

Univerzita Karlova 2. lékařská fakulta



Dizertační práce

# Biochemická diagnostika expanzních kontuzí mozku

MUDr. David Vajtr

Školitel: **Prof. MUDr. Richard Průša, CSc.**

Ústav klinické biochemie a patobiochemie  
UK 2.LF a FN Motol

Praha 2009

# OBSAH

<b><u>1. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ZNALOSTÍ</u></b>	<b>6</b>
1.1. PATOFYZIOLOGIE PRIMÁRNÍHO A SEKUNDÁRNÍHO PORANĚNÍ MOZKU	6
1.2. EXPANZNÍ PROCESY - EXPANZNÍ KONTUZE A MALIGNÍ ZVÝŠENÍ NITROLEBNÍHO TLAKU PŘI EDÉMU MOZKU	11
1.3. PATOFYZIOLOGICKÉ REAKCE PŘI HYPOXII MOZKU U TRAUMAT	15
1.4. HEMATO-ENCEFALICKÁ BARIÉRA MOZKU	21
1.5. PATOFYZIOLOGICKÉ REAKCE ASTROGLIE PŘI PORANĚNÍ MOZKU	25
1.6. MONITOROVÁNÍ PATOBIOCHEMICKÝCH ZMĚN PŘI PORANĚNÍ MOZKU	29
<b><u>2. CÍLE PRÁCE</u></b>	<b>42</b>
<b><u>3. METODY</u></b>	<b>43</b>
3.1. SOUBOR PACIENTŮ	43
3.2. LABORATORNÍ VYŠETŘOVACÍ METODY	50
3.3. MIKROSKOPICKÉ VYŠETŘENÍ	52
3.4. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	53
<b><u>4. VÝSLEDKY</u></b>	<b>51</b>
4.1. NEUROBIOCHEMICKÉ MARKERY A KLINICKÁ MONITORACE STAVU VĚDOMÍ U PACIENTŮ S LOŽISKOVÝM PORANĚNÍM MOZKU	56
4.2. HODNOTY NEUROBIOCHEMICKÝCH UKAZATELŮ U PACIENTŮ S RIZIKOVÝMI FAKTORY	59
4.3. HODNOTY NEUROBIOCHEMICKÝCH UKAZATELŮ U LOŽISKOVÝCH PORANĚNÍ MOZKU (EXPANZNÍ A NE-EXPANZNÍ KONTUZE)	64
4.4. HODNOTY NEUROBIOCHEMICKÝCH UKAZATELŮ U DIFUZNÍCH PORANĚNÍ MOZKU	66
4.5. HODNOTY ZÁNĚTLIVÝCH A RŮSTOVÝCH FAKTORŮ U LOŽISKOVÝCH PORANĚNÍ MOZKU	73
<b><u>5. DISKUZE</u></b>	<b>79</b>
<b><u>6. ZÁVĚR.</u></b>	<b>90</b>
<b><u>7. SOUHRN</u></b>	<b>93</b>
<b><u>8. SUMMARY</u></b>	<b>97</b>

**9. LITERATURA** **101**

---

**10. PŘÍLOHA: SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ K TÉMATU** **113**

10.1. PŮVODNÍ PRÁCE A PŘEHLEDNÉ ČLÁNKY V ČASOPISECH S DEFINOVANÝM IMPAKT FAKTOREM	113
10.2. OSTATNÍ PŮVODNÍ PRÁCE A PŘEHLEDNÉ ČLÁNKY (BEZ IF)	113
10.3. OPONOVANÁ ABSTRAKTA V ČASOPISECH S DEFINOVANÝM IMPAKT FAKTOREM	114
10.4. OSTATNÍ ABSTRAKTA V ČASOPISECH A VE SBORNÍCÍCH	115

**11. PŘÍLOHA PUBLIKOVANÝCH VÝSLEDKŮ** **117**

11.1. PŘÍLOHA 1	117
11.2. PŘÍLOHA 2	118
11.3. PŘÍLOHA 3	119
11.4. PŘÍLOHA 4	120
11.5. PŘÍLOHA 5	121
11.6. PŘÍLOHA 6	122

## PODĚKOVÁNÍ

Moje srdečné poděkování patří váženému panu prof. MUDr. R. Průšovi, CSc. za trpělivé vedení a směřování mé vědecké práce a zejména za možnost podílet se jako spolupracovník na řešení grantového projektu, který se zabývá monitorováním biochemických ukazatelů po poranění mozku. Poděkování patří mému dlouholetému spolupracovníkovi Ing. J. Kukačkovi, PhD. za jeho nezištnou pomoc.

Většina analýz vzorků krce od pacientů byla realizována na pracovišti Ústavu klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF v Praze. Děkuji jeho zaměstnancům za vytvoření tvůrčího a svobodného prostředí.

Poděkování dále patří laboratoři elektronové mikroskopie AV ČR, za trpělivé dokumentování a softwarové zpracování elektronogramů, jmenovitě RNDr. O.Benadovi, CSc.

Děkuji všem, za jejichž podpory tato práce vznikla, zejména za odborné pomoci při interpretaci elektronogramů prof.MUDr. M.Ellederovi, DrSc.

Práce vznikla za podpory grantu *IGA MZ, reg.č. NR/8793-3/2006.*

## SEZNAM ZKRATEK

<i>BBB</i>	<i>hematoencefalická bariéra (Blood brain barrier)</i>
<i>CBF</i>	<i>mozkový krevní průtok</i>
<i>CD 68</i>	<i>receptor fagocytujících buněk</i>
<i>CRP</i>	<i>C reaktivní protein</i>
<i>C-tau</i>	<i>štěpené s mikrotubuly asociované proteiny</i>
<i>CT</i>	<i>computer tomography</i>
<i>DAI</i>	<i>difuzní axonální poranění</i>
<i>DAB</i>	<i>di-amino-benzidine</i>
<i>EGF</i>	<i>epidermální růstový faktor</i>
<i>GCS</i>	<i>Glasgow coma scale</i>
<i>GFAP</i>	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
<i>GluR</i>	<i>receptor neurotransmiteru Glutamátu</i>
<i>HIF</i>	<i>hypoxií indukovatelný faktor</i>
<i>ICP</i>	<i>intrakraniální (nitrolební) tlak</i>
<i>IL-6</i>	<i>interleukin 6</i>
<i>ISS</i>	<i>injury severity score</i>
<i>MBP</i>	<i>myelinový bazický protein</i>
<i>MMP</i>	<i>matrixové metaloproteinázy</i>
<i>NF-H</i>	<i>neurofilamenta o velké molekulové hmotnosti</i>
<i>NOS</i>	<i>oxid dusnatý z L-argininu produkující syntáza</i>
<i>NSE</i>	<i>neuron specifická enoláza</i>
<i>RZS</i>	<i>rychlá záchranná služba</i>
<i>S-100B</i>	<i>kalcium vázající protein S-100B</i>
<i>TBI</i>	<i>traumatické mozkové poranění</i>
<i>TCA</i>	<i>cyklus trikarboxylových kyselin</i>
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	<i>faktor nekrotizující tumory <math>\alpha</math> (alfa)</i>
<i>VEGF</i>	<i>cévní a endoteliální růstový faktor</i>

# **1. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ZNALOSTÍ**

## **1.1. PATOFYZIOLOGIE PRIMÁRNÍHO A SEKUNDÁRNÍHO PORANĚNÍ MOZKU**

### **1.1.1. ÚVOD**

Rozlišuje se primární a sekundární poranění mozku, dále lze poranění rozdělit na fokální a difuzní. Primární poranění mozku vzniká jako výsledek působení mechanických sil vedoucích k deformaci mozkové tkáně v okamžiku úrazu. Mezi primární poranění fokální patří například mozková kontuze a akutní intracerebrální hematom. Mezi difuzní patří otřes mozku a difuzní axonální poranění. Na sekundárním mozkovém poškození se podílejí zejména systémové vlivy jako hypotenze a hypoxie, dále intoxikace alkoholem a mozkový edém, změny nitrolebečního a perfuzního tlaku a aktivace molekulárních a biochemických mechanismů rozvíjejících se po traumatu mozku. Je známo, že traumatem postižený mozek je citlivější k hypoxii a hypotenzi. Hypoxie vzniká často při aspiraci do dýchacích cest, zejména v souvislosti s intoxikací alkoholem a při poranění hrudníku. Hypotenze bývá definována jako systolický tlak nižší než 90 kPa, její výskyt při těžkých úrazech hlavy zdvojnásobuje mortalitu pacientů. K hypotenzi dochází sekundárně na základě šokového stavu, zejména při krvácení do dutiny hrudní nebo břišní. Hypotenze se společně s dalšími patofyziologickými mechanismy jako jsou poruchy autoregulace nebo vazospasmy výrazným způsobem podílí na výsledném sekundárním ischemickém poškození mozku. Tato hemodynamicky podmíněná ischemie se nejvíce projeví v distální části arteriálních teritorií. Z dalších systémových inzultů se na sekundárním poranění mozku negativně uplatňuje i hyperkapnie tím, že umožňuje vazodilataci a zhoršuje tak mozkový edém. Velmi závažným systémovým inzultem je hypertermie, zvláště pokud dosahuje hodnot vyšších než 39 °C, protože při těchto teplotách dochází ke zvýšenému vyplavování excitatorních aminů a k narušení funkce proteinkinázy C. Hyperglykemie a hypoglykemie jsou

další stavy zhoršující sekundární mozkové poškození. Společné patofyziologické projevy porušeného metabolismu vedoucího ke smrti buňky jsou nastartovány při sekundárním poškození mozku kupříkladu mechanickým poraněním axonů, ischemií a hypoxií mozkové tkáně, vazogenním edémem nebo zvýšeným nitrolebečním tlakem. U ischemie dochází

ke snížení oxidativní fosforylace a v dalším kroku dochází k excesivnímu nahromadění laktátu. Laktátová acidóza může vést až ke smrti buňky.

Laktát se tvoří v nadbytku i při porušení iontové homeostázy excitatorními aminy, které hrají zásadní roli v patofyziologii poranění mozku. K vyplavení excitatorních aminů dochází na základě mechanického poškození mozku. Mezi nejdůležitější excitatorní neurotransmitery patří glutamát a aspartát. Byly identifikovány typy receptorů pro tyto aminy: receptor AMPA - iontový kanál při jehož aktivaci dochází k masivními průniku sodíku a vody a úniku draslíku z buňky, nastává tzv. zduření buňky; dále receptor NMDA; jehož integrální částí je iontový kanál pro vápník, který při excesivním influxu kalcia do buňky aktivuje řadu nežádoucích kaskád. Dalším typem glutamátových receptorů je metabotropický receptor, který aktivuje fosfolipázu C.

### **1.1.2. FOKÁLNÍ A DIFUZNÍ PORANĚNÍ MOZKU**

#### **1.1.2.1. FOKÁLNÍ PORANĚNÍ MOZKU.**

Mozková kontuze vzniká nejčastěji kontaktním mechanismem. Nejčastěji se objevuje na bázi frontálního a temporálního laloku, je lokalizována povrchově v kortikální a subkortikální oblasti. Má jak složku kontuzní, tak i hemoragickou. Na množství krve a na homogenitě léze na CT vyšetření záleží zda se léze označí jako kontuze nebo intracerebrální hematom. Pro grafické zobrazení kontuzí jsou charakteristické změny v čase. Při CT vyšetření se ložisko objevuje s odstupem 6-12 hodin. S větším odstupem (řádově dny) obraz ložiska mizí a většinou nezanechává pseudocystu. Intracerebrální hematom vzniká, je-li narušená tepna většího kalibru

v ložisku kontuze. Těžké zhmoždění mozkové tkáně se označuje jako lacerace. Zhmožděná tkáň má různý stupeň prokrvácení, k prokrvácení dochází hlavně mechanismem hemoragické nekrózy tkáně. Určité množství erytrocytů ovlivňuje umístění kontuze a průsvit poraněných cév. Kontuze je téměř vždy provázena úrazovým subarachnoidálním krvácením (*Ragaisis, 2002*).

Na další vývoj kontuzního ložiska mají vliv i změny průtoku ložiskem mechanismem cévních spazmů, který je obdobný jako u neúrazového subarachnoidálního krvácení, avšak spazmy málokdy dominují v klinickém obraze. Ischemický deficit při těchto cévních spazmech potencuje nepříznivý vývoj kontuzního poranění. Expanzivní chování kontuze nebo druhotné prokrvácení či sekundární expanze intracerebrálního hematomu mohou, podobně jako množství a velikost primárních kontuzí, zásadně ovlivnit stav a prognózu pacienta.

Tok draselných iontů do extracelulárního prostoru vede k cytotoxickému otoku astrocytů v důsledku jejich pufrčních funkcí při regulaci iontové homeostázy. Tento patofyziologický proces se považuje za příčinu potraumatického zvýšení nitrolebního tlaku (intrakraniální tlak, ICP) (*Ragaisis, 2002*). Přítomnost primární nebo sekundárně vzniklé ischemie u ložiskového poranění je dále spojená s vysokou koncentrací glutamátu v mikrodialyzátu extracelulární tekutiny.

Sekundární poškození mozku po krátkodobé ischemii v experimentu dávají někteří autoři do příčinné souvislosti s aktivací biochemických kaskád vedoucích k buněčné dysfunkci. U pokusných zvířat byl magnetickou rezonancí a imunohistochemicky vyšetřen edém mozku po krátkodobé ischemii. V intervalu do 21 hodin po ischemickém inzultu bylo pozorováno zduření astroglie (se silnou GFAP imunoreaktivitou), zatímco neurony podléhaly apoptóze (*Rumpel et al., 1997*).



### **1.1.2.2. DIFUZNÍ PORANĚNÍ MOZKU.**

Difuzní axonální poranění podle biomechanických studií závisí na míře akceleračních a deceleračních mechanismů. Setrvačné síly při nárazu poškozují jak axony, tak i drobné cévy. U těžkých typů axonálního poranění dochází k disrupci axonů a k přetržení cév v mozkovém kmeni a v corpus calosum. V následujících šesti hodinách se retrahuje axolema, mezi 12 až 24 hodinami dochází ke zduření axonů, ke vzniku Kajalových retrakčních měchýřků. Po několika dnech dochází k invazi mikroglie a po týdnech ke vzniku gliózy. V průběhu měsíců podléhají přerušená vlákna Wallerově degeneraci. Ještě před strukturním porušením axolemy vznikne dezintegrace cytoskeletu. Při napnutí axolemy se zvýší její propustnost pro kalcium. Influx kalcia aktivuje proteázy, které dezintegrují strukturu neurofilament. Primární postižení cytoskeletu je způsobeno i poruchou fosforylace neurofilament (*Fitzpatrick et al., 1996, Fitzpatrick et al., 1998*). V experimentálním modelu dynamické deformace mozkové kůry trvající 25 milisekund bylo u 12 pokusných zvířat pozorováno poškození axonů. Poškození bylo prokázáno pozitivitou protilátek proti neurofilamentům v podkorové bílé hmotě v místě kontuze. V protiléhle hemisféře nebo ve vzdálených oblastech nebyly pozorovány známky poškození axonů (*Shreiber et al., 1999*).

Mezi častou příčinu DAI patří dopravní nehody. Někteří autoři pozorovali, že DAI se velmi často kombinuje s kontuzemi mozku (*Jing et al., 2001*).

### **1.1.2.3. PATOFYZIOLOGIE DIFUZNÍHO AXONÁLNÍHO PORANĚNÍ.**

V okamžiku nárazu hlavy na pevnou překážku dochází u nejtěžších případů k okamžitému mechanickému přerušení axonů (primární axotomie). U lehkých a středně těžkých úrazů mozku existuje tzv. sekundární axotomie; Axolema je fragmentována, roztržené axony vylučují axoplazmu ve formě retrakčních kuliček. Při ložiskové poruše axoplazmatického proudění vzniká fokální zduření v důsledku abnormálního nahromadění

axoplazmatických organel (mezi 6 - 12 hodinami po úraze). Rektrakční kuličky se tvoří nejčastěji mezi 24 - 72 hodinami. Při nekontrolovatelném průniku vápníku do poraněných nervových vláken dochází k aktivaci kalcium dependentních enzymů, zejména kalpainů, které štěpí mikrotubuly a neurofilamenta. V nervových vláknech dochází ke zduření mitochondrií, nadbytek kalcia aktivuje i membránové fosfolipázy. *Gennarely et al.* popsal čtyři stupně poškození v závislosti na natažení axonů. V prvním stupni při deformaci axonů do 5 % jeho délky vzniká přechodná depolarizace membrány. Důsledkem je selhání tvorby a šíření akčních potenciálů. V druhém stupni je reverzibilní poškození cytoskeletu, axon se deformuje až do 10 % jeho délky, iontové poruchy jsou provázeny vstupem tekutiny do buňky, axon zduří, dochází k varikozitám, přítomny jsou i puchýřky na membránách v Ranvierových zářezích. Ve třetím stupni při deformaci axonů do 20 % dochází k proteolýze a shlukování neurofilament a mikrotubulů, tvoří se axonální retrakční kuličky v místě přerušeno axonálního transportu. Ve čtvrtém stupni již dochází k přetržení (axotomii) nervového vlákna. Ve studii u pacientů, kteří zemřeli v důsledku DAI, bylo vyšetřeno corpus callosum (*McCracken et al., 1999*). Western blot prokázal významnou redukci v hladinách tripletu neurofilament, nebyly však zjištěny žádné změny beta-tubulinu nebo změny MAP (s mikrotubuly asociované proteiny).

#### 1.1.2.3.1 **CYTOSKELET A JEHO VÝZNAM PŘI PATOFYZIOLOGICKÝCH DĚJÍCH U DIFUZNÍHO A LOŽISKOVÉHO PORANĚNÍ MOZKU.**

Významná oblast buňky je submembránová oblast, kde se odehrávají základní pochody vzniku a přenosu signálů. Nachází se zde i řada proteinů, které interagují s cytoskeletem. Intracelulární proteiny (ezrin, radixin, moezin) váží přes C-terminální doménu mikrofilamenta a na opačné doméně váží transmembránové glykoproteiny. Specializovaná místa adheze (fokální kontakty) obsahují integriny, které interagují s proteiny asociované s mikrofilamenty (talin, vinkulin, aktinin a filamin). Dále obsahují kinázy a další molekuly. Navázáním ligandů na integriny dochází k jejich

shlukování a k připojení mikrofilament ve formě svazků stresových vláken. V mezibuněčných spojích jsou transmembránové receptory - kadheriny, které se váží na aktinová filamenta přes zakotvovací proteiny a přes proteiny asociované s mikrofilamenty. Aktivace cyklin-dependentní kinázy (CDC 42) vede k odlišné aktivaci proteinů regulujících polymeraci aktinu a tvorbu svazků mikrofilament. Mikrotubuly, jako další součást cytoskeletu, umožňují přenos signálů vznikajících na receptorech do nitra buňky. Mikrotubuly prostupují cytoplazmu od jádra k plazmatické membráně a jsou spojeny s organizačním centrem mikrotubulů (MTOC). V buňkách je dynamická nestabilita mikrotubulů regulována proteiny asociovanými s mikrotubuly. Motorem mikrotubulů je dynein; dynaktin je komplex proteinů vážících se na mikrotubulární motor dynein. Podél stabilních mikrotubulů jsou lokalizována vimentinová filamenta. Tubulínové komplexy jsou klíčové proteiny pro nukleaci mikrotubulů (*Geddes et al., 1999*). Mezi další základní stavební proteiny cytoskeletu patří střední filamenta tj. keratiny, desmin, vimentin, GFAP, neurofilamenta o nízké molekulové hmotnosti - 62 kDa, střední - 102 kDa a vysoké hmotnosti - 130 kDa. GFAP je protein gliových buněk. Vimentin je obsažen v mezenchymálních buňkách a je rovněž exprimován v astroglii. Neurofilamenta tvoří v myelinizovaných axonech tzv. triplet.

## **1.2. EXPANZNÍ PROCESY - EXPANZNÍ KONTUZE A MALIGNÍ ZVÝŠENÍ NITROLEBNÍHO TLAKU PŘI EDÉMU MOZKU**

### **1.2.1. POTRAUMATICKÝ MOZKOVÝ EDÉM U EXPANZNÍCH PROCESŮ**

Mechanické trauma mozku a cévního endotelu naruší integritu hematoencefalické bariéry. Přitom dochází k extravazaci tekutiny a plazmatických proteinů do extracelulárního prostoru zejména v bílé hmotě mozku a tento proces se označuje jako vazogenní edém. Příčina porušení hematoencefalické bariéry není pouze mechanická, ale na zvýšení cévní propustnosti se podílejí též látky uvolněné z poškozené mozkové tkáně

(kyselina arachidonová, histamin, bradykinin a volné radikály). Na tvorbě edému se rovněž podílejí membránové kanály tzv. malé homotetramerní aquaporiny. Vazogenní edém dosahuje maxima 48 - 72 hodin po úraze, může způsobit výrazné zvýšení nitrolebečního tlaku, a na CT se jeví jako hypodenzní oblast. Na tomto typu edému se podílí také kolagenáza mechanismem štěpení bazální membrány kapilár. Při zhoršeném mozkovém krevním průtoku, zejména při ischemii se v šedé hmotě mozkové projeví edém cytotoxický. Při tomto typu edému proniká do intracelulárního prostoru voda společně se sodnými ionty. Edém se vyvíjí již během prvních hodin po úraze. Tok draselných iontů do extracelulárního prostoru vede k cytotoxickému otoku astrocytů v důsledku jejich pufrční funkce při regulaci iontové homeostázy. Tento proces se obvykle uvádí jako příčina potraumatického nárůstu ICP (*Ragaisis, 2002*).

Při poranění hypotalamu a mozkového kmene v místě vazoregulačních center dochází k vazoparalýze s následným zvýšením mozkového krevního průtoku, což se projeví zvýšením nitrolebečního tlaku a označuje se jako mozková hyperemie. Nakonec dojde při dekompenzaci ke snížení mozkového perfúzního tlaku a k mozkové ischemii. Zvýšený nitrolebeční tlak v důsledku edému hraje významnou roli v sekundárním poškození mozku. Hodnoty nitrolebečního tlaku vyšší než 20 torrů se všeobecně považují za patologické.

Otevření BBB se uskutečňuje ve dvou vlnách (bifázické), je spojené s vytvářením vazogenního edému. Primární otevření souvisí s reaktivní hyperemií. Sekundární druhotné otevření BBB je způsobené mechanismem ischemického poškození bariéry (*Klatzo, 1987*). Mozkový edém (*Unterberg et al., 2004*), který způsobí expanzi objemu mozku, je zásadní činitel, který má vliv na morbiditu a mortalitu u pacientů s poraněním hlavy v důsledku zvýšeného nitrolebního tlaku (ICP). Ve studiích (*Aarabi et al., 2006*) bylo prokázáno, že dekompresivní kraniektomie má pozitivní vliv na přežití; pomocí kraniektomie se podařilo snížit ICP na méně než 20 mm Hg u 85 % pacientů.

### 1.2.2. **PATOFYZIOLOGIE ISCHEMICKÉHO EDÉMU**

Histochemické studie a fyzikální měření detegovaly vzestup tkáňové vody již za 5 minut po arteriální okluzi. Maximum tohoto vzestupu bylo prokázáno za 3 až 4 dny, kdy je akumulace vody intracelulární, vzniká vakuolizace, zduření astroglie a zblednutí myelinu. Neurony zduřují hlavně v terminálních presynaptických částech. V bílé hmotě je patrné zvětšení objemu v axoplasmě. Příliv tekutiny do vnitřního prostředí neuropylu vyvolává změny v iontové rovnováze. Je narušená i funkce astrocytů, které ztrácejí izolační schopnost v okolí synapsí.

### 1.2.3. **POSTISCHEMICKÁ PERIFOKÁLNÍ HYPEREMIE**

Na změnu acidobazické rovnováhy v mozkovém parenchymu při ischemii reagují drobné arterioly uvolněním svalového tonu. Obnoví se krevní průtok. Impulzem k neregulované vazodilataci může být kromě ischemie také mechanické poškození úrazem (komoce, kontuze) nebo poškození toxické. Vztahy mezi mozkovým krevním objemem a rychlostí průtoku lze dobře pozorovat u generalizovaných mozkových vazodilatací, které jsou známy převážně z traumatické etiologie. V makroskopickém obraze se stav krevní hypervolemie označuje jako turgescence. Při generalizovaných vazodilatacích někteří autoři sledovali vztah mezi arteriovenózním cirkulačním časem a procentem přežití mozkových traumat. Při hodnotách arteriovenózního cirkulačního času více než 8,0 sekund všichni postižení umírali. Šlo o stavy celkové vaskulární mozkové paralýzy, které na CT obraze imponovaly jako mozková turgescence.

