

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č.6: Zdravotnictví

Reakce ependymálních buněk na subarachnoidální krvácení

Tereza Richtrová

Jihomoravský kraj

Brno, 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Reakce ependymálních buněk na subarachnoidální krvácení

Ependymal cell response to subarachnoid hemorrhage

Autoři: Tereza Richtrová

Škola: Gymnázium Matyáše Lercha, Žižkova 55, příspěvková organizace

Kraj: Jihomoravský

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

Brno, 2023

Prohlášení

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

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

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

V Brně dne

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Marku Joukalovi Ph.D., přednostovi Anatomického ústavu Masarykovy univerzity, za trpělivost, zasvěcení do problematiky a cenné rady při tvorbě mé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Klaudivii Hašanové, asistentce na Anatomickém ústavu, za pomoc v zorientování se v problematice a za konzultaci týkající se mé práce a Lumírovi Trenčanskému, laborantovi Anatomického ústavu, za pomoc ve statistickém vyhodnocení výsledků a zasvěcení do práce s analytickými programy.

jihomoravský kraj



Tato práce byla vypracována za finanční podpory Jihomoravského kraje.

Cíle práce

Cílem této práce bylo sledovat expresi enzymů hemoxygenázy a biliverdinreduktázy v ependymálních buňkách potkanů v reakci na subarachnoidální krvácení ve srovnání s případy aplikace umělého mozkomíšního moku do mozku, při které došlo ke zvýšení intrakraniálního tlaku. Výsledky těchto skupin byly ještě srovnány s intaktními zvířaty.

Anotace

V této práci se zabýváme reakcí ependymálních buněk na subarachnoidální krvácení. Ependymální buňky jsou speciální gliové buňky, které se nacházejí v centrální nervové soustavě. Jejich primární funkcí je produkovat mozkomíšní mok, díky čemuž se podílejí na regeneraci, které ale pomáhají i vypouštěním jiných enzymů. Vystylají centrální kanál míšný a dutinu mozkovou. Mozek je zásobován krví z dvou párových tepen; vertebrální a vnitřní krční. Větve těchto tepen jsou navzájem propojeny a vytvářejí tzv. Willisův okruh, který se nachází v subarachnoidálním prostoru, což je prostor mezi arachnoideou a omozečnicí (dvěma ze tří mozkových plen), vyplněný mozkomíšním mokem. K subarachnoidálnímu krvácení (SAK) dochází nejčastěji z důvodu ruptury aneurysmatu (výdutě) cévní stěny Willisova okruhu. SAK způsobuje, že v mozku dojde k nárůstu intrakraniálního tlaku, což způsobuje poškození buněk. Mimo to je ještě část mozku, která byla doposud prokrvována tepnou, u které došlo k ruptuře, najednou bez přísunu krve, což může vést k mrtvici. Z důvodu tohoto nebezpečí dojde k reakci ependymálních buněk tím, že začnou produkovat enzymy, díky kterým se snaží krve zbavit a rozložit subarachnoidálnímu prostoru škodlivý hemoglobin.

Proto jsme se v této práci zaměřili na sekreci enzymů hemoxygenázy-1 (HO-1) a biliverdinreduktázy (BR), které se podílejí na rozkladu hemu, produkovaných ependymálními buňkami a zkoumali jsme jejich koncentraci po 1, 3 a 7 dnech po subarachnoidálním krvácení. Výzkum jsme prováděli na potkanech, jimž byla do subarachnoidálního prostoru vstříknuta krev jako simulace krvácení (skupina SAK). Do pokusu byla zařazena i skupina s názvem ACSF, u níž se místo krve vstříknul umělý mozkomíšní mok (ACSF = artificial cerebrospinal fluid) pouze pro zvýšení intrakraniálního tlaku bez vlivu krve. Hladinu enzymů jsme zjišťovali metodou nepřímé imunohistochemie a porovnávali jsme ji s hladinou u intaktních jedinců, kteří byli pouze usmrceni. U skupiny SAK exprese HO-1 postupně

stoupala a 7. den byla největší. Skupina ACSF měla zvýšenou hladinu HO-1 pouze 3. den a jinak se pohybovala zhruba na úrovni intaktů. Exprese BR u skupiny SAK 1. den stoupla a postupně klesala a u skupiny ACSF se držela stále skoro na stejné úrovni jako u intaktních zvířat, až na menší odchylky.

Tímto jevem můžeme sledovat, že sekrece těchto enzymů je důležitá jak pro rozklad hemoglobinu, tak i pro regeneraci, proto byly vypouštěny i bez přítomnosti krve. Ependymální buňky zahajují reakci na přítomnost krve i zvýšení intrakraniálního tlaku. Pomocí enzymů HO-1 a BR odbourávají hemoglobin a brání se proti nebezpečí způsobeném zvýšeným intrakraniálním tlakem. Zvýšení intrakraniálního tlaku samo o sobě také mohlo způsobit lehké krvácení, čímž došlo opět k sekreci hemoxygenázy.

Klíčová slova

Ependymální buňky; subarachnoidální krvácení; hematolikvorová bariéra; hemoxygenáza-1; biliverdinreduktáza; hemoglobin

Annotation

This paper deals with the reaction of ependymal cells to subarachnoid hemorrhage. Ependymal cells are a special type of glial cells (neuroglia) located in the central nervous system. Their primary function consists in the production of cerebrospinal fluid, thus assisting regeneration to which secretion of other enzymes by said cells is also instrumental. The central canal of the spinal cord and the cranial cavity is lined with ependymal cells. The brain is supplied with blood from two paired arteries; the vertebral and internal carotid. The branches of these arteries are connected to each other to form what is called the Circle of Willis, which is located in the subarachnoid space, the space between the arachnoid and the pia mater (two of the three meninges) and which is filled with cerebrospinal fluid. Subarachnoid hemorrhage (SAK) occurs most often due to the rupture of an aneurysm (bulge) in the vascular wall of the circle of Willis. SAK causes an increase in intracranial pressure in the brain, which results in cell damage. In addition, the part of the brain that was previously blood-supplied by the artery that ruptured is suddenly left with no blood flow, which can lead to a stroke. Because of this danger, the ependymal cells respond by producing enzymes to remove the blood and break down the hemoglobin that is harmful to the subarachnoid space.

Therefore, in this study, we focused on the secretion of the enzymes heme oxygenase-1 (HO-1) and biliverdin reductase (BR) (both are involved in heme degradation and are produced by ependymal cells) and examined their concentration at 1, 3 and 7 days after the occurrence of subarachnoid hemorrhage. The study was conducted on rats that had blood injected into the subarachnoid space to simulate hemorrhage (SAK rat group). An ACSF rat group was also included in the experiment, in the case of which artificial cerebrospinal fluid (ACSF) was administered instead of blood simply to increase intracranial pressure without the presence of blood. Enzyme levels were determined using the method of indirect immunohistochemistry and compared with those of intact subjects who were only killed. In the SAK rat group, HO-1 expression increased gradually and was highest on day 7. The control rat group had elevated HO-1 levels only on day 3 and was otherwise roughly at the level of intact subjects. BR expression in the SAK rat group increased and gradually decreased on day 1, and in the control rat group it remained almost at the same level as in the intact animals, except for minor deviations.

By this phenomenon, we can observe that the secretion of these enzymes is important for both

hemoglobin breakdown and regeneration, which is why they were secreted in the absence of blood. Ependymal cells initiate a response to the presence of blood as well as an increase in intracranial pressure. With the help of the enzymes HO-1 and BR, they break down hemoglobin and defend against any danger caused by increased intracranial pressure. The increase in intracranial pressure itself may also have caused light bleeding, again causing the secretion of heme oxygenase.

Keywords

Ependymal cells; subarachnoid hemorrhage; hematoliquor barrier; heme oxygenase-1; biliverdin reductase; hemoglobin

Obsah

Anotace	6
Klíčová slova	7
Annotation	8
Keywords	8
Obsah	9
1. Seznam zkratk	12
2. Úvod do problematiky	13
2.1 Mozkové komory	13
2.2 Cévní zásobení mozku	13
2.3 Ependymální buňky	14
2.4 Mozkové pleny:	15
2.4.1 Dura mater	15
2.4.2 Arachnoidea mater	16
2.4.3 Pia mater	16
2.5 Mozkomíšní mok	17
2.5.1 Choroidní plexus	17
2.5.2 Hematoencefalická bariéra	18
2.5.3 Hematolikvorová bariéra	18
2.6 Subarachnoidální krvácení	19
2.6.1 Diagnostika SAK	20
2.6.2 Léčba SAK	21
2.6.3 Komplikace způsobené SAK	22
2.6.4 Willisův okruh	22
2.6.5 Hemoxygenáza	23
2.6.6 Biliverdin reduktáza	24
	10

2.6.7 Imunofluorescenční barvení a metoda imunohistochemie	24
3. Materiál a metodika	24
3.1 Zvířata a biologický materiál	24
3.1.1 Chirurgické zákroky	25
3.1.2 Zpracování vzorků	25
3.2 Dvojitá imunohistochemická detekce hemoxigenázy-1 a biliverdinreduktázy	25
3.3 Analýza obrazu	26
3.4 Statistické vyhodnocení	26
4. Výsledky	26
4.1 Expres hemoxigenázy-1 v ependymálních buňkách po SAK	26
4.1.1 Graf 1: Průměrná relativní intenzita hemoxigenázy-1	27
4.2 Expres biliverdinreduktázy v ependymálních buňkách u SAK	27
4.2.1 Graf 2: Průměrná relativní intenzita biliverdinreduktázy	28
5. Diskuze	28
6. Závěr	29
7. Bibliografie	31
8. Seznam obrázků	34
9. Seznam grafů	35

