

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Autoreferát dizertační práce

Patofyziologie poškození mozku po subarachnoidálním krvácení a možnosti terapeutického ovlivnění

MUDr. Martin Kolář

2019

Školitel: Prof. MUDr. Jan Páchl, CSc.

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady:

Fyziologie a patofyziologie člověka, Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný,
DrSc.

Školící pracoviště:

Univerzita Karlova, Klinika anesteziologie a resuscitace, Fakultní
nemocnice Královské Vinohrady

Autor:

MUDr. Martin Kolář

Školitel:

Prof. MUDr. Jan Páchl, CSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy

Obsah	
Souhrn	3
Summary	5
1 Úvod	7
2 Hypotézy a cíle práce	7
3 Metodika	8
3.1 Pokusná zvířata	8
3.2 Model SAK	8
3.3 Měření mozkové perfuze	8
3.4 Farmakoterapie	8
3.5 Dekompresní kraniektomie	9
3.6 Volné radikály a preemptivní podání melatoninu	9
3.7 Statistické vyhodnocení	10
4 Výsledky	10
4.1 Důsledky subarachnoidálního podání krve / IR	10
4.2 Terapeutické intervence	12
5 Diskuse	16
5.1 Efekt intracerebroventrikulárního podání nitroprussidu sodného	16
5.2 Efekt dekompresní kraniektomie	17
5.3 Neurologický deficit po experimentálním SAK a efekt preemptivně podaného melatoninu	19
6 Závěry	19
7 Literatura	21
8 Publikace autora	23

Souhrn

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

Cílem práce bylo testovat následující hypotézy: 1. SAK způsobí pokles perfuze mozku mechanismem nitrolební hypertenze i časnou vazokonstrikci, 2. Časné perfuzní změny mohou být ovlivněny podáváním vazodilatacia – donoru NO, i eliminací nitrolební hypertenze, 3. V důsledku SAK dochází ke vzniku volných radikálů, 4. Důsledky poškození volnými radikály lze zmírnit podáním antioxidantu (melatonin).

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

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

K odlišení vlivu nitrolební hypertenze a vazokonstrikce na hypoperfuzi byl testován vliv dekompresní kraniektomie (DK) na perfuzní poruchy v časně fázi SAK. Zvířatům byla provedena rozsáhlá oboustranná fronto-temporo-parietální kraniektomie a durotomie. Jakožto výraz míry vazokonstrikce byla stanovena mozková cévní rezistence jako podíl CPP a změny mozkové perfuze v procentech výchozích hodnot ($R = \text{CPP} / \Delta \text{perfuze}$).

Ve třetí části experimentu byla metodou EPR/ESR měřena hladina volných radikálů po navození SAK. Následně bylo hodnoceno podání melatoninu na dlouhodobý neurologický deficit. Melatonin (100 mg / kg *i.p.*) byl podán 1 hod. před navozením SAK. Neurolo-

gické změny byly sledovány behaviorálními testy. Na závěr proběhlo morfologické hodnocení počtu odumřelých neuronů v hilu hippokampu.

Výsledky: U necelé poloviny zvířat léčených SNP došlo k závažné systémové hypotenzi a signifikantnímu poklesu mozkové perfuze, u zbylých zvířat se změny perfuze nelišily od kontrolních skupin. Podání druhé dávky SNP vedlo k mírnému vzestupu perfuze mozkové kůry ve srovnání s hodnotami před podáním SNP, nicméně v porovnání se skupinou bez farmakointervence nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl.

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

Zvýšení hladin hydroxylových i nitroxylových radikálů bylo pozorováno jak u zvířat s navozeným SAK, tak u falešně operovaných. Podání melatoninu signifikantně snížilo počet odumřelých buněk v hippokampu, nicméně mezi jednotlivými skupinami nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v sensorimotorických testech. I přes výraznou vizuální rozdílnost výsledků jsme neprokázali statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami v učení v Morrisově vodním bludišti.

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

Summary

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

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

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

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

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

In the third experiment, we measured levels of free radicals in both SAH and sham groups using the EPR/ESR method. Then we

evaluated the effect of melatonin on long-time neurologic deficit. Melatonin (100 mg / kg *i.p.*) was administered 1 hour before SAH induction or sham procedure. Neurologic deficit was evaluated by behavioral tests. At the end, a blinded evaluator counted the number of dead neurons in slices of hippocampal hilus.