### 1.2.4. **EXPANZNÍ LOŽISKOVÁ PORANĚNÍ MOZKU**

U skupiny 740 pacientů byly analyzovány závažné kontuze mozku a expanzní chování kontuzních ložisek. U 31,8 % pacientů byly kontuze umístěny při pólu a na spodině frontálních nebo temporálních laloků. Pouze u 2,5 % pacientů byly kontuze na konvexitě hemisfér spojené s kontuzemi v subkortikální bílé hmotě (*Bykovnikov, 1985*).

V jiném experimentu byl analyzován model řízené deformace mozkové kůry u zvířat, kde byla provedena kraniektomie před deformací, za účelem ověřit hypotézu, kdy má být použita dekompresivní kraniektomie u pacientů s narůstajícím nitromozkovým tlakem (Zweckberger et al., 2003). U kontrolní skupiny zvířat autoři uzavřeli otvor po kraniotomii bezprostředně po řízeném poranění mozkové kůry a u druhé skupiny byla kraniektomie ponechána. U kontrolní skupiny se hodnoty ICP zvýšily 6 hodin po operaci na 23,7 mmHg ( $p < 0,001$ ), zatímco u kraniotomií nebyl pozorován žádný vzestup ICP. 24 hodin po traumatu byly zjištěny největší objemy expanzních ložisek. U kraniotomovaných zvířat byl objem kontuzních ložisek o 40 % menší v porovnání s kontrolní skupinou ( $18,3 \pm 2,0$  vs.  $30,2 \pm 3,5$  mmHg,  $p < 0,04$ ). Tato pozorování potvrzují, že kraniektomie ovlivní významně poúrazové zvýšení ICP, redukuje sekundární poškození mozku a zlepšuje funkční uzdravení po experimentálním poranění mozku.

Autoři (Plesnila et al., 2003), kteří analyzovali data získaná měřeními regionálního mozkového průtoku (rCBF) u zvířat po poranění mozku, zjistili, že v prvních 24 hodinách po poranění se objem kontuzního ložiska zvětšil na 140 % oproti iniciálnímu objemu. Výrazná hypoperfuze poraněného ložiska (až na 30 % bazální perfuze mozku) byla pozorovaná již do 1 hodiny po poranění. Ve tkáni v okolí kontuze se mozkový průtok pomalu normalizoval na 80 % bazálních hodnot. Hypoperfuze v prvních hodinách po poranění se může významným způsobem podílet na expanzním nárůstu objemu kontuzního ložiska. V nových experimentálních studiích bylo prokázáno, že snížení centrálního mozkového průtoku není příčinou sekundární expanze kontuzního ložiska. Zatímco objem kontuze se zvětšil z 24,9 na 35,5 mm<sup>3</sup> ( $p < 0,01$ ) do 24 hodin po úrazu, tak oblast ischemie s  $CBF < 10\%$  se zvětšila pouze minimálně z 22,3 na 25,1 mm<sup>3</sup> (Engel et al., 2008).

### **1.2.5. KLINICKÉ DŮSLEDKY ZVÝŠENÉHO NITROLEBNÍHO TLAKU**

Při nárůstu nitrolebního tlaku dochází k posunu a herniacím mozkové tkáně, vytvářejí se otlakové konusy. Temporální konus vzniká při zvýšeném tlaku v supratentoriálním prostoru tzv. tentoriální herniace. Trvá-li tlak déle nebo je-li expanze v zadní jámě lební, rozvíjí se okcipitální konus. Při tentoriální herniaci je mozek tlačěn do tentoriálního otvoru laterálně nebo centrálně. Laterální herniace, označovaná jako unkální nebo temporální konus (otlakový kužel) vzniká stlačením uncus gyri hippocampi pod tentorium cerebelli mezi okraj tentoria a mozkový kmen. Dochází ke kompresi a dislokaci mozkového kmene.

Při centrální herniaci dochází k posunu diencefala a mezencefala do tentoriálního otvoru. Přitom dochází jednak k přímému mechanickému poškození mozkové tkáně, kompresi mozkového kmene, jednak dochází k natažení a natržení malých perforujících cév. Vznikají drobné vícečetné hemoragie označované jako posunová krvácení, nebo infarkty v mozkovém kmeni.

## **1.3.PATOFYZIOLOGICKÉ REAKCE PŘI HYPOXII MOZKU U TRAUMAT**

### **1.3.1. FYZIOLOGIE MOZKOVÉHO KREVNIHO ZÁSOBNÍ A VÝZNAM POÚRAZOVÉ HYPOXIE PŘI SEKUNDÁRNÍM POŠKOZENÍ MOZKOVÉ TKÁNĚ.**

Mozek má značné nároky na oxidační a metabolickou dodávku živin; u dospělého člověka je krevní průtok mozem 50-60 ml/ 100 g tkáně/ minutu, což pro mozek jako celek činí asi 750 ml za minutu. Za klidových podmínek mozek konzumuje 65 % celkové tělesné spotřeby glukózy. Na mozkovém průtoku se podílí tzv. autoregulace, dále je zde chemicko-metabolická kontrola mozkového průtoku a neurogení kontrola mozkového průtoku. Významný vliv na krevní průtok mozem mají výchyly acidobazické rovnováhy mozkového intersticia. Hematocefalická bariéra chrání tkáň proti akutní zátěži kyselinami i zásadami. Mozkové cévní řečiště je značně senzitivní ke změnám parciálního tlaku oxidu

uhličitého (CO<sub>2</sub>), protože hematoencefalická bariéra je pro CO<sub>2</sub> volně prostupná. Akutní změny pH krve ovlivňují mozkový průtok jen velmi málo. Arteriální tenze kyslíku mozkový krevní průtok relativně neovlivňuje, četní autoři při poklesu parciálního tlaku kyslíku nepozorovali žádný efekt na mozkovou cirkulaci a to při poklesu tlaku kyslíku až na hodnoty 6,6 kPa; teprve pod těmito hodnotami nastává pokles cerebrovaskulární rezistence a zvyšuje se regionální průtok. Mozková tkáň je relativně dobře chráněná při snižování arteriálního tlaku kyslíku jeho zvýšenou extrakcí z krve, avšak při hodnotách parciálního tlaku kyslíku pod 3 kPa již dochází k poruše funkce neuronů. Většina autorů se přiklání k názoru, že samotná hladina kyslíku sama o sobě ovlivňuje mozkový průtok jen velmi málo, avšak metabolické důsledky hypoxemie jsou zodpovědné za změny mozkového průtoku. U pacientů s TBI byly prokázány mnohočetné epizody mozkové hypoxie v perifokální tkáni v okolí kontuze v prvních 5 dnech po poranění. Střední tlak kyslíku (PtiO<sub>2</sub>) v perikontuzní tkáni byl nižší než v okolní zdravé tkáni (19,7+/-2,1 mmHg v.s. 25,5+/-1,5 mmHg, p < 0,05) (Longhi et al., 2007).

Při tkáňové hypoxii stoupá koncentrace kyselého vodíkového iontu v perivaskulárním prostoru a v buňce hladkého svalu cévní stěny je zvýšeně produkován laktát. Tyto změny vyvolávají vazodilataci, která může přispívat v vazogennímu edému a dalšímu zhoršení difuzního kvocientu kyslíku ve tkáni.

Rovněž byla studována regionální ischemie u případů traumatického poškození mozku (Coles, 2004). Hypoxie a hypotenze jsou rizikové faktory rozvoje sekundárního poškození mozku po traumatu (Chi et al., 2006, Geeraerts et al., 2007). Nové přístupy umožnily získávat klinické údaje o stavu regionálního zásobení mozku kyslíkem, o tkáňových metabolitech metodou mikrodialýzy, o mozkovém průtoku (CBF) a extrakční frakci kyslíku.



### 1.3.2. **VLIV ISCHEMIE NA ENERGETICKÝ METABOLIZMUS**

Hypoxicko-ischemické poškození vede k selhání energetického metabolismu, které způsobí porušení iontové homeostázy a nahromadění neurotransmiterů v extracelulárním prostoru. Při poklesu parciálního tlaku kyslíku se inaktivuje O<sub>2</sub> - senzitivní draslíkový kanál, vzrůstá produkce laktátu a klesá pH tkáně. Při poklesu ATP selhávají ATP dependentní procesy. Nejdříve selhává Na-K-ATPáza, která udržuje intracelulární koncentraci draselných iontů 155 mmol/l a sodných iontů 12 mmol/l. Depolarizace membrány vede k otevření napětově závislých iontových kanálů a dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace sodných iontů a vápníku.

### 1.3.3. **VLIV ISCHEMIE NA METABOLISMUS VÁPNIKU A INICIACE APOPTÓZY.**

Energeticky náročný kompenzační mechanismus distribuce kalcia v buňce je porušen v případě mozkové ischemie. Patologický nárůst intracelulární koncentrace vápníku je považován za klíčový mechanismus vedoucí ke smrti buňky. Za fyziologických okolností je nadbytek kalcia v buňce kompenzován navázáním na intracelulární proteiny, zvýšeným transportem ven z buňky a přerozdělením do buněčných organel. Za příčiny poúrazové poruchy kalciové homeostázy jsou považovány kromě ischemie i další mechanismy jako vliv excitatorních aminů, zvýšení membránové permeability neuronů na základě mechanického poškození a porucha hematoencefalické bariéry mechanickým poškozením endotelu.

Excitotoxicita při ischemii zvyšuje intracelulární koncentraci iontů kalcia a zinku, které aktivují cytotoxické biochemické kaskády. Kalcium aktivuje kalcium-dependentní cysteinové proteázy tzv. kalpainy, které štěpí složky cytoskeletu; proteolýza aktivovaná kalciumem vede k dezintegraci cytoskeletu, zejména mikrotubulů. Endonukleáza může být aktivní při průniku velkého množství iontů kalcia intracelulárně a dochází tak ke štěpení DNA. Kalcium vázané na kalmodulin aktivuje kalmodulin-kinázu,

NO-syntázu, kalcium-dependentní proteinkinázu C, která modifikuje funkci iontových kanálů NMDA a AMPA. Aktivace kalcium dependentní fosfolipázy A2 se podílí na poškození buňky kyslíkovými radikály. Intercelulární kalcium ovlivňuje i interakci astrocyt-endotelie mechanismem intercelulární difuze kalcia skrze gap junction a tímto způsobem aktivuje inositoltrifosfát jakožto druhého posla (*Paemeleire, 2002*).

Kalcium rovněž aktivuje lipolýzu, která způsobí poruchu membránových funkcí za vzniku diacylglycerolů, fosfolipidů, aktivuje vznik volných mastných kyselin a destičkového aktivačního faktoru. Kalcium v dalším kroku aktivuje některé enzymatické systémy za vzniku volných radikálů. Nadbytek hydroxylových radikálů potom začíná oxidovat membrány v procesu lipidové peroxidace. Proteinová fosforylace je rovněž narušená a vede k aktivaci apoptózy. Souběžně s excitotoxicitou se iniciují pochody vedoucí k apoptóze. Mezi faktory spouštějící apoptozu při ischemii jsou řazeny cytokiny, zejména interleukin-1 a TNF-alfa. Poškození mitochondrií vede k aktivaci vnitřní kaskády apoptózy uvolněním pro-apoptotických faktorů. Volné kyslíkové radikály a aktivace membránové sfingomyelinázy vedou ke štěpení a uvolnění ceramidu, který atakuje mitochondriální membránu.

Axon a jeho synapse patří mezi další místa, kde se iniciují procesy apoptózy. Synapse obsahují četné organely a proteiny uplatňující se při apoptóze, zejména proteiny BCL-2 rodiny, protein p53 a kaspázy. Alterace axonálního transportu rovněž může spouštět apoptozu v okamžiku, kdy lehký řetězec dyneinu (DLC) váže protein BIM, který inaktivuje anti-apoptotický protein BCL-2, který je umístěn na membráně mitochondrií.

Aktivace glutamátových receptorů a průnik kalcia do buňky vede k apoptóze otevřením mitochondriálních pórů (MTP), dochází k otevření napětově závislého aniontového kanálu (VDAC) a následné uvolnění cytochromu C, který se stane součástí apoptozomu. Proteiny označované jako PSD (proteiny lokalizované v postsynatických densních oblastech) ovlivňují produkci oxidu dusnatého (molekuly NO). Produkce oxidu dusnatého (NO) v mozkové tkáni je regulována kalcium/kalmodulin-

dependentní NO syntetázou (nNOS), kterou regulují proteiny v postsynaptických denzních oblastech; zejména byly studovány proteiny PSD-93 a PSD-95 (*Brenman et al., 1996*).

U pacientů s traumatem mozku byly v synaptických zakončeních pozorovány rozšířené synaptické váčky, deplece váček, velké množství axoplazmatických granulárních substancí a zduření pre- a post-synaptických struktur. V synaptických zakončeních byly rovněž zjištěny lipidové inkluze, glykogenové partikule a místy bylo pozorováno vymizení postsynaptických denzních oblastí (*Castejon et al., 1995*).

#### 1.3.4. VLIV ISCHEMIE NA STRUKTURNÍ ZMĚNY NEURONU A GLIE

Mozek kryje své energetické potřeby prakticky pouze oxidační glykolýzou. Snížení běžného mozkového průtoku pod 50 % se obvykle neprojevuje žádným deficitem funkce. Teprve při poklesu mozkového průtoku k hodnotám 20 ml/ 100 g tkáně/ minutu klesá funkční aktivita neuronů a oplošťuje se EEG křivka. Tato situace je patofyziologickým podkladem nepozornosti, závratí a mdlob. Při hodnotách mozkového průtoku pod 20 ml/ 100 g tkáně/ minutu po delší dobu již dochází k dlouhodobé depolarizaci buněčné membrány se ztrátou funkce. Depolarizovaná buněčná membrána tak ztratila informační funkci a nachází se ve stavu tzv. ischemického polostínu (ischemic penumbra). Při ztrátě membránového potenciálu v prvních minutách ischemie se snižuje počet synaptických vezikul, které současně zduří. Zvětšení objemu dendritických zakončení přispívá k přerušení neurotransmise. Při poklesu mozkového průtoku pod hodnoty 10 ml/ 100 g tkáně/ minutu dochází po několika minutách ke strukturálním změnám mozkových buněk. Nejcitlivější je neuron, po jeho poškození nastává rozvrat v buňce oligodendroglie, poté v mikroglia a posléze i v buňce cévního endotelu. V pásmu průtoku mezi 20 až 10 ml/ 100 g tkáně/ minutu již stoupá hladina intersticiálního laktátu, klesá hladina kreatin fosfátu, avšak může být ještě zachována hladina ATP i funkce iontové pumpy. Při poklesu průtoku pod 10 ml/ 100 g tkáně/ minutu dochází k selhání ATP pumpy,

kteřé je doprovázeno únikem draselných iontů do intersticia a pohybem sodných iontů do buněk.

### 1.3.5. STRUKTURÁLNÍ ZMĚNY NEURONU A GLIE V POŠKOZENÉM LOŽISKU

Prvotní strukturální změnou v ischemickém ložisku je zduření mitochondrií, rozpadá se mitochondriální matrix společně s tvorbou mikrovakuol. Inhibice proteosyntézy znamená rozvrat integrity neuronů. Dochází ke shlukování ribozomů. Během první hodiny zduří Golgiho komplex a endoplazmatické retikulum s pyknózou a inkrustacemi podél buněčného povrchu. Po více hodinách dochází ke zduření lysozomu a k ruptuře buněčné membrány. Pseudopodie astrocytů nasávají vodu a jejich objem se zvětší až na trojnásobek. Nastává hydrolyza jejich bílkovinných filament. Extracelulární prostor získává expanzivní charakter při zvětšení těl astroglie. Astrocyty reagují na poranění produkcí některých komponent cytoskeletu (*Baldwin and Scheff, 1996*). V experimentálním modelu na krysách byla u 344 zvířat pozorována exprese GFAP a vimentinu v astrocytech do 2 dnů po kontrolovaném nárazu se vznikem kontuze mozku. Kromě imunohistochemických změn dochází k ultrastrukturálním změnám gliových a gangliových buněk jako reakce na trauma mozku (*Castejon, 1998*). Při vyšetření 9 pacientů s kraniocerebrálním poraněním komplikovaným subdurálním nebo epidurálním krevním výronem byly při analýzách elektronogramů pozorovány známky mozkového edému, zvýšený vakuolární a vezikulární transport v cytoplazmě endotelií a zduření astrogliálních perivaskulárních výběžků. V gangliových pyramidových a nepyramidových neuronech byla pozorována dilatace endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu. V oligodendrocytech byly zjištěny známky myelinolýzy a byly nacházeny fagocytující astrogliální buňky (*Wollmann et al., 1981*). Po poranění mozku byly pozorovány fragmentace a nebo dilatace *cis-* a *trans-*nakupených cisteren Golgiho aparátu (*Castejon, 1999b*). V experimentálním modelu reperfuze poškození u zvířat bylo zjištěno,

že došlo ke změnám kapilár, zvýšil se počet mikrokřků, došlo ke zduření endotelií a zduření astrogliálních výběžků (*Okumura et al., 1994*). V souboru 22 pacientů s poraněním mozku byly analyzovány rovněž subtypy astrocytů, reagující na poranění změnou glykogenových partikulí, změnami denzity a objemu cytoplazmy (*Castejon, 1999a*). Poranění postihovalo rovněž morfologii mitochondrií (*Castejon and de Castejon, 2004*).

## **1.4. HEMATO-ENCEFALICKÁ BARIÉRA MOZKU**

### **1.4.1. STRUKTURA A FUNKCE HEMATO-ENCEFALICKÉ BARIÉRY**

Hematoencefalická bariéra se skládá z bazální membrány kapilár, astrogliálních perivaskulárních pochev, které se spoluúčastní na selektivě cerebrovaskulárního transportu a další anatomickou složkou hematoencefalické bariéry je cévní endotel. Transport látek v mozkové tkáni přes endotelovou membránu je jednak mechanický - jako transport transcelulární, tj. pinocytózou nebo filtrací a difuzí a druhou variantou je transport paracelulární, přes spojení sousedících plošek endotelií, které se nazývají zonule okludens. Transport enzymatický - na principu enzymatické bariéry je založen na výbavě endotelií. Stěny mozkových cév mají vysokou aktivitu v degradaci monoaminů. Kyselina gama-aminomáselná neprochází hematoencefalickou bariérou pro vysokou aktivitu GABA transaminázy. Na izolovaných endoteliích byla pozorována vysoká aktivita enzymu gama-glutamyltranspeptidázy a alkalické fosfatázy. Mayer a spolupracovníci pozorovali, že aktivita těchto enzymů (gama-glutamyltranspeptidázy a alkalické fosfatázy) se snížila v okamžiku, kdy vzrostl index proliferace izolovaných endotelialních buněk, avšak aktivita ACE (angiotenzin konvertujícího enzymu) byla zachovaná (*Meyer et al., 1990*).

#### 1.4.2. POŠKOZENÍ HEMATO-ENCEFALICKÉ BARIÉRY

Mikrovaskulární poškození při hypoxii se rozvíjí v několika stupních. Dochází k disrupci bariéry a poškození endotelií, které vede k vazospazmům a nastartování adheze destiček a leukocytů prostřednictvím exprese adhezních molekul, zejména ICAM-1. Zánětlivé faktory produkované buňkami BBB ovlivňují permeabilitu bariéry a ovlivňují expresi adhezních molekul. Migrace leukocytů bariérou je významně ovlivněna produkcí cytokinů (*Persidsky, 1999*). Aktivace MMP-2 a MMP-9 vede ke štěpení kolagenu typu IV v bazální membráně hematoencefalické bariéry. Edém může v konečném důsledku vést až k sekundární ischemii.

V experimentu byly pozorovány změny molekulární struktury arterioli mozkové kůry. Při ischemii byly postiženy všechny složky arterioli; endotelový glykokalyx, junkční molekuly okludin, PECAM-1 a vinculin. Narušeny byly i molekuly bazální laminy jako kolagen typu IV, laminin a glykan heparansulfát (*Mazzetti et al., 2004*). Mikrovaskulární poškození bylo zdokumentováno v experimentu s traumatickým subarachnoidálním krvácením u krys, kde bylo poškození bazální laminy prokázáno degradací kolagenu IV a extravazací albuminu do tkáně (*Scholler et al., 2007*). Otevření BBB v místě krvácení začalo 6 hodin po poranění a maximum změn bylo pozorováno po 48 hodinách. Poškození bazální laminy významně korelovalo s dysfunkcí BBB ( $r=-0,63$ ;  $p=0,0001$ ).

V několika studiích byl prokázán vztah mezi endoteliemi, pericyty a astroglialními výběžky jako složkami hematoencefalické bariéry. Hypoxie v monovrstvě endotelových buněk vedla k disrupci BBB, oproti tomu dvojí vrstva endotelií a pericytů si i za hypoxických podmínek udržela těsné spojení za minimální dysfunkce BBB (*Hayashi et al., 2004*). Anatomickou celistvost a fyziologickou funkci bariéry narušují nejen fyzikální, ale i chemické vlivy. Poškození bariéry nastává zvýšením pinocytotického transportu přes endotelovou buňku a otevřením interendotelových junkcí. Na stržení bariéry při mozkové ischemii se uplatňují tři patofyziologické mechanismy. Dochází k extravazaci sérových proteinů, k abnormální

pasáži farmakologicky aktivních substancí, které mění reaktivitu buněk cévní svaloviny (biogenní aminy). Je narušena extrakce tkáňových metabolitů a toxických produktů zpět do cévního řečiště. V současnosti se předpokládá, že vymizení bílkoviny po stržení BBB zajišťují hlavně pericyty digescí (*Kalvach and Gregova, 2005*).

S narušením transportu kyseliny mléčné ze tkáně do cévního řečiště vzrůstá acidóza a osmolalita intersticia. V časném stádiu se již po první hodině pozoruje únik mikromolekulárních substancí, za 5-15 hodin unikají proteiny a vrchol abnormální pasáže noradrenalinu, serotoninu a dopaminu byl pozorován za 72 hodin. Časový sled stržení hematoencefalické bariéry se uplatňuje dvěma hlavními mechanismy. Nejprve vnikne zvýšený intraluminální tlak do paralyzovaných cév (efekt hemodynamický), později změněné fyzikální a chemické vztahy vedou k nové vlně extravazace. Významnou roli při stržení (shutt down) bariéry hraje aktivace fosfolipázy, vzestup intracelulárního kalcia, účinek volných radikálů a metabolitů kyseliny arachidonové (prostaglandiny a leukotrieny).

Otevření BBB bylo pozorováno ve dvou vlnách (bifázické) a bylo spojené s vytvářením vasogenního edému. Primární otevření se dává do vztahu s reaktivní hyperemií. Sekundární otevření BBB je způsobené mechanismem ischemického sekundárního poškození (*Klatzo, 1987*).

Poškození astrocytů v experimentu způsobilo propouštění BBB pro proteiny po 24 hodinách, petechiální hemorhagie byly pozorované po 48-72 hodinách. Reparace bariéry a obnovení funkce bariéry byla pozorovaná po 6 dnech (*Willis et al., 2004*). Vaz a spolupracovníci, kteří studovali vzorky mozkové tkáně u operovaných pacientů z důvodu kontuze mozku (n=11), prokázali v endoteliích intracelulární edém. Těsná spojení mezi endoteliálními buňkami zůstala intaktní. Na abluminální straně byla vysoká pinocytotická aktivita a astrogliální výběžky byly zduřelé (*Vaz et al., 1997*).

Endoteliální dysfunkce postižením endotelu vede ke zvýšení propustnosti cévní stěny a posunutí rovnováhy mezi vazoaktivními

mechanizmy i hemokoagulačními působky. Důležitým momentem pro uvolnění cytokinů a růstových faktorů je aktivace endotelií, zejména jejich membrány. Aktivovaný endotel uvolňuje látky umožňující prostup leukocytů do subendoteliálních vrstev a ulpívání trombocytů na cévní stěně. Prvním krokem aktivace endotelu je uvolnění selektinu-P, L, E. Selektiny na povrchu endotelie podporují ulpívání a nabalování leukocytů a trombocytů. Tento proces je kontrolován interleukinem-1 a TNF alpha. V dalším kroku endotelie produkují chemoatraktanty, které aktivují cestou G-proteinu integriny na povrchu leukocytu. Integriny se váží s bílkovinou VCAM a bílkovinou ICAM na membráně endotelie a umožní průnik leukocytu do subendoteliálních vrstev. Rovněž syntéza a umístění integrinů na endoteliální membráně je pod kontrolou cytokinů.