1 Seznam zkratek

SAK - subarachnoidální krvácení

EC - ependymální buňky

HO-1 - hemoxygenáza-1

BR - biliverdinreduktáza

CNS - centrální nervový systém

CSF - mozkomíšní mok (*cerebrospinal fluid*)

ACSF - umělé mozkomíšní mok

HEB - hematoencefalická bariéra

Hb - hemoglobin

2 Úvod do problematiky

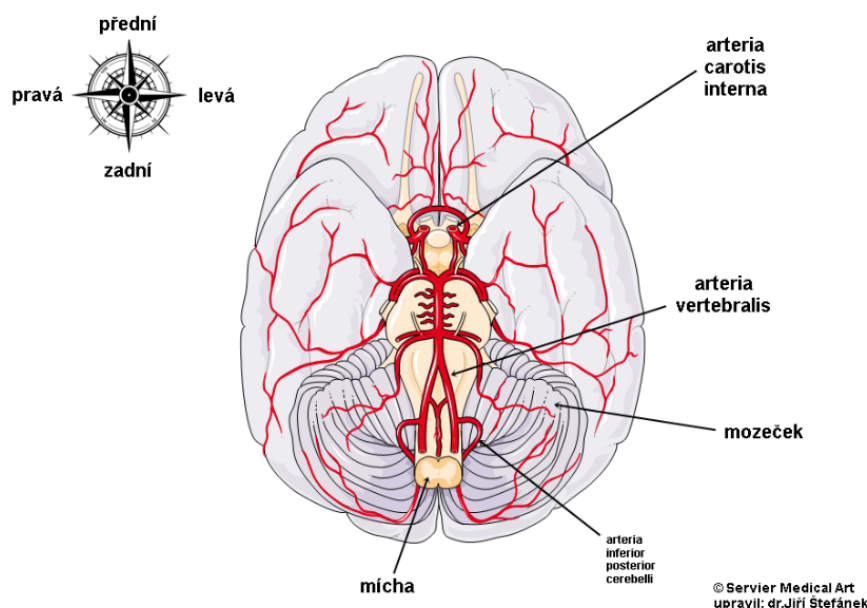
2.1 Mozkové komory

Mozkové komory představují čtyři navzájem propojené prostory, z nichž jsou dvě postranní - pravá a levá postranní komora, které jsou uloženy v hemisférách - a na ně navazující třetí a čtvrtá komora. Existuje propojení mezi postranními komorami a třetí mozkovou komorou pomocí foramen interventriculare. Prodloužením komorového systému mozku je centrální kanál, který obsahuje mícha a který v dospělosti chátrá a obliteruje. Celý komorový systém je vyplněný mozkomíšním mokem, produkovaným v choroidním plexu (Lowery and Sive, 2009).

2.2 Cévní zásobení mozku

Centrální nervový systém (CNS), stejně jako každý jiný tělesný systém, vyžaduje neustálé okysličování a výživu. Mozek má obzvláště vysoké nároky na kyslík - v klidovém stavu představuje pětinu celkové spotřeby kyslíku v těle. Je také velmi citlivý na nedostatek kyslíku a během několika minut dochází k ischemické smrti buněk.

Mozek je prokrvován dvěma párovými tepnami: vertebrální a vnitřními krční tepnou. Tyto tepny vycházejí z krku a stoupají do lebky. V lebeční klenbě tvoří koncové větve těchto tepen anastomotický kruh, který se nazývá Willisův kruh. Z tohoto kruhu vycházejí větve, které zásobují většinu mozku. Ostatní části CNS, jako je například mícha, jsou zásobovány menšími větvemi z vertebrálních tepen (Trojan, 2003).



Obr 1: - Pohled na mozek zespodu se základními tepnami
 ("Mozek - cévní zásobení," 2022)

Centrální nervový systém vyžaduje neustálé okysličení a výživu. Mozek má obzvlášť vysokou spotřebu kyslíku – v klidu představuje jednu pětinu celkové spotřeby kyslíku v těle. Je také velmi citlivý na nedostatek kyslíku, přičemž ke smrti ischemických buněk dochází bez přístupu kyslíku během několika minut.

2.3 Ependymální buňky

Ependym je vrstva gliových buněk. Jedná se o speciální cylindrický epitel nacházející se v dutině mozkové a centrálním kanále míšním. Kromě sekrece mozkomíšního moku má ještě důležitou funkci co se týče podílu na regeneraci v případě poškození CNS (centrální nervový systém).

Ependymální buňky (EC) mají nejčastěji dlaždicový, kvádrový nebo sloupcový tvar, pravidelné kulaté jádro (granulovaný chromatin) a nenápadné jádérko (Del Bigio, 2010). Vyznačují se morfologickou a funkční polaritou. Vrcholová část cytoplazmy těchto buněk obsahuje četné mitochondrie. Na povrchu ependymálních buněk je mnoho cytoplazmatických výčnělků, mikrokloků a ve většině buněk jsou přítomny shluky pohyblivých řas.

Z hlediska povrchu ependymálních buněk existují tři typy nacházející se v mozkových komorách. Nejběžnějším typem jsou mnohořasinkové (E1). Vyskytují se i dvouřasinkové EC (E2) s jednou nebo dvěma pohyblivými řasinkami – strukturou 9+2 mikrotubulů, ale liší se od buněk E1 o přítomnost konkrétních bazálních těles. Jednořasinkové EC (E3) představují třetí typ EC. Obsahují pouze jednu primární nepohyblivou řasinku. V roce 2006 bylo zjištěno jiné rozložení EC ve třetí komoře mozku u myši a lidí. Zatímco je ventrální část třetí komory u myši pokryta výlučně E2 a E3 buňkami a dorzální část je pokryta buňkami E1 a okrajem mezi nimi je ostrý, zřetelný, lidské ependymální buňky také neobsazují specifická místa (Delgehyr et al., 2015).

2.4 Mozkové pleny:

Mozkové pleny neboli meninge, jsou membránové obaly mozku a míchy, zajišťující ochranu a krevní zásobení CNS (centrálního nervového systému) a mají své vlastní mízní cévy, které mozek sám o sobě neobsahuje. Existují tři vrstvy mozkových plen, známé jako dura mater, arachnoidea mater a pia mater (Decimo et al., 2021).

Tyto obaly mají dvě hlavní funkce:

1. jako pojivová tkáň poskytují podpůrnou vrstvu pro cerebrální a kranální vaskulaturu
2. společně s mozkomíšním mokem slouží k ochraně CNS před mechanickým poškozením

2.4.1 Dura mater

Dura mater (tvrdá plena mozková) tvoří vnější vazivový obal mozku a nachází se hned pod kostěnou částí lebky a páteřního kanálu. Je silná, pevná a neroztažitelná. Tvoří ji kolagenní vazivo s cévním zásobením. Probíhají v ní tepny i žíly a pomocí venózních splavů je z nich krev odváděna.

2.4.2 Arachnoidea mater

Arachnoidea mater (pavučnice) je střední vrstva mozkových blan, ležící přímo pod dura mater, ale nepřiléhá k povrchu mozku. Skládá se z vrstev pojivové tkáně, je avaskulární a není inervována. Vyživují ji jemné cévy. Pod arachnoideou je prostor známý jako subarachnoidální prostor, který obsahuje mozkomíšní mok. Malé výběžky arachnoidey do

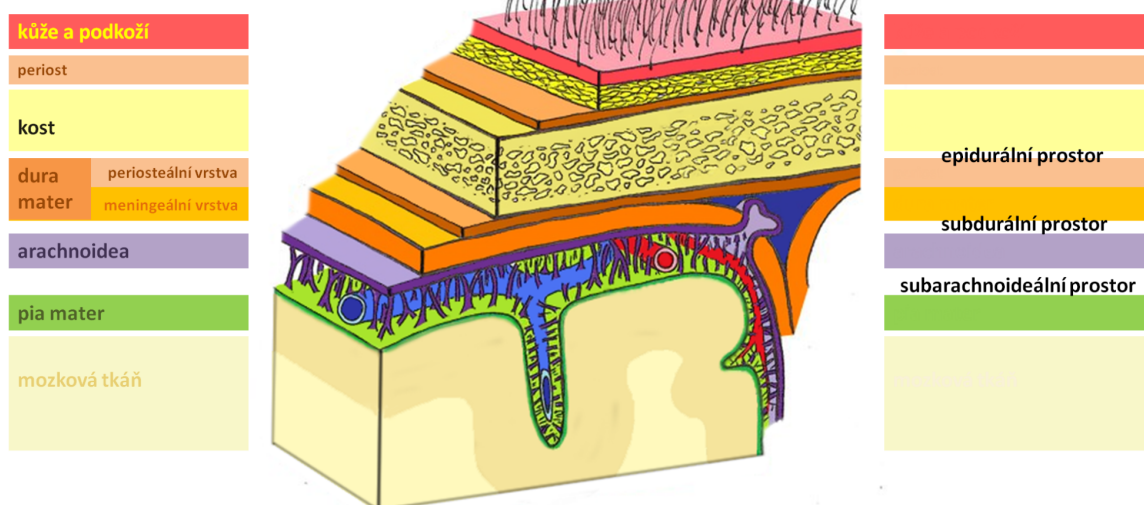
tvrdé pleny (známé jako arachnoidální granulace) umožňují mozkomíšnímu moku znovu vstoupit do oběhu přes durální venózní siny.

2.4.3 Pia mater

Pia mater (omozečnice) se nachází pod subarachnoidálním prostorem. Je velmi tenká a těsně přiléhá k povrchu mozku a míchy. Je to jediný obal, který kopíruje obrysy mozku.