Results: Approximately one half of SNP-treated animals developed serious systemic hypotension and significant decrease of brain perfusion; perfusion in the other animals did not differ from control group. Second dose of SNP slightly increased the brain perfusion; nevertheless, this increase was insignificant compared to animals without pharmacointervention.

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

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

Conclusions: Perfusion impairment after SAH is caused mainly by intracranial hypertension and decrease of cerebral perfusion pressure. Decompressive craniectomy eliminated the intracranial hypertension and decreased the immediate mortality of experimental animals; on the other hand, it did not improve the cortical perfusion and increased cerebral vascular resistance. Intracerebroventricular administration of sodium nitroprusside improved the brain perfusion only minimally, besides, it had serious side effects (hypotension) that worsened the perfusion. Preemptive administration of melatonin decreased the amount of dead neurons in hippocampus; nevertheless no beneficial effect in neurobehavioral tests was detected.

1 Úvod

Neúrazové subarachnoidální krvácení (SAK) způsobené rupturou aneurysmatu je cévní mozková příhoda s vysokou mortalitou. Důsledky SAK jsou akutní i dlouhodobé. Na rozvoji neurologického poškození při SAK se podílí nitrolební hypertenze, časná i pozdní vazokonstrikce mozkových tepen i zánětlivá odpověď. Dosavadní výzkumy ukazují, že významnou roli bezprostředně i dlouhodobě po SAK hraje oxid dusnatý (NO) a jím zprostředkovaná vazodilatace [1].

Prvotním inzultem při SAK je prudký vzestup nitrolebního tlaku (intracranial pressure, ICP) [2], v jehož důsledku dochází k poklesu mozkového perfuzního tlaku (cerebral perfusion pressure, CPP) a průtoku krve mozkem (cerebral blood flow, CBF). Iniciální pokles CBF však souvisí nejen s nitrolební hypertenzí, ale i s časnou vazokonstrikcí mozkových tepen [3]. Vazokonstrikční efekt arteriální krve je připisován poruše vazodilatace zprostředkované oxidem dusnatým. Jedním z uvažovaných mechanismů je vychytávání (scavenging) NO hemoglobinem, který je po SAK přítomen v subarachnoidálním prostoru [4]. Dalším scavengerem NO je superoxidový anion (O_2^-), se kterým se NO slučuje za vzniku prudce reaktivního a toxického peroxynitritu ($ONOO^-$) [5]. Jiný možný mechanismus časného poškození mozku je dysfunkce endotelu, charakterizovaná funkčními a morfologickými změnami endotelu [1], v jejichž důsledku dochází k selhání endotelem zprostředkované vazodilatace [6]. Dalšími mechanismy časného i pozdního poškození mozku po SAK jsou zánětlivá odpověď [7] a poškození volnými kyslíkovými radikály – superoxidovým aniontem, hydroxylovým radikálem, peroxidem vodíku, NO, peroxynitritem [1].

2 Hypotézy a cíle práce

Cílem práce bylo na zvířecím modelu otestovat následující hypotézy: 1. subarachnoidální krvácení způsobí pokles perfuze mozku mechanismem nitrolební hypertenze i časnou vazokonstrikcí, 2. časná perfuzní změny mohou být ovlivněny podáváním vazodilatacia – donoru NO, i eliminací nitrolební hypertenze, 3. v důsledku

SAK dochází ke vzniku volných radikálů, 4. důsledky poškození volnými radikály lze zmírnit podáním antioxidantu (melatonin).

3 Metodika

3.1 Pokusná zvířata

Pokusy byly prováděny na samcích laboratorního potkana kmene Wistar (220 – 240 g). Zákroky byly prováděny v celkové anestezii ketaminem (100 mg/kg) a midazolamem (1,2 mg/kg) *i.p.* doplněné infiltrací měkkých tkání hlavy lokálním anestetikem (trimekain 1% 0.3 ml). Zvířatům byla kanylována *a. femoralis* a zbroušena kalva nad pravou hemisférou.

3.2 Model SAK

K navození SAK byl použit model injekce do prechiasmatické cisterny [8]. Po kanylaci prechiasmatické cisterny bylo aplikováno 250 μ l čerstvé autologní neheparinizované arteriální krve během 15 sekund, kontrolní skupině (sham-operated) byl podán stejným způsobem bolus izotonického roztoku (IR – 0,9% roztok NaCl) o tělesné teplotě.

