

MODEL CEREBRÁLNÍCH VAZOSPAZMŮ A METABOLOMICKÉ MAPOVÁNÍ

ALEŠ HEJČL^{a,b,c}, KATEŘINA VONDRÁKOVÁ^{d,e},
PETR KELBICH^f, MARTIN SAMEŠ^a,
GRYGORIY TSENOV^{d,g} a PETR KAČER^h

^a Neurochirurgická klinika Univerzity Jana Evangelisty Purkyně, Krajská zdravotní, a.s., Masarykova nemocnice, o.z., Ústí nad Labem, ^b Fakultní nemocnice u sv. Anny, Mezinárodní centrum klinického výzkumu, Brno, ^c Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Oddělení neurověd, Praha, ^d Oddělení vývojové epileptologie, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, ^e Katedra fyziologie, Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2, ^f Oddělení biochemie, Krajská zdravotní, a.s., Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem, ^g Oddělení neurověd, biomedicíny a pohybových věd, Lékařská fakulta, Univerzita ve Veroně, Strada le Grazie 8, 37134, Verona, Itálie, ^h Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 5.11.16, přijato 14.12.16.

Klíčová slova: cerebrální vasospasmy, mikrodialýza, endothelin-1, HPLC, MS

Úvod

Netraumatické subarachnoidální krvácení (SAK) je akutní neurologický stav, jehož nejčastější příčinou je ruptura mozkového aneurysmatu. Při SAK dochází k vylití krve do subarachnoidálního prostoru na spodině mozku, který je normálně vyplněn mozkomíšním mokem (MMM). SAK je nejzávažnější formou mozkové mrtvice s roční incidencí 2–16/100 000 (cit.¹). Přibližně 15 % pacientů umírá na místě. Mortalita SAK z ruptury aneurysmatu je přibližně 40–50 % a 60 % přeživších trpí nějakou formou neurologického deficitu, nicméně detailní kognitivní vyšetření těchto pacientů by nejspíše ukázalo ještě vyšší hodnoty. Prognóza pacientů po SAK je dána několika faktory. Jestliže pacienti přežijí primární postižení mozku při ruptuře aneurysmatu, jsou v následujících dnech a týdnech ohroženi mimo jiné pozdní ischemií mozku (delayed cerebral ischemia, DCI). Přestože je již dnes všeobecně akceptováno, že příčiny DCI jsou rozličné, zásadním faktorem zůstávají cerebrální vasospasmy².

Cerebrální vasospasmy (CV) se objevují převážně v období od 4. do 14. dne po SAK, nicméně mohou přetrvávat i déle. Radiografické vasospasmy jsou přítomny u 70 % pacientů se SAK, nicméně klinicky symptomatické pouze ve 20–30 % SAK iniciuje imunitní odpověď³, což

v úvodní fázi znamená aktivaci makrofágů a neutrofilů, které proniknou do subarachnoidálního prostoru, fagocytují červené krvinky a zničí komplex hemoglobin-haptoglobin. Makrofágy a neutrofilové zůstávají v subarachnoidálním prostoru vzhledem k absenci lymfatického systému v CNS a poruše cirkulace MMM dané SAK. Makrofágy a neutrofilové odumírají a rozpadají se, což vede k uvolnění intracelulárních endotelinů a kyslíkových radikálů s následnou arteriopatií a vazokonstrikcí indukovanou zánětem. Tento vývoj časově koreluje s rozvojem klinických CV. Tento proces iniciuje druhou fázi imunitní odpovědi, jejímiž nositeli jsou lymfocyty a plazmocyty a tento druhý inzult se rozvíjí dny až týdny po vzniku SAK. Zánět a ischemie tkáně indukovaná SAK aktivuje syntézu endothelinu-1 (ET-1), což je výrazný vazokonstriktor vylučovaný astrocyty a leukocyty. Nárůst koncentrace ET-1 doprovází pokles NO a tato nerovnováha obou mediátorů způsobuje přetrvávající vazokonstrikci mozkových cév po SAK. ET-1 je významným mediátorem vazokonstrikce po SAK a jeho přesná role ještě není zcela objasněna. Je zajímavé, že u pacientů po SAK jsou koncentrace ET-1 téměř fyziologické. Význam tak může mít zvýšená koncentrace receptorů pro endothelin, což pak vede k arteriální vazokonstrikci⁴. Navíc ischemie mozku vede k navýšení těchto receptorů v mozku, čímž může vasospasmy dále potencovat⁵.