Stejně jako dura mater je vysoce vaskularizovaná, a její cévy prostupují až k mozkové tkáni a podílejí se na jejím krevním zásobení a ochraně mozku, její cévy pronikají i do tkání CNS (centrální nervový systém). Pia mater tvoří podklad pro choroidní plexus. Mezi arachnoideou a omozečnicí se nachází tzv. subarachnoidální prostor, který je naplněný mozkomíšním mokem.

Obaly mozku



Obrázek 2: - Koronární řez lebkou, mozkovými plenami a mozkovou tkání
(“Elektronická učebnice - ELUC,” n.d.)

2.5 Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok (CSF) je čirá, bezbarvá tekutina podobná plazmě, která omývá centrální nervový systém (CNS) a vyplňuje mozkové komory, ve kterých je tvořen, a subarachnoidální prostor, tvořící se z krevní plazmy v choroidním plexu (Brinker et al., 2014).

Většina mozkomíšního moku je vylučována specializovanou tkání zvanou choroidní plexus, která se nachází v laterální, třetí a čtvrté komoře. Sekrece mozkomíšního moku je rovná jeho vstřebávání, takže v CNS je neustále přítomno kolem 150-270 mililitrů CSF, z nichž se v dutinách nachází pouze čtvrtina. Obsahuje bílkoviny, glukózu a plazmatické soli. Jeho cirkulace jde od laterálních komor přes 3. a 4. komoru až do subarachnoidálního prostoru.

Hlavní funkcí mozkomíšního moku je mechanická ochrana mozku a míchy, poskytování základní imunologické ochrany CNS, odstraňování metabolického odpadu a také transport neuromodulátorů a neurotransmiterů. Vzhledem k tomu, že míšní i mozková tkáň jsou extrémně jemné a citlivé, jsou náchylné k porušení i bez námahy těla, takže to, že jsou plně v CSF je pro ně klíčové. Je také velmi užitečný pro klinickou diagnostiku (Chrisman, 1992).

2.5.1 Choroidní plexus

CSF (mozkomíšní mok) je produkován specializovanou tkání zvanou choroidní plexus. Choroidní plexy jsou umístěny ve stěnách postranních komor a ve střeších třetí a čtvrté komory. Choroidní plexus obsahuje četné klky (villy), kterými vylučuje mozkomíšní mok. Strukturálně se každý villus skládá ze tří složek:

1. Vrstva modifikovaných ependymálních buněk (buňky cévnatky), která směřuje k lumen komor a vylučuje CSF. Buňky vykazují mnoho apikálních vilózních výběžků a jsou navzájem pevně spojeny těsnými spoji.

2. Vrstva pia mater

3. Fenestrovaná kapilára přímo pod pia mater.

Ependymální buňky choroidního plexu přijímají různé chemikálie z krevní cévy, která je pod nimi, a používají je k aktivní sekreci CSF. Kapalina CSF tedy není pouhým ultrafiltrátem krve, ale liší se od ní obsahem elektrolytů, glukózy a bílkovin. Cévní zdroj pro choroidální plexy se liší mezi laterální, třetí a čtvrtou komorou (Cserr, 1971).

Přední část choroidního plexu v postranních komorách a třetí komoře je zásobována přední choroidální tepnou, zatímco jejich zadní části jsou vaskularizovány zadními laterálními a mediálními choroidními tepnami (větve zadní mozkové tepny). Ve čtvrté komoře je zásobován dolními cerebrálními tepnami.

2.5.2 Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra (HEB) je specifické biologické rozhraní, které odděluje mozek od periferního oběhového systému. Funkcí této bariéry je udržovat homeostázu v mozku, bránit vstupu potenciálně škodlivým látkám, a regulovat transport živin (Bechmann et al., 2007).

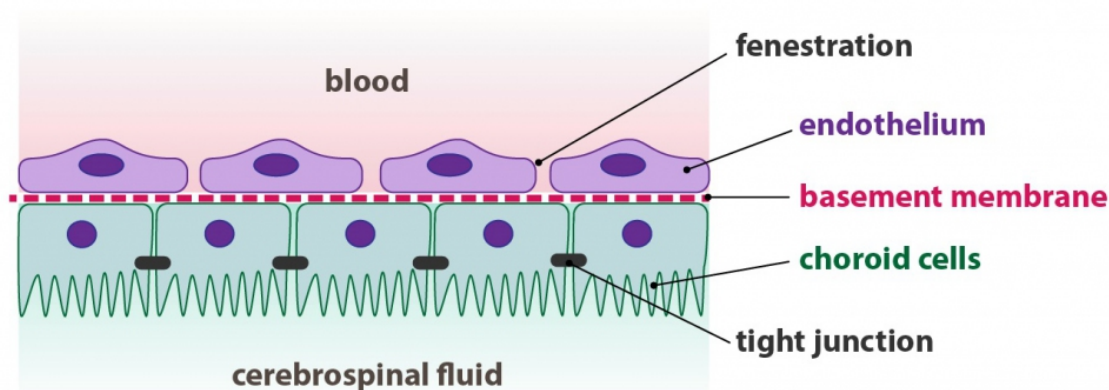
HEB je tvořena mozkovými endoteliálními buňkami vystylajícími mozkovou mikrovaskulaturu a je důležitým mechanismem pro ochranu mozku před kolísáním složení plazmy a před cirkulujícími látkami, jako jsou neurotransmitery a xenobiotika, která jsou schopna narušit nervovou funkci. Bariéra také hraje důležitou roli v homeostatické regulaci mozkového mikroprostředí nezbytné pro stabilní a koordinovanou aktivitu neuronů (Abbott, 2002).

2.5.3 Hematolikvorová bariéra

Hematolikvorová bariéra se nachází v choroidním plexu mozkových komor. Choroidní plexus je epitelově-endoteliální konvolut, skládající se z vysoce vaskularizované vazivové tkáně fenestrované kapilárami a souvislé výstelky epitelových buněk spojených těsnými spoji, které jsou pro vytváření hematolikvorové bariéry klíčové. Exprimuje receptory jako například pachové, vomeronazání a chuťové, které by mohly pomáhat s monitorováním složení krve a mozkomíšního moku (Solár et al., 2020b).

Hematolikvorová bariéra odděluje mozkomíšní mok a krev. Podobně jako hematoencefalická bariéra se skládá ze tří strukturálně odlišných částí:

- 1) Choroidální epitelové buňky propojené těsnými spoji (které jsou propustnější než spoje mezi endotelovými buňkami mozkových kapilár) a vylučují mozkomíšní mok. Strana přivrácená k likvoru má svůj povrch zvětšený přítomností výběžků zvaných mikrovilly.
- 2) Bazální membrána
- 3) Endotel kapilár pia mater obsahující fenestrace.



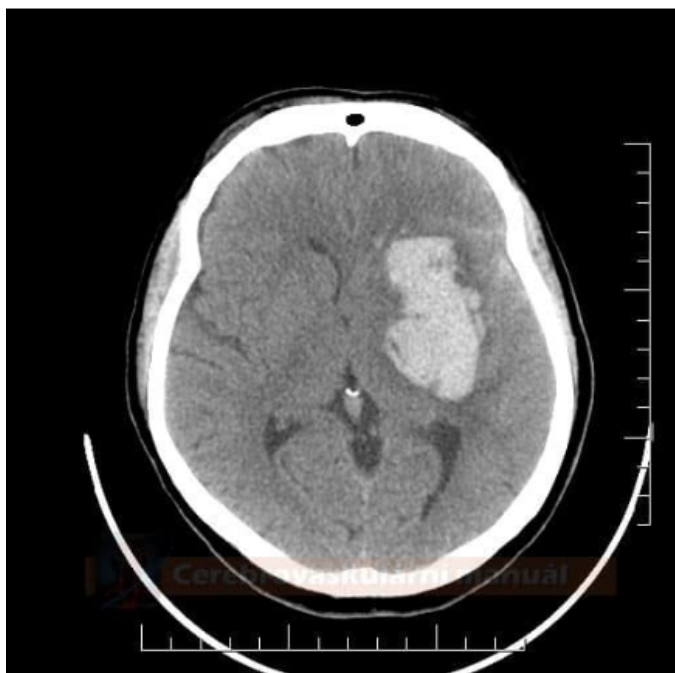
Obrázek 3.0 - Řez hematolikvorovou bariérou

(“11. Cerebrospinal Fluid, Blood-Brain Barrier and Blood-CSF Barrier • Functions of Cells and Human Body,” n.d.)

Hematolikvorová bariéra také omezuje přestup látek z krve do likvoru. Je propustnější než hematoencefalická bariéra a mnoho bílkovin se tak dostává do mozkomíšního moku. Jejich koncentrace jsou nižší než v krevní plazmě. Porucha hematolikvorové bariéry tak vede ke zvýšení koncentrace proteinů v mozkomíšním moku. Transport probíhá i opačným směrem a látky z likvoru se mohou dostat do oběhu (“11. Cerebrospinal Fluid, Blood-Brain Barrier and Blood-CSF Barrier • Functions of Cells and Human Body,” n.d.).

2.6 Subarachnoidální krvácení

Subarachnoidální krvácení (SAK) je jedním ze tří typů nitrolebních krvácení (epidurální krvácení (mezi lebkou a dura mater), subdurální krvácení (mezi dura mater a arachnoideou) a subarachnoidální krvácení (mezi pavučnicí a omozečnicí). SAK je tudíž přítomnost krve v subarachnoidálním prostoru.