3.3 Měření mozkové perfuze

Perfuzce mozkové kůry byla snímána 1 minutu před intracister-nální injekcí, během aplikace krve nebo izotonického roztoku a 30 minut po aplikaci. Perfuze byla měřena metodou Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA; přístroj PeriCam PSI HR, Perimed Instruments, Švédsko).

3.4 Farmakoterapie - intracerebroventrikulární aplikace farmak

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

3.5 Dekompresní kraniektomie

K odlišení vlivu časně vazokonstrikce od efektu nitrolební hypertenze byla pokusným zvířatům provedena rozsáhlá oboustranná fronto-temporo-parietální kraniektomie a durotomie. Pro měření nitrolebního tlaku bylo zavedeno ICP čidlo do levé mozečkové hemisféry. CPP byl vypočítán pomocí rovnice: $CPP = MAP - ICP$.

3.6 Volné radikály a preemtivní podání melatoninu

Metodou EPR/ESR byla měřena hladina volných radikálů po navození SAK a u kontrolní skupiny. Následně bylo hodnoceno podání melatoninu na dlouhodobý neurologický deficit. Melatonin (100 mg / kg *i.p.*) byl podán 1 hod. před navozením SAK. V druhé části byl 1 hodinu před navozením SAK podán melatonin 100 mg/kg *i.p.* Předpokládané změny byly následně sledovány pomocí behaviorálních testů a morfologicky. V tomto experimentu nebyla kanylována *a. femoralis* a k navození SAK byla podána alogenní arteriální krev.

3.6.1 Behaviorální testy

Senzorimotorické funkce byly sledovány za 24 hodin po iniciálním inzultu: pohyb na rotujícím válci (rotarod) a výdrž na horizontální hrazdě (beam balance). Následovalo učení v Morrisově vodním bludišti (Morris Water Maze, MWM) během šesti dnů. Poslední den učení byla na závěr testována retence paměti pomocí „probe testu“ (memory retrieval test), následující den „probe test“ byl zopakován. Parametry byly vyhodnocené v oblastech vodního bludiště definovaných pomocí programu EthoVision XT10.

3.6.2 Morfologické hodnocení

U 3 jedinců z každé skupiny bylo 7. den po navození SAK provedeno histologické vyšetření mozku. V mozkových řezech byly spočítány zaniklé neurony v oblasti hilu hippocampu. Pro každou skupinu byl zaslepeným hodnotitelem stanoven jejich průměrný počet v jednom řezu.

3.7 Statistické vyhodnocení

Rozdíly ICP, CPP, změny mozkové perfuze a mozkové cévní rezistence mezi skupinami byly porovnány pomocí dvouvýběrové ANOVA s Bonferroniho *post-hoc* testem. Změny perfuze ve skupinách se SAK, maximum perfuze dosažené po počátečním poklesu způsobeném aplikací krve do prechiasmatické cisterny, hodnoty perfuze při sekundárním poklesu po dosažení maximální hodnoty, a změny krevního tlaku ve skupinách léčených nitroprussidem sodným byly porovnány pomocí ANOVA pro opakovaná měření. Hladiny volných radikálů, senzomotorické testy: Kruskal – Wallis test s Dunnovým *post-hoc* testem, nebo jednofaktorová ANOVA.

Pro hodnocení prostorového učení a paměti byly použity následující parametry: latence plavání, celková uplavaná vzdálenost, průměrná rychlost plavání a „search error“. Data byla hodnocena pomocí dvoufaktorové ANOVA pro opakovaná měření s Tukeyho *post-hoc* testem. Při hodnocení korelace mezi CPP a perfuzí byl vypočten Spearmanův korelační koeficient.