Ačkoliv výzkum vasospasmů je rozsáhlý, doposud neexistují všeobecně akceptovatelné biomarkery časné diagnostiky rozvoje vasospasmů a jejich progresu, které by umožnily brzké a cílené zahájení léčby. Klinická diagnostika vasospasmů je založena na klinickém monitorování, opakovaném měření pomocí transkraniální dopplerometrie (TCD) a angiografie mozkových cév. Současná diagnostika má však svá úskalí, neboť nedokáže často včas zachytit rozvoj vasospasmů a s tím souvisejícího rozvoje pozdního neurologického deficitu (DCI). V posledních letech se rozvíjí tzv. multimodální monitorování mozku, které zahrnuje invazivní monitorování zásobením kyslíkem pomocí tkáňové oxymetrie, tkáňového metabolismu pomocí mikrodialýzy a monitorace průtoku krve mozdem. Mikrodialýza je metoda jak klinického, tak převážně experimentálního výzkumu⁶.

Mikrodialýza se využívá u pacientů se SAK v situaci, kdy jsou tlumení, uměle ventilováni a tedy klinicky nevyšetřitelní. Podle některých studií⁷ může mikrodialýza predikovat rozvoj vasospasmů i o několik hodin dříve, než dojde ke klinickým projevům. Zcela logickým se tedy jeví navrhnout experimentální model CV, který by pomohl mapovat metabolické změny mozku. Jednou z možností je experimentálně indukovat CV bezprostřední aplikací nízkých koncentrací ET-1 do mozkové tkáně. Několik experimentálních studií^{8,9} již potvrdilo, že tento vazokonstrikční peptid při přímé aplikaci do tkáně dokáže omezit regionální krevní průtok (RKP). Navíc v naší pilotní studii jsme zjistili, že pomocí aplikace různých koncentrací ET-1 lze modelovat odlišné a různě trvající změny RKP u potkana. S ohledem na výše uvedená fakta o úloze ET-1 v rozvoji CV a DCI u pacientů jsme se rozhodli vyvinout animální

model CV a zmapovat dopad CV na biochemii tkáně a definovat neurochemické koreláty vzniku CV.

Experimentální část

Experimenty byly provedeny na šedesátidenních (P60) potkanech kmene Albino Wistar pocházejících z chovů na Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR (CZ 11760353 a 1398/2014-MZE-17214). Den narození byl stanoven jako den 0. Odstav zvířat od matky se konal 28. den života. Zvířata byla chována v kontrolovaných podmínkách (teplota 22 ± 1 °C, vlhkost 50–60 %, světlo od 6:00–18:00) s volným přístupem k vodě a potravě. Experimenty byly schváleny Výborem pro ochranu zvířat na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky (číslo schválení 095/2010, 013/2012); ústav vlastní NIH prohlášení o shodě s normami pro humánní péči a používání laboratorních zvířat č.j. 1396/2014-MZE-17214 platící do 31. prosince 2018. Péče o zvířata a experimentální postupy jsou prováděny v souladu s pokyny Evropského společenství směrnic Rady 2010/63/EU. Experimentální skupiny tvořilo 9 zvířat pro experiment 1 a 7 potkanů pro experiment 2 (viz text níže).

Mikrodialýza a měření regionálního krevního průtoku

Pro vyvolání CV byla použita intrahipokampální infúze endotelinu-1 v koncentraci 40 pmol a celkovém objemu 1 μ l. Experimenty byly provedeny podobně, jak již bylo popsáno dříve^{10,11} s následujícími modifikacemi:

Experiment 1: Kanyla pro intrahipokampální infúzi látek byla zavedena do pravého dorzálního hipokampu v souřadnicích AP=3,7; ML=3,0; DV=3,5 mm; podle¹². Dále částí zvířat byla zavedena mikrodialyzační sonda (AT4.15.1.Cu, AgnTho's AB, Švédsko, cut-off 6 kDa, délka membrány 1 mm), která byla implantována cca 0,5–0,8 mm posteriorně. Sonda byla promývána umělou mozkomíšním mokem s konstantní rychlostí 1,0 μ l min^{-1} . Hodinu po zavedení MD sondy byl započat sekvenční odběr vzorků, vždy po 20 min. Po prvním (tj. bazálním vzorku) byl zvířatům infundován ET-1 ($n=6$),

Tabulka I
Eluční program LC metody pro stanovení derivátu glutathionu

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	1	99
2,5	1	99
5	65	35
10	1	99
15	1	99

kontrolní skupině byl podán fosfátový pufr ($n=4$) ve stejném objemu.