Mikrovaskulární poškození při systémovém zánětu (SIRS) se často rozvíjí u polytraumatizovaných, šokovaných pacientů. Syndrom systémové zánětlivé odpovědi je provázen aktivací makrofágů a neutrofilů, systémovým uvolněním mediátorů a jejich interakcí s endotelem. Je narušena hemodynamika, dochází k vazodilataci, kardiodepresi, nastávají mikrocirkulační poruchy (poškození endotelu, mikroembolizace, edémy tkání a maldistribuce průtoku). Z těchto důvodů dochází ke zhoršenému využití kyslíku. Tento řetěz změn vede k buněčné hypoxii a následně k orgánové dysfunkci. Selhání mikrocirkulace je klíčovým momentem rozvoje SIRS. Ucpávání (plugging) kapilár je zapříčiněno mikrotrombotizací a sekvestrací krevních elementů. V experimentu bylo potvrzeno, že zvířata s genetickým defektem genu pro P-selektin měli významně menší objem ložiska infarktu ( $p < 0,05$ ) mozkové tkáně při experimentální ischemii a reperfuzi. U zvířat s expresí P-selektinu na endoteliích byl vyšší influx neutrofilních leukocytů, ucpávání kapilár a nižší mozkový průtok (rCBF); průtok byl měřen Dopplerem (*Connolly et al., 1997*).

Na zhoršeném průtoku se podílí i edém endoteliálních buněk. Mikrovaskulární selhání způsobuje hypoxické poškození jednotlivých tkání, to je zároveň jedním z momentů, které udržují systémový zánět v chodu.



## **1.5.PATOFYZIOLOGICKÉ REAKCE ASTROGLIE PŘI PORANĚNÍ MOZKU**

### **1.5.1. ÚLOHA GLIE V ENERGETICKÉM METABOLIZMU PŘI ISCHEMII.**

Gliové buňky jsou různorodé elementy; patří sem astrocyty, oligodendrocyty a mikroglie. Existují dva typy astrocytů, typ I., označovaný jako fibrilární astrocyt nacházející se v bílé hmotě, a typ II., protoplazmatický astrocyt v šedé hmotě mozku. Oba typy se specificky značí pomocí GFAP a nespecificky vimentinem. Gliové buňky mají významnou podpůrnou úlohu, vytvářejí gliální síť složené z jemných výběžků, zajišťují iontovou a objemovou homeostázu a plní funkce hematoencefalické bariéry.

Metabolické potřeby mozku jsou zajišťovány oxidací glukózy, která difunduje přes hematoencefalickou bariéru. Specifický glukózový transportní mechanismus se zvyšuje při stoupajících metabolických nárocích. Vybavení glie transportními proteiny pro glukózu

a monokarboxylové kyseliny (GLUT, MCT) na membránách je důležité pro energetický metabolismus; MCT transportéry zajišťují přenos laktátu a ketolátek (acetoacetátu, hydroxybutyrátu).

Na poranění reagují astrocyty rozdílně, jak bylo popsáno ve studii u pacientů (n=22) s ložiskovým poraněním mozku. Castejon prezentuje rozdílné reakce astrocytů na poranění; ultrastrukturálně popsal změny v obsahu glykogenových partikulí v astrocytech, změny denzity typu - světlé a tmavé astrocyty, změněný byl i obsah lipofuscinu v astrocytech a byly pozorovány i objemné, hypertrofické astrocyty (*Castejon, 1999a*). Byla formulována tzv. Hamprechtova-Dringenova hypotéza o podílu astroglie v glukoneogenezi v centrálním nervovém systému (*Wiesinger et al., 1997*). Astrocyt může velmi rychle změnit fenotyp na konzumpci nebo produkci laktátu. Ultrastrukturální pozorování tuto hypotézu podporují; různé typy astrocytů s deplecí nebo akumulací glykogenových partikulí byly popsány u pacientů s ložiskovým poraněním mozku (*Dringen and Hamprecht, 1993, Dringen et al., 1993*).

### 1.5.2. INTERAKCE MEZI NEURONY A ASTROGLIÍ.

Astrocyty mohou metabolizovat glukózu a pyruvát, ale také mastné kyseliny a glutamát. Aktivní transport spotřebovává nejvíce energie pro znovuoobnovení iontových gradientů. Enzym natrium - kalium - ATPáza (Na/K-ATPáza) je přítomen i v gliových buňkách. Transportní mechanismy energeticky závislé na ATP jsou v gliových buňkách využívány k přečerpání draselných iontů z gliových buněk do neuronů. Důležitou roli pro pokrytí metabolických nároků hraje i glykogen.

Metabolismus glykogenu je odlišný v gliích a neuronech. Při nízké hladině glykémie zajišťuje astroglie svou glykogenolýzou tvorbu glukóza-6-fosfátu a tvorbu laktátu, který je transportován mezi astroglíí a neuronem (astrocytární - neuronový - laktátový člunek). Údaje získané in vitro potvrzují, že laktát z astroglie je inkorporován do neurotransmiterů glutamátu a GABA v kultuře neuronů.

V neuronech unikají metabolity z TCA cyklu, které slouží k syntéze glutamátu, GABA a acetyl-koenzymu A, který je prekurzorem acetylcholinu. Astrocyty hrají významnou roli v doplňování intermediálních metabolitů. Karboxylace pyruvátu na oxalacetát má zásadní význam pro syntézu intermediálních produktů Krebsova cyklu a jeho derivátů glutamátu a kyseliny GABA. Oxalacetát je transportován do cytoplazmy neuronů, kde je přeměněn na malát enzymem malát dehydrogenázou. Malát je transportován do mitochondrií, malát-ketoglutarátovým nosičem činností tzv. malát-aspartátového člunku a doplňuje tak metabolity v TCA cyklu. Mitochondrie v astroglíích obsahují vysoce aktivní enzym ketoglutarátdehydrogenázu. Metabolismus astrocytů je zapojen do metabolismu neurotransmiterů na synapsích. Glutamát uvolňovaný do synaptické štěrbiny je vychytáván astrocyty (glutamátovými transportéry) a konvertován na glutamin pomocí enzymu glutaminsyntetázy. GABA je vychytávána do TCA cyklu a ketoglutarát je glutamát dehydrogenázou nebo aspartát aminotransferázou přeměněn na glutamát. Glutamin je postupně transportován do neuronů. Tyto reakce se označují jako GABA-glutamát-glutaminový cyklus.

### 1.5.3. VÝZNAM MEMBRÁNOVÝCH KANÁLŮ A RECEPTORŮ GLIOVÝCH BUNĚK PŘI TRAUMATU.

Gliové buňky mají napěťově nezávislé draselné kanály a řadu napěťově závislých kanálů. Gliové buňky mají negativní klidový membránový potenciál -90 mV (milivoltů). Funkce iontových kanálů gliových buněk spočívá v kontrole extracelulární koncentrace draselných iontů pomocí prostorového pufrčního mechanismu. Pufrční mechanismus je založen na napěťově závislých draslíkových kanálech rozmístěných podél astroglie. Za membránovou vodivost astrocytů jsou zodpovědné především draslíkové kanály. Vápníkové proudy jsou řízeny napěťově závislými kalciovými kanály u astrocytů. Vstup kalcia do buňky vede ke zvýšení koncentrace intracelulárního kalcia, které ovlivňuje druhé posly. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-kotransportér, který se uplatňuje v regulaci buněčného objemu při laktátové acidóze je aktivovaný kalciovými ionty. V experimentu docházelo k otoku buněk v přítomnosti extracelulárního kalcia, avšak nedocházelo k otoku v mediu bez volného kalcia (*Ringel et al., 2006*).

Astrocyty mají receptory aktivované ligandem, nejčastěji glutamátové receptory, které ovlivňují propustnost pro sodné a draselné ionty. Aktivované kanály pomocí GABA ovlivňují u astrocytů propustnost chloridů. V experimentu bylo prokázáno, že při TBI dochází ke snížené expresy glutamátových receptorů na membránách astrocytů. Počet GFAP-positivních astrocytů se zvyšuje, avšak redukuje se významně počet astrocytů pozitivních na EAAT1 or EAAT2 receptory; v této souvislosti autoři vysvětlují skutečnost, že pokles vychytávání glutamátu vlivem EAAT je zodpovědný za zvýšení extracelulárního glutamátu (*van Landeghem et al., 2006*).

### 1.5.4. NEUROIMUNOLOGICKÉ VZTAHY ASTROGLIE.

Možnosti reakce na poranění má v centrálním nervovém systému nejenom mikroglie, ale v omezeném množství i astroglie. Dochází k proliferaci astroglie, ke zvýšené produkci intermediálních filament

a formování gliové jizvy. Iniclace gliózy se může odehrávat i při zánětlivé reakci, která je spuštěná přítomností interleukinu-1, který je běžně produkován makrofágy. Mikroglíí produkováný interleukin-1 vede také k proliferaci astrocytů. Naopak řada stimulačních faktorů vede k proliferaci mikroglie a tyto stimulační faktory jsou produkovány astrocyty. Působením interleukinu-1, interferonu nebo TNF alfa se spouští v astrocytech produkce molekuly NO. Interleukin-1 dále navozuje produkci interleukinu-6 v astrocytech.

#### 1.5.5. ÚLOHA ASTROGLIE V IONTOVÉ HOMEOSTÁZE.

Úlohou astroglie je prostorový pufrací mechanismus draselných iontů zajišťující homeostázu draselných iontů v extracelulární tekutině pomocí Na/K ATP pumpy. Přesun KCl je založený na chloridových kanálech, které se otevírají při depolarizaci astroglie. Transport iontů je provázen i přesunem vody, což vede ke zvětšení objemu gliových buněk. Ukazuje se, že gliové buňky velmi efektivně pufrují alkalické změny v extracelulárním prostoru. V neuronech převládá tok vodíkových iontů dovnitř buňky, zatímco u gliových buněk vodíkové ionty proudí ven z buňky. Na pufracích mechanismech astroglie se uplatňuje i enzym karbonátanhydráza.

#### 1.5.6. REAKCE ASTROGLIE PŘI PORANĚNÍ MOZKU

Strukturální změny v kontuzním ložisku postihují zejména pseudopodie astrocytů, které nasávají vodu a jejich objem se zvětší až na trojnásobek. Nastává hydrolýza jejich bílkovinných filament (GFAP). V experimentálním zvířecím modelu s kontuzemi mozku při kontrolovaném nárazu byla u 344 pokusných zvířat pozorována exprese GFAP a vimentinu v astrocytech do 2 dnů po poranění (*Baldwin and Scheff, 1996*). V experimentálním modelu dynamické deformace mozkové kůry trvající 25 milisekund u 12 zvířat byla pozorována GFAP imunopozitivita astroglie v okolí kontuze. Poškození axonů bylo prokázáno pozitivitou protilátek proti neurofilamentům v podkorové bílé hmotě v místě kontuze. V protiléhle

hemisféře nebo ve vzdálených oblastech nebyly pozorovány známky poškození axonů (*Shreiber et al., 1999*).

## **1.6. MONITOROVÁNÍ PATOBIOCHEMICKÝCH ZMĚN PŘI PORANĚNÍ MOZKU**

Poranění hlavy je prokazatelné nejenom klinickými a zobrazovacími metodami, ale i laboratorním monitorováním kraniospecifických ukazatelů. Z poraněné tkáně se uvolňují některé specifické proteiny do cirkulace (např. neuron specifická enoláza (NSE) a protein S-100B), které jsou využívány i ke sledování klinického stavu a stanovení prognózy vývoje poranění (outcome) u těchto pacientů. Monitorování poškozených gliových a gangliových buněk při primárním poranění mozku je možné stanovením sérových hladin NSE a proteinu S-100B.

### **1.6.1. KRANIOSPECIFIČTÍ UKAZATELÉ**

#### **1.6.1.1. NEURON SPECIFICKÁ ENOLÁZA**

Neuron specifická enoláza (NSE) byla poprvé popsána Moorem a McGregorem v roce 1965. Hlavní vlastností NSE oproti jiným enolázám je její vysoký stupeň stability. NSE je glykolytický enzym (2-fosfo-D-glycerol hydroláza, molekulová hmotnost 80 kDa, referenční rozmezí fyziologických hodnot v séru se udává do 15,2 µg/l, biologický poločas je více než 20 hodin). Je popsáno 5 izoenzymů NSE. Izoenzym s podjednotkami γγ (gama) je lokalizovaný primárně v cytoplazmě neuronů, izoenzym αγ je obsažen v erytrocytech a může interferovat s hodnotami izoenzymu γγ při hemolýze odebraného krevního vzorku. Heterodimer αγ dimer je pozorován v neuroendokrinních buňkách (ovískový malobuněčný karcinom plic, neuroblastomu). Gen kódující protein NSE je lokalizován na 12 chromozomu (12p.13). NSE je zapojená do neuronální aktivity při vysoké koncentraci intracelulárních chloridů.

Klinické a experimentální studie: NSE je považován za senzitivní ukazatel pro odhad prognózy pacientů s poraněním hlavy. U pacientů,

kteří zemřeli následkem poranění hlavy, byly publikovány hladiny NSE vyšší než u pacientů přežívajících. Nižší hodnoty NSE byly zjištěny u pacientů s dobrým klinickým průběhem (s příznivým vývojem GCS) po mozkovém poranění. Woertgen a spolupracovníci pozorovali vyšší hodnoty NSE (Woertgen *et al.*, 1997) u pacientů s horším klinickým vývojem a horším GOS (ukazatel Glasgow outcome scale patří mezi ukazatele uzdravení pacienta). Střední hodnoty NSE byly u pacientů s horším GOS 38,0 µg/l vs. 26,9 µg/l ( $p < 0,05$ ) u pacientů s příznivým uzdravením. Stejně výsledky byly pozorovány i pro protein S-100B (4,9 µg/l vs 1,7 µg/l,  $p < 0,05$ ). V jiné studii (Yamazaki *et al.*, 1995). byly u 25 pacientů s poraněním mozku shromážděny vzorky krve v intervalu 1,5-8,0 hodin. Ve skupině pacientů, kteří zemřeli, byly ve shodě s předešlou studií Woertgena a spol., zjištěny vyšší hodnoty NSE než u pacientů, kteří přežili ( $51,3 \pm 27,3$  µg/l vs.  $17,6 \pm 11,4$  µg/l,  $p < 0,005$ ).

Při experimentálním poranění mozku byly pozorovány hladiny NSE v séru v závislosti na čase. Nejvyšší hladiny NSE byly prokázány 6 hodin po úraze. Hermann a spolupracovníci publikovali studii, kde sledovali hodnoty proteinu S-100B a NSE u pacientů s různým nálezem v zobrazení CT (Herrmann *et al.*, 2000) podle Marshallovy klasifikace a s různě závažným poraněním (lehké, střední a těžké poranění). U obou ukazatelů byl zjištěn významný pokles koncentrací ve čtyřdenním pozorovaném intervalu. S-100B hodnoty u pacientů s lehkým poraněním průběžně klesly na fyziologické hodnoty; koncentrace u pacientů se středním až těžkým poraněním mozku zůstaly nezměněné. Významné rozdíly mezi skupinami byly dosaženy 73-96 hodin po poranění hlavy. U NSE byl zjištěn odlišný časový vývoj hodnot. Nejvýznamnější rozdíly hladin NSE mezi skupinami byly zjištěny již během prvních 24 hodin po nehodě. Pacienti se závažným poraněním (na místě úrazu skóre GCS < 12) měli výrazně vyšší hodnoty a delší uvolňování obou ukazatelů. Hodnoty S-100B a NSE korelovaly s GCS skóre na místě nehody. Nepotvrdili se rozdíly mezi koncentracemi proteinu S-100B a NSE mezi pacienty s difuzním poraněním I a II. Pacienti s difuzním poraněním IV a pacienti s ložiskovou lezí měli významně vyšší

hodnoty S-100B a NSE v porovnání s pacienty s difuzním poraněním I nebo II. U pacientů se známkami difuzního poranění axonů byly zjištěny vrcholy koncentrací obou proteinů třetí den po poranění, následované poklesem ve čtvrtém dni. U pacientů s pohmožděním kůry byl zjištěn vrchol koncentrací NSE v prvních hodinách, zatímco S-100B vrcholí 25-48 hodin po poranění. Obě hodnoty S-100B a NSE byly ve významném vztahu s objemem ložiska pohmoždění. Pacienti se známkami zvýšeného ICP měli oba ukazatele v séru zvýšené; nejvyšších hladin bylo dosaženo 49-72 hodin po poranění a koncentrace NSE poklesla k hladinám nalezeným v prvních hodinách po poranění, zatímco S-100B hodnoty zůstaly zvýšené. U pacientů s kontuzemi bez indikace k chirurgické intervenci pozoroval Guan et al. hodnoty NSE  $24,03 \pm 2,85 \mu\text{g/l}$ , u pacientů operovaných  $55,2 \pm 6,35 \mu\text{g/l}$  a nejvyšší hodnoty byly pozorované ve skupině pacientů s generalizovaným otokem mozku  $83,85 \pm 15,82 \mu\text{g/l}$  (Guan et al., 2003). Významná korelace hodnot NSE a GCS skóre ( $p < 0,01$ ) byla v této studii potvrzena. Woertgen v experimentu (Woertgen et al., 2002) prokázal vztah mezi ukazatelem poškození neuronů (NSE) a intenzitou pohmoždění mozkové kůry, které bylo provedeno řízeným nárazem s deformací 2 mm. Nebyl zjištěn vztah mezi intenzitou nárazu a hodnotami GFAP a S-100B, avšak u NSE byl zjištěn významný vztah mezi intenzitou nárazu a hladinami vyplavovaného markeru ( $p < 0,05$ ).

Ogata v imunohistochemické studii u 19 pacientů s difuzním poraněním hlavy (Ogata and Tsuganezawa, 1999) s krátkou periodou přežití vyšetřoval corpus calosum s použitím protilátek proti prekurzoru beta amyloidu (bAPP) a proti NSE. Po 1,5 hodině přežití již bylo pozorované hromadění proteinů (bAPP, NSE) v poraněných axonech. Kontuze byly současně přítomné u 14 pacientů.

### 1.6.1.2. KALCIUM VÁZAJÍCÍ PROTEIN S-100B

Protein S-100B je vápník vázající protein lokalizovaný v astroglii (molekulová hmotnost 21 kDa, referenční rozmezí fyziologických hodnot v séru do 0,105 µg/l). Název S-100 proteinu je odvozen od jeho solubility v nasyceném roztoku síranu amonného při neutrálním pH. Protein byl popsán v roce 1965 Moorem. O mechanismu vyplavování, uvolňování a nitrobuňčné funkci S-100 není mnoho informací. Přesto jsou důkazy, že S100 reguluje buněčné procesy závislé na vápníku prostřednictvím různých koncentrací: nanomolární koncentrace S-100 kontrolují diferenciaci a růst, zatímco mikromolární koncentrace mohou navodit apoptózu (*Fano et al., 1993, Fano et al., 1995*). Mezi cílové molekuly S-100B proteinu patří anexin, protein p53, GFAP, vimentin a protein GAP-43. Hlavní funkcí S100 proteinu je inhibice proteinové fosforylace, regulace energetického metabolismu, vazba guanylátcyklázy, modifikace cytoskeletu inhibicí tubulinu a ovlivnění GFAP, zvýšení transkripce BCL-2 a interleukinu-6, touto regulací inhibuje apoptózu buňky a dále působí protektivně proti účinkům glutamátu (*Ray et al., 2002*). Interakce proteinu S100B jsou ovlivňovány a spouštěny vápníkem, zinkem a ionty mědi (*Heizmann, 2004*). Astrogliální protein S-100B se rovněž uplatňuje při modulaci synaptické plasticity. Předpokládá se, že protein S-100B je jedním z proteinů, který zprostředkovává neuron-gliální interakce. S-100B protein uplatňuje své působení i extracelulárně (*Nishiyama et al., 2002*).

S100 je směs proteinů složených ze dvou imunologicky rozlišitelných jednotek, které se kombinují jako dimer  $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  a  $\beta\beta$  dimer. Izoformy  $\alpha\beta$  a  $\beta\beta$  jsou přítomny v astrogliích. Biologický poločas S100 proteinu je přibližně 1 hodina. Jednotky dimeru jsou propojeny disulfidickým můstkem. Zvýšené koncentrace S100 v periferní krvi jsou považovány za známku dysfunkce hematoencefalické bariéry a uvolňování proteinu S100 do periferní krve může diagnostikovat mozkovou dysfunkci i u pacientů bez podstatné a viditelné patologie v zobrazení CT.

Klinické a experimentální studie potvrdily, že u pacientů s těžkým a středně těžkým poraněním (GCS méně než 12) byly koncentrace



proteinu S-100B a NSE vyšší než u pacientů s lehčím traumatem (GCS více než 12). Pokud byl sledován časový vývoj hodnot NSE a proteinu S-100B po dobu více hodin až dní, bylo zjištěno, že po 24-72 hodinách klesají hodnoty obou ukazatelů až k hodnotám v rozmezí referenčního intervalu. Hodnoty NSE a S-100B nejsou ovlivněné kupř. hladinou alkoholu v době poranění. Hodnoty NSE a S-100B byly významně vyšší u pacientů, kde na místě úrazu bylo skóre GCS < 12 (*Herrmann et al., 2000*).

Při vyšetření pacientů (n=85) se vstupním GCS skóre  $\leq 8$  bylo prokázáno, že sérové hodnoty GFAP, S-100B a NSE významně korelují se skórem závažnosti poranění (ISS) a nálezy na CT; avšak nebyl prokázán významný vztah mezi pohlavím a věkem. V souboru bylo 16% pacientů s hypotenzí při příjmu a 25% pacientů s hypoxií jako rizikovými faktory podílejícími se na rozvoji sekundárního poškození mozku. U těchto pacientů byly významně vyšší hodnoty NSE a S-100B proteinu v séru (*Vos et al., 2004*).

Některé nedávné práce ukazují na spojitost mezi klinickým výsledkem léčby (outcome pacientů) a koncentracemi S-100B a NSE v krvi u pacientů se závažným poraněním mozku (*Skogseid et al., 1992, Ross et al., 1996, Berger, 2006, Berger et al., 2007*). Pleines poukázal na spojitost mezi hodnotami S-100B a výsledkem léčby a uzdravením (outcome) pacientů (*Pleines et al., 2001*). Pozornost byla rovněž věnována neuropsychickým obtížím pacientů přetrvávajícím i po 6 měsících od poranění. Ve skupině 69 pacientů s poraněním mozku nebyla po 6 měsících od poranění většina pacientů významně omezena v obvyklých denních aktivitách. Avšak u 2/3 pacientů byly neurologickým vyšetřením zjištěny neuropsychologické problémy s pamětí a s kognitivními funkcemi. Hodnoty NSE a S-100B dobře korelovaly s hodnotami GOS skóre (*Herrmann et al., 2001*).

Někteří autoři sledovali, zda imunitní děje mohou v mozkové tkáni přispívat k sekundárnímu poškození po úraze a ovlivňovat uzdravení pacientů. Pleines et al. analyzoval vztah mezi mediátory zánětu ICAM-1 a IL-6 a hladinami markerů S-100B a NSE u 13 pacientů. V mozkomíšním moku byly pozorovány vysoké hladiny S-100B a NSE u pacientů v prvních

3 dnech po poranění. Paralelně s nárůstem těchto hodnot byl pozorován vzestup markerů zánětu ICAM-1 a IL-6. V séru byly zjištěny významné korelace mezi hodnotami NSE a IL-6 (*Pleines et al., 2001*). U 22 pacientů byl pozorován vztah mezi vyššími hodnotami NSE ( $p < 0,004$ ), proteinu S-100B ( $p < 0,001$ ) a špatného neurologického uzdravení pacientů. Autoři McKeating a spolupracovníci, kteří porovnávali hodnoty v krvi arteriální a krvi venózní z jugulárního bulbu u proteinu S-100B zjistili, že maximálních hodnot bylo dosaženo 24 hodin po poranění; hodnoty mezi venózní a arteriální krví se lišily jen velmi málo, avšak rozdíl byl statisticky významný (*McKeating et al., 1998*). Do studie byli zařazeni pacienti s průměrnou hodnotou GCS v celém souboru 6 bodů, převažovali muži, poměr mezi poraněním difúzním/ložiskovým/oběmi typy poranění byl 7/10/4 .

Protein S-100B je považován za vhodný ukazatel ke sledování klinického stavu i u pacientů s méně závažným traumatem hlavy (GCS > 12) (*Ingebrigtsen and Romner, 2003, Ingebrigtsen et al., 2005*).

Raabe a spolupracovníci publikovali významný vztah mezi časnými hodnotami S-100B a objemem pohmoždění mozkové kůry u pacientů se závažným poraněním, ale neprokázali vztah mezi koncentrací NSE a objemem pohmoždění (*Raabe et al., 1999*). V kontrastu s těmito poznatky Skogseid zjistil závislost mezi nejvyšší koncentrací NSE a objemem pohmoždění (*Skogseid et al., 1992*). Woertgen pozoroval, že NSE ani S100 protein nekorelovali se závažností nitrolební patologie (*Marshall et al.*) u pacientů se závažným poraněním mozku (*Woertgen et al., 1997*).

Některé studie se zaměřily na předpověď mozkové herniace u pacientů s nárůstem ICP. V souboru pacientů s polytraumatem, kteří byli indikováni k transplantaci orgánů, byl pozorován vzestup hodnot proteinu S-100B bezprostředně před vznikem mozkové herniace (*Unden et al., 2004*).