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

4 Výsledky

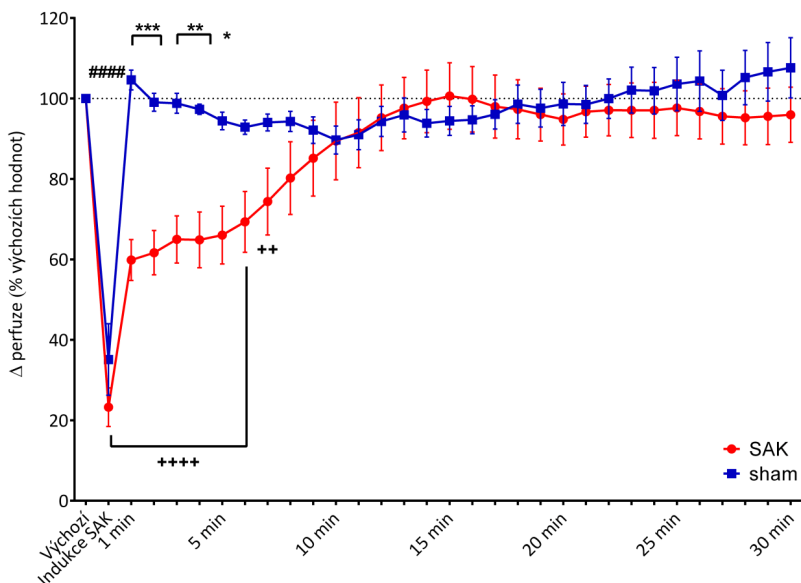
4.1 Důsledky subarachnoidálního podání krve / IR

4.1.1 Změny mozkové perfuze

Podání krve i izotonického roztoku do prechiasmatické cisterny bylo spojeno s významným poklesem mozkové perfuze (Obr. 1). Subarachnoidální podání krve bylo spojeno s 29% mortalitou (7 zvířat z 24).

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

kračoval do konce monitorovaného období (30 min po navození SAK).



Obr. 1 Perfuze byla oproti výchozím hodnotám signifikantně nižší v prvních 9 minutách po navození SAK (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, ++++ $p < 0,0001$). Ve srovnání s kontrolní skupinou byla perfuze signifikantně nižší prvních 6 minut po navození SAK (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Po podání IR došlo k výraznému poklesu perfuze oproti výchozí hodnotě (##### $p < 0,0001$) a následně k rychlému návratu k normě.

4.1.2 Změny nitrolebního tlaku a mozkového perfuzního tlaku

Během podání arteriální krve do prechiasmatické cisterny došlo k významnému vzestupu ICP ($74,8 \pm 12,8$ mmHg, $p < 0,001$) a poklesu CPP oproti výchozím hodnotám ($32,6 \pm 17,1$ mmHg, $p < 0,001$). Po podání IR došlo k zvýšení ICP na $76,2 \pm 7,8$ mmHg ($p < 0,001$), CPP klesl na $18,8 \pm 6,2$ mmHg ($p < 0,001$). S vzestupem ICP a poklesem CPP korespondoval i pokles mozkové perfuze. K návra-

tu ICP k fyziologickým hodnotám došlo během 4 minut po aplikaci arteriální krve a za 2 minuty po aplikaci FR.

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

4.1.3 Hladiny volných radikálů

Metodou EPR/EPR jsme po navození SAK prokázali zvýšení hladin obou měřených radikálů. V porovnání s kontrolami (bez jakékoliv chirurgické intervence) byly ve skupinách operovaných zvířat oba radikály zvýšeny bez ohledu na přítomnost SAK.

4.2 Terapeutické intervence

4.2.1 Efekt intrathekálního podání nitroprussidu sodného

Nitroprussid sodný byl pokusným zvířatům podáván po navození SAK ve dvou fázích: první dávka po 3 minutách od navození SAK, druhá dávka podle aktuálního průběhu změn perfuze mezi 11. a 25. minutou, v okamžiku dosažení „plateau“ stavu. Po podání SNP byly pozorovány 2 odlišné reakce: v 8 případech nedošlo k žádné změně arteriálního krevního tlaku a časový průběh změn mozkové perfuze se nijak nelišil od vývoje mozkové perfuze u zvířat ve skupinách SAK-SNP a SAK-V. U zbývajících 7 zvířat se vyvinula závažná systémová hypotenze doprovázená poklesem mozkové perfuze. Ve srovnání s normotenzními zvířaty byla v této podskupině mozková perfuze signifikantně nižší mezi 30. sec a 1 min 40 sec po podání SNP.