Experiment 2: V experimentech pro měření RKP byla místo MD sondy zavedena jehlová sonda pro měření RKP (Perimed, Švédsko) a průtok byl měřen obdobným způsobem, jak bylo popsáno dříve¹⁰. Během všech experimentů byla zvířata udržována při konstantní teplotě (37 ± 0 °C) pomocí vyhřívané podložky s automatickým udržováním žádané teploty (Supratech Engineering, Maďarsko).

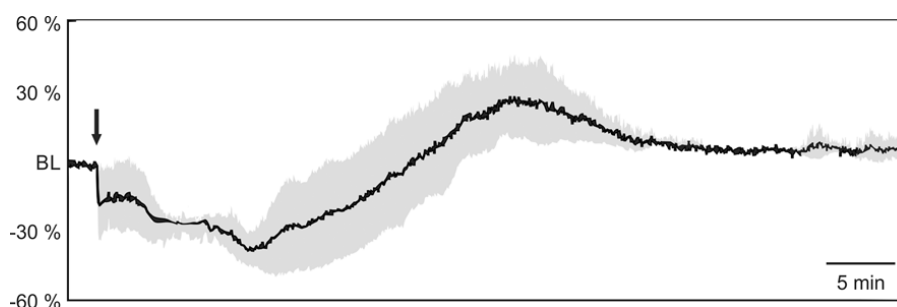
Analýza mikrodialyzačních vzorků

Pro samotný vývoj a optimalizaci derivatizačních reakcí a postupů při zpracování vzorků byl pro analýzy využit hybridní hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, USA), který je kombinací dvou analyzátorů – lineární iontové pastí a orbitrapové pastí, spojený s kvarterní pumpou Accela 600 (Thermo Scientific, USA) a autosamplermem Accela AS (Thermo Scientific, USA). Pro následné měření vzorků za použití vyvinutých metod byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA) spojený s kvarterní pumpou Accela 600 (Thermo Scientific, USA) a autosamplermem Accela Open AS (Thermo Scientific, USA). Pro stanovení derivatizovaných aminokyselin byla užitá UHPLC kolona C18 EVO, $100 \times 2,1$ mm, 1,7 μ m (Phenomenex, USA). Separace látek na chromatografické koloně byla prováděna gradientovou elucí o složení mobilních fází acetonitril (A) a 10 mM vodný roztok mravenčanu amonného (B). Gradientová metoda je zaznamenána v tab. I (poměr mobilních fází je udáván v objemových procentech). Průtok mobilní fáze byl konstantní (150 μ l min^{-1}) po celou dobu analýzy. Nástřikový objem vzorku činil 10 μ l. ESI⁺-MS analýza byla prováděna v SRM (selected reaction monitoring) módu.

Výsledky a diskuse

Regionální krevní průtok (RKP)

Měření regionálního krevního průtoku provedené pomocí Dopplerova průtokoměru ukázalo, že intrahipokampální infúze ET-1 ($n=4$) vedla k ~40% poklesu RKP (obr. 1), zatímco infúze fosfátového pufru (pH 7,4) u kontrolní skupiny ($n=4$) výrazně RKP neměnila (data nejsou ukázána). Výstupem je potvrzení, že touto dávkou nedosáhneme tkáňové ischemie, nicméně mimikujeme tvorbu vazospazmu, který často doprovází subarachnoidální krvácení. Ovšem zůstává otázkou napodobení takto vyvolaných CV v jiných oblastech mozku dospělého potkana. Primární úlohu při vzniku a průběhu ET-1 indukovaných vazospazmů bude samozřejmě hrát odlišná vaskularizace různých částí mozku¹³, dále koncentrace ET-1, věk a typ pokusných zvířat se mohou rovněž podepsat na výsledku.