Obrázek 4: CT zobrazení subarachnoidálního krvácení

(“Diagnostika subarachnoidálního krvácení (SAK) | Cerebrovaskulární manuál,” 2019)

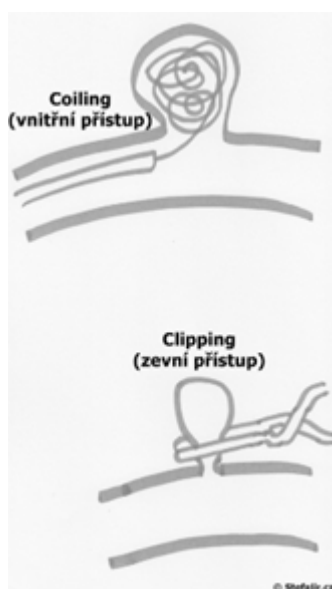
Může být způsobené roztržením aneurysmatu (výduť tepny způsobena strukturálními změnami v její stěně), arteriovenózní malformací, zraněním hlavy, zvýšením krevního tlaku. Vlivem krvácení do subarachnoidálního prostoru naroste v mozku tlak, což způsobuje poškození buněk. Když dojde k roztržení aneurysmatu, krev se dostane v mozku do prostoru, kam nemá a část mozku, která byla prokrvována danou tepnou je bez přístupu ke krvi, což vede k ischemii mozku.

2.6.1 Diagnostika SAK

Příznaky subarachnoidálního krvácení jsou: nesnesitelná bolest hlavy, nevolnost, zvracení, fotofobie, ztuhlé svaly v oblasti krku, zhoršený zrak, aj. Diagnostiku uskutečníme pomocí CT vyšetření (computer tomography), magnetická rezonance v případě subarachnoidálního krvácení není dostatečně efektivní. CT vyšetření krvácení nejen prokáže, popřípadě téměř s jistotou vyloučí, ale také určí jeho mohutnost a dokážeme SAK díky němu dobře lokalizovat. Nicméně, co se týče tzv. leaku, tedy prosakování malého množství krve, signalizujícího blížící se rupturu, počítačová tomografie jej nedokáže pokaždé odhalit (CT vyšetření mozku nezachytí asi 5% subarachnoidálních krvácení) (Neumanová, n.d.). Vyšetření likvoru je provedeno, pokud CT krvácení neprokázalo, ale stále na něj přetrvává podezření.

2.6.2 Léčba SAK

V případě aneurysmatu lze provést složitý neurochirurgický zákrok, ve kterém lékaři na výduť nasadí speciální svorku a tím ji uzavřou. Tuto metodu označujeme jako clipping, což zabrání opakovanému krvácení. Jinou metodou, která je více zatěžující pro pacienta, je zákrok, kdy se lékař k aneuryzmatu dostane zevnitř skrze tepnu tak, že se do větší tepny zasune tenká hadička, ta se pak příslušnou tepnou posouvá k aneuryzmatu a do vaku výchlípky se pak vypustí drobné kovové drátky. Drátky vyplní vak, vysráží se na nich krev a aneuryzma je uzavřeno – tento postup se označuje jako tzv. coiling (“Subarachnoidální krvácení,” 2010).



Obrázek 5 - Zákroky při ruptuře aneurysmatu
(“Subarachnoidální krvácení,” 2010)

2.6.3 Komplikace způsobené SAK

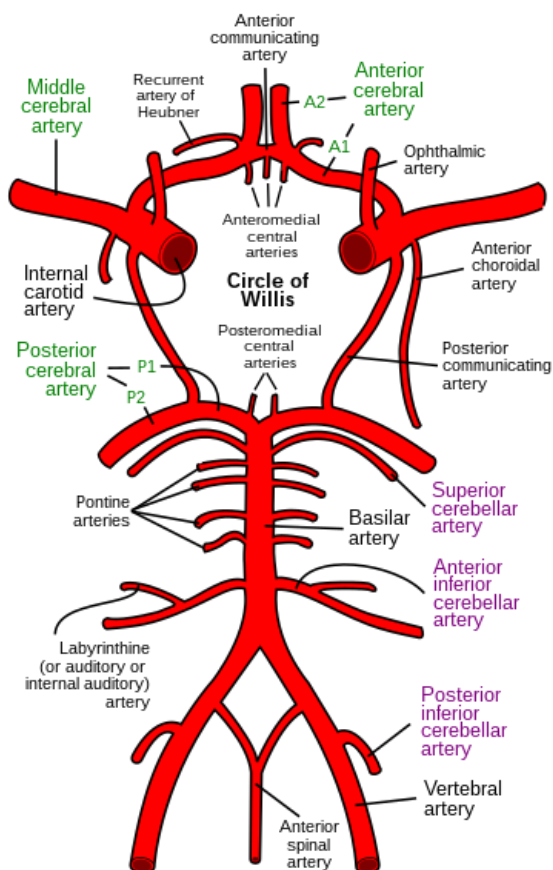
Asi třetina pacientů postižených subarachnoidálním krvácením zemře dříve, než se dostane do nemocnice a dalších 12-40% umírá do 2 dnů od momentu, kdy byli hospitalizováni. Tato čísla jsou zapříčiněna nejen důsledky mozkovými, ale také srdeční arytmií. Při chirurgické léčbě se pak přidávají komplikace výkonu. Pokud dojde k vývoji opětovného krvácení, bývá jeho průběh vážnější než když se subarachnoidální krvácení objevilo poprvé.

Typickou a také nejzávažnější příčinou mortality SAK jsou vazospazmy. Jsou způsobeny vniknutím rozpadlých krevních produktů do subarachnoidálního prostoru, přičemž cévy reagují vazokonstrikcí, při které dojde ke stažení a zúžení cévy, což sníží prokrvení tkáně v určité části mozku. U některých typů mozkových krvácení se vazospasmy vyskytují méně často, ale v případě SAK jsou typické. Způsobí nedokrvení a ischemii mozku, ke kterým dojde v místech, které jsou zásobeny krví z tepen, ve kterých dojde k vazospasmu.

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

2.6.4 Willisův okruh

Nejčastěji dochází k ruptuře aneurysmat v oblasti Willisova okruhu. Willisův okruh je anatomická struktura poskytující anastomotické propojení mezi přední a zadní mozkovou cirkulací a mezi pravou a levou hemisférou (Vrselja et al., 2014). Willisův kruh obklopuje stopku hypofýzy a zajišťuje důležitou komunikaci mezi předním a zadním mozkem (tj. mezi vnitřní krkavicí a vertebrobazilárním systémem po obliteraci primitivních embryonálních spojení). Ačkoli je u některých jedinců přítomen kompletní Willisův kruh, zřídka je viditelný celý; anatomické odchylky jsou velmi časté a dobře vyvinutá komunikace mezi jednotlivými částmi je identifikována u méně než poloviny populace. Willisův kruh se začíná tvořit v okamžiku, kdy pravá a levá vnitřní krkavice vstupují do lebeční dutiny a každá z nich se dělí na dvě hlavní větve: přední mozkovou tepnu a střední mozkovou tepnu. Přední mozkové tepny se pak spojují a krev může díky tomu křížem proudit přední komunikační tepnou.



Obrázek 6 - Schéma Willisova okruhu
 ("Circle of Willis," 2023)

2.6.5 Hemoxygenáza

Hemoxygenáza (HO) je enzym důležitý pro metabolismus hemu. Rozkládá molekulu hemu, obsaženou v hemoglobinu, na zelenou sloučeninu biliverdinu, následně rozkládanou enzymem biliverdinreduktázou. Dochází přitom k uvolnění železa z hemu a vzniku oxidu uhelnatého. U savců existují alespoň dva funkčně aktivní isozymy HO, HO-1 je 32-kDa protein, který je indukovatelný četnými škodlivými podněty a HO-2 je konstitutivně syntetizovaný 36-kDa protein, který se hojně vyskytuje v mozku a varlatech. Navzdory tomu, že oba isozymy katalyzují degradaci hemu podobným mechanismem, vykazují významné rozdíly ve své molekulární struktuře, biochemických charakteristikách, distribuci ve tkáních a genové regulaci, což naznačuje, že izoformy HO mohou mít odlišné buněčné funkce.

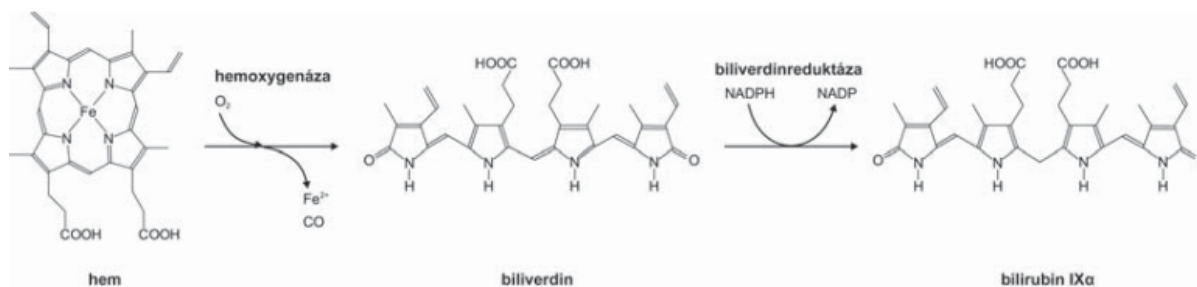
Posmrtné studie na lidských mozcích ukázaly, že exprese HO-1 je zapojena do patologie neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimer, Parkinson a Huntington. Na druhé straně je HO-2 převládajícím izoenzymem nervové tkáně a mozkových cév a je důkazem jeho role v buněčné signalizaci. (Chauveau et al., 2005).

