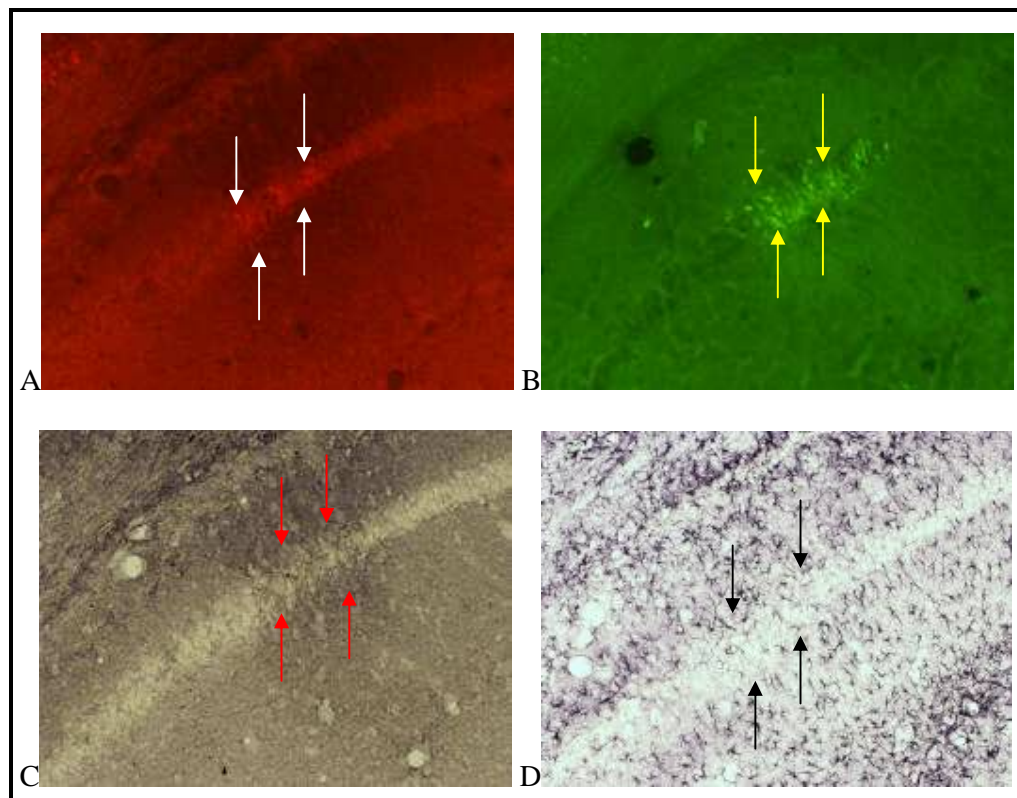
43. ROSAMOND W., et al., *Heart disease and stroke statistics–2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*, *Circulation*, 2007, roč. 115, č. 5, s. 69–171,
44. ROSS, J.G., PRESTON, R.L., BARTLE, S.J., *Evaluation of Sodium Thiosulfate as an Extracellular Water Marker in Cattle*, *Journal of Animal Science*, 1992, č. 70, s. 434-438
45. SAMSA, G.P., et al., *Utilities for major stroke: results from a survey of preferences among persons at increased risk for stroke*, *American Heart Journal*, 1998, roč. 136, č.4, s. 703–713, ISSN 0002-8703
46. SEIDL, Z., OBENBERGER, J., *Neurologie pro studium i praxi*, Grada, Praha, 2004, 365 s., ISBN 80-247-0623-7
47. SEIFERT, G., SCHILLING, K., *Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective*, *Nature Reviews Neuroscience*, 2006, roč. 7, s. 194 - 206
48. SCHMIDT, O.,I., HEYDE, E., C., ERTEL, W., STAHEL, P., F., *Closed head injury - an inflammatory disease?*, *Brain Research Reviews*, 2005, roč. 48, č.2, str. 388–399, ISSN 0165-0173
49. SCHMUED L., C., HOPKINS K., J., *Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration*, *Brain Research*, 2000, roč. 874, č.2, s. 123–130, ISSN 0006-8993
50. SCHMUED, L.,C., *The progression of neuronal, myelin, astrocytic, and immunological changes in the rat brain following exposure to aurothioglucose*, *Brain Research*, 2002, roč. 949, č.1-2, s. 171–177, ISSN 0006-8993
51. SHAH SID, MD , *Stroke Pathophysiology*, Ferne, [online], © 2008, [cit. 12.7.2008], dostupné z <http://www.uic.edu/com/ferne/pdf/pathophys0501.pdf>.
52. SILBERNAGL, S., DESPOPOULOS, A., *Atlas fyziologie člověka*, Grada Publishing, Praha, 2004, 448 s, ISBN 80-247-0630-X
53. SILBERNAGL, S., LANG, F., *Atlas patofyziologie člověka*, Grada, Praha, 2001, s. 404, ISBN 80-7169-968-3