U 8 zvířat léčených nitroprussidem došlo k sekundárnímu poklesu perfuze po předchozím dosažení vrcholu (bifázický průběh tvaru „vrchol – plateau“). Těmto zvířatům byla podána další dávka 10 μg SNP ICV. Po podání této dávky došlo k poklesu krevního tlaku. Po 2 minutách po podání 2. dávky SNP došlo k nesignifikantnímu vzestupu perfuze. Tento vzestup perfuze nedosáhl hodnot pozorovaných ve skupině *sham*-SNP.

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

Falešně operovaná (sham-operated) zvířata

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

4.2.2 Dekompresní kraniektomie

Vlivem dekompresní kraniektomie došlo k signifikantnímu snížení ICP během intracisternální aplikace arteriální krve nebo FR – $74,8 \pm 11,5$ mm Hg versus $18,4 \pm 4,6$ mm Hg ve skupinách se SAK ($p < 0,01$) a $76,2 \pm 6,9$ mm Hg versus $20,0 \pm 1,7$ mm Hg v *sham* skupinách ($p < 0,0001$). Ve všech skupinách došlo k návratu ICP a CPP k fyziologickým hodnotám v průběhu 4 minut po intracisternální aplikaci.

Zvýšený ICP v okamžiku intracisternální injekce vedl k výraznému poklesu perfuze ve skupinách SAK i *sham* ($25,7 \pm 5$ % výchozích hodnot, $p < 0,001$, a $35,1 \pm 8,3$ %, $p < 0,001$). Méně významný pokles perfuze byl v okamžiku subarachnoidální injekce pozorován i u DK-SAK a DK-*sham* skupin ($70,2 \pm 3,9$ % výchozích hodnot, $p < 0,001$, a $80,9 \pm 3,0$ %, $p < 0,001$). Ve skupině *sham* zvířat došlo k návratu mozkové perfuze k výchozím hodnotám během 1 minuty, zatímco ve skupině SAK byla perfuze mozku signifikantně nižší až do 6. minuty po intracisternální injekci ($p < 0,05$, porovnání s výchozími hodnotami). U skupiny DK-SAK zůstala mozková perfuze snižena do 28. minuty po navození SAK ($p < 0,05$, porovnání s výchozími hodnotami); tento pokles byl způsoben zvýšenou cévní re-

zistenci (obr. 2). Mírná, ale významná ($p < 0,05$) hypoperfuze trvající 6 minut po subarachnoidální injekci byla pozorována i u DK-sham zvířat.

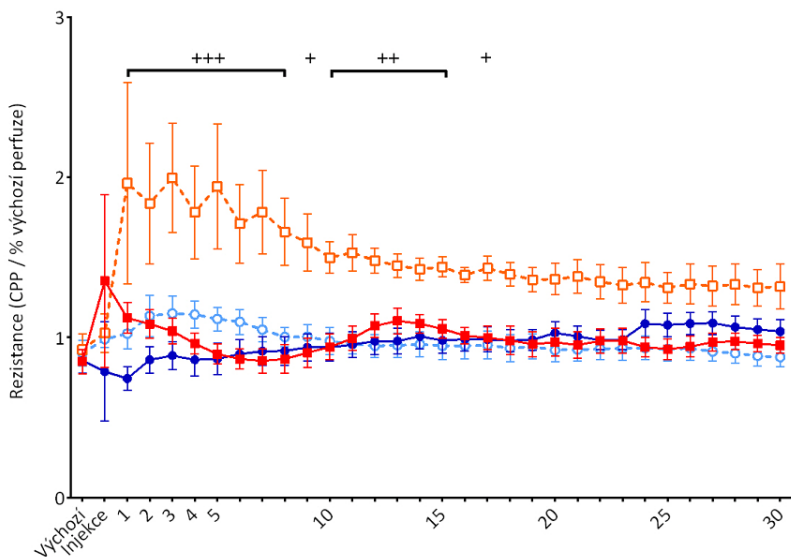
I přes redukci ICP však DK nezlepšila časnou hypoperfuzi po SAK, samotná dekompresní kraniektomie vedla ke snížení perfuze ve srovnání se skupinami bez DK. Ve skupině DK- SAK došlo během navození SAK k mírnému poklesu perfuze ($70,2 \pm 3,6$ % výchozích hodnot, signifikantně vyšší ve srovnání se skupinou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

Změny mozkové cévní rezistence a efekt DK

Mozková cévní rezistence se nezměnila u skupiny SAK, *sham* ani DK-*sham*, naproti tomu ve skupině DK-SAK vzrostla krátce (20 sekund) po intracisternální aplikaci krve a zůstala zvýšená až do 16. minuty (obr. 2).