2.6.6 Biliverdin reduktáza

Biliverdinreduktáza (BR) je enzym redukující biliverdin, vedlejší produkt katabolismu hemu, na bilirubin. Vazebné motivy přítomné v izozymech BR umožňují širokou škálu interakcí se složkami metabolicky důležitých signálních drah, jako jsou kaskády enzymů inzulinového receptoru, proteinkinázy a zánětlivé mediátory. Kromě toho byly hladiny bilirubinu v sérech negativně spojeny s abdominální obezitou a hypertriglyceridémií (O'Brien et al., 2015).

2.6.7 Redukce hemoglobinu po SAK

Hemoglobin (Hb) je červené krevní barvivo. Zajišťuje přenos krevních plynů, především kyslíku, z plic do periferních tkání, a je převážně syntetizován v kostní dřeni. Hb je sférická molekula a skládá se ze dvou základních částí - molekul globinů a molekul hemu. Cyklický hem má jako centrální kation Fe^{2+} . Celá molekula tím pádem obsahuje čtyři řetězce - globiny a čtyři molekuly hemu, z nichž každá obsahuje jeden kation Fe^{2+} . Když se tělo chce Hb zbavit, převážně kvůli regeneraci po krvácení, je Hb odbouráván v MFS (mononukleární fagocytární systém), tvořeném fagocytujícími buňkami, zejména makrofágy jater, sleziny, kostní dřeni a podkoží. Molekula Hb je nejdříve rozdělena rozpadem červené krvinky na molekuly globinů a molekuly hemu. Globinové řetězce jsou následně přeměněny na aminokyseliny a reutilizovány. Následně proběhne degradace hemu. Enzym HO-1 pomocí molekuly O_2 rozštěpí cyklickou molekulu uvolněním jednoho methylenového můstku, následně vyloučeného z těla ven v podobě CO, a uvolní železo v podobě kationtu Fe^{3+} . Tímto vznikne molekula zeleného barviva, s názvem biliverdin. Ta je poté enzymem BR (biliverdinreduktáza) redukována na hlavní degradační produkt katabolismu hemu - bilirubin. Ten se následně naváže na albumin, plazmatickou bílkovinu, a je přenesen do jater nebo vyloučen močí, či stolicí ("4. Metabolismus hemoglobinu a transport krevních plynů • Funkce buněk a lidského těla," n.d.).



Obrázek 7 - Katabolická dráha hemu

2.6.8 Imunofluorescenční barvení a metoda imunohistochemie

Metoda imunohistochemie je laboratorní metoda, během které dochází k vazbě protilátky s antigenem. Za antigen můžeme považovat libovolnou makromolekulární látku cizího původu, která vnikne do nitrobuněčné tekutiny. U nepřímé imunohistochemie se používají dvě protilátky; primární a sekundární. Primární protilátka přisedá na svůj antigen a sekundární protilátky, viditelné pod fluorescenčním mikroskopem, se vážou na primární protilátku. Antigen je díky tomu označen vyšším počtem molekul markerů, čímž se zvyšuje citlivost reakce (Ramos-Vara, 2005).

3 Materiál a metodika

3.1 Zvířata a biologický materiál

Výzkum byl prováděn na 17 potkanech kmene Wistar (hmotnost 200 – 250 g, samci). Sledování byli ve sterilních podmínkách (teplota 22°C, dvanáctihodinový režim střídání světla a tmy v Pavilonu biomodelů MUNI. Ve sterilním prostředí byly také prováděny zákroky, všechny podle protokolu, který byl schválen Odbornou komisí pro zajištění dobrého životního standardu pokusných zvířat Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a komisí Ministerstva zemědělství České republiky. Stravu měla zvířata ad libitum.

3.1.1 Chirurgické zákroky

Jako anestezie byla potkanům podána směs 5% ketaminu a 2% xylazinu. Poté byl zvířatům proveden podélný řez v šíjové krajině do svalů, které se anestezií rozvolnily. Odhalila se tím atlanto-okcipitální membrána, přes kterou proběhl aplikace 100 µl arteriální krve do mozkové komory cisterna magna u skupiny SAK a 100µl syntetického likvoru do subarachnoidálního prostoru u skupiny ACSF za účelem zvýšení tlaku v oblasti mozkových komor. Zárok byl proveden stříkačkou s 30 G jehlou. Tato metoda aplikace byla původně publikována Solomonem (Schwartz and Solomon, 1996).

Zvířata skupiny SAK a ACSF přežívala 1 den (počet zvířat – ACSF: 2, SAK: 3), 3 dny (počet zvířat – ACSF: 2, SAK: 3), a 7 dní (počet zvířat – ACSF: 2, SAK: 3). Pro porovnání výsledků se výzkum prováděl na dvou intaktních zvířatech (Solár et al., 2020a).

3.1.2 Zpracování vzorků

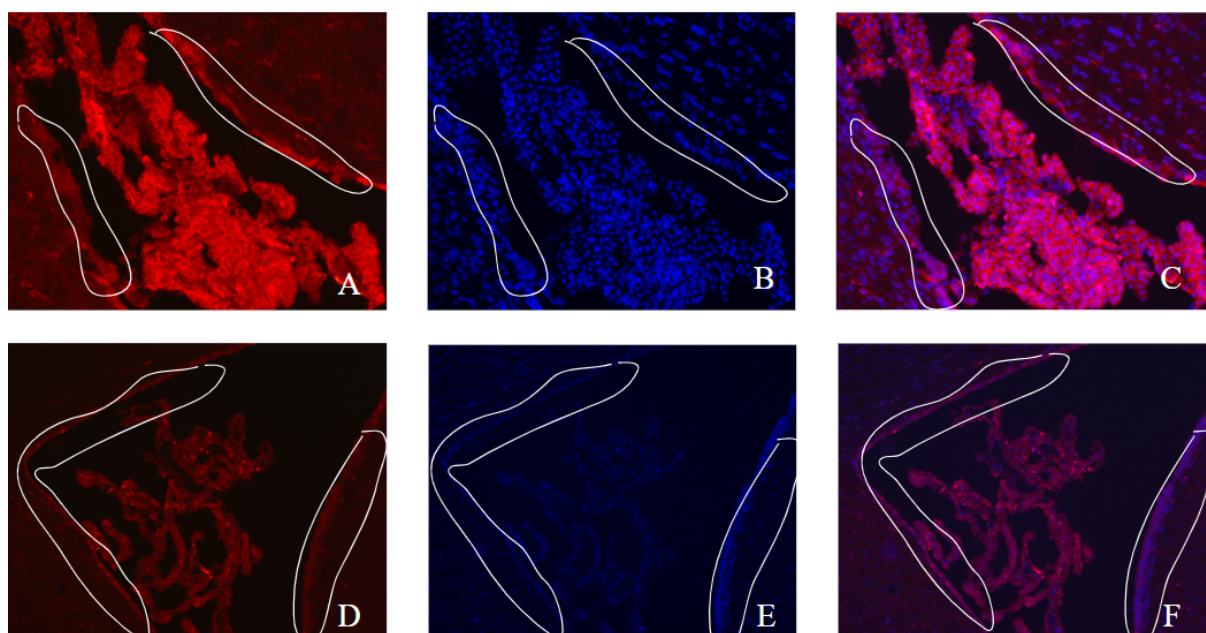
Zvířata pro výzkum skupiny ACSF a SAK po přežití určitého počtu dnů spolu s intaktními jedinci byla usmrcena za pomoci CO₂. Poté byla provedena transkardiální perfuze pomocí Zamboniho fixačního roztoku a roztoku PBS. Potkanům byl odebrán mozek a naložen do Zamboniho fixačního roztoku po dobu tří dnů, potom byl umyt 10% sacharózou a zalit do směsi Tissue-Tek OCT. Následně na vzorky působila 5 minut směs methanolu a acetonu v teplotě -20°C a byly opláchnuty směsí PBS-BSA-Tween. Poté z nich byly připraveny kryostatové řezy o průměru 20 µm (kryostat Leica 1800; Leica Microsystem, Weltzlar, Německo).

3.2 Imunohistochemická detekce hemoxygenázy-1 a biliverdinreduktázy

Vzorky se inkubovaly s polyklonální primární králičí protilátkou proti hemoxygenáze 1 (1:100; Serotec) za pokojové teploty na 16 hodin. Poté se aplikovala oslí sekundární anti-králičí protilátka konjugovaná s CY5 (1:100; Chemicon) na 90 minut. Na další sklíčka se aplikovala polyklonální primární králičí protilátka proti biliverdinreduktáze (1:100; Abcam) na 16 hodin a poté oslí sekundární protilátka konjugovaná s CY5 (1:100; Jackson) na 90 minut. Buněčná jádra byla vizualizována Hoechstem (Solár et al., 2020a).

3.3 Analýza obrazu

Analýza obrazu byla vždy provedena na více než 10 řezech s odstupem 60 μm u všech skupin zvířat. Analýza imunofluorescenční intenzity hemoxygenázy-1 a biliverdinreduktázy kolem pozitivních oblastí endymálních buněk byla po manuálním označení pozitivních oblastí provedena v programu NIS-Elements AR Analysis (verze 4.20.00 Nikon, Brno, Česká republika).