Nedávno byly publikovány některé studie, které analyzovaly hladiny proteinu S-100B u pacientů bez poranění mozku. Zvýšené hodnoty S-100B byly pozorovány kupř. u zlomenin lemuru nebo po

kardiovaskulárních operacích. V experimentu na 10 zvířatech v celkové anestezii byly měřeny koncentrace proteinu S-100B po bilaterální zlomenině femuru. Bylo zjištěno, že S-100B dosahovaly nejvyšších hladin 30-120 minut po fraktuře femuru ( $p < 0,001$ ) (Pelinka et al., 2003). Autoři Jonsson s kolektivem pozorovali zvýšení hladin S-100B po implantaci kardiopulmonálního bypassu (Jonsson et al., 2004).

Je rovněž známo, že koncentrace S-100B se mění s věkem. Sérové koncentrace proteinu S-100B jsou různé v séru zdravých osob v závislosti na věku, nebyla však pozorována závislost na pohlaví (Portela et al., 2002). Nebyl prokázán vliv kupř. onemocněním diabetes mellitus na vyplavování markerů do krve. Někteří autoři analyzovali vztah mezi hodnotami markerů NSE a S-100B a případným ovlivněním těchto hladin u diabetických pacientů. Hodnoty NSE a S-100B byly nižší než u kontrolní skupiny zdravých osob. Nebyly zjištěny změny v hladinách markerů mezi jednotlivými typy diabetu 1. typu a 2. typu (Hovsepian et al., 2004). Autoři analyzovali i hodnoty S-100B a NSE u pacientů s lehkým poraněním (mild trauma, GCS > 12) a vliv akutního ovlivnění alkoholem v okamžiku úrazu na změny ve vyplavování sledovaných markerů. 139 pacientů s anamnézou úrazu pod vlivem alkoholu bylo neurologicky vyšetřeno a byly provedeny CT snímky. U skupiny s pozitivním CT nálezem byly hodnoty S-100B v séru významně vyšší než u skupiny bez CT nálezu ( $p < 0,001$ ). Nebyly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými skupinami v hodnotách NSE a krevní glukózy a hladinou alkoholu v krvi (Mussack et al., 2002).

## 1.6.2. PROTEINY CYTOSKELETU

### 1.6.2.1. GLIÁLNÍ FIBRILÁRNÍ KYSELÝ PROTEIN

GFAP (gliální fibrilární kyselý protein) byl poprvé izolován Engem v roce 1971. GFAP je hlavní součástí cytoskeletu astrocytů a patří mezi intermediální filamenta cytoskeletu. Je to monomerická molekula s molekulovou hmotností 40 až 53 kDa. GFAP je produkován při glioze

jako obecná reakce nervové tkáně na poškození (traumatické, zánětlivé, ischemické a toxické).

Klinické a experimentální studie potvrdily vztah mezi jednotlivými markery poškození glie (GFAP, S-100B) a neuronů (NSE) v krvi. Pohmoždění mozkové kůry bylo provedeno řízeným nárazem s deformací 2 mm. Nejvyšší hodnoty NSE v séru byly pozorovány 6 hodin po poranění (31,5 µg/l), nejvyšší hodnoty GFAP byly za 1 hodinu po poranění (0,079 µg/l). Nebyl zjištěn vztah mezi intenzitou nárazu a hodnotami GFAP a S-100B. U NSE byl zjištěn vztah mezi intenzitou nárazu a hladinami vyplavovaného markeru ( $p < 0,05$ ) (Woertgen et al., 2002). Vos a spolupracovníci analyzovali soubor 85 pacientů se vstupním GCS skóre  $\leq 8$  (Vos et al., 2004). Bylo prokázáno, že hodnoty GFAP, S100B a NSE významně korelují se skórem závažnosti poranění (ISS) a nálezy na CT; avšak nebyl prokázán významný vztah mezi pohlavím a věkem. Autoři pozorovali, že pacienti kteří zemřeli nebo po 6 měsících měli špatné hodnoty skórovacího ukazatele uzdravení (GOS), měli významně vyšší hodnoty GFAP, S-100B a NSE oproti pacientům přežívajícím. Hodnoty proteinu S-100B vyšší než 1,13 µg/l predikovaly 100% úmrtnost v daném souboru pacientů. U zdravých osob jako kontrolní skupiny byla hladina proteinu GFAP 0,49 µg/l. U pacientů, kteří zemřeli, byly vstupní hodnoty GFAP při příjmu 7,8 µg/l, u pacientů se špatným uzdravením po 6 měsících byly hodnoty GFAP 6,6 µg/l a s příznivým ukazatelem uzdravení po 6 měsících byly hodnoty GFAP 0,95 µg/l. V nových studiích bylo zjištěno, že přetrvávající zvýšení GFAP v séru po 2 dnech od poranění je prediktivním faktorem zvýšené mortality pacientů (Lumpkins et al., 2008) 2 den po úraze byly střední hodnoty GFAP u pacientů bez TBI 0,02 pg/ml ve srovnání s hodnotami 2,17 pg/ml u pacientů s TBI ( $p = 0,003$ ).

Imunohistochemické studie: U kontuzního poranění mozku řada autorů pozorovala rozdílnou imunoreaktivitu astroglie s protilátkami proti GFAP a proti proteinu S100. Autoři Li a kol. (Li et al., 1998) pozorovali, že astroglie exprimovala protein S100 ve výběžcích, zatímco značení proteinu GFAP bylo negativní v prvních 4 hodinách po úraze a imunopozitivita

s protilátkou proti NSE byla prokázána v perikaryu neuronů. U 38 případů poranění mozku bylo imunohistochemickým vyšetřením zjištěno, že pozitivita GFAP byla přítomná již po 12 hodinách po zranění a největší imunopozitivita buněk byla 4 den po poranění a tato pozitivita buněk přetrvávala až do 7 dne (Tao et al., 2000).

#### **1.6.2.2. NEUROFILAMENTA**

Neurofilamenta patří mezi základní stavební proteiny cytoskeletu spolu s dalšími proteiny středních filament tj. keratinů, desminu, vimentinu, GFAP. Rozlišují se neurofilamenta o nízké molekulové hmotnosti - 62 kDa, střední - 102 kDa a vysoké molekulové hmotnosti - 130 kDa. Neurofilamenta obsahují tandemové repeticce složené ze tří aminokyselin lysinu-serinu-prolinu (KSP). Tato sekvence KSP je velmi častá a v neurofilamentech dochází k fosforylaci aminokyseliny serinu. Některé studie potvrdily, že v důsledku fosforylace aminokyseliny serinu jsou NF-H rezistentní k působení kalpainů a dalších proteináz (*Greenwood et al., 1993, Strong et al., 2001, Shaw et al., 2005*).

Klinické a experimentální studie: Neurofilamenta se řadí mezi nové markery poranění mozku (*Pineda et al., 2004*) společně s enzymy jako je kaspáza a kalpainy, jejichž substrátem je spektrin. Hladiny hyperfosforylovaných neurofilament v séru mohou být dobrý ukazatel poškození axonů (*Shaw et al., 2005*). Hodnoty NF-H byly analyzovány v likvoru a v krvi u skupiny pacientů se zánětlivými a nezánětlivými afekcemi centrálního nervového systému. Koncentrace NF-H dosahovaly u pacientů se zánětlivými onemocněními hodnot 0,22 ng/l (meningitis), 0,16 ng/l (neuritis) a 1,43 ng/l (encefalomyelitis). U pacientů se subarachnoidálním krvácením byly hodnoty NF-H 3,92 ng/l (*Petzold and Shaw, 2007*).

### 1.6.3. UKAZATELÉ ZÁNĚTLIVÉ ODPOVĚDI

#### 1.6.3.1. CYTOKINY

Cytokiny jsou mediátory nespecifické imunity, polypeptidy o molekulové hmotnosti 8-30 kDa, které účinkují v malých koncentracích, jsou esenciální pro fungování zánětu jakožto obranného a reparačního děje. Účinek cytokinů je jak lokální, tak systémový.

Interleukin-1 je v neaktivní formě peptid o molekulové hmotnosti 33 kDa, aktivní forma má 17 kDa. Je produkován buňkami fagocytárního systému, lymfocyty, endotelem. Zvyšuje aktivitu polymorfonukleárů, stimuluje syntézu reaktantů akutní fáze v játrech a zvyšuje expresi tkáňového faktoru a adhezních molekul (ICAM) endotelu, zvyšuje permeabilitu kapilár. Má antiproliferativní účinek, podporuje produkci kolagenu a aktivuje kolagenázy. Interleukin 1 má tedy angiogenní potenciál.

Klinické a experimentální studie: Likvor a sérum byly vyšetřeny u 23 pacientů s GCS<8. Nejvyšší koncentrace S-100B byly pozorovány 6 hodin po poranění. Nejvyšší hodnoty IL-6 a IL-8 byly zjištěné do 6 hodin po poranění a u ostatních ukazatelů (IL-1beta, TNF-alpha a IL-10) byly hodnoty zvýšené 24 hodin po poranění. Vyšší hodnoty byly prokázány u pacientů s vysokými hodnotami ICP ( $p < 0,05$ ) ve srovnání s ostatními (Hayakata et al., 2004). Akutní trauma mozku zvyšuje expresi zánětlivých cytokinů, kupř. IL-1. Na buněčné kultuře izolovaných neuronů byl prokázán efekt interleukinu-1beta, který vedl ke zvýšené expresi metaloproteinázy MMP-9 (Vecil et al., 2000).

Interleukin-6 se tvoří na podnět TNF a interleukinu-1. Indukuje syntézu proteinů akutní fáze, podporuje mitózu B-lymfocytů. Interleukin 6 vykazuje i antiproliferativní účinky, inhibuje proliferaci endotelových buněk.

Klinické a experimentální studie: Podle některých autorů je poškození BBB zčásti způsobené aktivací prozánětlivých faktorů. Současně s rozvojem prozánětlivé kaskády poškozující bariéru se rozvíjí i protektivní

mechanizmy, mezi které patří uvolnění interleukinu 6 působením NO. IL-6 hraje významnou roli při produkci inhibitorů metaloproteináz, kupř.  $\alpha_2$ -makroglobulinu, který je uvolňován z perivaskulárních astrocytů při poškození BBB. Při iatrogenní disrupci BBB hyperosmotickým roztokem manitolu při chemoterapii významně vzrostly hladiny  $\alpha_2$ -makroglobulinu po 4 hodinách (*Cucullo et al., 2003*). IL-6 působí jako protektivní faktor při poškození BBB.

Autoři Singhal a kol. pozorovali, že u pacientů s poraněním hlavy byly koncentrace IL-1 a IL-6 v likvoru vyšší než v krvi (*Singhal et al., 2002*). Průměrné hodnoty IL-6 v likvoru a v krvi byly 650 vs. 253 ng/l ( $p < 0.001$ ). Vysoké hladiny IL-6 byly spojené s lepším uzdravením (outcome). U 14 pacientů s poraněním mozku byla použita metoda mozkové mikrodialýzy. Bylo zjištěno, že pacienti, kteří přežili a pacienti s dobrým skóre uzdravení měli významně vyšší hladiny IL-6 v mikrodialyzátu (*Winter et al., 2004*).

Imunitní děje mohou v mozkové tkáni přispívat k sekundárnímu poškození mozku a ovlivňovat uzdravení pacientů. Ve studii, ve které byl sledován vztah mezi mediátory zánětu ICAM-1 a IL-6 a hladinami markerů S-100B a NSE bylo u 13 pacientů pozorován vzestup hodnot S-100B a NSE u pacientů v prvních 3 dnech po poranění a současně byl pozorován vzestup markerů zánětu ICAM-1 a IL-6 (*Pleines et al., 2001*).

### **1.6.3.2. FAKTOR NEKROTIZUJÍCÍ TUMORY (TNF)**

Faktor nekrotizující tumory TNF-alfa je mediátorem zánětlivé reakce, má cytotoxické účinky, indukuje tvorbu kyslíkových radikálů, zvyšuje tělesnou teplotu a má silné angiogenní účinky. Hlavním zdrojem TNF jsou makrofágy. TNF-beta má analogické funkce, má cytotoxické a cytolytické účinky. Maximálních hladin dosahuje TNF asi do 1 hodiny po inzultu. Aktivní molekula uvolněná po odštěpení metaloproteinázou má 17 kDa, v cirkulaci se vyskytuje jako dimer (27-33 kDa), aktivní forma tvoří trimer 51 kDa. Při hypoxii je zvýšena afinita endotelových buněk k TNF. U 17

pacientů nebyla pozorována závislost mezi hladinami TNF alfa a prognózou a uzdravením pacientů. Avšak hladiny TNF alfa byly významně vyšší u pacientů s poraněním hlavy ve srovnání s kontrolami (Crespo et al., 2007). U 47 pacientů se závažným poraněním hlavy bylo pozorováno, že hladiny TNF alfa byly již po 4 hodinách zvýšené v porovnání s kontrolami (Spielmann et al., 2001).

#### 1.6.4. RŮSTOVÉ FAKTORY

##### 1.6.4.1. RŮSTOVÝ FAKTOR VEGF

VEGF je 34-42 kDa dimerický glykoprotein, který působí jako hlavní mediátor angiogeneze a cévní permeability. V posledních letech byl zaznamenán velký zájem o výzkum angiogeneze nejenom v oblasti hematologických malignit (kupř. u mnohočetného myelomu, myelodní leukemie). Účinky VEGF jsou podporovány zejména epidermálním růstovým faktorem (EGF) a jeho působení je hlavně v časně fázi angiogeneze. V CNS stimuluje proliferaci endotelových buněk, hraje roli při cévní permeabilitě a vzniku edému mozku. VEGF indukuje migraci buněk a působí jako inhibitor apoptózy. Produkce VEGF je kontrolována labilním transkripčním faktorem HIF (hypoxií indukovatelný faktor) a jeho tvorba významně stoupá při hypoxii tkání. Hypoxie zvyšuje HIF a produkci VEGF; uvádí se, že tento patofyziologický mechanismus je zodpovědný za zvýšenou permeabilitu cév a formování vazogenního edému. V experimentech na zvířatech bylo pozorováno, že u myší, které nebyly schopné reagovat na hypoxii zvýšením tvorby VEGF se objevila degenerace motorických neuronů v mozkovém kmeni (Fischer et al., 2000).

Klinické a experimentální studie: U poranění mozku byly zjištěny významně vyšší hodnoty VEGF ( $398 \pm 62$  vs.  $149 \pm 15$  ng/l,  $p = 0,0002$ ) ve srovnání s kontrolami. Nejvyšší hodnoty VEGF ( $916 \pm 264$  ng/l) byly pozorovány 22 hodin po traumatu hlavy u dětí a dospívajících (Shore et al., 2004). Zvýšená exprese VEGF byla prokázána v poraněné tkáni v endoteliích a astroglálních buňkách. Po poranění mozku se zvyšuje



exprese VEGF v endoteliích. VEGF přispívá k disrupci bariéry a zvyšuje permeabilitu kapilár prostřednictvím syntézy molekuly NO a aktivací guanylátcyklázy. Mayhan a spolupracovníci sledovali efekt antagonisty NO-syntázy (L-NMDA) při současném podání VEGF. V tomto experimentu potvrdili, že L-NMDA inhiboval propustnost piálních arteriol, která byla zvýšená po předchozím podání VEGF (*Mayhan, 1999*).

Imunohistochemické studie: Imunohistochemická pozitivita VEGF koresponduje s lokalizací dysrupce BBB v oblastech, kde došlo k mikronekróze mozkové kůry (*Lafuente et al., 2002*). Imunopozitivita VEGF v poškozených arteriolách byla v experimentu pozorovaná po 36 hodinách, pozitivitu bylo možné prokázat i v astrocytech. Postupný začátek proligerace a angiogeneze byl pozorován po 3-5 dnech (*Nag et al., 1997*). U 6 operovaných pacientů s ložiskovým poraněním mozku byly vyšetřeny excize tkáně metodou imunohistochemie. V místě, kde se formoval mozkový edém byla na GFAP pozitivních astrocytech zjištěna exprese VEGF a aquaporinů AQ-P1, AQP4. Významná pozitivita byla zejména na astrogliálních perivaskulárních výběžcích (*Suzuki et al., 2006*).

## **2. CÍLE PRÁCE**

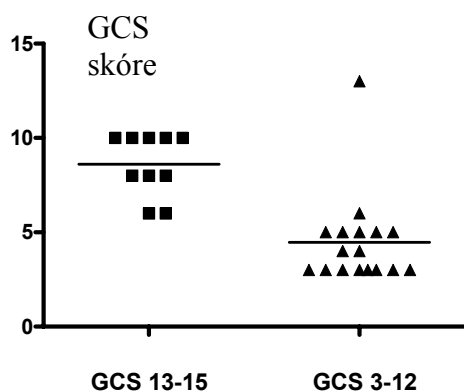
- 1. Podat přehled současného stavu literárních znalostí o významu biochemických ukazatelů závažnosti poranění mozku a zhodnotit jejich význam.**
- 2. Získat soubor pacientů s ložiskovým a difuzním (primárním) poraněním mozku. Rozdělit pacienty do skupiny s rozvojem expanzní kontuze a skupiny pacientů se stacionárními kontuzemi mozku, které nepůsobí nitrolební expanzi.**
- 3. Zavést metodu měření neurofilament o vysoké molekulové hmotnosti (NF-H), gliálního kyselého proteinu (GFAP) a markeru zánětu interleukin-6 u pacientů s kontuzí mozku a difuzním axonálním poraněním.**
- 4. Popsat vztah mezi jednotlivými biochemickými markery a klinickým skorovacím systémem (GCS), zhodnotit význam rizikových faktorů (prokázaných ve zdravotní dokumentaci pacientů) v patofyziologii sekundárního poranění mozku a popsat kinetiku změn hodnot biochemických ukazatelů u ložiskového a difuzního poranění mozku v průběhu hospitalizace pacientů.**
- 5. Zdokumentovat ultrastrukturální morfologické změny hematoencefalické bariery u expanzních kontuzí mozku a pozorovat a popsat imunohistochemické rozdíly v expresi proteinů u pacientů s difuzním a ložiskovým poraněním mozku.**

### 3. METODY

#### 3.1. SOUBOR PACIENTŮ

Podrobné vyhodnocení radiologických a biochemických údajů bylo provedeno u 38 pacientů. U 10 pacientů dominovalo difuzní poranění, u 28 pacientů bylo převážně ložiskové poranění mozku. Vývoj stavu vědomí byl měřen standardním skórovacím systémem *Glasgow coma scale*. Validní údaje GCS na místě poranění byly dostupné u 27 pacientů (viz **Graf.1**), u ostatních nebylo možné validní hodnoty GCS na místě nehody určit z důvodu analgosedace pacienta přivolanou RLP.

V průběhu léčby byl hodnocen klinický stav pacientů pomocí GCS skóre, které patří mezi nejčastěji používanou stupnicí hodnocení stavu vědomí. U 10 pacientů došlo během 10 dnů od přijetí ke klinickému zlepšení GCS na hodnotu 13 -15 bodů, vstupní hodnoty GCS byly v průměru  $8,6 \pm 0,5$  bodů. U 17 pacientů bylo GCS menší než 13 bodů po 10 dnech hospitalizace. Vstupní hodnoty GCS byly průměrně  $4,4 \pm 0,5$  bodů.



**Graf. 1** - Vstupní hodnoty GCS u skupiny, ve které jsme po 10 dnech pozorovali zlepšení klinického stavu a GCS 13-15 (lehké poranění mozku), vstupní hodnoty GCS u skupiny kde nedošlo po 10 dnech ke zlepšení klinického stavu a pacienti měli hodnoty GCS 12 a méně (poranění středně těžké a těžké poranění). Z grafu je patrné, že u žádného pacienta nebyla vstupní hodnota GCS 15 bodů.

### 3.1.1. DEMOGRAFICKÉ ÚDAJE

V souboru pacientů byl průměrný věk žen vyšší než mužů a v souboru převažovali muži. Průměrný věk mužů byl  $47,3 \pm 3,0$  let, žen  $68,6 \pm 9,0$  let. V souboru bylo celkem 35 mužů a 3 ženy.

### 3.1.2. RIZIKOVÉ FAKTORY

V celém souboru 38 pacientů byl jeden nebo i více rizikových faktorů současně prokázány u 8 pacientů; u tří pacientů zjištěn jako rizikový faktor systolický tlak nižší než 90 mm Hg při přijetí do zdravotnického zařízení; u 5 pacientů byla při příjmu koncentrace laktátu vyšší než 2,0 mmol/l. Mydriáza byla pozorována u 5 pacientů. U 4 pacientů v celém souboru byla na místě úrazu lékařem RZS zjištěna aspirace žaludečního obsahu. Srdeční zástava byla na místě úrazu úspěšně resuscitována u jednoho pacienta, který zemřel po třech dnech. Dále byl ve 3 případech diagnostikován pneumotorax.

### 3.1.3. LOŽISKOVÉ A DIFUZNÍ PORANĚNÍ MOZKU, EXPANZNÍ KONTUZE

U 10 pacientů dominovalo difuzní poranění mozku, u 28 pacientů bylo převážně ložiskové poranění mozku.

Expanzní proces, přetlak středočarových struktur na CT, byl prokázán u 16 pacientů, z těchto pacientů byla u 12 provedena neurochirurgická resekce kontuzního ložiska, u 4 pacientů se jednalo o expanzní edém hemisféry bez možnosti resekce a byla provedena dekompresivní kraniektomie.

Stacionární kontuze: 12 pacientů v celém souboru bylo bez známek expanzního ložiska na CT snímcích; u těchto pacientů docházelo k postupnému odbarvování kontuzí v CT obraze.

V celém souboru bylo u 10 pacientů diagnostikováno difuzní axonální poranění jako převládající diagnóza podle klinického průběhu a CT nálezu, kde drobné kontuze nemohly vysvětlit delší dobu (déle než 1 týden) trvající

bezvědomí. Vyšetření pomocí NMR po 2-3 týdnech diagnózu difuzního axonálního poranění potvrdilo.

#### **3.1.4. NEURORADIOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ**

Série vyšetření CT snímků byly provedeny u 38 pacientů, první CT snímek byl pořízen do 24 hodin po nehodě u všech pacientů. 10 pacientů vykazovalo nitromozkové patologické změny svědčící pro diagnózu difuzního poranění mozku. Po 2-3 týdnech bylo DAI potvrzeno vyšetřením pomocí NMR.

U pacientů s DAI byla na CT snímcích prokázána kontuzní ložiska menšího rozsahu, kdy čelní laloky byly postiženy u 6 pacientů, spánkové u 4 pacientů, temenní u 2 pacientů; týlní laloky u pacientů postiženy nebyly. 1 pacient měl známky poškození pod tentoriem postihující mozkový kmen, a mozečkové struktury nebyly postiženy. Známky otoku mozku bez ložiskové léze byly přítomné u 1 pacienta.

Další pacienti (n=28) měli na CT snímcích známky převládajícího ložiskového poranění mozku. Čelní laloky byl postiženy u 16 pacientů, spánkové u 15 pacientů, temenní u 9 pacientů a týlní laloky byly postiženy u 4 pacientů s ložiskovým poraněním. 2 pacienti měli známky poškození pod tentoriem postihující mozkový kmen, u 1 pacienta poranění postihovalo mozečkové struktury.

#### **3.1.5. KINETIKA VÝVOJE KONTUZE V CT OBRAZE**

Sledovali jsme postupné dobarvení dalších kontuzních ložisek mozku, která nebyla přítomná na prvních snímcích; ložiska pohmoždění, která se dobarvila do 48, 72 a po více než 96 hodinách (viz Tab.1), nebo progresse ložiska patrného na prvních CT snímcích do 24 hodin od poranění.

<b>Skupina Pacientů</b>	24 hod	48 hod	72 hod	≥96 hod
N-EXP (12)	10 <sup>1</sup>	4 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>2</sup>
EXP (16)	16 <sup>1</sup> /10 <sup>3</sup>	6 <sup>2</sup> /1 <sup>4</sup>	0/0	1 <sup>2</sup> /1 <sup>4</sup>
DAI (10)	5 <sup>1</sup>	3 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>	0

**Tab.1** Kontuzní ložiska při vyšetření CT u pacientů s poraněním mozku a jejich vývoj v čase. Dobarvení kontuzních ložisek po 24, 48, 72 a 96 hodinách. Legenda: N-EXP - pacienti se stacionárními ne-expansními ložisky poranění mozku. EXP - pacienti s expansními ložisky poranění mozku. DAI- pacienti s difuzním axonálním poraněním mozku; menší ložiska kontuzí byla přítomná i u pacientů s DAI. Index: <sup>1</sup> počet pacientů u kterých byla prokázána hemorhagická ložiska (kontuze, intracerebrální hematom) do 24 hodin od poranění. <sup>2</sup> pacienti s dobarvením nových ložisek do 48, 72 nebo i po více než 96 hodinách od poranění; tato ložiska nebyla na CT snímcích do 24 hodin patrná. <sup>3</sup> pacienti u kterých se expanzní proces na CT snímcích manifestoval do 24 hodin. <sup>4</sup> pacienti u kterých se expanzní proces na CT snímcích manifestoval po více než 24 hodinách.