Obr. 1. Výsledky měření regionálního krevního průtoku po intrahipokampální infúzi ET-1 dospělým zvířatům. Vazospazmová aktivita v mozku dospělého potkana po aplikaci ET-1 ($40 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$). Černá linie znázorňuje procentuální průměrnou hodnotu RKP (pokles/nárůst v procentech) oproti bazální hodnotě (BL na ose y). Šedé pole znázorňuje standardní chybu průměru. Černá šipka ukazuje začátek infúze ET-1. Časová značka 5 min

Mikrodialýza

Před zahájením každého MD experimentu bylo u použitých MD sond zkontrolováno tzv. „recovery“ (tzn. propustnost) mikrodialyzační sondy AgnTho's v roztocích o známých koncentracích. Propustnost námi zvolené sondy se pohybovala v rozmezí 54–89 % v souvislosti s daným metabolitem a rychlostí perfúze (viz tab. II). Na základě těchto výsledků pro MD experimenty s danou sondou byla zvolena rychlost průtoku $1 \mu\text{l min}^{-1}$, při které bylo dosaženo vyšší než 70% propustnosti.

Intrahipokampální infúze ET-1 ($40 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) vedla k významnému zvýšení koncentrací glutamátu, laktátu a glycerolu (obr. 2). Na druhou stranu došlo ke snížení extracelulárních koncentrací glukózy, pyruvátu a také GABA (obr. 2). U kontrolní skupiny zvířat ($n=4$), které byl podán fosfátový pufr, jsme zaznamenali jen nepatrné změny v hladinách metabolitů, které ovšem byly srovnatelné s bazálními hodnotami (data neukázána).

Během nedostatečného zásobení tkáně kyslíkem a glukosou dochází k přepnutí na anaerobní metabolismus a konverzi pyruvátu na laktát. Poměr mezi těmito metabolity indikuje změny redoxního stavu buněk, způsobené např. ischemií nebo dysfunkcí mitochondrií. V našich experimentech došlo k ~29% poklesu pyruvátu a ~246% nárůstu laktátu, což značí masivní acidózu. Dále byl zjiš-

těn pokles excitační aminokyseliny aspartátu (o ~30 %), a inhibičních neurotransmiterů GABA (o ~37 %) a taurinu (o ~26 %) první hodinu po aplikaci. Naopak hladina hlavního excitačního neurotransmiteru, glutamátu, postupně narůstala a během druhé hodiny po vzniku CV významně vzrostla o ~42 % oproti bazální hodnotě. Je známo, že nárůst glutamátu slouží jako nepřímý raný marker energetického deficitu a poškození buněk. Bylo zjištěno, že během ischemie jeho hladina v dialyzátu roste až na neurotoxickou úroveň¹⁴. Je známo, že derivát glutamátu, glutamin, vzniká energeticky náročnou konverzí v astrocytech. Bylo zjištěno, že během tranzientní kompletní cerebrální ischemie dochází k jeho několikanásobnému nárůstu v hipokampu¹⁵. V našem případě koncentrace této aminokyseliny poklesla významně jen 2. hodinu po infúzi ET-1, a to o ~29 % oproti bazální hodnotě.