54. ŠŤASTNÝ, F., PLISS, L., HÖSCHL, C., *Interakce mezi proteázami a hematoencefalickou bariérou: Možné důsledky pro klinickou praxi*, Psychiatrie, Tigis s.r.o., Praha, 2002, roč.6, č.4, ISSN 1211-7579
55. ŠIMONOVÁ Z., *Morfologické změny gliových buněk ovlivňují parametry extracelulárního prostoru*, Praha, 2001, disertační práce na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy, školitel: Prof. MUDr. Eva Syková, Dr.Sc
56. ŠIROKÝ, J., *Zdraví: mozková mrtvice (CMP)*, [online], © 2003, poslední revize 20.2.2003, [cit. 2.4.2008], dostupné z <http://archiv.neviditelnypes.zpravy.cz/clanky>
57. TROJAN, S., a kol., *Lékařská fyziologie*, Grada Publishing, Praha, 2003, 772 s., ISBN 80-247-0512-5
58. TSENOV, G., et al., *Intrahippocampal Injection of Endothelin-1: A New Model of Ischemia-induced Seizures in Immature Rats*, *Epilepsia*, 2007, roč. 48, č. 5, s. 7-13
59. VAŇÁSKOVÁ E., *Testování v rehabilitační praxi - cévní mozkové příhody*, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotních oborů, Brno, 2004, 65 s., ISBN 80-7013-398-8
60. VEZZANI A, GRANATA T., *Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence*, *Epilepsia*, 2005, roč. 46, č. 11, str. 1724–1743
61. VOKURKA, M., HUGO, J., a kol., *Velký lékařský slovník*, Maxdorf, Praha, 2005, 1001 s., ISBN 80-7345-058-5
62. VYSKOČIL, F., *Poznámky k funkční neuroanatomii člověka pro biology s přihlédnutím k jiným živočichům*, [online]. © 2002 [cit. 2008-07-28]
63. WHO, *Rehabilitace po CMP*, Grada, Praha, 2004, 199 s., ISBN 80-247-0592-3
64. WELLS, R. B. *Cortical Neurons and Circuits: A Tutorial Introduction* [online]. © 2005 [cit. 2.6.2008]. dostupné z <http://www.mrc.uidaho.edu/~rwells/techdocs/Cortical%20Neurons%20and%20Circuits.pdf>>



65. WESTON, M., R., et.al., *Inflammatory cell infiltration after endothelin-1-induced cerebral ischemia: histochemical and myeloperoxidase correlation with temporal changes in brain injury*, Journal of Cerebral Flow & Metabolism, 2007, č.27, s 100-114
66. WHO, *Rehabilitace po CMP*, Grada, Praha, 2004, 199 s., ISBN 80-247-0592-3
67. WITTNER, L., et al., *Three-dimensional reconstruction of the axon arbor of a CA3 pyramidal cell recorded and filled in vivo*, Brain Structure and Function, July 2007, roč. 212, č. 1, s. 75-83, ISSN: 1863-2653
68. WOLFGANG, J.S., MRAK, R.E., GRIFFIN, T., *Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective*, Journal of Neuroinflammation, 2004, [online], © 2005, [cit. 2.6.2008], dostupné z <http://www.jneuroinflammation.com/content/1/1/14>
69. WALD, J., *Centrální nervový systém*, [online], [cit. 2.6.2008]  
[http://www.anamneza.cz/moduly/lidsketelo.php?soubor=kapitola4\\_3.php](http://www.anamneza.cz/moduly/lidsketelo.php?soubor=kapitola4_3.php)