### 3.1.6. BIOMECHANIKA PORANĚNÍ

Při studiu biomechaniky úrazového děje v souboru 38 pacientů bylo zjištěno, že se mělo jednat o 11 řidičů a 1 spolujezdce ve vozidle; kraniocerebrální poranění dále utrpělo 6 chodců, v 9 případech ke vzniku poranění došlo při pádu z výše, v 6 případech při pádu na rovině, v 1 případě se jednalo o úder tupého předmětu do oblasti hlavy a ve 3 případech se jednalo o zranění cyklisty. V 1 případě byl mechanismus nejasný; jednalo se o neznámého muže (*casus socialis*).

### 3.1.7. NEUROCHIRURGICKÁ LÉČBA

Z celkového souboru 38 pacientů, bylo 12 pacientů operováno pro rozvíjející se přetlak středočarových struktur (na CT snímcích) a nárůst

ICP, u 4 pacientů byla provedena dekompresivní kraniektomie při nárůstu ICP.

Byly analyzovány dvě skupiny pacientů (u jedné skupiny došlo v průběhu 10 dnů ke zlepšení GCS skóre na hodnoty lehkého poranění (GCS 13-15) a ve druhé skupině bylo po 10-ti dnech GCS skóre nižší než 13 bodů) a byla sledována četnost operačního zákroku. Ve skupině se zlepšením GCS po 10 dnech byli operováni 3 pacienti (tj. pacienti s expanzním kontuzním ložiskem). Ve skupině bez zlepšení GCS po 10 dnech bylo 9 pacientů operovaných pro expanzní chování kontuzního ložiska (ICP větší než 20 torrů, přetlak středočarových struktur o 5 mm a více, rozvoj mydriázy) a 4 pacienti s dekompresivní kraniektomií při generalizovaném edému.

### **3.1.7.1. INFORMOVANÝ SOUHLAS A VYJÁDŘENÍ ETICKÉ KOMISE**

Studie a informovaný souhlas pacienta byly schváleny etickou komisí nemocnice FN KV a grantovou agenturou IGA MZ. U pacientů v dlouhodobém bezvědomí byl informovaný souhlas podepsán ošetřujícím lékařem a v případě odběru vzorků pro diagnostické účely (rutinní vyšetření NSE a S-100B) nebylo nutné informovaný souhlas vyžádat. Informovaný souhlas pacient podepsal při přeložení na standartní lůžkové oddělení nebo při překladu do spádové nemocnice.

## **3.2. LABORATORNÍ VYŠETŘOVACÍ METODY**

### **3.2.1. BIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ**

#### **3.2.1.1. NEUROBIOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ NSE A S-100B**

Vzorky venózní krve byly odebrány 1. až 3. den po přijetí, dále od 4. do 6. dne a od 7. do 10. dne. Sraženiny v krvi byly přípustné, centrifugace byla provedena do 30 minut, sérum bylo uskladněno při -70 °C pro pozdější analýzu. Sérové proteiny byly analyzovány s použitím plně automatizovaných systémů metodou ECLIA diagnostickými soupravami

Roche na přístroji Elecsys 2010 a Cobas e411. principem metody je sendvičový test, kdy biotinylovaná protilátka proti NSE nebo S-100B a monoklonální protilátky proti příslušným epitopům značené rutheninovým komplexem reagují za tvorby sendvičového komplexu. Po přidání mikročástic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem. V měřící komůrce jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena. Výsledky jsou vyhodnoceny z kalibrační křivky.

Horní hranice referenčního rozmezí v séru pro NSE je 15,2 µg/l a pro S-100B protein 0,105 µg/l.

Podrobný popis metodiky měření koncentrace NSE (isoenzym  $\gamma\gamma$ ) a proteinu S-100B jsme publikovali *Kukačka et.al., 2006, Vajtr et al. 2006, Vajtr et al.2009* .

### **3.2.1.2. VYŠETŘENÍ ZÁNĚTLIVÝCH A RŮSTOVÝCH MARKERŮ, NEUROFILAMENT A GFAP**

Zavedli jsme měření zánětlivého markeru interleukinu-6 na analyzátoru DPC Immulite soupravou Immulite IL-6 (DPC, USA). Souprava je určena ke stanovení interleukinu-6 v séru imunochemicky s chemiluminiscencí. Podrobný popis metodiky měření koncentrace interleukinu 6 (IL-6) je uveden v Příloze č.6. Zavedli jsme měření markerů zánětu, TNF, EGF, VEGF mikročipovou metodou ELISA na analyzátoru Evidence Investigator (Randox, Irsko). Souprava je určena ke stanovení markerů v séru. Zavedli jsme měření hyperfosforylovaných neurofilament metodou ELISA (Biovendor, ČR), komerčním setem, kde sekundární protilátkou byla králičí protilátka s HRP, po inkubaci 1 hodinu a po promytí byl přidán roztok substrátu tetrametylbenzidinu. Souprava je určena ke stanovení NF-H v séru. Koncentrace neurofilament byla stanovena na fotometru Tecan Sunrise, který pracuje na principu vertikální fotometrie a enzymové imunoanalýzy. Jedná se o měření absorbance nebo podílu prošlého záření



jamkou mikrotitrační destičky. Intenzita záření nebo absorbance jsou pak přímo nebo nepřímo úměrné výsledné koncentraci stanovovaného analytu. Zavedli jsme měření gliového kyselého proteinu GFAP metodou ELISA (GE Healthcare, USA). Souprava je určena ke stanovení GFAP v séru.

### **3.3. MIKROSKOPICKÉ METODY**

#### **3.3.1. ULTRASTRUKTURÁLNÍ VYŠETŘENÍ V ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPII**

U operovaných pacientů (n=12) byla tkáň odebraného kontuzního ložiska fixovaná 3% glutaraldehydem (k pozdějšímu zpracování pro elektronovou mikroskopii) v kakodylátovém pufru a dofixovány 2% oxidem osmičelým. Po odvodnění v řadě alkoholů byly vzorky zalité do eponu podle obvyklé procedury. Barvené ultratenké řezy byly prohlíženy na přístroji Philips CM100 (FEI, Philips EO, Nizozemí) a vybrané oblasti byly digitálně zobrazené kamerou MegaViewII slow-scan. Digitální snímky byly upravené softwarem Analysis 3.2 Pro software.

Podrobný popis metodiky jsme publikovali *Kukačka et.al., 2006, Vajtr et al. 2006, Vajtr et al.2009* .

#### **3.3.2. IMUNOHISTOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ PROTEINŮ VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII**

U operovaných pacientů (n=12) byla tkáň odebraného kontuzního ložiska fixovaná formaldehydem. Histologické bločky byly zalité do parafinu k imunohistochemickému vyšetření s monoklonálními protilátkami (Chemicon, USA). Primární protilátky byly proti antigenům cytosketu (GFAP, vimentinu, NF, tubulinu, vinkulinu), proti antigenům NSE a S100 proteinu, proti receptoru CD-68, proti P-selektinu, proliferačnímu antigenu Ki-67 a růstovému faktoru VEGF.

Dále byly získány vzorky (n=5) mozkové tkáně odebrané při autoptickém vyšetření u pacientů, kteří zemřeli s diagnózou DAI (histologické bločky byly zapůjčeny s laskavým svolením Prim.MUDr. P.Toupalíka, PhD., Ústav soudního lékařství UK 2.LF a FN Bulovka).

Podrobný popis metodiky jsme publikovali *Kukačka et.al., 2006, Vajtr et al. 2006, Vajtr et al.2009* .

### **3.4. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT**

#### **3.4.1. STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT**

Hodnoty byly analyzovány programem StatView a GraphPad Prism 4.0 verze. U všech pacientů byly koncentrace jednotlivých markerů vyjádřeny jako aritmetický průměr, rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnány metodou ANOVA v programu StatView. Všechna prezentovaná data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr  $\pm$  standardní chyba měření (SEM). Hodnoty  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné.

## 4. VÝSLEDKY

Výsledky zahrnují především data získaná biochemickou analýzou vzorků pacientů s ložiskovým (pacienti s expanzní kontuzí mozku a neexpanzním stacionárním ložiskovým poraněním mozku) a difuzním (axonálním) poraněním mozku.

Hlavní pozornost jsme věnovali neurobiochemickým ukazatelům ve vztahu k nejčastěji používanému klinickému skórovacímu systému GCS a na hodnoty neurobiochemických ukazatelů u pacientů s rizikovými faktory (*Vajtr et al., 2006, Kukačka et al., 2006, Vajtr et al., 2007, Kukačka et al., 2008, Vajtr et al., 2009*).

Dále jsme analyzovali jsme hodnoty neurobiochemických ukazatelů u ložiskových poranění (hodnoty neurobiochemických ukazatelů u ložiskových expanzních a ne-expanzních kontuzí v kapitole 4.3.), kde jsme současně sledovali, zda změny hematoencefalické bariéry (ultrastrukturální analýza a imunohistochemický průkaz exprese proteinů) jsou morfologickým korelátem expanzního chování kontuze.

U ložiskových poranění jsme analyzovali rozdíly v hodnotách zánětlivých a růstových faktorů u expanzních a neexpanzních kontuzí mozku, pozorovali a popsali jsme patomorfologické změny exprese P-selektinu, CD 68 a růstového faktoru VEGF u expanzních kontuzí mozku ve srovnání s expresí těchto proteinů u difuzních poranění mozku (imunohistochemickými metodami).

Hodnoty neurobiochemických ukazatelů byly rozdílné u difuzního poranění mozku ve srovnání s ložiskovým poraněním mozku.

Analyzovali jsme imunohistochemické změny v expresi proteinů S-100 B a základních proteinů cytoskeletu (kupř. vinkulinu, vimentinu, GFAP, tubulinu). Studovali jsme, zda imunohistochemické změny v expresi proteinů tvořících hematoencefalickou bariéru jsou morfologickým korelátem expanzního chování kontuze.

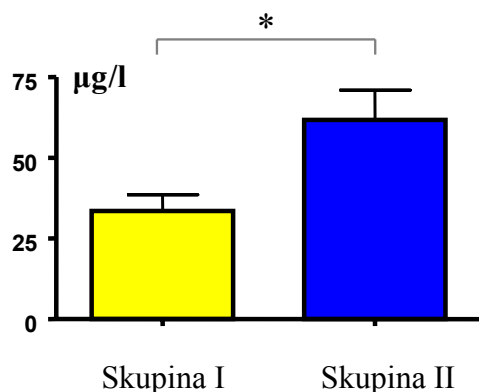
#### **4.1. NEUROBIOCHEMICKÉ MARKERY A KLINICKÁ MONITORACE STAVU VĚDOMÍ U PACIENTŮ S LOŽISKOVÝM PORANĚNÍM MOZKU**

Analyzovali jsme hodnoty neurobiochemických ukazatelů v závislosti na objektivně vyšetřeném vývoji klinického stavu vědomí, měřeným pomocí GCS skóre. Podle vývoje GCS skóre do 10 dne hospitalizace byli pacienti rozděleni do skupiny I (s klinickým zlepšením a úpravou hodnot GCS v průběhu 10 dnů od přijetí na hodnoty 13-15 (tyto hodnoty jsou považované za lehké poranění mozku) a skupiny II (bez zlepšení skóre GCS).

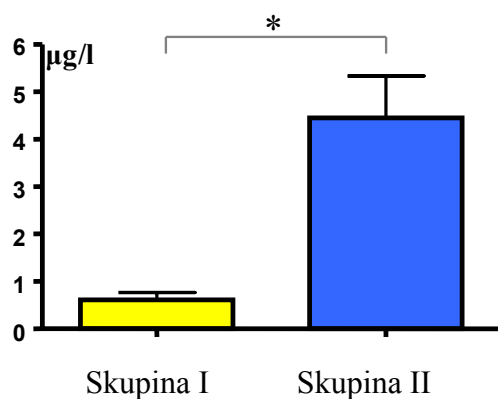
##### **4.1.1. HODNOTY NSE, S-100B A VÝVOJ GCS SKÓRE.**

U pacientů s ložiskovým poraněním hlavy byl zjištěn pokles průměrných hodnot NSE a proteinu S-100B od 1. dne do 10. dne ( $p < 0,05$ ) hospitalizace. U pacientů s klinickým zlepšením a úpravou hodnot GCS (skupina I) v průběhu 10 dnů od přijetí na hodnoty 13-15 (tyto hodnoty jsou považované za lehké poranění mozku) byly hodnoty NSE (33,53 vs. 61,76  $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ , **graf. 2**) a proteinu S-100B (0,61 vs. 4,45  $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ ) nižší 1.-3. den po přijetí (**graf. 3**) ve srovnání s hodnotami u pacientů bez zlepšení skóre GCS (skupina II). Od 4. do 10. dne nebyly mezi oběma soubory statistické rozdíly.

Ve skupině I byli 3 pacienti s expanzní kontuzí mozku; ve skupině II bylo 9 pacientů operováno pro rozvíjející se expanzní proces a hodnota GCS po 10 dnech byla nižší než 13 bodů, tj. na hranici středně závažného poranění.



**Graf. 2** – Skupina I (pacienti s klinickým zlepšením a úpravou hodnot GCS v průběhu 10 dnů od přijetí na hodnoty 13-15). Skupina II (pacienti bez zlepšení GCS skóre). Hodnota NSE 1. až 3. den po poranění. NSE, koeficient  $p < 0,03$  (\*), Welshova korekce  $p < 0,002$ . Hodnoty GCS 13-15 bodů jsou považovány za ukazatel lehkého poranění mozku (mild trauma). Ve skupině I nezemřel, po dobu hospitalizace, žádný pacient a vstupní hodnoty GCS po traumatu hlavy byly  $8,6 \pm 0,5$  bodů. U skupiny II bylo vstupní GCS po traumatu hlavy průměrně  $4,4 \pm 0,5$  bodů



**Graf. 3** – Skupina I (pacienti s klinickým zlepšením a úpravou hodnot GCS v průběhu 10 dnů od přijetí na hodnoty 13-15). Skupina II (pacienti bez zlepšení GCS skóre). Hodnoty S-100B, koeficient  $p < 0,0016$  (\*), Welshova korekce  $p < 0,0001$ .

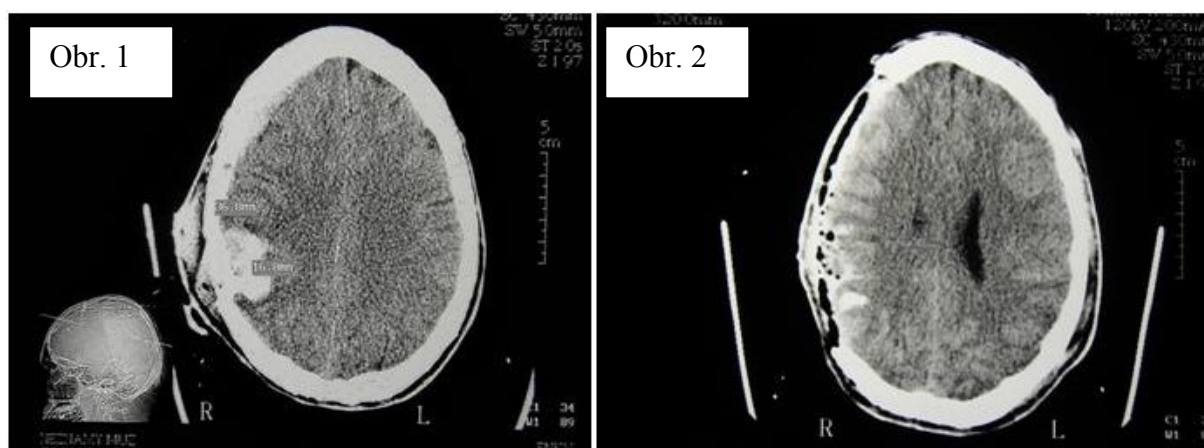
#### 4.1.2. **KAZUISTIKY U PACIENTŮ S PŘÍZIVÝM VÝVOJEM GCS SKÓRE.**

Ze skupiny pacientů s příznivým vývojem GCS byli 3 pacienti s expanzní kontuzí mozku; zde uvádíme 2 reprezentativní kazuistiky z této skupiny. Pacienti, kteří byli operováni ve skupině I pro expanzní kontuzi mozku vykazovali klinické zlepšení již v prvních pooperačních dnech. Kazuistiky, které demonstrují příznivý klinický průběh vývoje poranění mozku jsou uvedeny níže.

**Kazuistika č.1 (skupina I):** 28 letý pacient po kraniocerebrálním poranění při pádu ze schodů v ebrietě. Na vstupním CT byla kontuze frontálně vpravo s plášťovým akutním subdurálním hematomem fronto-temporálně vpravo s přetlakem středočarových struktur 5 mm. Na kontrolním CT s odstupem 6 hodin progrese přetlaku. Indikováno zavedení čidla ICP, které ukazuje hodnoty kolem 30 torrů. Pacient byl somnolentní, zornice izokorické, GCS 8. Nemocný byl urgentně operován. Provedena evakuace akutního subdurálního hematomu a resekce kontuze s plastikou tvrdé pleny. Hodnoty NSE po operaci přechodně stoupají na 33,63 µg/l. Hladiny proteinu S-100B klesly z hodnot 0,344 µg/l až k referenčním hodnotám během 3 dnů. Po odtlumení pacienta 6. den nastává postupně zlepšování klinického stavu až do plného vědomí s GCS 15.

**Kazuistika č.2 (skupina I):** 32 letý pacient s kraniocerebrálním poraněním při autonehodě. Na vstupním CT nález akutního subdurálního hematomu s kontuzí mozku pod impresivní zlomeninou parietálně vpravo (**obr. 1 a 2**), která vznikla po nárazu do předního jedoucího vozidla. Při klinickém vyšetření nemocný s flekční reakcí na algický podnět bilaterálně, izokorické zornice, GCS 6, otevřená impresivní zlomenina parietálně vpravo s výtokem likvoru, v ráně patrná mozková tkáň. Nemocný urgentně operován. Provedena evakuace hematomu z dekompresivní kraniektomie a resekce části kontuzních hmot mozku

s plastikou tvrdé pleny. Hodnoty markerů kontinuálně klesají během 4 dnů k referenčnímu rozmezí ze vstupních hodnot NSE (49,27 µg/l) a S100b (1,88 µg/l). 8. den po odtlumení pacienta postupně zlepšování klinického stavu až do plného kontaktu (GCS 15). Po 3 měsících pacient plně soběstačný, bez ložiskového neurologického nálezu na hlavových nervech a končetinách. Provedena replantace kostní ploténky.



**Obr. 1 a 2** - Pacient s úpravou hodnot GCS do 10 dnů hospitalizace. Vstupní CT prokázalo akutní subdurální hematom s kontuzí mozku pod impresivní zlomeninou parietálně vpravo (obr.1). Při operaci byla provedena evakuace hematomu z dekompresivní kraniektomie (obr.2) a resekce části kontuzních hmot mozku s plastikou tvrdé pleny.

**Morfologické vyšetření** okrajové zóny kontuze prokázalo u pacientů skupiny I perivaskulární krvácení a únik krevních bílkovin do perivaskulárního kompartmentu. V pericytech nacházíme telolysosomy (obr.14, na str.69), které odpovídají imunohistochemické pozitivě s protilátkou proti receptoru CD68 (obr. 27; detail na str.75). V astroglálních výběžcích jsme nacházeli proteiny, v cytoplasmě byly známky edému, jádra a jádérka byla dobře barvitelná.

#### 4.1.3. **KAZUISTIKY U PACIENTŮ S NEPŘÍZIVÝM VÝVOJEM GCS SKÓRE.**

Ze skupiny pacientů s nepříznivým vývojem GCS byla u 9 pacientů diagnostikována expanzní kontuze mozku; zde uvádíme 2 reprezentativní kazuistiky z této skupiny. Uvádíme kazuistiky dvou případů úmrtí, které demonstrují nepříznivý klinický a laboratorní průběh vývoje poranění mozku, kde vstupní hodnoty GCS byly nižší (průměrná hodnota GCS na místě vzniku poranění 4,4 bodů) než u pacientů, kde došlo ke zlepšení GCS po 10 dnech hospitalizace (průměrná hodnota GCS na místě vzniku poranění u této skupiny byla 8,6 bodů). Ve skupině II byla u 9 pacientů provedena resekce kontuzního ložiska pro rozvíjející se expanzní proces.

**Kazuistika č.3 (skupina II):**- 42letý pacient po kraniocerebrálním poranění, které utrpěl při pádu ze schodů v ebrietě. Na vstupním CT nacházíme kontuze frontálně oboustranně s plášťovým akutním subdurálním hematomem parietálně vpravo. Plánovaný operační výkon, provedena evakuace akutního subdurálního hematomu a resekce kontuze s plastikou tvrdé pleny. Na kontrolním CT s nepříznivým pooperačním nálezem, dobarvení kontuzních ložisek frontálně vpravo a temporálně vlevo. Rozvoj bilaterální mydriázy, vyhasnutí kmenových reflexů, 2.pooperační den známky smrti mozku při maligním posttraumatickém edému. Biochemické monitorování prokázalo vzestupnou tendenci koncentrací proteinu S-100B 1. den (1,40 µg/l), 2. den (4,15 µg/l) a 3. den (10,7 µg/l).

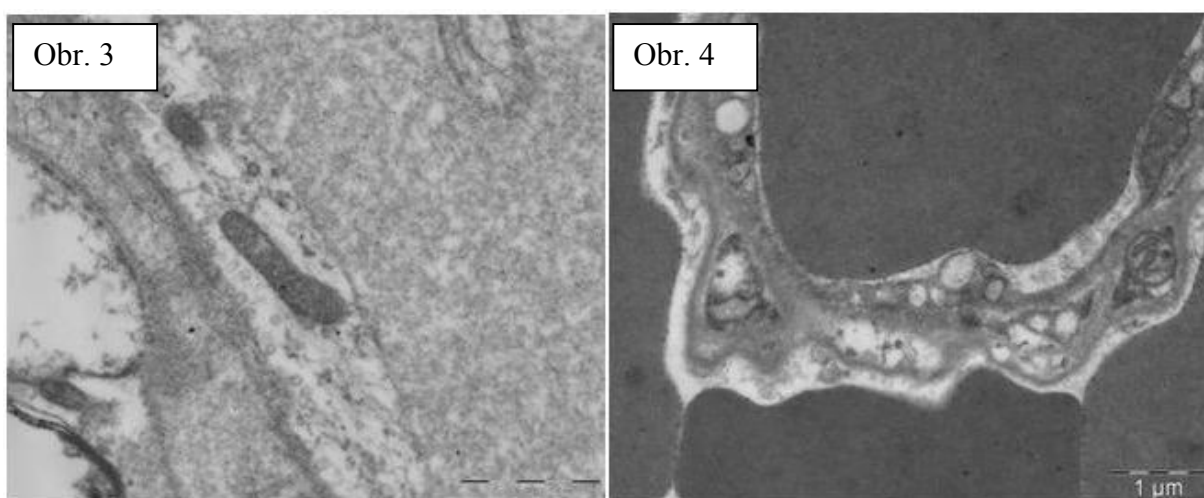
**Kazuistika č.4 (skupina II):**- 50letý pacient, *casus socialis*, nalezen v hlubokém bezvědomí. Na vstupním CT nález akutního subdurálního hematomu fronto-temporálně vpravo, přetlak středočarových struktur doleva o 24 mm, kontuze temporo-parietálně vpravo. Nemocný urgentně operován. Provedena evakuace hematomu z dekompresivní kraniektomie a resekce části kontuzních hmot mozku. Na kontrolním CT přetrvávající edém, přetlak středočarových struktur o 20 mm. Biochemické monitorování prokázalo vzestupnou tendenci hladin proteinu S-100B



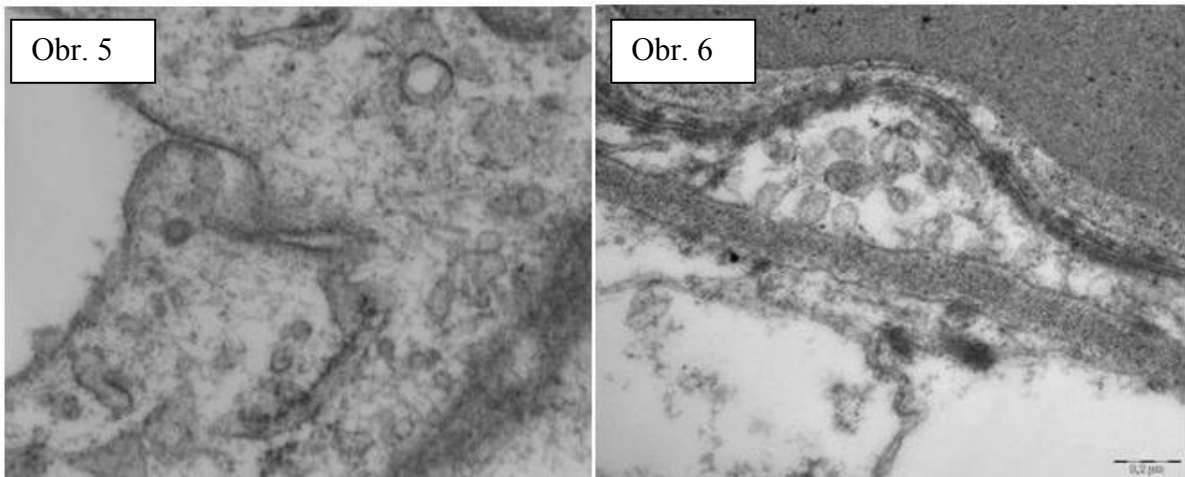
1.den (1,38  $\mu\text{g/l}$ ), 2.den (1,44  $\mu\text{g/l}$ ) a 3.den (4,80  $\mu\text{g/l}$ ). 6.den exitus lethalis.