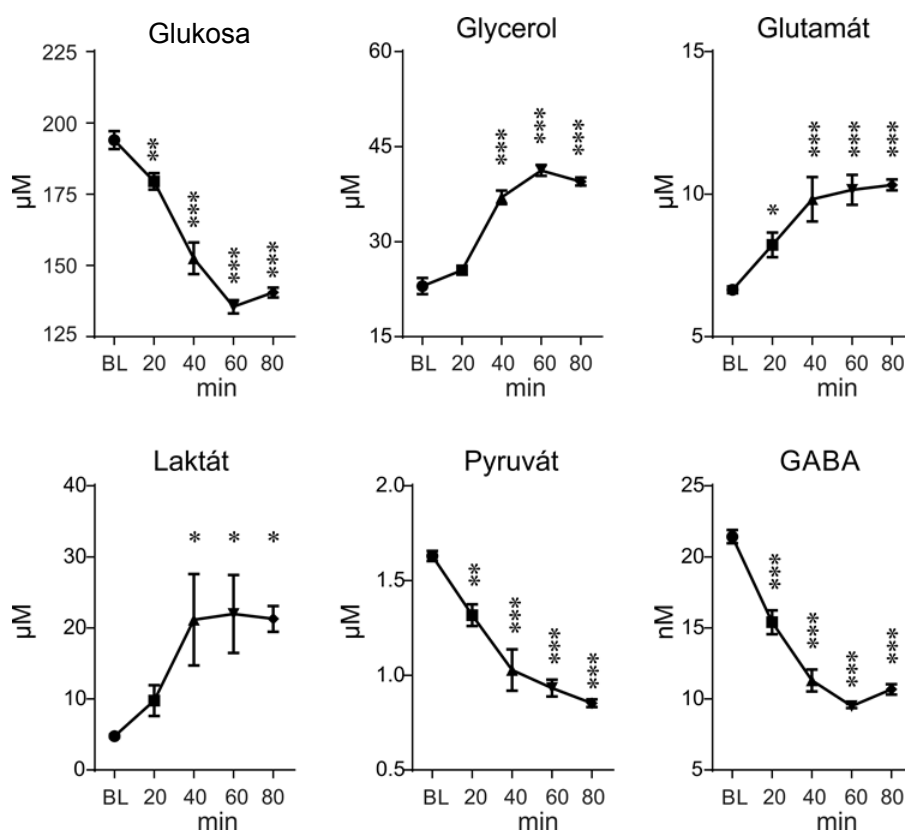
Nilsson a spol. ve své studii¹⁶ dokonce uvedli, že dramatické změny extracelulárních koncentrací laktátu, stejně tak glukózy a glycerolu, přímo korelují s klinickým stavem pacienta a spolu se změnami koncentrace glutamátu a poměru laktát/pyruvát mohou sloužit jako citlivý marker ischemie u pacientů se SAK. Vezmeme-li v potaz fakt, že výše uvedené markery jsou nedílnou součástí klinické diagnostiky CV a ischemie¹⁶ a jsou rovněž používané v automatických mikrodialyzačních analyzátoch, jedná se tedy o relevantní výstup v našem modelu.

Tabulka II

In vitro propustnost membrány (recovery proby) AgnTho's sondy AT4.15.1.Cu

Parametr	GABA [#]			Pyruvát			Glutamát		
Rychlost, $\mu\text{l min}^{-1}$	1	1,5	2	1	1,5	2	1	1,5	2
Roztok A	77	68	65	73	63	58	70	62	54
Roztok B	84	71	69	76	67	63	75	66	59
Roztok C	89	75	73	79	72	68	82	70	62

Hodnoty propustnosti membrány v procentech jsou uvedeny jako průměrná hodnota při různé rychlosti perfúze. Koncentrace: roztok A – $10 \mu\text{M}$, roztok B – $50 \mu\text{M}$ a roztok C – $100 \mu\text{M}$. [#] v případě GABA byly použity roztoky v nM koncentracích



Obr. 2. Změny v tkáňové biochemii hipokampu po infúzi ET-1 (40 pmol μL^{-1}). Každý bod reprezentuje koncentraci určitého metabolitu v mikrodialyzačním vzorku mozku potkana. Hvězdičky reprezentují signifikantní rozdíl (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) oproti příslušné bazální koncentraci (BL vzorek). Čas je udán v minutách po infúzi ET-1

Mimo jiné, infúze ET-1 vyvolala řadu změn v extracelulárních koncentracích metabolitů (viz tab. III), které nebyly doposud zmapované či diskutované v souvislosti s CV. Během první hodiny po infúzi došlo k signifikantnímu poklesu nepolárních aminokyselin α -alaninu o $\sim 29\%$ a valinu o $\sim 40\%$ oproti bazálním hodnotám. Naopak u glycinu došlo k nárůstu koncentrace po indukci cerebrálního vazospazmu a to o $\sim 18\%$. Kromě toho, CV způsobuje také pokles pozitivně nabitého histidinu o $\sim 24\%$, nicméně nejvyšší pokles byl zaznamenán u lysinu, u kterého došlo ke snížení průměrné koncentrace o $\sim 42\%$. Podobný pokles byl zaznamenán i u serinu (o $\sim 35\%$) a tyrosinu (o $\sim 37\%$) během první hodiny po infúzi ET-1.