Obrázek 8 - Snímky endymu z fluorescenčního mikroskopu

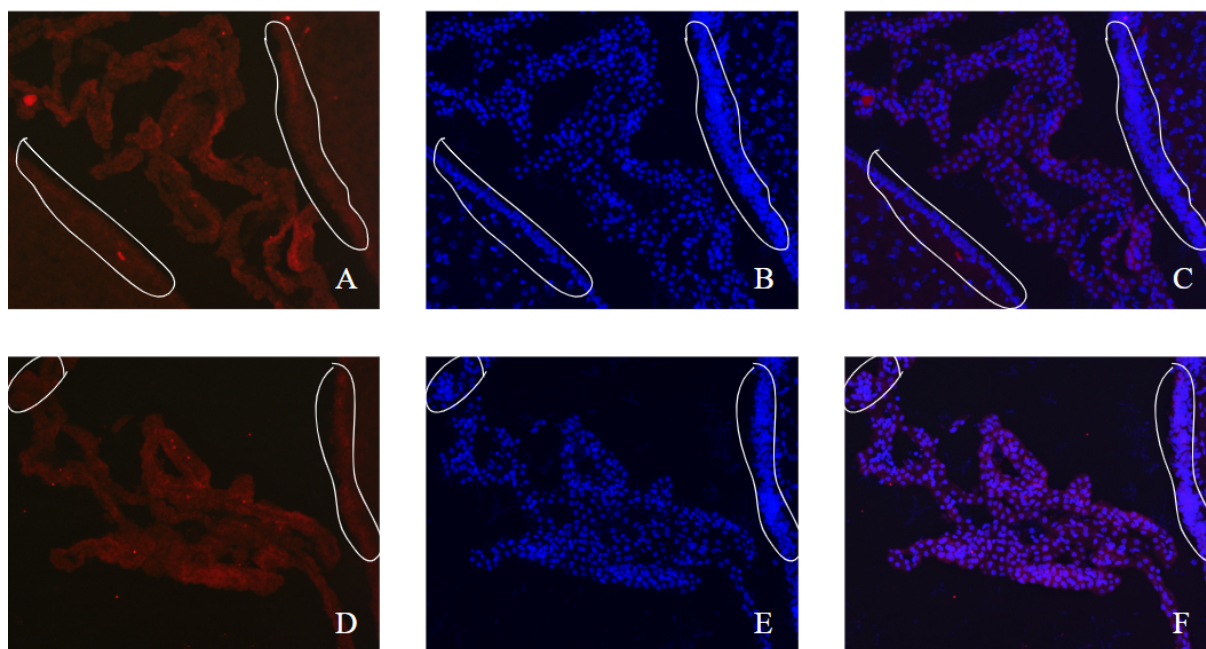
Snímky A, D: fluoreskující HO-1 pozitivní endymální buňky pod mikroskopem v červeném spektru

Snímky B, E: zvýrazněná jádra endymálních buněk v modrém spektru

Snímky C, F: překrytí obou obrázků pro lepší lokalizaci cytoplazmy

Snímky A - C: skupina SAK, 3 dny

Snímky D - F: skupina SAK, 7 dní



Obrázek 9 - Snímky endymu z fluorescenčního mikroskopu

Snímky A, D: fluoreskující BR pozitivní endymální buňky pod mikroskopem v červeném spektru

Snímky B, E: zvýrazněná jádra endymálních buněk v modrém spektru

Snímky C, F: překrytí obou obrázků pro lepší lokalizaci cytoplazmy

Snímky A - C: skupina SAK, 3 dny

Snímky D - F: skupina SAK, 7 dní

3.4 Statistické vyhodnocení

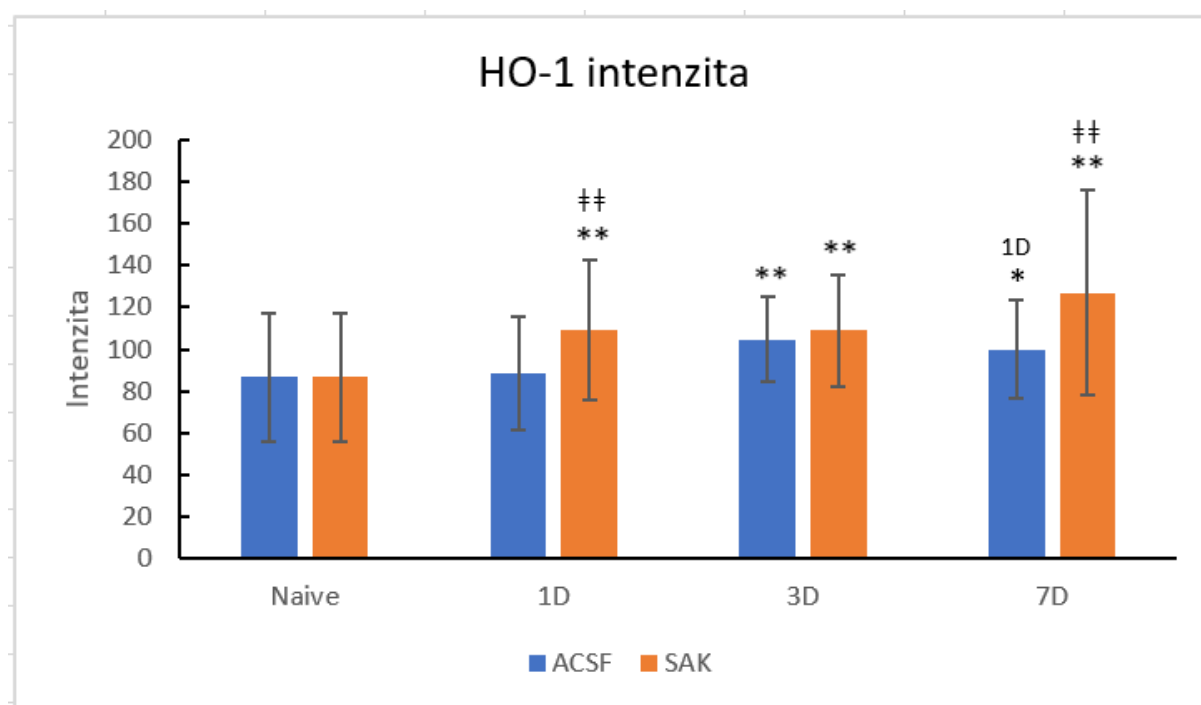
Data týkající se intenzity imunofluorescence získaná pomocí programu NIS-Elements AR Analysis byla vyhodnocena Mann-Whitneyho U-testem v programu Statistica 13.5 (TIBCO Software Inc., Tulsa, USA). U skupin ACSF i SAK byla vyhodnocována průměrná relativní intenzita imunofluorescence pozitivních oblastí v červeném spektru záření fluorescenčního mikroskopu. Data byla srovnávána s průměrnou relativní intenzitou fluorescence tkáně intaktních zvířat. Hodnoty průměrné relativní intenzity fluorescence byly zpracovány v programu Statistica a grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel.

4 Výsledky

4.1 Exprese hemoxygenázy-1 v ependymálních buňkách po SAK

Přítomnost enzymu byla pozorována ve všech skupinách a ve všech periodách v cytoplazmě buněk. Výsledky prokázaly, že po prodělení SAK (subarachnoidální krvácení) došlo hned v prvním dni k výraznému zvýšení hladiny hemoxygenázy-1 oproti intaktním jedincům. U skupiny ACSF k nárůstu došlo až během třetího dne, v prvním dni byla hladina skoro stejná jako u intaktu. Ve třetím dni se hladina u skupiny SAK držela víceméně na stejné úrovni jako v prvním, ale u sedmého dne došlo k ještě většímu zvýšení hladiny. Oproti tomu u skupiny ACSF v sedmém dni hladina trochu klesla a přiblížila se tím hladině u intaktu.

4.1.1 Graf 1: Průměrná relativní intenzita hemoxygenázy-1 v ependymálních buňkách po SAK



Legenda grafu:

* - signifikantní rozdíl oproti naivu

† - Signifikantní rozdíl oproti kontrole

1D - signifikantní rozdíl oproti dané periodě na hladině 5%

dvojitá značka - signifikantní rozdíl na hladině 1% v dané periodě

SAK - skupina zvířat, jimž byla vstříknuta do subarachnoidálního prostoru krev

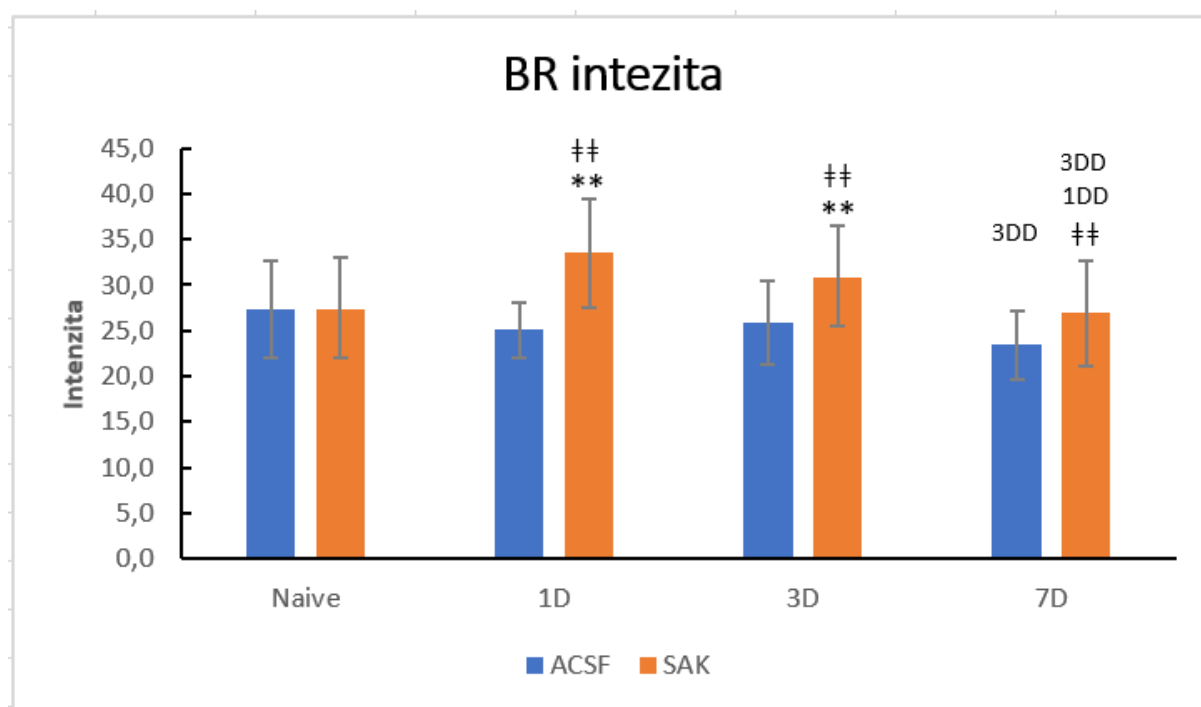
ACSF - skupina zvířat, jimž byl vstříknut do subarachnoidálního prostoru syntetický likvor