**Morfologický obraz okrajové zóny kontuze** u skupiny II s horší prognózou prokazuje vystupňované ultrastrukturální změny. Nacházeli jsme poškození kapilár, aktivaci povrchu endotelií s tvorbou výběžků, vystupňovanou pinocytotickou aktivitu (obr. 3 - 6) a formování multivesikálních tělísek v endoteliích. V buňkách byly vystupňované známky cytotoxického edému, prakticky vymizení proteinů v astrogliálních výběžcích, deformace mitochondrií a dystrofie organel.

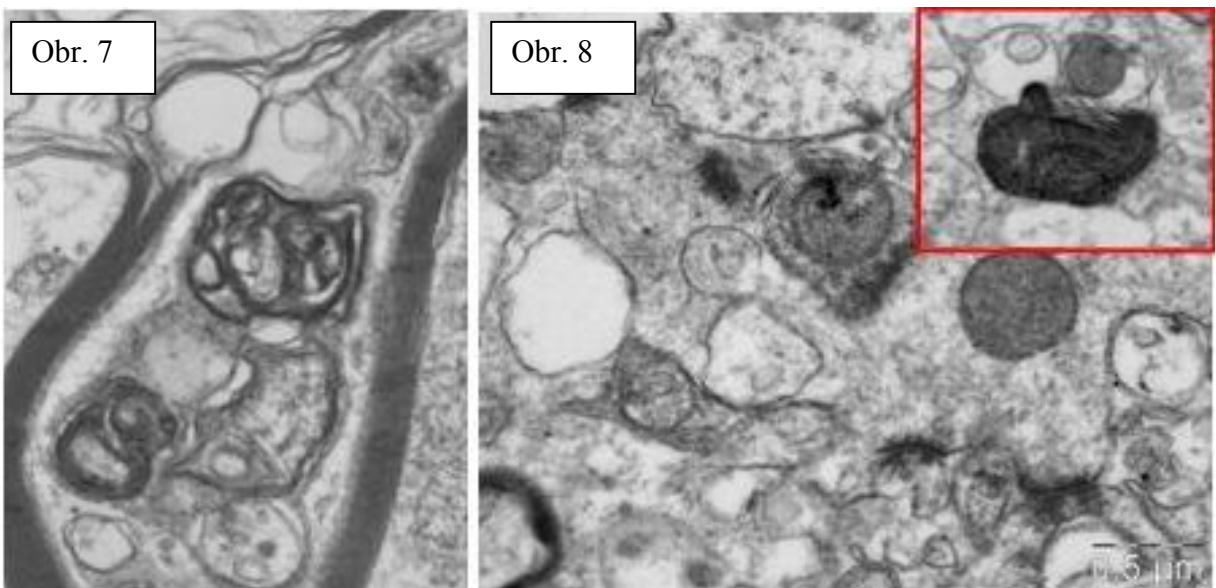
Byla dokumentována neuroaxonální degenerace s autofagií mitochondrií při ultrastrukturálním vyšetření (obr. 7). Malé množství synaptických vesikul v presynaptické části a obraz degenerace synapsí byl pozorován (obr. 8.-10). Leukocytární adhezi a vycestování leukocytů do tkáně jsme zjistili u obou skupin.



**Obr. 3 a 4** - Proces pinocytosy a transcytosy v endoteliích různě vyznačený u pacientů s expanzními kontuzemi mozku. Pinocytotické vakuoly v entotelii, lumen kapiláry (obr.3). Zduření astrogliálních perivaskulárních pochev u expanzní kontuze dobře koreluje s perivaskulární imunonegativitou proteinu S-100B (viz imunohistochemické vyšetření). Větší vakuoly ve stěně kapiláry (obr.4) mohou být patomorfologickým korelátem vakuolární či albuminoidní dystrofie při sekundárním (ischemicko-hypoxickém) poškození mozkové tkáně.

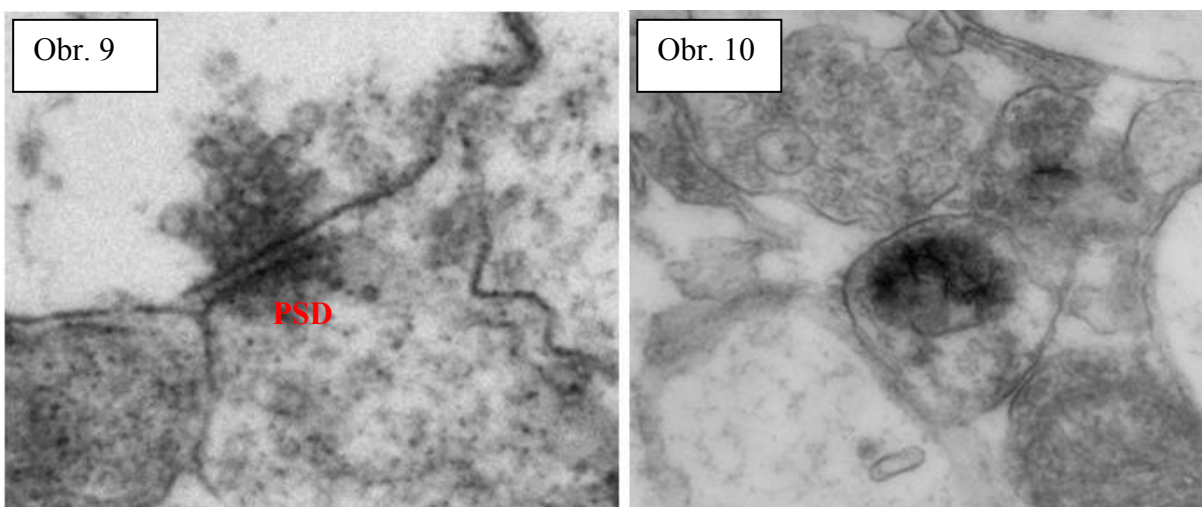


**Obr. 5 a 6** - *Zonulae occludens* (obr. 5) nejsou v těsném spojení ve srovnání s pozorováním na obr. 6, kde jsou těsná spojení (*tight junction*) neporušená. U expanzních kontuzí byla rovněž patrná imunonegativita vinkulinu (protein asociovaný s mikrofilamenty komunikující s integriny). Na obr. 6 je patrná tvorba časného „early“ endozómu v cytoplazmě endotelie. V této části jsou dobře patrná neporušená těsná spojení.



**Obr. 7-8** – Ultrastrukturální analýza expanzní kontuze mozkové kůry u pacienta bez zlepšení hodnot GCS do 10 dnů hospitalizace. Na obr. 7 je vystupňovaná neuronaxonální dystrofie s autofagií mitochondrií v axonu (konzultováno s Prof.MUDr.M.Ellederem, DrSc.). Na obr. 8 nacházíme synapse asymetrického

typu. Postsynaptický denzní materiál je dobře patrný na dalším snímku (obr.9).  
V detailu - degenerace synapse s poškozenými mitochondriemi.



**Obr. 9 a 10** - Ultrastrukturální analýza u pacienta bez zlepšení hodnot GCS do 10 dnů hospitalizace. Synapse a presynaptická část s několika vesikulami. PSD - postsynaptický denzní materiál. Nervové vlákno se synaptickými vesikulami - Presynaptická část s agranulárními vesikly, postsynaptická densita (PSD) a aktivní zóna. Obr. 10 s patrnou mitochondrií; Inkrustace mitochondrie v blízkosti synapse.

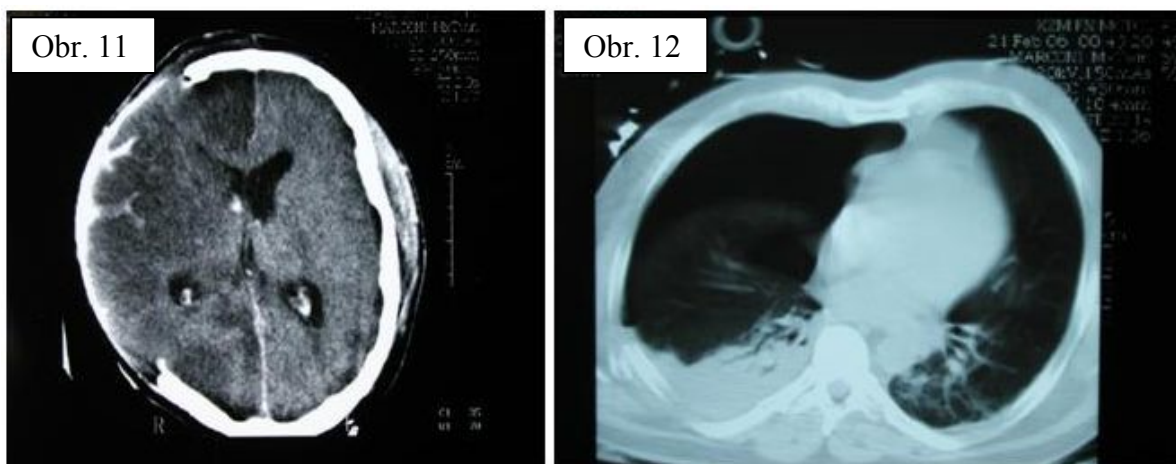
#### **4.2. HODNOTY NEUROBIOCHEMICKÝCH UKAZATELŮ U PACIENTŮ S RIZIKOVÝMI FAKTORY**

V celém souboru 38 pacientů byly u 8 pacientů zjištěny tyto rizikové faktory: u tří pacientů (systolický tlak nižší než 90 mm Hg při přijetí); u 5 pacientů byl při příjmu laktát v koncentraci vyšší než 2,0 mmol/l. Mydriáza byla pozorována u 5 pacientů. U 4 pacientů byla na místě úrazu lékařem RZS zjištěna aspirace žaludečního obsahu. Srdeční zástava byla na místě úrazu úspěšně resuscitována u jednoho pacienta, který však zemřel po třech dnech (obr. 11, 12). Dále byl ve 3 případech diagnostikován pneumotorax.

#### 4.2.1. HODNOTY NSE A S-100B U PACIENTŮ S RIZIKOVÝMI FAKTORY

U pacientů, kde na místě poranění byly dokumentované lékařem RZS rizikové faktory (aspirace žaludečního obsahu, hypotenze, nebo srdeční zástava s úspěšnou resuscitací) jsme nacházeli hodnoty NSE  $76,95 \pm 22,1$   $\mu\text{g/l}$  a S-100B  $3,81 \pm 1,7$   $\mu\text{g/l}$ .

U pacientů, kteří měli při hospitalizaci nárůst intrakraniálního tlaku nad 10-20 torrů, byly hodnoty NSE  $64,19 \pm 20,4$   $\mu\text{g/l}$  a S-100B  $3,74 \pm 1,2$   $\mu\text{g/l}$  významně vyšší než u pacientů bez známek nitrolební hypertenze. Rizikové faktory zhoršují globální nebo lokální ischemii mozku po poranění.



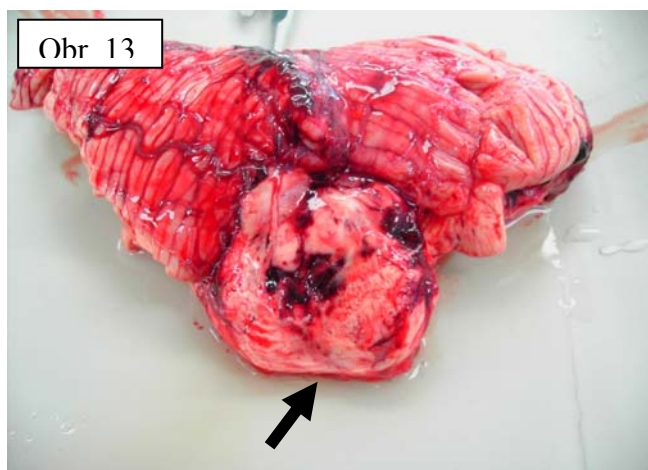
**Obr. 11 a 12** – CT snímky hlavy a hrudníku u pacienta bez zlepšení hodnot GCS do 10 dnů hospitalizace. Poranění řidiče osobního automobilu při dopravní nehodě. Rizikové faktory: v anamnéze je lékařem RZS uváděna srdeční zástava s úspěšnou resuscitací, haemothorax a pneumothorax po nárazu nepřipoutaného řidiče na volant v osobním vozidle. Na CT snímku hlavy je patrná dekompresivní kraniektomie, pooperačně edém hemisféry s kompresí předního rohu postraní komory. Exitus lethalis 3. pooperační den. Na CT snímku hrudníku sériové zlomeniny žeber, haemothorax l.dx (stav po přijetí).

#### 4.2.2. HODNOTY NSE A S-100B U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU SMRTI MOZKU.

V průběhu studie došlo k úmrtí 5 pacientů ze skupiny II (s nepříznivým vývojem GCS po 10 dnech hospitalizace) pro přidružené komplikace základního kraniocerebrálního poranění (smrt mozku při maligním edému mozku a při pohmoždění mozkového kmene).

Ve skupině II zemřelo celkem 5 osob (45 %), jejichž průměrné koncentrace NSE se od 1.dne z 32,72 µg/l zvýšily 2.-3. den na hodnoty 86,95 µg/l a u proteinu S-100B z 3,42 µg/l 2.-3. den se zvýšily na 5,8 µg/l. U dvou pacientů bylo na CT zjištěno pohmoždění mozkového kmene (skupina II). U smrti mozku při generalizovaném edému bylo při autoptickém vyšetření prokazováno posunové krvácení do mozkového kmene (obr. 13) a otlakový týlní konus. Ischemie vede k morfologickým změnám (**obr. 14** a **obr.15**). Mechanické poškození buněk a ischemie vedou k aktivaci biochemických kaskád kupř. aktivaci neuronální NO-syntázy (**obr.16**).

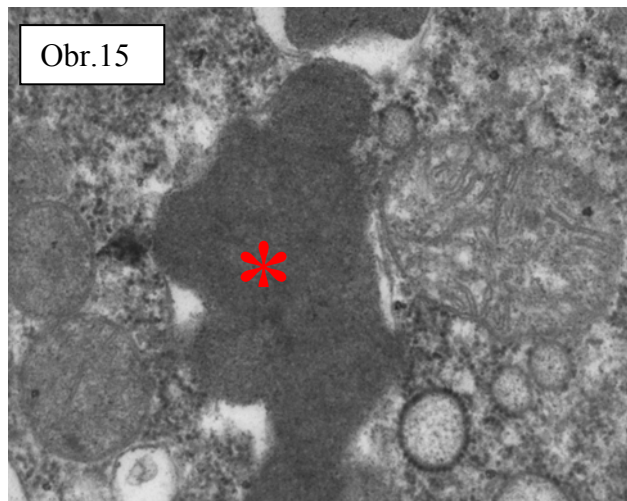
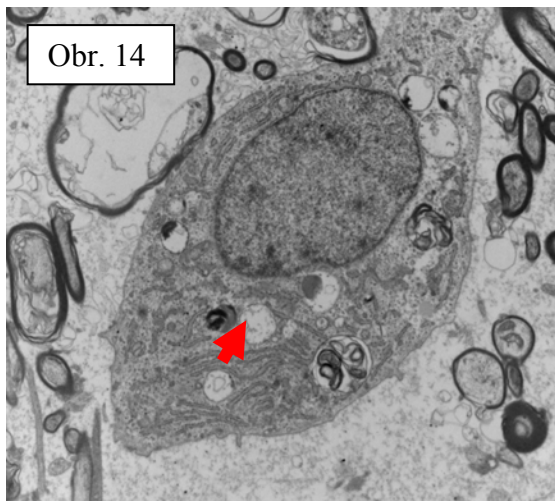
Ve skupině I (se zlepšením hodnot GCS po 10 dnech na hodnoty odpovídající lehkému poranění 13-15 bodů) nezemřel žádný pacient.



**Obr. 13** - Posunové krvácení do centrálních částí mozkového kmene po více dnech u pacienta s nárůstem ICP. Vstupní CT nepopisuje ložiska krvácení do mozkového kmene. Při laterální herniaci při maligním nárůstu ICP došlo ke stlačení

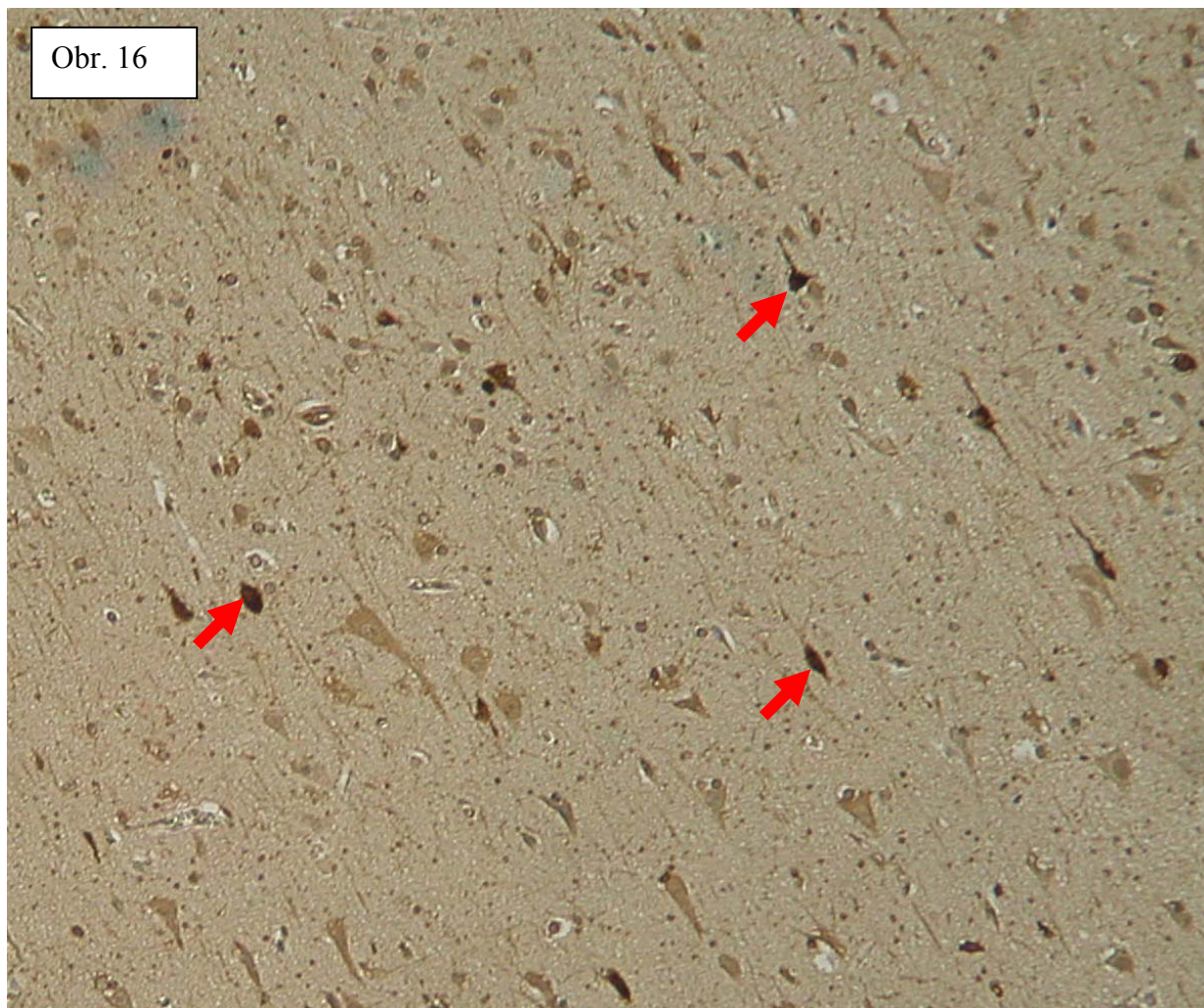


*uncus gyri hippocampi pod tentorium cerebelli mezi okraj tentoria a mozkový kmen. Vznikla komprese a dislokace mozkového kmene a přímé mechanické poškození mozkové tkáně; komprese mozkového kmene vede rovněž k natržení malých perforujících pontinních cév.*



**Obr. 14 a 15** - *Pacient po kraniocerebrálním poranění; na vstupním CT nacházíme kontuze frontálně oboustranně s plášťovým akutním subdurálním hematomem parietálně vpravo, na kontrolním CT po operaci dobarvení kontuzních ložisek frontálně vpravo a temporálně vlevo. Rozvoj bilaterální mydriázy, vyhasnutí kmenových reflexů, 2.pooperační den známky smrti mozku při maligním posttraumatickém edému. Biochemické monitorování prokázalo vzestupnou tendenci koncentrací proteinu S-100B 1. den (1,40 µg/l), 2. den (4,15 µg/l) a 3. den (10,7 µg/l). Ultrastrukturálně nacházíme ischemické změny neuronů v kontuzním ložisku, dilatace (šipka) Golgiho komplexu a endoplasmatického retikula, neuronální degenerace mitochondrií s patrným zduřením a rozpadem mitochondriální matrix společně s tvorbou mikrovakuol, Na obr.15 pozorujeme hromadění tukových kapének (hypoxická steatoza- hvězdička).*

Obr. 16



**Obr. 16** - Na obrázku je pozitivita některých neuronů při imunohistochemickém barvení s protilátkou proti neuronální NO- syntetáze (šípky), znázornění DAB.

Za příčiny púrazové poruchy kalciové homeostázy jsou považovány kromě ischemie (u pacientů s rizikovými faktory) i další mechanismy, jako vliv excitatorních aminů a zvýšení membránové permeability neuronů na základě mechanického poškození (Obr. 14). Zvýšená propustnost pro ionty vápníku vede k aktivaci kalcium dependentních enzymů kalpainů, kalmodulinu i NO-syntázy. Produkce oxidu dusnatého (NO) v mozkové tkáni je regulována kalcium/kalmodulin-dependentní NO syntetázou (nNOS), kterou regulují proteiny v postsynaptických denzních oblastech.

### **4.3. HODNOTY NEUROBIOCHEMICKÝCH UKAZATELŮ U LOŽISKOVÝCH PORANĚNÍ MOZKU (EXPANZNÍ A NE-EXPANZNÍ KONTUZE)**

#### **4.3.1. HODNOTY NSE A S-100B U PACIENTŮ S EXPANZNÍM PORANĚNÍM MOZKU**

Všichni pacienti s fokálním poraněním hlavy měli vyšší hodnoty S-100B a vyšší hodnoty NSE v porovnání s kontrolními hodnotami (pro S-100B jsou 0,105 µg/l a pro NSE 15,5 µg/l,  $p < 0,05$ ). U všech pacientů byly hodnoty S-100B a NSE při přijetí do nemocnice nad referenčním rozmezím.

V prvních 6 dnech se významně snížily hodnoty proteinu S-100B ( $p < 0,05$ ) u skupiny operovaných pacientů (skupina I operovaných pacientů).

U skupiny neoperovaných pacientů léčených konzervativně (skupina II konzervativní léčba) s kontuzemi bez přetlaku středočarových struktur na CT snímcích byl pozorován pouze mírný pokles hodnot S-100B v prvních 10 dnech hospitalizace.

Pokud jsme porovnávali obě skupiny mezi sebou, prokázali jsme vyšší hodnoty proteinu S-100B u skupiny I v prvních 3 dnech hospitalizace ve srovnání se skupinou II. Při analýzách NSE nebyl zjištěn mezi oběmi skupinami významný rozdíl v koncentracích NSE v průběhu 1. až 6. dne hospitalizace ( $p > 0,05$ ).