Mortalita

Čtyři zvířata (25 %) ve skupině SAH, 0 % ve skupině SAK-DK a obou falešně operovaných skupinách.



Obr. 2 Ve skupině DK-SAK byl pozorován vzestup mozkové cévní rezistance a trval do 16. minuty po navození SAK (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$).

4.2.3 Melatonin

Změny mozkové perfuze po podání melatoninu

Mezi skupinami (SAK versus M-SAK a Sham versus M-Sham) nebyly pozorovány rozdíly, samotná porucha perfuze bezprostředně po navození SAK nebyla melatoninem ovlivněna.

Ovlivnění změn v behaviorálních testech preemptivním podáním melatoninu

V testu výdrže na horizontální hrazdě ani na rotujícím válci nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi skupinami. Test prostorové orientace: proces učení nebyl narušen, v prvních dnech učení byly pozorovány rozdíly v rychlosti plavání při hledání ostrůvku. V memory retrieval testu se nepodařilo prokázat statisticky signifikantní rozdíly

mezi jednotlivými skupinami, a to ani v 6., ani v 7. dni po navození SAK.

Morfologické hodnocení

Preemptivní aplikace melatoninu snížila počet odumřelých buněk jak po SAK, tak po aplikaci IR.

5 Diskuse

Hlavním mechanismem uplatňujícím se v časně hypoperfuzi po SAK byla nitrolební hypertenze a pokles mozkového perfuzního tlaku. Přestože dekompresní kraniektomie efektivně snížila nitrolební tlak a bezprostřední mortalitu, vedla paradoxně ke zvýšení mozkové cévní rezistence.

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

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

5.1 Efekt intracerebroventrikulárního podání nitroprussidu sodného

Tato studie je první, ve které byl testován efekt intracerebroventrikulárního podání SNP v podmínkách časně hypoperfuze po subarachnoidálním krvácení. Podávání donorů oxidu dusnatého bylo zkoumáno v několika experimentálních i klinických studiích v podmínkách pozdního vazospasmu. Role donorů NO v prevenci nebo léčbě EBI byla studována pouze v experimentu [9].

V tomto experimentu nebyl pozorován žádný příznivý efekt podání SNP 3 minuty po navození SAK. U poloviny zvířat léčených SNP došlo k arteriální hypotenzi a k poklesu mozové perfuze. Toto

může být způsobeno buď arteriální hypotenzí, nebo nitrolební hypertenzí. V podmínkách porušené autoregulace je mozková perfuze závislá na CPP a MAP [10] a tudíž arteriální hypotenze po podání SNP může vést k snížení mozkové perfuze, tuto hypotézu podporuje i nález významné korelace mezi CPP a perfuzí u zvířat se SAK. Po druhé dávce SNP, která byla podána po druhém poklesu perfuze, byl pozorován mírný vzestup perfuze mozku, který však nedosahoval úrovně pozorované ve skupině sham-SNP. Tato diskrepance mezi efektem SNP u zvířat se SAK a falešně operovaných může mít více důvodů. Nedostatečný efekt ICV aplikace SNP může být způsoben zhoršenou distribucí léčiva v subarachnoidálním prostoru. Po SAK jsou arterie Willisova okruhu obaleny koagulem, které může bránit difuzi vazodilatancia a tím pádem není dosaženo dostatečné koncentrace NO v cévní stěně [11], v důsledku SAK byla rovněž pozorována zpomalená cirkulace likvoru subarachnoidálním prostorem a jeho zhoršený průnik do mozkového parenchymu [12]. Další možné vysvětlení je, že dávka vedoucí ke vzestupu perfuze ve skupině sham-SNP může být nedostatečná v situaci, kdy hladina NO je po SAK snižena v důsledku vychytávání. Tuto možnost podporuje skutečnost, že po druhé dávce SNP došlo k mírnému zvýšení perfuze, které však nedosáhlo hodnot pozorovaných ve skupině sham-SNP.