Naive - intaktní skupina zvířat

4.2 Exprese biliverdinreduktázy v endymálních buňkách u SAK

Přítomnost enzymu byla ve všech skupinách a ve všech periodách pozorována v cytoplazmě buněk. Pomocí dvoustupňové imunohistochemické fluorescenční analýzy se prokázalo, že po SAK (subarachnoidální krvácení) dochází u skupiny ACSF během prvního dne k mírnému poklesu biliverdinreduktázy, naopak u skupiny SAK se její hladina zvedá. U skupiny ACSF bylo následně zaznamenáno, že během třetího dne se exprese biliverdinreduktázy mírně zvýšila a přiblížila se intaktu. U sedmého dne její hladina opět klesla a vykazuje odchýlení od prvního i třetího dne, ale nezaznamenali jsme žádné výrazné výkyvy. Skupina SAK prokázala největší nárůst biliverdinreduktázy hned během prvního dne a následující dny hladina postupně klesala.

4.2.1 Graf 2: Průměrná relativní intenzita biliverdinreduktázy v ependymálních buňkách po SAK



Legenda grafu:

* - signifikantní rozdíl oproti naivu

† - Signifikantní rozdíl oproti kontrole

1D - signifikantní rozdíl oproti dané periodě na hladině 5%

dvojitá značka - signifikantní rozdíl na hladině 1%

SAK - skupina zvířat, jimž byla vstříknuta do subarachnoidálního prostoru krev

ACSF - skupina zvířat, jimž byl vstříknut do subarachnoidálního prostoru syntetický likvor

Naive - intaktní skupina zvířat

5 Diskuze

Cílem této práce bylo zjistit, k jaké dochází reakci v EC po subarachnoidálním krvácení. Chování ependymálních buněk je zkoumáno a sledováno již dlouhou dobu. Demonstrace na zvířatech tak díky tomu věrně pomáhají k lepšímu pochopení patofyziologie poškození mozku při ischemické tak hemoragické cévní příhodě, kterou se zabývá tato práce. Zaměřili jsme se proto na navození podmínek, simulující spontánní subarachnoidální krvácení pro možnost pozorování reakce ependymálních buněk.

EC byly objeveny již v roce 1837. Valentin a Purkinje zviditelnili výstelku vnitřních dutin mozku, systém mozkových komor, pozorováním nápadných řasinek na jejich povrchu. Tuto výstelku nazvali "ependyma" a buňky, které ji tvoří, označili jako ependymální buňky. Po jejich prvotním objevu vyžadovalo objasnění této buněčné vrstvy jako mimořádně důležité součásti vyvíjejícího se a zralého mozku mnoho desetiletí výzkumu.

Systém degradace hemu byl objeven v roce 1968 Tenhunenem a jeho spolupracovníky, kteří popsali unikátní mikrosomální enzym identifikovaný jako hemoxygenáza (HO). HO-1 je její konstitutivní forma je přítomna v nízkých hladinách ve většině savčích tkání a je regulována řadou oxidačních podnětů a provádí antioxidační a protizánětlivé reakce. Prostřednictvím biologických aktivit svých metabolitů působí hemoxygenáza cytoprotektivně, degraduje totiž, spolu s enzymem biliverdinreduktázou, hem obsažený v hemoglobinu. Zaměřili jsme se na HO-1 jako na klíčovou molekulu podílející se na reakci nervového systému na poškození. Role, kterou HO-1 hraje, je velmi komplexní a není zcela objasněna. I když bylo jasné prokázáno, že aktivace HO-1 v neuronech, mimo podílu na rozkladu hemoglobinu, silně chrání před poškozením buněk. To nám napovídá, že kromě degradace hemoglobinu mají enzymy HO-1 a BR i čistě regenerační funkci, která nesouvisí s přítomností krve (Nitti et al., 2018).

Pro správnou funkci mozku je nutné udržet v CNS (centrální nervový systém) vysoce regulované prostředí a zbavovat se patogenů a jakýchkoli škodlivých látek. Proto ependymální buňky na poškození mozku velmi rychle a intenzivně (Sarnat, 1995). Hrají klíčovou roli v homeostáze mozkomíšního moku (CSF), metabolismu mozku a odstraňování odpadních látek z mozku. EC se podílejí na vzniku onemocnění v průběhu celého života, včetně vývojových poruch, rakoviny a neurodegenerativních onemocnění. Přesto zůstávají ependymální buňky z velké části nedostatečně prozkoumané (MacDonald et al., 2021). V

případě SAK je pro EC nejdůležitější se zbavit krve dostávající se do subarachnoidálního prostoru, obsahujícího pouze CSF, což zajistily sekrecí enzymů HO-1 a BR, které zajišťují degradaci hemoglobinu. SAK s sebou nese dva hlavní patofyziologické faktory. Vliv krve a produktů vytvořených rozpadem hemoglobinu na tkáň mozku a s její přítomností v subarachnoidálním prostoru související zvýšený intrakraniální tlak. Z těchto dvou faktorů byly sledovány oba na skupině SAK a na skupině ACSF pouze zvýšený intrakraniální tlak. V několika studiích bylo prokázáno, že po subarachnoidálním krvácení jsou enzymy HO-1 a BR produkovány v choroidním plexu (Solár et al., 2020a) a jejich přítomnost jsme v této práci prokázali i v cytoplazmě ependymálních buněk. Výsledky této práce ukazují, že hned 1. den po prodělání SAK se hladina HO-1 výrazně zvýšila oproti intaktu, což bylo způsobeno náhlou přítomností krve v subarachnoidálním prostoru. Po 3. dni zůstala hladina skoro stejná a v 7. dni se zvedla ještě víc. Vidíme tak, že HO-1 odbourává hemoglobin u skupiny, které bylo způsobeno subarachnoidální krvácení, čímž jsme potvrdili experimentální studie týkající se sekrece HO-1 po SAK (Schallner et al., 2015). U skupiny ACSF jsme zaznamenali nárůst hladiny HO-1 během 3. dne v reakci na zvýšený intrakraniální tlak. Expresi biliverdinreduktázy v cytoplazmě ependymálních buněk jsme pozorovali na stejně koncipovaných skupinách. Dle výsledků můžeme říct, že koncentrace subarachnoidálního hemoglobinu hraje důležitou roli v regulaci hladiny hemoxygenázy-1 (Matz et al., 1996) a že se jedná o hlavní enzym zodpovědný za odstraňování krve ze subarachnoidálního prostoru po subarachnoidálním krvácení (Schallner et al., 2015).

Hladina BR se u skupiny ACSF držela skoro na stejné úrovni, zaznamenali jsme mírný pokles během 1. dne a mírné zvýšení během 3. dne, ale hladina se oproti intaktu neměnila nijak výrazně. Dle výsledků můžeme tedy konstatovat, že u skupiny SAK se hladina velmi výrazně zvýšila hned první den po indukci krvácení a poté se postupně snižovala. Tato zvýšená hladina biliverdinreduktázy se navíc postupně zvyšovala po celou dobu trvání subarachnoidálního krvácení. Bylo také zjištěno, že biliverdinreduktáza usnadňuje řešení hematomu a tlumí zánět po hemoragické cévní mozkové příhodě (Zhang et al., 2018).

Výsledky naznačují, že krev sama o sobě a produkty vzniklé degradací hemoglobinu způsobují silnou reakci v počátečním stádiu SAK. Poté co výsledky skupiny SAK srovnáme se skupinou ACSF, můžeme říct, že na zvýšený intrakraniální tlak reaguje především HO-1, a to nejvíce 3. den. V této práci jsme zjistili zvýšené hladiny hemoxygenázy-1 a biliverdinreduktázy v ependymálních buňkách po indukci subarachnoidálního krvácení, což

je způsobeno degradací hemoglobinu, ale zvýšená hladina hemoxygenázy-1 byla zjištěna i třetí den po aplikaci umělého mozkomíšního moku. Tuto zvýšenou hladinu hemoxygenázy-1 lze považovat za obranný mechanismus buněk choroidálního plexu proti oxidačnímu stresu vyvolanému zvýšeným intrakraniálním tlakem (Conzen et al., 2019). Na druhou stranu, hladina biliverdinreduktázy nebyla v choroidálním plexu zvířat po podání umělého mozkomíšního moku významně změněna, což naznačuje, že biliverdinreduktáza není ovlivněna oxidačním stresem vyvolaným zvýšeným intrakraniálním tlakem.