Ukazatel Dny	1-3 den Skupina I	1-3 den Skupina II	4-6 den Skupina I	4-6 den Skupina II	7-10 den Skupina I	7-10 den Skupina II
<b>S100B</b> μg/l	<b>3,06</b> ± 1,06 *	<b>0,64</b> ± 0,2 *	<b>0,71</b> ± 0,3	<b>0,59</b> ± 0,3	<b>0,23</b> ± 0,1	<b>0,15</b> ± 0,1
<b>NSE</b> μg/l	<b>42,59</b> ± 7,6	<b>37,57</b> ± 6,9	<b>17,94</b> ± 2,9	<b>29,63</b> ± 7,6	<b>27,75</b> ± 0,1 *	<b>17,70</b> ± 7,3 *
<b>IL-6</b> ng/l	<b>302,2</b> ± 119,9*	<b>59,60</b> ± 11,9 *	<b>408,5</b> ± 280,8 *	<b>51,94</b> ± 12,3 *	<b>N.A.</b>	<b>24,46</b> ± 7,4

**Tab. 2:** Vývoj hodnot (dynamika časových změn markerů NSE, S-100B a IL-6) u obou skupin I (operovaných) a skupiny II (léčených konzervativně) při 10 denní hospitalizaci po kraniocerebrálním traumatu. Koncentrace NSE se snížily u skupiny konzervativně léčených (skupina II) až k referenčním hodnotám po 4 až 6 dnech hospitalizace; u skupiny operačně léčených přetrvávaly zvýšené hodnoty i 7 až 10 den. Koncentrace S-100B se statisticky významně snížily u skupiny operovaných i u skupiny léčených konzervativně již od 4 do 6 dne po poranění. Koncentrace interleukinu (IL-6) se zvýšily u skupiny operovaných pacientů od 4 do 6 dne. Významné statistické rozdíly mezi skupinami ve stejném časovém intervalu jsou označeny symbolem \* ( $p < 0,05$ ). N.A. (hodnoty nebyly získány). Průměrné hodnoty (Mean ± SEM).

#### 4.3.2. SROVNÁNÍ ČASOVÉHO VÝVOJE HODNOT NSE, PROTEINU S-100B S HODNOTAMI IL-6 U PACIENTŮ S EXPANZNÍM PORANĚNÍM MOZKU

Při srovnání hodnot IL-6 a hodnot NSE, proteinu S-100B u pacientů s expanzním poraněním mozku v jednotlivých časových intervalech (tab.2) jsme pozorovali, že po operaci se hodnoty IL-6 zvýšily (průměrné

hodnoty 1.-3. den byly  $302,2 \pm 119,9$  ng/l a 4.-6. den  $408,5 \pm 280,8$  ng/l), zatímco koncentrace NSE a S-100B po operaci expanzního ložiska u operovaných pacientů se snížily ( $p < 0,05$ ).

Patomorfologické analýzy prokázaly významnou infiltraci kontuzního ložiska zánětlivými elementy s převažujícími polymorfonukleárními leukocyty. Popsali jsme neuronofagii poškozených nervových buněk a pozorovali jsme aktivaci mikroglie, která exprimovala protein CD68 ve fagozómech (obr.30, strana 75).

#### **4.4. HODNOTY NEUROBIOCHEMICKÝCH UKAZATELŮ U DIFUZNÍCH PORANĚNÍ MOZKU**

U pacientů s DAI ( $n=10$ ) byly prokázány drobné kontuze mozku, které se dobarvily do 24 – 72 hodin (Tab.1, strana 49). Tyto kontuze nebyly takového rozsahu, aby klinicky vysvětlily delší dobu trvající bezvědomí.

Drobné kontuze mozku se u pacientů s DAI nemanifestují známkami expanzního procesu (přesun středočarových struktur, vzestup hodnot ICP) vyžadující operační léčbu. Patomorfologické známky takovýchto kontuzních (stacionárních) ložisek je možné studovat v autoptickém materiálu.

##### **4.4.1. HODNOTY GFAP V PRŮBĚHU HOSPITALIZACE U DIFUZNÍHO A LOŽISKOVÉHO PORANĚNÍ MOZKU**

Průměrné koncentrace GFAP v séru u pacientů s difuzním poraněním v průběhu 10 denní hospitalizace byly významně nižší než u pacientů s ložiskovým poraněním mozku ( $0,49 \pm 0,3$  vs  $4,21 \pm 1,1$   $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ ).

Při sledování dynamiky změn koncentrací GFAP v průběhu 10 denní hospitalizace pacientů jsme zjistili, že koncentrace GFAP se u obou skupin (DAI a ložiskových poranění mozku) od 1. do 10. dne snížily (Tab. 3).

Tab.3

Ukazatel	DAI			Ložiskové kontuzní poranění		
	Průměr	1-3	4-10	Průměr	1-3	4-10
<b>GFAP</b> μg/l	<b>0,49</b> ± <b>0,3</b>	<b>0,93</b> ± <b>0,7</b>	<b>0,1</b>	<b>4,21</b> ± <b>1,1</b>	<b>8,34</b> ± <b>1,9</b>	<b>1,12</b> ± <b>0,6</b>

Tab.4

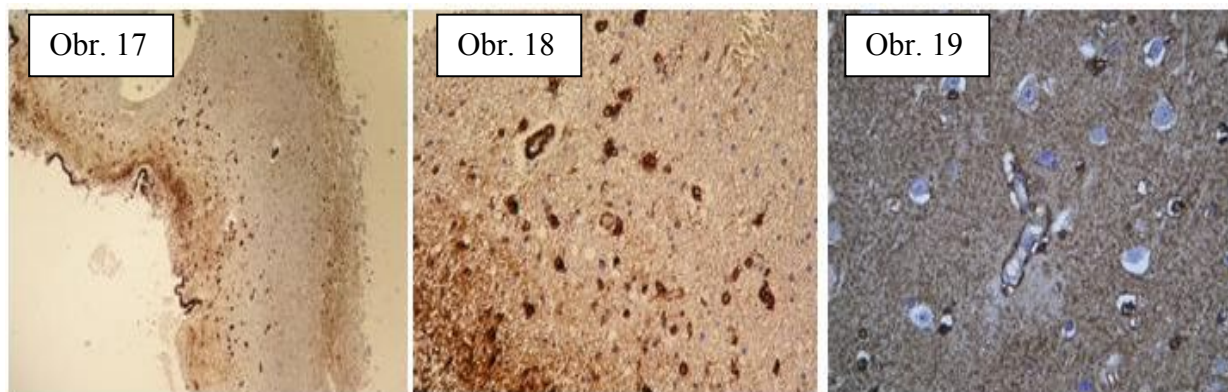
Ukazatel	Expanzivní proces		Neexpanzivní proces	
	1-3	4-10	1-3	4-10
<b>GFAP</b> μg/l	<b>8,58 ± 2,4</b>	<b>0,73 ± 0,4</b>	<b>1,85 ± 0,6</b>	<b>0,10 ± 0,1</b>

**Tab. 3 a 4** – Pacienti s difuzním (DAI) a ložiskovým poraněním mozku. Časový vývoj hodnot jednotlivých ukazatelů. Průměr - všechny hodnoty ve skupině pacientů s DAI a ložiskovým poraněním mozku. Hodnoty proteinu GFAP (Tab.4) u expanzních a neexpanzních ložiskových poranění mozku. Průměrné hodnoty (Mean ± SEM).

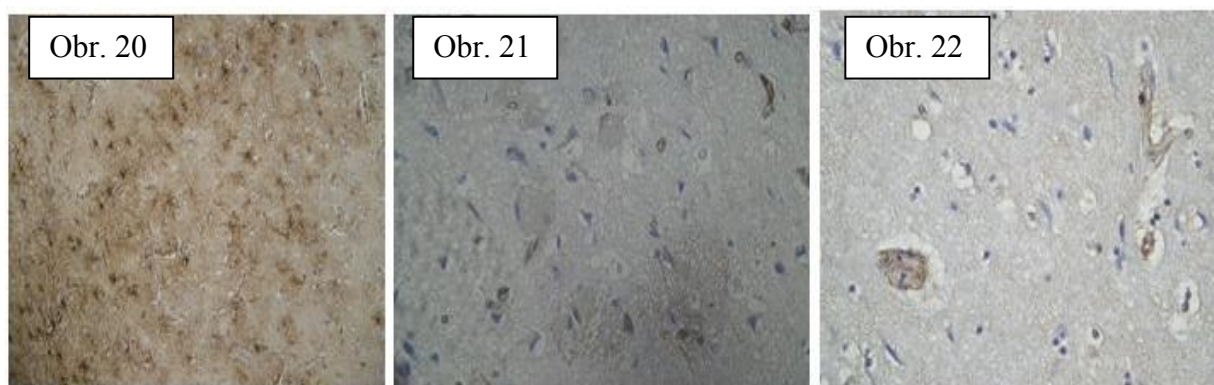
Byl pozorován pokles koncentrací GFAP u DAI i u expanzních a neexpanzních ložiskových lézí mozku od 1.-3. dne po vzniku poranění až na nejnižší hodnoty 4.-10. den (Tab.4). Pacienti s expanzním ložiskovým poraněním mozku měli nejvyšší koncentrace GFAP 8,58 ± 2,4 μg/l 1.-3. den ze všech pacientů. Pacienti s neexpanzními kontuzemi měli 1.-3.den koncentrace 1,85 ± 0,6 μg/l. Rozdíl mezi pacienty s expanzním a neexpanzním ložiskovým poraněním byl významný (p<0,05).

Patomorfologické analýzy prokázaly významné změny mezi DAI i ložiskovými poraněními mozku. Imunohistochemickým vyšetřením byla pozorována zachovaná exprese proteinu cytoskeletu (vimentin – **obr. 17**

a **obr.18**) u drobných kontuzí mozku pacientů s DAI. Slabá barvitelnost až vymizení exprese proteinů bylo zjištěno u operovaných pacientů s expanzní kontuzí mozku (**obr.20** až **obr.22**).



**Obr. 17, 18 a 19 Pacienti s diagnózou DAI a expanzní kontuzí –** Na obr.17 je řez corpus callosum. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti vimentinu, znázornění DAB. Obr. 18 ukazuje detail ložiska kontuze - Pacient s diagnózou DAI. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti vimentinu, znázornění DAB, výrazná pozitivita cév v ložisku malé kontuze u pacienta s DAI. Obr. 19 - Pacient s diagnózou expanzní kontuze mozku, plánovaná operace do 24 hodin po přijetí. Mozková kůra, imunohistochemické barvení s protilátkou proti vimentinu, znázornění DAB. Patrná je slabá imunopozitivita ve srovnání s obr. 17.-18.



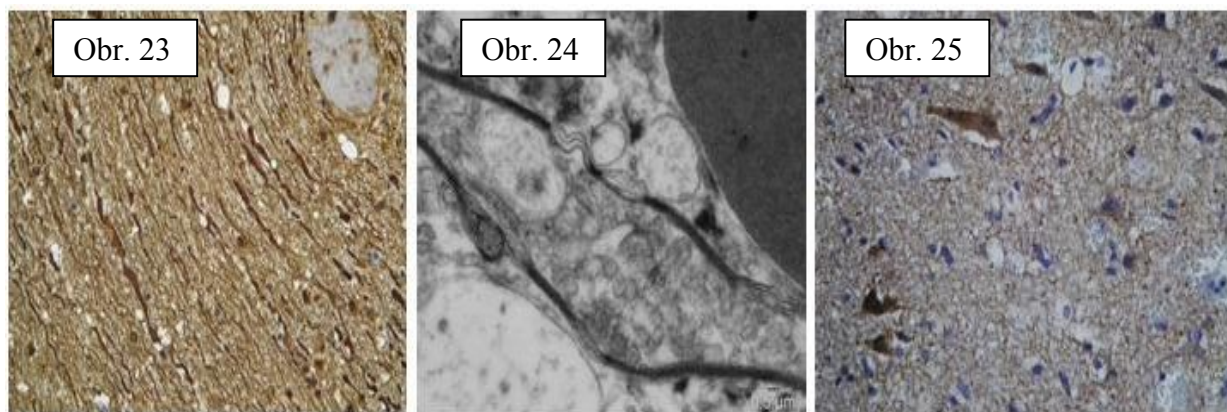
**Obr. 20, 21 a 22 Pacienti s diagnózou expanzní kontuze. -** Obr. 20 představuje řez mozkovou kůrou. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti GFAP proteinu, znázornění DAB. Reaktivní astroglia v okolí kontuze byla zastižena u jednoho pacienta s operovanou expanzní kontuzí mozku, u kterého byla plánovaná operace po více než 24-48 hodinách. Obr. 21 - Pacient s diagnózou

*expanzní kontuze. Mozková kůra, detail expansního ložiska s patrným otokem buněk. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti-vimentinu se znázornění DAB ukazuje slabou pozitivitu vimentinu ve výstelce kapilár (srovnání s výraznou pozitivitou proti vimentinu u pacientů s DAI; viz obr. 17, 18). Obr. 22 - Pacient s diagnózou expanzní kontuze. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti vinkulinu, znázornění DAB. Slabá pozitivita výstelky kapilár.*

#### 4.4.2. **HODNOTY HYPERFOSFORYLOVANÝCH NEUROFILAMENT NF-H U DIFUZNÍHO AXONÁLNÍHO PORANĚNÍ A KONTUZÍ MOZKU**

Průměrné hodnoty NF-H byly vyšší u pacientů s DAI (n=10) ve srovnání s hodnotami u pacientů (n=23) s ložiskovým poraněním ( $0,625 \pm 0,14$  vs.  $0,139 \pm 0,02$  ng/l,  $p < 0,05$ ) v průběhu 10 denní hospitalizace (Tab. 5). Časový vývoj hodnot koncentrací neurofilament NF-H měl u obou skupin vzestupný trend. Bylo pozorováno zvýšení koncentrací NF-H u pacientů s DAI z  $0,263$  ng/l od 1.-3.dne po poranění až na nejvyšší hodnoty  $1,325$  ng/l 7.-10. den. Hodnoty u ložiskových poranění hlavy se zvýšily z  $0,103$  ng/l od 1.-3. dne po poranění až na hodnoty  $1,108$  ng/l 7.-10. den. Pacienti s expanzním ložiskovým poraněním mozku měli hodnoty NF-H shodné jako pacienti s neexpanzními kontuzemi (Tab. 6); statisticky významné rozdíly nebyly prokázány.

Patomorfologická pozorování prokázala poškození axonů u DAI (imunohistochemická detekce demaskovaného tripletu neurofilament v poškozených axonech na **obr.23**). Poškození axonů bylo pozorováno rovněž u pacientů s expanzními kontuzemi při ultrastrukturálním vyšetření mozkové tkáně (**obr.24**). Imunohistochemicky byla u pacientů s expanzním ložiskovým poraněním mozku prokázána neurofilamenta v perikariu nervových buněk vysvětlitelné jako projev hromadění při oblenění axoplazmatického toku (**obr. 25**).



**Obr. 23, 24 a 25** Pacient s diagnózou DAI a pacient s expansí kontuzí mozku - Obr. 23 zobrazuje řez v corpus callosum. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti neurofilamentum, znázornění DAB. Varikózní zduření a zvlnění pozitivních axonů při použití protilátky proti NF-H. Obr. 24 - Pacient s expansí kontuzí mozku. Na elektronogramu dokumentujeme hromadění organel ve varikózně zduřelém axonu. Multivesikulární tělíska jsou dobře patrná. Ložiskové axonální poranění dokumentované v prvních 24-48 hodinách u pacienta s převažujícím fokálním nálezem není v rozporu s nárůstem NF-H v krvi (z průměrných hodnot 0,121 ng/l 1. až 3. den na hodnoty 0,506 ng/L 4. až 10. den). Obr. 25 - Pacient s expansí kontuzí mozku, na řezu zachycena mozková kůra. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti neurofilamentum (NF), znázornění DAB. Pozitivita NF v perikaryu neuronů je dobře patrná, barvení DAB.

#### 4.4.3. SROVNÁNÍ HODNOT PROTEINU S-100B, HODNOT HYPERFOSFORYLOVANÝCH NEUROFILAMENT A GFAP U DIFUZNÍCH A LOŽISKOVÝCH PORANĚNÍ MOZKU

U pacientů byly srovnávány hodnoty S-100B proteinu, GFAP a NF-H u pacientů s difuzním poraněním (n=10) a ložiskovým poraněním (n=23). Koncentrace S-100B byly vyšší u pacientů s ložiskovým poraněním mozku ( $1,72 \pm 0,4 \mu\text{g/l}$  vs.  $0,37 \pm 0,1 \mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ ) ve srovnání s pacienty s DAI v průběhu 10 denní hospitalizace. Nejvyšší koncentrace proteinu S-100B a GFAP byly zjištěny u skupiny s expansí kontuzemi mozku (S-100B  $4,21 \pm 1,1 \mu\text{g/l}$ ; GFAP  $8,58 \pm 2,4 \mu\text{g/l}$ ) 1.-3.den.

Vysoké hodnoty proteinu S-100B u expanzních kontuzí korelují s porušením astrogliálních perivaskulárních pochev s vymizením S-100 proteinu (**obr. 27**) a GFAP proteinu v astrogliálních výběžcích prokázané imunohistochemickým vyšetřením. Na druhou stranu u pacientů s DAI, u kterých byly naměřené nízké koncentrace proteinu S-100B nacházíme silnou imunopozitivitu proti S-100B proteinu (**Obr. 26**).

Nejvyšší hodnoty NF-H byly u pacientů s difuzním poraněním ( $0,60 \pm 0,18$  ng/l) 7.-10. den a u pacientů s neexpanzními kontuzemi mozku ( $0,63 \pm 0,2$  ng/l) 7.-10. den. Imunohistochemické vyšetření prokázalo pozitivitu s protilátkou proti NF-H v axonech i pacientů s DAI, ale rovněž i u pacientů s expanzními kontuzemi mozku (**obr. 23 – obr. 25**).

Tab.5

Ukazatel Dny	DAI			Ložiskové kontuzní poranění		
	Průměr	1-3	4-10	Průměr	1-3	4-10
<b>S-100B</b> μg/l	<b>0,37</b> ± <b>0,1</b>	<b>0,84</b> ± <b>0,4</b>	<b>0,13</b> ± <b>0,1</b>	<b>1,72</b> ± <b>0,4</b>	<b>2,43</b> ± <b>0,6</b>	<b>0,35</b> ± <b>0,2</b>
<b>NF</b> ng/l	<b>0,62</b> ± <b>0,14</b>	<b>0,26</b> ± <b>0,1</b>	<b>0,60</b> ± <b>0,18</b>	<b>0,13</b> ± <b>0,02</b>	<b>0,10</b> ± <b>0,01</b>	<b>0,41</b> ± <b>0,1</b>

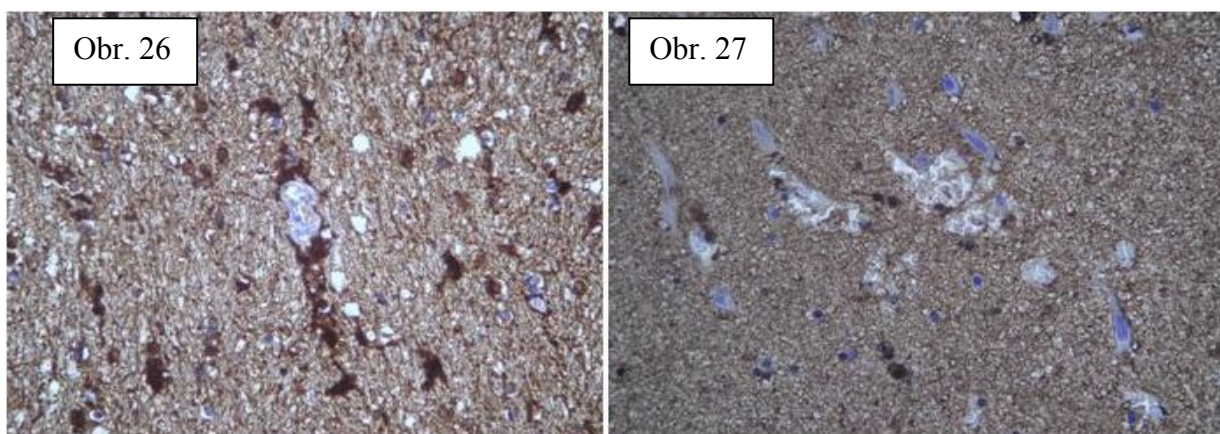
Tab.6

Ukazatel Dny	Expanzivní proces		Neexpanzivní proces	
	1-3	4-10	1-3	4-10
<b>S-100B</b> μg/l	<b>4,21 ± 1,1</b>	<b>0,19 ± 0,1</b>	<b>0,92 ± 0,3</b>	<b>0,47 ± 0,3</b>
<b>NF</b> ng/l	<b>0,12 ± 0,1</b>	<b>0,50 ± 0,2</b>	<b>0,06 ± 0,1</b>	<b>0,63 ± 0,2</b>

**Tab. 5 a 6** Pacienti s difuzním (DAI) a ložiskovým poraněním mozku - Časový vývoj hodnot jednotlivých ukazatelů (S-100B a NF-H) u ložiskových a difuzních



poranění (DAI) mozku (Tab.5). Průměr - všechny hodnoty ve skupině pacientů s DAI a ložiskovým poraněním mozku. Průměrné hodnoty (Mean  $\pm$  SEM). Hodnoty proteinu S-100B a NF-H (Tab.6) u expanzních a neexpanzních ložiskových poranění mozku. Hodnoty NF-H se zvýšily i obou skupin (DAI i u ložiskových poranění mozku), těmto výsledkům odpovídají i ultrastrukturální a iminohistochemická pozorování změn axonů, které byly variózně zduřelé jak u pacientů s DAI (viz obr.23), tak i u pacientů operovaných s expanzní kontuzí mozku (obr.24); axonální změny jsou u obou skupin.



**Obr. 26 a 27 Pacienti s diagnózou DAI a expanzní kontuzí mozku.**

*Imunohistochemické barvení s protilátkou proti S-100B proteinu - Na obr. 26 je patrná pozitivita protilátky proti S-100B proteinu astrogliálních perivaskulárních pochev u pacienta s diagnózou DAI, kde nebyly zjištěné klinické (mydriáza zornic) ani rentgenologické známky expanzního procesu (přesun středočarových struktur). Obr. 27 - Pacient s expanzní kontuzí mozku. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti S-100B proteinu, znázornění DAB. Imunohistochemická negativita astrogliálních perivaskulárních pochev v detailu expanzního ložiska; v okolí cév extravasace erytrocytů. Při srovnání obr. 26 a obr.27 je patrný rozdíl v expresi proteinu S-100B, která byla prokázána vazbou protilátky v mozkové tkáni pacienta s DAI a slabou pozitivitou ve tkáni u expanzní kontuze mozku.*



#### **4.5. HODNOTY ZÁNĚTLIVÝCH A RŮSTOVÝCH FAKTORŮ U LOŽISKOVÝCH PORANĚNÍ MOZKU**

Sérové koncentrace interleukinů, TNF- $\alpha$  a VEGF byly měřeny metodou miročipové Elisa na analyzátoru Evidence Investigator (Randox) u 18 pacientů v našem souboru. 18 pacientů s ložiskovým poraněním mozku bylo rozděleno do skupiny I (n=7) s expanzní kontuzí mozku a skupinu II (n=11) se stacionárními kontuzemi.

##### **4.5.1. HODNOTY INTERLEUKINŮ U PACIENTŮ S EXPANSNÍM PORANĚNÍM MOZKU**

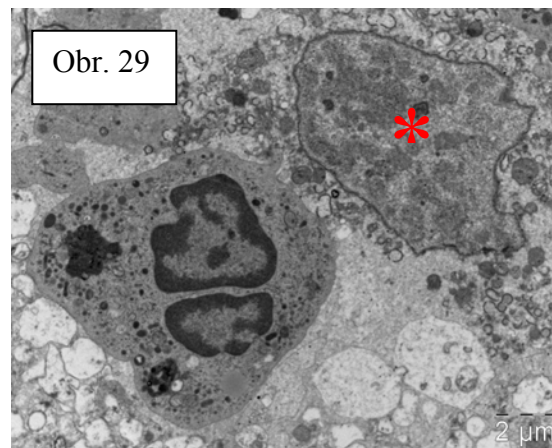
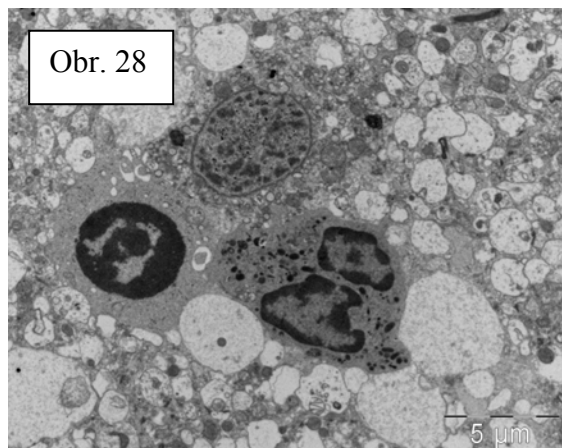
Biochemické vyšetření prokázalo vyšší průměrné koncentrace IL-6 ( $273,8 \pm 57,32$  ng/l vs.  $116,4 \pm 35,87$  ng/l,  $p < 0,03$ ) u skupiny pacientů s expanzní kontuzí mozku (skupina I) ve srovnání se skupinou II ne-expanzních kontuzí 1. až 6. den po přijetí.