Dále, v důsledku CV došlo k poklesu 5-HT o $\sim 24\%$ první hodinu po aplikaci ET-1, naopak hladina dopaminu v dialyzátu vzrostla o $\sim 102\%$ oproti bazální hodnotě. Nezávisle provedenou imunohistochemickou analýzou bylo zjištěno, že monoaminy mohou stejně jako glutamát působit neurotoxicky, což bylo potvrzeno i dříve¹⁷.

Molekulou, která také přispívá k neuronálnímu poškození, je oxid dusnatý (NO), který vzniká přeměnou argininu na citrulin. V našich experimentech došlo k poklesu argininu o $\sim 39\%$ a nárůstu citrulinu o $\sim 95\%$. Bylo

zjištěno, že poměr arginin/citrulin je indikátorem aktivity syntasy oxidu dusnatého a produkce NO. Je známo, že tato signální molekula má v organismu mnoho funkcí, např. jako neurotransmitter se účastní procesu učení a tvorby paměti, na cévy působí vazodilatačně a zvyšuje krevní průtok. NO je mimo jiné produkován fagocyty a může hrát roli v inflamatorních a imunitních odpovědích, navíc může přispívat k reperfučnímu poškození po ischemii. Zdá se, že NO může být jednou z možných příčin vzniku vazospazmů^{18,19}.

V neposlední řadě jsme zmapovali markery zánětlivé reakce (leukotrien B₄, prostaglandin E₂) a oxidativního stresu (8-izoprostan, NO-tyrosin a O-tyrosin). U těchto metabolitů byl zjištěn postupný nárůst po dobu dvou hodin od infúze ET-1. Naši pozornost upoutal masivní nárůst koncentrace endotelinu-1. Infúze ET-1 vedla k navýšení jeho celkové koncentrace téměř 8 násobně (viz tab. III). Již dříve se spekovalo¹⁹ o tom, že zvýšená endogenní produkce ET-1 může stát za rozvojem pozdního ischemického deficitu u pacientů se subarachnoidálním krvácením. Tato otázka zůstává i nadále neprozkoumaná, stejně tak i mechanismy pozdní spontánní produkce endogenního ET-1 a jeho role ve vzniku opakovaných CV.

Tabulka III

Hladiny koncentrací vybraných metabolitů v dospělém mozku před aplikací (BL) a 1. a 2. hodinu po aplikaci ET-1 (40 pmol μl^{-1}) do pravého dorzálního hipokampu