6 Závěr

Prokázali jsme, že po prodělání SAK dochází ve všech periodách k progresivnímu zvýšení hladin enzymů podílejících se na odbourávání hemoglobinu, hemoxygenázy-1 a biliverdinreduktázy. Ke zvýšené sekreci těchto enzymů došlo jednak kvůli reakci na přítomnost krve v subarachnoidálním prostoru a jednak vlivem zvýšení intrakraniálního tlaku. Aplikace krve do subarachnoidálního prostoru ve skupině SAK způsobila velmi výraznou reakci ependymálních buněk, které zahájily sekreci HO-1 a BR hned během prvního dne po SAK, čímž zahájily odbourávání Hb. Čistě na zvýšení intrakraniálního tlaku reagují EC také, sice ne v takové míře, ale stále ne zanedbatelně. Zahájí především sekreci HO-1, což můžeme brát jako obranný mechanismus EC. Enzym BR na zvýšený intrakraniální tlak nemá až takový vliv.

Závěrem tedy můžeme říci, že ependymální buňky na přítomnost krve způsobenou SAK reagují produkcí enzymů, pomocí kterých degradují hemoglobin, HO-1 a BR, čímž se zbavují nechtěné krve v subarachnoidálním prostoru, jinak naplněném pouze CSF. Jedná se také o obranný mechanismus na zvýšení intrakraniálního tlaku, kterým je SAK způsobený.

7 Bibliografie

4. Metabolismus hemoglobinu a transport krevních plynů • Funkce buněk a lidského těla, n.d. URL
<http://fbt.cz/skripta/vi-dychaci-soustava/4-metabolismus-hemoglobinu-a-transport-krevnich-plynu/> (accessed 2.10.23).
11. Cerebrospinal Fluid, Blood-Brain Barrier and Blood-CSF Barrier • Functions of Cells and Human Body, n.d. URL
<http://fbt.cz/en/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/12-likvor-hematoencefalicka-a-hematolikvorova-bariera/> (accessed 1.19.23).
- Abbott, N.J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. *J. Anat.* 200, 629–638. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>
- Bechmann, I., Galea, I., Perry, V.H., 2007. What is the blood–brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 28, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.007>
- Brinker, T., Stopa, E., Morrison, J., Klinge, P., 2014. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS* 11, 10. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-10>
- Chauveau, C., Rémy, S., Royer, P.J., Hill, M., Tanguy-Royer, S., Hubert, F.-X., Tesson, L., Brion, R., Beriou, G., Gregoire, M., Josien, R., Cuturi, M.C., Anegón, I., 2005. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106, 1694–1702. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0494>
- Chrisman, C.L., 1992. Cerebrospinal Fluid Analysis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 22, 781–810. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(92\)50077-8](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(92)50077-8)
- Circle of Willis, 2023. . Wikipedia.
- Conzen, C., Becker, K., Albanna, W., Weiss, M., Bach, A., Lushina, N., Steimers, A., Pinkernell, S., Clusmann, H., Lindauer, U., Schubert, G.A., 2019. The Acute Phase of Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Intracranial Pressure Dynamics and Their Effect on Cerebral Blood Flow and Autoregulation. *Transl. Stroke Res.* 10, 566–582. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0674-3>
- Cserr, H.F., 1971. Physiology of the choroid plexus. *Physiol. Rev.* 51, 273–311. <https://doi.org/10.1152/physrev.1971.51.2.273>
- Decimo, I., Dolci, S., Panuccio, G., Riva, M., Fumagalli, G., Bifari, F., 2021. Meninges: A Widespread Niche of Neural Progenitors for the Brain. *The Neuroscientist* 27, 506–528. <https://doi.org/10.1177/1073858420954826>
- Del Bigio, M.R., 2010. Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 55–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0624-y>
- Delgehyr, N., Meunier, A., Faucourt, M., Bosch Grau, M., Strehl, L., Janke, C., Spassky, N., 2015. Ependymal cell differentiation, from monociliated to multiciliated cells, in: *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp. 19–35. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.004>
- Diagnostika subarachnoidálního krvácení (SAK) | Cerebrovaskulární manuál, 2019. URL <https://www.manual-cmp.cz/sak-diagnostika/> (accessed 1.30.23).
- Elektronická učebnice - ELUC [WWW Document], n.d. URL <https://eluc.ikap.cz/verejne/lekce/241> (accessed 2.5.23).
- Lowery, L.A., Sive, H., 2009. Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *BioEssays* 31, 446–458. <https://doi.org/10.1002/bies.200800207>
- MacDonald, A., Lu, B., Caron, M., Caporicci-Dinucci, N., Hatrock, D., Petrecca, K., Bourque, G., Stratton, J.A., 2021. Single Cell Transcriptomics of Ependymal Cells

- Across Age, Region and Species Reveals Cilia-Related and Metal Ion Regulatory Roles as Major Conserved Ependymal Cell Functions. *Front. Cell. Neurosci.* 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.703951>
- Matz, P., Turner, C., Weinstein, P.R., Massa, S.M., Panter, S.S., Sharp, F.R., 1996. Heme-oxygenase-1 induction in glia throughout rat brain following experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.* 713, 211–222. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01511-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01511-6)
- Možek - cévní zásobení [WWW Document], 2022. . *Medicína Nemoci Stud.* Na 1 LF UK. URL <https://www.stefajir.cz/mozek-cevni-zasobeni> (accessed 1.30.23).
- Neumanová, L., n.d. Závažnost spontánního subarachnoidálního krvácení z hlediska soběstačnosti a společenského uplatnění.
- Nitti, M., Piras, S., Brondolo, L., Marinari, U., Pronzato, M., Furfaro, A., 2018. Heme Oxygenase 1 in the Nervous System: Does It Favor Neuronal Cell Survival or Induce Neurodegeneration? *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2260. <https://doi.org/10.3390/ijms19082260>
- O'Brien, L., Hosick, P.A., John, K., Stec, D.E., Hinds, T.D., 2015. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.02.001>
- Qureshi, A.I., Sung, G.Y., Razumovsky, A.Y., Lane, K., Straw, R.N., Ulatowski, J.A., 2000. Early identification of patients at risk for symptomatic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Crit. Care Med.* 28, 984.
- Ramos-Vara, J.A., 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42, 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Sarnat, H.B., 1995. Ependymal Reactions to Injury. A Review: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 1–15. <https://doi.org/10.1097/00005072-199501000-00001>
- Schallner, N., Pandit, R., LeBlanc, R., Thomas, A.J., Ogilvy, C.S., Zuckerbraun, B.S., Gallo, D., Otterbein, L.E., Hanafy, K.A., 2015. Microglia regulate blood clearance in subarachnoid hemorrhage by heme oxygenase-1. *J. Clin. Invest.* 125, 2609–2625. <https://doi.org/10.1172/JCI78443>
- Schwartz, T.H., Solomon, R.A., 1996. Perimesencephalic Nonaneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Review of the Literature. *Neurosurgery* 39, 433–440. <https://doi.org/10.1097/00006123-199609000-00001>
- Solár, P., Brázda, V., Levin, S., Zamani, A., Jancalek, R., Dubovy, P., Joukal, M., 2020a. Subarachnoid Hemorrhage Increases Level of Heme Oxygenase-1 and Biliverdin Reductase in the Choroid Plexus. *Front. Cell. Neurosci.* 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.593305>
- Solár, P., Zamani, A., Dubovy, P., Joukal, M., Kubíčková, L., 2020b. Choroid plexus and the blood–cerebrospinal fluid barrier in disease. *Fluids Barriers CNS* 17. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00196-2>
- Subarachnoidální krvácení [WWW Document], 2010. . *Medicína Nemoci Stud.* Na 1 LF UK. URL <https://www.stefajir.cz/subarachnoidalni-krvaceni> (accessed 1.19.23).
- Trojan, S., 2003. *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing.
- Vrselja, Z., Brkic, H., Mrdenovic, S., Radic, R., Curic, G., 2014. Function of Circle of Willis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 578–584. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.7>
- Zhang, Yiting, Ding, Y., Lu, T., Zhang, Yixin, Xu, N., McBride, D.W., Tang, J., Zhang, J.H., 2018. Biliverdin reductase-A attenuated GMH-induced inflammatory response in the spleen by inhibiting toll-like receptor-4 through eNOS/NO pathway. *J. Neuroinflammation* 15, 118. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1155-z>

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Pohled na mozek zespodu se základními tepnami (“Mozek - cévní zásobení,” 2022)

Obrázek 2: Koronární řez lebkou, mozkovými plenami a mozkovou tkání (“Elektronická učebnice - ELUC,” n.d.)

Obrázek 3: Řez hematolikvorovou bariérou (“11. Cerebrospinal Fluid, Blood-Brain Barrier and Blood-CSF Barrier • Functions of Cells and Human Body,” n.d.)

Obrázek 4: CT zobrazení subarachnoidálního krvácení (“Diagnostika subarachnoidálního krvácení (SAK) | Cerebrovaskulární manuál,” 2019)

Obrázek 5: Zákroky při ruptuře aneurysmatu (“Subarachnoidální krvácení,” 2010)

Obrázek 6: Schéma Willisova okruhu (“Circle of Willis,” 2023)

Obrázek 7: Katabolická dráha hemu

Obrázek 8: A, B, C, D, E, F: znázornění vyhodnocení imunofluorescence HO-1 (vlastní obr.)

Obrázek 9: A, B, C, D, E, F: znázornění vyhodnocení imunofluorescence BR (vlastní obr.)

9 Seznam grafů

Graf 1: Imunokvantifikace hemoxygenázy-1 po SAK

Graf 2: Imunokvantifikace biliverdinreduktázy po SAK