U významného počtu testovaných zvířat byla po ICV podání SNP pozorována arteriální hypotenze. Příčinou může být – kromě vstřebání SNP do systémové cirkulace – přímý efekt nitroprussidu na struktury zodpovědné za regulaci arteriálního krevního tlaku – např. *organum vasculosum laminae terminalis*, uložené ve třetí mozkové komoře [13].

5.2 Efekt dekompresní kraniektomie

Perfuzí mozku je závislá na mozkovém perfuzním tlaku (CPP = MAP – ICP) a globální rezistencí mozkových cév. Úvodní pokles perfuze je způsoben zvýšením objemu subarachnoidálního prostoru a tudíž zvýšením ICP a snížením CPP [14, 15]. Ve studiích provedených na zvířecím modelu nicméně tato hypoperfuzie trvala i po vzestupu CPP [14, 15]. Příčinou této hypoperufze může být časná vazokon-

strikce (tedy zvýšená rezistence mozkového cévního řečiště) způsobená vychytáváním (scavengingem) oxidu dusnatého a porušením endotelem zprostředkované vazodilatace. Cílem tohoto experimentu bylo oddělit od sebe tyto dva mechanismy, které se podílejí na vzniku časné hypoperfuze (tedy změny CPP a mozkové cévní rezistence) a určit jejich vliv na poruchy mozkové perfuze.

Navození SAK zvířatům bez DK vedlo k prudkému vzestupu ICP a k poklesu CPP až téměř k nulovým hodnotám, což bylo provázáno 25% mortalitou. DK umožnila dostatečnou expanzi intrakraniálního objemu, takže po indukci SAK došlo pouze k mírnému vzestupu ICP a k poklesu bezprostřední mortality z 25 % na 0 %.

Hlavním zjištěním je, že po navození SAK nedošlo k výraznější změně mozkové cévní rezistence, nebyla tedy pozorována jinými autory popisovaná časná vazokonstrikce. Důvodů může být několik. Roli může hrát způsob měření mozkové perfuze (LASCA snímající velký povrch hemisféry versus bodové měření laser-dopplerovskou sondou). Výsledky může ovlivnit i použitá anestezie nebo model navození SAK.

Dalším zjištěním je, že ačkoliv preemptivní DK snížila mortalitu po navození SAK, vedla k protražovanému snížení mozkové perfuze, které bylo způsobeno především zvýšenou rezistencí mozkových cév. Snížená perfuze ve skupině DK-SAK může být způsobena herniací mozkové tkáně. Ta je pozorována zpravidla při nepřiměřeně malé dekompresní kraniektomii; v tomto experimentu byla tedy provedena rozsáhlá fronto-temporo-parietální kraniektomie, která by měla této komplikaci předejít.

Zvýšená rezistence mozkových cév spolu se snížením perfuze ve skupině DK-Sham naznačuje, že DK sama o sobě může do jisté míry zvýšit mozkovou cévní rezistenci. Expanze edematózní tkáně nad úroveň kraniektomie může způsobit protažení axonů a tím zpět k poškození neuronů [16]. V našem modelu snížila DK mortalitu z 25 % na 0 %, nicméně zhoršila perfuzi mozku. Podobně v klinické studii DK po úrazu mozku snížila mortalitu, ale zvýšila podíl těžce neurologicky postižených pacientů [17].

5.3 Neurologický deficit po experimentálním SAK a efekt preemptivně podaného melatoninu

Samotná časná porucha perfuze nebyla melatoninem ovlivněna, vzhledem ke vzniku volných radikálů v důsledku SAK lze předpokládat, že melatonin může ovlivnit změny v pozdějším průběhu. Mechanismus antioxidačního účinku melatoninu je dvojitý: ve fyziologických hladinách se uplatňuje jeho schopnost downregulace prooxidačních enzymů a stimulace exprese enzymů antioxidačních, při supranormálních hladinách melatonin funguje jako scavenger, neboť se snadno uplatňuje jako donor elektronu [18].