Metabolit	Koncentrační změny v čase ^a		
	BL	1. hodina	2. hodina
Glutamát, μM	7,1 \pm 0,1	9,1 \pm 0,3	10,0 \pm 0,3 *
Glutamin, nM	323,8 \pm 2,3	265,4 \pm 7,9	231,4 \pm 8,2 *
Aspartát, nM	7,2 \pm 0,1	5,1 \pm 0,2 *	4,2 \pm 0,3 *
GABA, nM	20,6 \pm 0,4	13 \pm 0,7 *	12,6 \pm 0,5 *
Taurin, nM	417,9 \pm 1,9	310,7 \pm 10,8 *	285 \pm 8,2 *
Glycin, nM	419,6 \pm 1,4	493 \pm 7,4 *	465,5 \pm 5,5 *
Serin, nM	65,7 \pm 1,6	42,8 \pm 2,5 *	47 \pm 2,2 *
Citrulin, nM	30,0 \pm 1,5	58,3 \pm 2,8 *	47,3 \pm 2,9 *
Arginin, nM	508,2 \pm 4,5	310,7 \pm 20,4 *	266,1 \pm 11,2 *
Alanin, nM	523,3 \pm 4,0	371,8 \pm 15,9 *	326 \pm 7,2 *
Histidin, nM	345,7 \pm 1,8	262,2 \pm 9,3 *	275,3 \pm 8,5 *
Tyrosin, nM	223,6 \pm 2,0	140,3 \pm 6,3 *	130,5 \pm 4,5 *
Valin, nM	56,2 \pm 1,1	33,9 \pm 2,2 *	32,3 \pm 2,4 *
Lysin, nM	46,2 \pm 0,6	26,6 \pm 1,6 *	31,7 \pm 1,7 *
Dopamin, nM	172,8 \pm 3,1	360,2 \pm 17,2 *	349,5 \pm 9,2 *
5-HT, nM	677,6 \pm 2,6	516,6 \pm 14 *	446,8 \pm 14,2 *
Laktát, μM	4,7 \pm 0,1	16,2 \pm 2,2 *	19,5 \pm 0,9 *
Pyruvát, μM	1,6 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1 *	0,9 \pm 0,0 *
8-isoprostan, ng/ml	25,3 \pm 0,7	27,5 \pm 0,4 *	31,3 \pm 0,6 *
NO-Tyrosin, ng/ml	35,5 \pm 0,9	46 \pm 1,1 *	56,8 \pm 1,1 *
o-Tyrosin, ng/ml	41 \pm 1,4	47,3 \pm 2,1 *	56,3 \pm 1,9 *
8-OHG, ng/ml	24 \pm 0,9	21 \pm 1,7	23,5 \pm 2,0
Leukotrien B4, ng/ml	25,6 \pm 0,7	27,8 \pm 0,7 *	32,8 \pm 0,7 *
Prostaglandin E2, ng/ml	41 \pm 0,9	45,8 \pm 1,1 *	51,3 \pm 1,8 *
Endotelin-1	25,2 \pm 1,5 fmol/ml	327,3 \pm 10,6 * pmol/ml	247,7 \pm 4 * pmol/ml

^a* označuje signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) oproti bazální hladině (BL)

Závěr

Exogenní aplikace ET-1 v koncentraci 40 pmol μl^{-1} do oblasti dorzálního hipokampu vedla k úspěšné modelaci cerebrálních vazospazmů u dospělých potkanů. Vazospazmy se projeví elevací relevantních metabolických markerů asociovaných s CV a ischemií relevantních po klinické stránce. Vhodný experimentální model CV v kombinaci s přímou detekcí markerů vazospazmů může přinést nové specifické markery CV umožňující včasné zahájení léčby, což může vést ke zlepšení klinických výsledků v léčbě pacientů s těžkým SAK. Léčba klinických vazospazmů se skládá z indukce hypertenze a při nedostatečném efektu pak následuje většinou intra-arteriální léčba spasmolytiky

či perkutánní angioplastika. Právě u pacientů v těžkém klinickém stavu je léčba svízelná a málo úspěšná²⁰. Je to zapříčiněno jednak těžkým primárním poškozením mozku, ale také problémem s časným a specifickým záchytem cerebrálních vazospazmů. Naše výsledky ukazují, že kombinace mikrodialyzační techniky a rozšířeného metabolického mapování HPLC/MS analýzou v experimentálním modelu může přinést nové poznatky v oblasti časného a specifického záchytu CV, tedy klíčových podmínek pro jejich úspěšnou léčbu.

Autoři by rádi poděkovali za finanční podporu Národním programu udržitelnosti I číslo LO-1215 (MŠMT – 34870/2013). Tato studie byla podpořena Grantovou

agenturou Karlovy univerzity (projekt č. 165115), grantem GAČR GA14-20613S. Podpořeno projektem č. LQ1605 (MŠMT ČR, NPU II), grantem MŠMT ČR č. LH14054 (KONTAKT II) a vnitřním grantem KZCR (IGA-KZ-2016-1-9).

Seznam zkratk

SAK	subarachnoidální krvácení
ET-1	endotelin 1
MMM	mozkomíšni mok
DCI	pozdní ischemií mozku (delayed cerebral ischemia)
CV	cerebrální vazospasmus
CNS	centrální nervový systém
CID	kolizně-indukovaná disociace
ESI	elektrosprejová ionizace
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
SRM	selektivní monitorování reakcí
GABA	γ -aminomáselná kyselina
MD	mikrodialýza
BL	bazální hladina
RKP	regionální krevní průtok