## PŘÍLOHA Č. 1

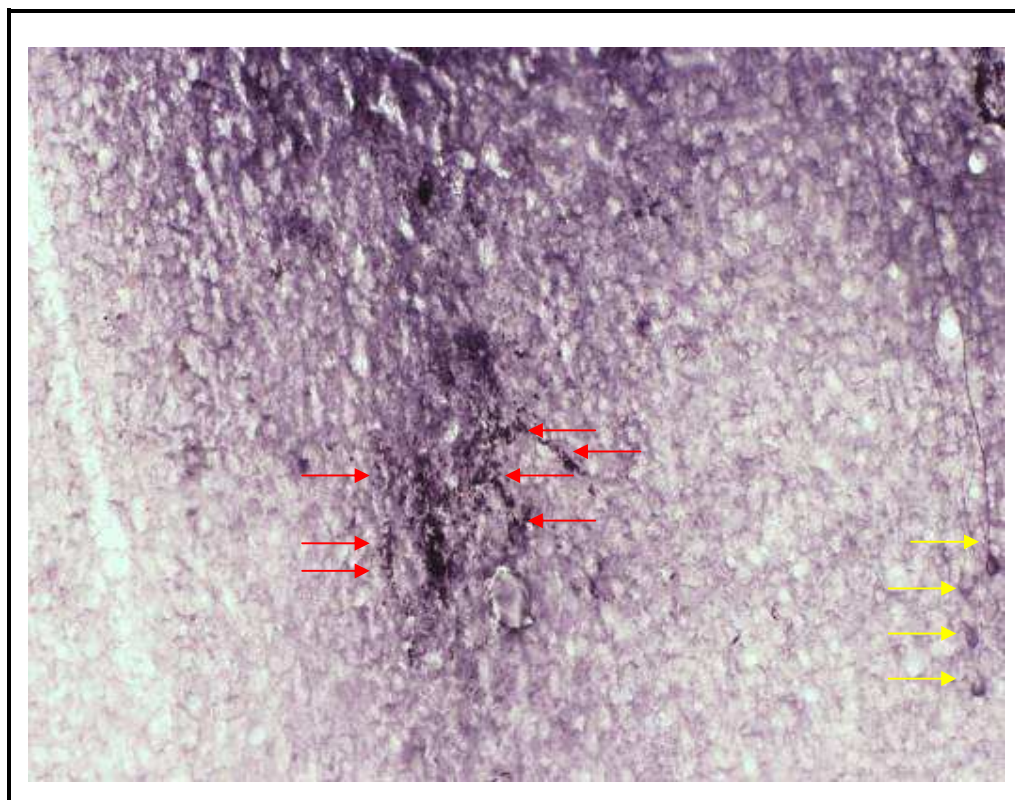


### Přehled všech použitých typů barvení

Přehled barvení v oblasti léze v zasažené části hippocampu (CA1) na ipsilaterální straně ischemie vyvolané ET-1. Poškození hippocampu je viditelné ve všech typech barvení.

- A - extravazace EB ukazující na porušení BBB
- B - degenerující buňky značené FJ-B
- C - extravazace IgG ukazující na porušení BBB
- D - GFAP značící hypertrofické astrocyty

## PŘÍLOHA Č. 2



Distribuce v IgG-pozitivních buňkách u P25 zvířete po aplikaci ET-1. Žluté šipky značí přítomnost IgG v neuronech, červené šipky značí přítomnost IgG v buňkách, které se nám nepodařilo blíže identifikovat.

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obr. 1</b> Astrocyt.....	20
<b>Obr. 2</b> Přítomnost IgG v poškozené oblasti .....	49
<b>Obr. 3</b> Oblast neuronálního poškození .....	49
<b>Obr. 4</b> Rozdělení rozsahu poškození do tří skupin .....	51
<b>Obr. 5</b> FJ-B pozitivní oblasti .....	52
<b>Obr. 6</b> Evans Blue versus Fluoro-Jade B .....	53
<b>Obr. 7</b> Přehledný obraz rozdílu ipsilaterální a kontralaterální strany .....	54
<b>Obr. 8</b> Oblast pozitivní na přítomnost IgG v buňkách - neuronech .....	55
<b>Obr. 9</b> Barvení na astrocyty protilátkou proti GFAP v kortexu .....	56
<b>Obr. 10</b> Srovnání Evans Blue versus GFAP .....	57
<b>Obr. 11</b> Morfologie buněk makroglie .....	58