V této studii jsme zjistili, že preemptivní podání melatoninu ve vysoké dávce (100 mg/kg) efektivně zabránilo odumírání buněk v hippokampu, což je v souladu s předchozími výsledky prováděnými na modelu SAK. Ve srovnání s předchozími pracemi jsme však po SAK nepozorovali významné změny v sensorimotorických testech a testech učení a paměti. Nesignifikantní rozdíly v sensorimotorických testech mohou mít několik vysvětlení:

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

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

6 Závěry

Subarachnoidální aplikace arteriální krve i izotonického roztoku způsobila prudký pokles mozkové perfuze. V rozvoji perfuzních poruch se převážně uplatňuje mechanismus nitrolební hypertenze a

poklesu mozkového perfuzního tlaku, nebyla pozorována zvýšená mozková cévní rezistence. Eliminace nitrolební hypertenze dekompresní kraniektomií snížila bezprostřední mortalitu pokusných zvířat, nicméně nezlepšila perfuzi mozku, naopak vedla ke zvýšení mozkové cévní rezistence.

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

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

7 Literatura

1. Sehba FA, Hou J, Pluta RM and Zhang JH: The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol* **97**: 14-37, 2012.
2. Voldby B and Enevoldsen EM: Intracranial pressure changes following aneurysm rupture. Part 3: Recurrent hemorrhage. *J Neurosurg* **56**: 784-9, 1982.
3. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, DiPerna CA, Jenkins AL, 3rd and Vallabhajosyula P: Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **42**: 352-60; discussion 360-2, 1998.
4. Sehba FA, Schwartz AY, Chereshev I and Bederson JB: Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**: 604-11, 2000.
5. Beckman JS and Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* **271**: C1424-37, 1996.
6. Park KW, Metais C, Dai HB, Comunale ME and Sellke FW: Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Anesth Analg* **92**: 990-6, 2001.
7. Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Manoranjan B, Turner RC, McConnell E, Vates GE, Huber JD, Rosen CL and Simard JM: Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Neuroinflammation: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* **17**: 497, 2016.
8. Prunell GF, Mathiesen T and Svendgaard NA: A new experimental model in rats for study of the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage. *Neuroreport* **13**: 2553-6, 2002.
9. Sehba FA, Ding WH, Chereshev I and Bederson JB: Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **30**: 1955-61, 1999.
10. Lang EW, Lagopoulos J, Griffith J, Yip K, Yam A, Mudaliar Y, Mehdorn HM and Dorsch NW: Cerebral vasomotor reactivity testing in head injury: the link between pressure and flow. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **74**: 1053-9, 2003.
11. Pluta RM, Butman JA, Schatlo B, Johnson DL and Oldfield EH: Subarachnoid hemorrhage and the distribution of drugs delivered into the cerebrospinal fluid. Laboratory investigation. *J Neurosurg* **111**: 1001-7, 1-4, 2009.
12. Goulay R, Flament J, Gauberti M, Naveau M, Pasquet N, Gakuba C, Emery E, Hantraye P, Vivien D, Aron-Badin R and Gaberel T: Subarachnoid Hemorrhage Severely Impairs Brain

Parenchymal Cerebrospinal Fluid Circulation in Nonhuman Primate. *Stroke* **48**: 2301-2305, 2017.

13. Lin MT, Pan SP, Lin JH and Yang YL: Central control of blood pressure by nitrergic mechanisms in organum vasculosum laminae terminalis of rat brain. *Br J Pharmacol* **127**: 1511-7, 1999.

14. Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH and Svendgaard NA: Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery* **52**: 165-75; discussion 175-6, 2003.

15. Bederson JB, Germano IM and Guarino L: Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke* **26**: 1086-91; discussion 1091-2, 1995.

16. Cooper DJ, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D'Urso P, Kossmann T, Ponsford J, Seppelt I, Reilly P and Wolfe R: Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *N Engl J Med* **364**: 1493-502, 2011.

17. Hutchinson PJ, Kolias AG, Timofeev IS, Corteen EA, Czosnyka M, Timothy J, Anderson I, Bulters DO, Belli A, Eynon CA, Wadley J, Mendelow AD, Mitchell PM, Wilson MH, Critchley G, Sahuquillo J, Unterberg A, Servadei F, Teasdale GM, Pickard JD, Menon DK, Murray GD and Kirkpatrick PJ: Trial of Decompressive Craniectomy for Traumatic Intracranial Hypertension. *N Engl J Med* **375**: 1119-30, 2016.

18. Hardeland R: Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* **27**: 119-30, 2005.

8 Publikace autora

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce, v časopisech s IF

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

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

Publikace, které jsou podkladem dizertační práce, v časopisech bez IF

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

Publikace autora, nesouvisející s dizertační prací

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