LITERATURA

- Feigin V. L., Lawes C. M., Bennett D. A., Barker-Collo S. L., Parag V.: *Lancet Neurol.* 8, 355 (2009).
- Lin C. L., Dumont A. S., Zhang J. H., Zuccarello M., Muroi C.: *BioMed Res. Int.* 2014, 1.
- Connolly E. S. Jr, Rabinstein A. A., Carhuapoma J. R., Derdeyn C. P., Dion J., Higashida R. T., Hoh B. L., Kirkness C. J., Naidech A. M., Ogilvy C. S., Patel A. B., Thompson B. G., Vespa P.: *Stroke* 43, 1711 (2012).
- Hansen-Schwartz J., Ansar S., Edvinsson L.: *Front. Biosci.* 13, 2160 (2008).
- Hansen-Schwartz J., Hoel N. L., Zhou M., Xu C. B., Svendgaard N. A., Edvinsson L.: *Neurosurgery.* 52, 1188 (2003).
- Goodman J. C., Robertson C. S.: *Curr. Opin. Crit. Care.* 15, 110 (2009).
- Skjøth-Rasmussen J., Schulz M., Kristensen S. R., Bjerre P.: *J. Neurosurg.* 100, 8 (2004).
- Bogaert L., Scheller D., Moonen J., Sarre S., Smolders I., Ebinger G., Michotte Y.: *Brain. Res.* 887, 266 (2000).
- Tsenov G., Mátěffiová A., Mares P., Otáhal J., Kubová H.: *Epilepsia* 48 (Suppl 5), 7 (2007).
- Tsenov G., Vondrakova K., Otáhal J., Burchfiel J., Kubova H.: *Exp. Neurol.* 265, 40 (2015).
- Vondrakova K., Pošusta A., Valeš K., Kubova H., Tsenov G., Kačer P.: *J. Chromatogr. A*, zasláno k publikaci.
- Paxinos G., Watson C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press 1998.
- Coyle P.: *Exp. Neurol.* 52, 447 (1976).
- Choi D. W., Rothman S. M.: *Annu. Rev. Neurosci.* 13, 171 (1990).
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer N. H.: *J. Neurochem.* 43, 1369 (1984).
- Nilsson O. G., Brandt L., Ungerstedt U., Säveland H.: *Neurosurgery.* 45, 1176 (1999).
- Filloux F., Townsend J.: *J. Exp. Neurol.* 119, 79 (1993).
- Pluta R. M.: *Pharmacol. Ther.* 105, 23 (2005).
- Suhardja A.: *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 1, 110 (2004).
- Hejčl A., Cihlář F., Smolka V., Vachata P., Bartoš R., Procházka J., Cihlář J., Sameš M.: *J. Neurosurg.*, zasláno k publikaci.

A. Hejčl^{a,b,c}, K. Vondráková^{d,e}, P. Kelbich^f, M. Sameš^a, G. Tsenov^{d,g}, and P. Kačer^h
^a Neurochirurgic clinic, University of J.E. Purkyne, Krajska zdravotni, a.s., Masaryk hospital in Usti nad Labem, ^b The International Clinical Research Center of St. Anne's University Hospital, Brno, ^c Department of Neuroscience, Institute of Experimental Medicine, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^d Department of Developmental Epileptology, Institute of Physiology, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^e Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, ^f Department of Biochemistry, Krajska zdravotni, a.s., Masaryk hospital in Usti nad Labem, ^g Department of Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, Anatomy and Histology Section, Faculty of Medicine, University of Verona, Italy, ^h University of Chemistry and Technology Prague): **A Model of Cerebral Vasospasms and Metabolomic Mapping**

Cerebral vasospasm (CV) is a one of the main factors leading to high morbidity and mortality in patients with a severe subarachnoid hemorrhage. Biomarkers of early diagnosis of the vasospasm development and progression are still poorly understood. Use of microdialysis (MD) techniques combined with modern practices in metabolomic analysis can significantly contribute to the understanding of these phenomena. The aim of this study was to design an animal model of the CV for understanding biochemical correlates of CVs, their development and progression. Intrahippocampal infusion of endothelin-1, a potent vasoconstrictor, in adult rats was used to mimic CV-condition. A range of biomarkers relevant to clinical practice was monitored using the MD and the HPLC-MS analysis. As a result, we developed a suitable model and a selective method of analysis to monitor neurochemical correlates that are highly relevant for future experimental and clinical research.