U hodnot IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-1A, IL-1B a MCP1 nebyly nalezeny významné rozdíly mezi oběma skupinami (u všech ukazatelů  $p > 0,2$ ) 1.-6. den hospitalizace. Vstupní hodnoty u sledovaných markerů v prvním dni po poranění se mezi skupinami nelišily.

Rovněž u hodnot IFNG ( $13,13 \pm 3,4$  ng/l vs.  $7,94 \pm 2,1$  ng/l,  $p > 0,2$ ) nebyly rozdíly mezi skupinami 1. až 6. den po přijetí.

##### **4.5.1.1. IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA BUNĚK ZÁNĚTLIVÉ ODPOVĚDI**

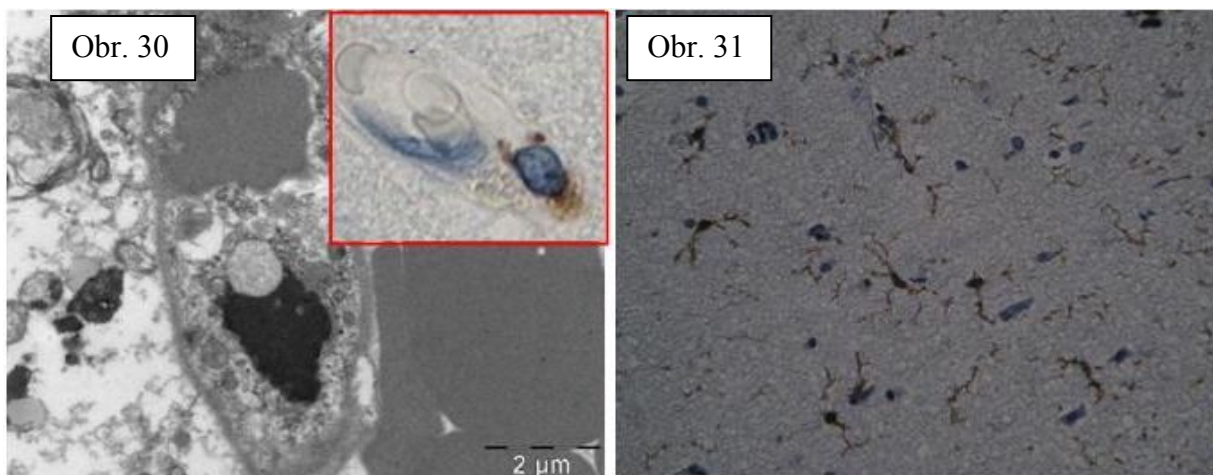
U pacientů s expanzními kontuzemi jsme nacházeli leukostazu a leukodiapedézu polymorfonukleárních leukocytů do tkáně. Aktivitu polymorfonukleárních leukocytů jsme pozorovali i ultrastrukturálně při procesu neuronofagie (**obr. 28 – obr. 29**).



**Obr. 28-29 Pacienti s ložiskovým poraněním mozku – Proces neuronofagie.** Myeloperoxidázová granula patrná v cytoplasmě polymorfonukleárního leukocyty a dobře patrné laločnaté jádro. Na obr.28 je v okolí zanikající buňky jak polymorfonukleární leukocyt, tak i buňka se sytě se barvícím kulatým jádrem, odpovídající i velikosti lymfocytu (reakce lymfocytů však má časově pozdější nástup- více hodin až dnů - než reakce polymorfonukleárních leukocytů na proces odumírání buňky); přikláníme se k názoru, že jde spíše o oligodendroglie. Na obr. 29 je patrná poškozená buňka- neuron (označený hvězdičkou) s rozpadem membrán a uvolněním organel do extracelulárního prostoru; tento proces je kontrolován polymorfonukleární leukocytem.

Analyzovali jsme aktivaci mikroglie pomocí imunohistochemické detekce proteinu exprimovaného ve fagozómech, který je označován jako receptor CD68 (**obr. 30**; detail). Ve tkáni expanzní kontuze byla již po 24 až 48 hodinách pozorovaná slabá, hrudkovitá pozitivita protilátky proti receptoru CD68 v perivaskulárním kompartmentu.

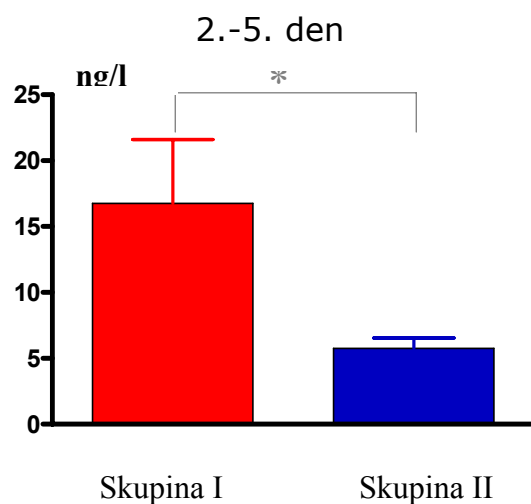
V dalších analýzách jsme pozorovali imunopozitivitu protilátky proti P-selektinu v buňkách připomínající gliové elementy (**obr. 31**). Imunopozitivita s protilátkou proti P-selektinu, zejména v perivaskulárních prostorách, je patomorfoloogickým korelátém imunitní reakce buněk mozkové tkáně na poranění.



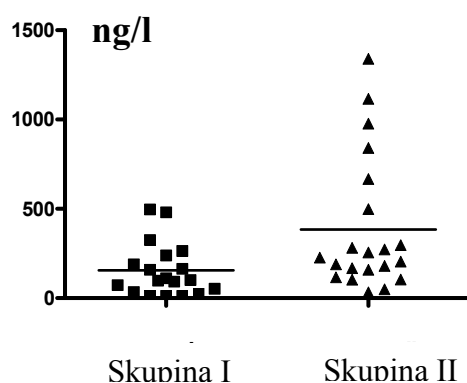
**Obr. 30-31 Pacienti s ložiskovým poraněním mozku** – Na obr. 30 byl v buňce (pericyt) zastižen telolyzozóm s cizorodým materiálem (elektronogram) u pacienta s expanzní kontuzí mozku. V lumen zastižen erytrocyt. Detail znázorňuje imunohistochemické barvení s protilátkou proti proteinu CD68, znázornění DAB. Pozitivita cytoplasmu buňky v okolí kapiláry. Na obr. 31 je excize expanzní kontuze u pacienta s ložiskovým poraněním mozku. Imunohistochemické barvení s protilátkou proti P-selektinu, znázornění DAB. V mozkové kůře jsou pozitivní keříčkovité struktury připomínající gliové elementy (mikroglie).

#### 4.5.2. **HODNOTY TNF, EGF A VEGF U PACIENTŮ S EXPAZNÍM PORANĚNÍM MOZKU**

U hodnot TNF $\alpha$  a EGF ( $p > 0,2$ ) jsme nezjistili významné rozdíly mezi skupinami první den po poranění. 2. až 5. den byly pozorovány rozdílné hodnoty TNF- $\alpha$  u expanzních kontuzí ( $16,77 \pm 4,8$  ng/l vs  $5,76 \pm 0,7$  ng/l,  $p < 0,05$ ) ve srovnání se stacionárními kontuzemi (graf. 5). Biochemické vyšetření prokázalo nižší hodnoty VEGF u skupiny pacientů s expanzní kontuzí mozku ( $155,4 \pm 33,89$  ng/l vs  $384,8 \pm 82,29$  ng/l,  $p < 0,02$ ) ve srovnání se skupinou stacionárních kontuzí 1. až 6.den po přijetí (graf. 6).



**Graf. 5 TNF-alfa u pacientů s ložiskovým poraněním mozku.** Vyšší hodnoty TNF- $\alpha$  byly u skupiny I (operovaných pacientů s expanzní kontuzí ve srovnání se skupinou II (konzervativně léčených stacionárních kontuzí) 2. až 5. den po přijetí ( $p < 0,05$ ).

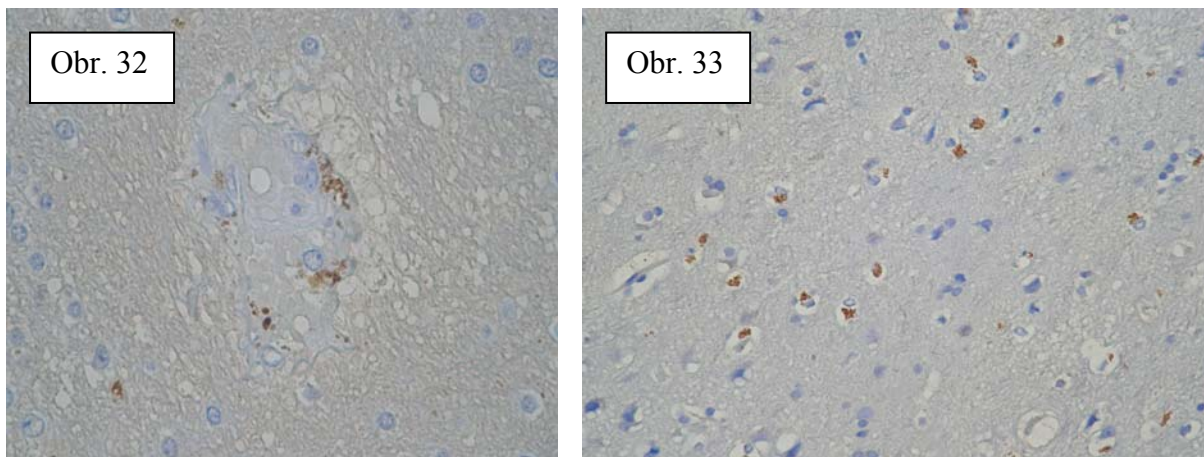


**Graf. 6 VEGF u pacientů s ložiskovým poraněním mozku.** Nižší hodnoty VEGF byly u skupiny I (operovaných pacientů s expanzní kontuzí; ( $155,4 \pm 33,89$  ng/l vs.  $384,8 \pm 82,29$  ng/l,  $p < 0,02$ ) ve srovnání se skupinou II (konzervativně léčených stacionárních kontuzí) 1. až 6. den po přijetí. Expres VEGF v mozkové tkáni pacientů s expanzní kontuzí byla potvrzena imunohistochemicky (viz obr. 32 a obr. 33).

#### **4.5.2.1. IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA EXPRESE ENDOTELIÁLNÍHO RŮSTOVÉHO FAKTORU**

U pacientů s expanzními kontuzemi mozku jsme pozorovali imunopozitivitu protilátky proti růstovému faktoru VEGF (**obr. 32 – obr.33**). Ve vzorcích expanzní kontuze byla již po 24 – 48 hodinách pozorovaná hrudkovitá pozitivita protilátky proti VEGF v perivaskulárním kompartmentu a v buňkách připomínající gliové elementy.

Syntéza VEGF je řízena produkcí faktoru HIF produkovaným při hypoxii; u expanzních kontuzích naše předešlé ultrastrukturální analýzy svědčí pro poškození endotelií.

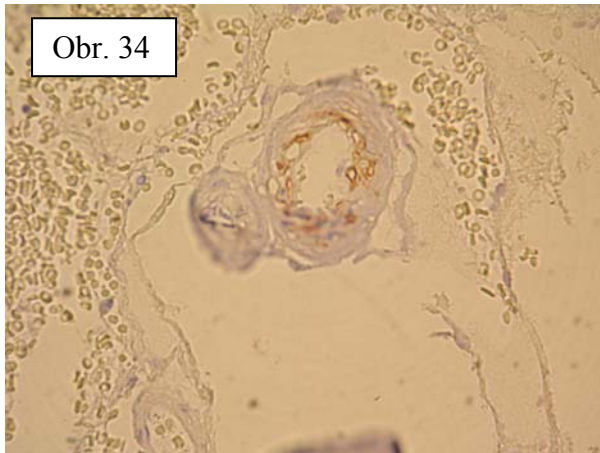


**Obr. 32 a obr. 33 - VEGF u pacientů s ložiskovým poraněním mozku.** - Na obrázcích je imunohistochemické barvení s protilátkou proti endoteliálnímu růstovému faktoru VEGF, zázornění DAB. Ve tkáni expanzní kontuze byla již po 24 až 48 hodinách pozorovaná hrudkovitá pozitivita protilátky anti-VEGF v perivaskulárním kompartmentu (obr. 32) a v gliových elementech v cytoplasmě (obr.33).

#### **4.5.2.2. PATOMORFOLOGICKÁ ANALÝZA POŠKOZENÍ ENDOTELIÍ KAPILÁR**

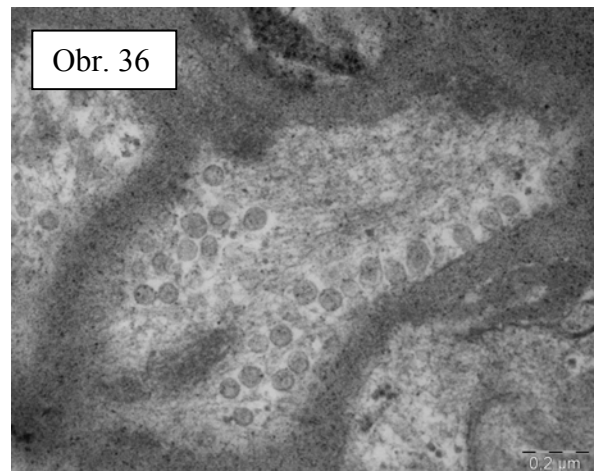
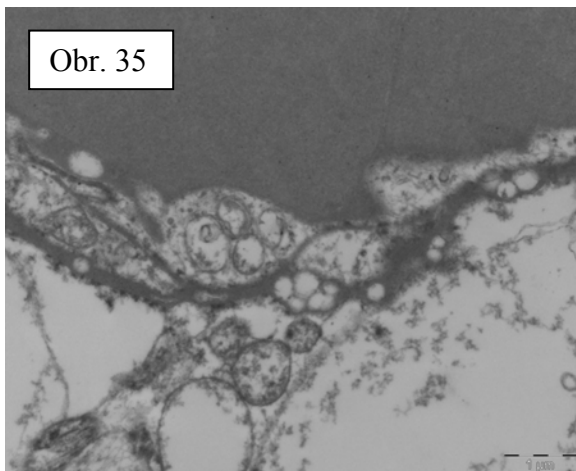
U pacientů s expanzními kontuzemi mozku (skupina I operovaných) jsme v kapilárách neprokázali proliferační aktivitu imunohistochemickou detekcí proliferačního antigenu Ki-67. Pozitivita protilátky proti Ki-67 byla pozorována v cévách středního kalibru, avšak pozitivita nebyla pozorována v endoteliích kapilárách.





**Obr. 34 - Pacient s ložiskovým poraněním mozku.** Na obrázku je imunohistochemické barvení s protilátkou proti proliferačnímu antigenu Ki-67, znázornění DAB. Imunopozitivita je patrná v endoteliích cévy středního kalibru. Perivaskulárně extravazáty erytrocytů.

Ultrastrukturální analýza potvrdila endoteliální změny u pacientů s expanzní kontuzí mozku. Byla pozorovaná vakuolizace endotelií i proces pinocytózy (viz **obr.35** a **obr.36**).



**Obr. 35 a 36 – Ultrastrukturální analýza u pacientů s ložiskovým poraněním mozku.** Na obrázcích je vakuolizace i proces pinocytózy pozorovaný v endoteliích již po 24 – 48 hodinách. Větší vakuoly v cytoplasmě endotelií na obr. 35 vznikly patrně dystrofií (suspektní hydropická vakuolizace) mitochondrií.

## 5. DISKUZE

V našich pozorováních, v krvi pacientů (odebrané v různých intervalech od přijetí po poranění do nemocnice), jsme měřením ukazatelů prokázali, že hodnoty neurobiochemických ukazatelů NSE, S-100B, a GFAP jsou vyšší u ložiskových než u difuzních poraněních (Vajtr et al., 2006, Kukačka et al., 2006, Vajtr et al., 2007, Kukačka et al., 2008, Vajtr et al., 2009). V textu dále diskutujeme pracovní předpoklad, že nejvyšší hodnoty neurobiochemických markerů v krvi u pacientů s expanzními kontuzemi mozku mohou být v příčinné souvislosti s morfologickými nálezy poškozené hematoencefalické bariéry u expanzních kontuzí mozkové tkáně.

Při morfologických pozorováních jsme získali data (zejména změny endotelií, u kterých byla zaznamenána zvýšená pinocytotická aktivita až známky poškození endotelií, charakterizované vytvářením menších až středních vakuol a vymizením organel), která jsme interpretovali jako patomorfologický korelát poškození hematoencefalické bariéry, která se tímto mechanismem stává zvýšeně propustná pro větší molekuly, mezi které řadíme i neurobiochemické markery uvolňované do krve při poškození nervových struktur. Imunohistochemické a ultrastrukturální údaje o změnách další ze složek hematoencefalické bariéry, mezi které patří zejména astroglie, tyto předpoklady potvrdili. Při srovnávacích imunohistochemických analýzách exprese proteinů cytoskeletu (vinkulinu, vimentinu, GFAP) buňkami hematoencefalické bariéry a proteinu astrogliálních buněk S-100B jsme pozorovali, že u expanzních kontuzích mozku nebyly proteiny cytoskeletu v endoteliích a S-100B v astroglii imunopozitivní ve srovnání se zřetelnou imunopozitivitou protilátek proti těmto proteinům ve tkáních mozku pacientů, kteří zemřeli v příčinné souvislosti s utrpěným difuzním axonálním poraněním.

Ve shodě s naším pracovním předpokladem (marker poškození axonů tj. NF-H bude vyšší u DAI než u kontuzí mozku) se statisticky prokázalo, že ukazatel poškození axonů tzv. hyperfosforylovaná neurofilamenta jsou ve vyšších koncentracích u difuzního axonálního poranění než u ložiskového poranění mozku. Zajímavá byla pozorování, že koncentrace NF-H mají vzestupný trend i u pacientů s ložiskovým poraněním mozku. Tato pozorování byla doplněna morfologickou analýzou expanzních kontuzních ložisek mozku, ve kterých byly zjištěny další skutečnosti o axonálních změnách v okolí expanzních kontuzí, zejména hromadění multivesikálních tělísek ve varikosně zduřených axonech a průkaz imunohistochemické positivity protilátek proti neurofilamentům v perikariu neuronů i v axonech, které níže diskutujeme.

Nepotvrdili jsme hypotézu, že zánětliví ukazatelé by měli být ve vyšších koncentracích u pacientů s akutním a život ohrožujícím expanzním ložiskovým procesem, při srovnání s pacienty se stacionárně se vyvíjejícími kontuzemi nebo pacienty s převažujícím difuzním postižením bílé hmoty. Nebyly zjištěné rozdíly mezi jednotlivými skupinami pacientů v hodnotách interleukinů IL-1, 2, 4, 8, 10 v krvi, pouze hodnoty interleukinu 6 byly vyšší u pacientů s expanzními kontuzemi ve srovnání s neexpanzními kontuzemi.

U pacientů s nižšími koncentracemi neurobiochemických ukazatelů (NSE a S-100B) v krvi byl výsledný klinický stav (monitorovaný pomocí GCS při přijetí do nemocnice po poranění a po 10 dnech léčby) příznivější a pacienti byli po 10 dnech v kategorii tzv. lehkého poranění s hodnotami GCS 13 až 15 bodů. Naopak, nejvyšší hodnoty NSE a S-100B byly pozorovány u pacientů se smrtí mozku, kde byl pozorován i další fenomén, při kterém došlo ke zvýšení koncentrací NSE a S-100B 2. až 3. den po poranění. Tato pozorovaná diskutuje s podobnými výsledky dalších autorů (*Vos et al., 2004, Herrmann et al., 2000, Herrmann et al., 2001*).



Dále jsme podali přehled používaných biochemických markerů poranění mozku; jejich význam při určení závažnosti poranění uváděný v literatuře je diskutován v Příloze č.1 a 2.

Skupina pacientů s ložiskovým a difuzním primárním poraněním mozku byla podrobně popsána v Metodice a Přílohách č. 3, 4, 5, 6. Pacienti byli rozděleni do skupiny s rozvojem expanzní kontuze, z těchto byla část pacientů řešena neurochirurgickým výkonem; skupiny pacientů se stacionárními kontuzemi mozku, které nepůsobí nitrolební expanzi a pacienti s diagnózou DAI.

Význam rizikových faktorů v patofyziologii sekundárního poranění mozku je popsán v klinických studiích (*Vos et al., 2004, Herrmann et al., 2000, Herrmann et al., 2001*). V našich analýzách jsme pozorovali u pacientů, kteří zemřeli, zvýšení neurobiochemických markerů NSE a S-100B. U všech těchto pacientů byl prokázán jeden nebo více rizikových faktorů. Význam rizikových faktorů u pacientů s diagnózou smrti mozku byl diskutován v článku uvedeného jako Příloha č.3. Rozvoj sekundárního poškození mozku po poranění je přisuzován působení rizikových faktorů, které se podílejí na spouštění patofyziologických reakcí. Sekundární poranění mozku tak prokazatelně zhoršuje výslednou kvalitu života (outcome) pacientů. V podobné studii Vos a kol. prokázal, že sérové hodnoty S-100B a GFAP byly vyšší u skupiny pacientů s hypoxií (3,2 vs. 1,8 µg/l pro S100B a 1,9 vs. 1,9 µg/l pro GFAP) a u hypotenze (3,1 vs. 1,9 µg/l pro S100B a 2,5 vs. 1,9 µg/l pro GFAP) ve srovnání s pacienty bez rizikových faktorů při přijetí do nemocnice (*Vos et al., 2004*). U pacientů našeho souboru, kde na místě poranění byly dokumentované lékařem RZS rizikové faktory (aspirace žaludečního obsahu, hypotenze, nebo zjištěna srdeční zástava s úspěšnou resuscitací) jsme nacházeli průměrné hodnoty NSE  $76,95 \pm 22,1$  µg/l a S-100B  $3,81 \pm 1,7$  µg/l. Herrmann a kol. (*Herrmann et al., 2000, Herrmann et al., 2001*) popsal, že u pacientů se zvýšeným ICP jsou nejvyšší hodnoty NSE a S-100B 49-72 hodin po poranění. Po 72

hodinách koncentrace NSE klesla k hladinám nalezeným v prvních hodinách po poranění, zatímco hodnoty S 100B zůstaly zvýšené. V našem souboru pacientů, kteří měli při hospitalizaci nárůst intrakraniálního tlaku nad 10-20 torrů, byly průměrné hodnoty NSE  $64,19 \pm 20,4$   $\mu\text{g/l}$  a proteinu S-100B  $3,74 \pm 1,2$   $\mu\text{g/l}$ . Rizikové faktory mohou vést k propustnosti (dysrupci) BBB vlivem hypoxie ve druhé vlně při bifázickém otevření BBB. Otevření BBB je popisováno ve dvou vlnách (bifázické), je spojené s vytvářením vazogenního edému. První otevření je v souvislosti s reaktivní hyperemií. Sekundární otevření BBB je způsobené mechanismem ischemického sekundárního poškození (Klatzo, 1987). Nálezy na hematoencefalické bariéře u pacientů s rozvojem expanzního edému diskutujeme níže.

Vztah mezi biochemickými markery a klinickým skorovacím systémem *Glasgow coma scale* byl diskutován v Příloze č.3 a 4. V řadě studií byly uváděny vysoké sérové hladiny S-100B a NSE nepřímo úměrné ke GCS (ukazatel stavu vědomí a závažnosti poranění) a CT-nálezy (Vos et al., 2004); vstupní hodnoty mají podle řady autorů (Woertgen et al., 1997, Pleines et al., 2001) význam k odhadu dlouhodobého výsledku léčby (outcome), protože hodnoty zaznamenané po přijetí v průběhu několika dnů poklesnou k referenčnímu intervalu (Herrmann et al., 2001).

Ve skupině pacientů, u které byly sledovány změny GCS skóre v průběhu 10 dnů hospitalizace bylo zjištěno, že pacienti s expanzní kontuzí mozku měli GCS skóre po 10 dnech stále nižší než 13 bodů. Za expanzní proces je možné považovat i generalizovaný edém celé hemisféry (celkem 4 pacienti), kde však neurochirurgické řešení nebylo možné. Ve skupině pacientů s expanzním nitrolebním procesem, kde GCS skóre bylo po 10 dnech hospitalizace stále nižší než 13 bodů, zemřelo celkem 5 pacientů. Podobné výsledky publikoval Herrman a kol. v souboru pacientů s těžkým a středně těžkým poraněním (GCS skóre nižší než 13), u kterých byly pozorovány vyšší hodnoty NSE a proteinu

S-100B ve srovnání s pacienty s lehčím traumatem a s GCS skóre 13-15 bodů (*Herrmann et al., 2001*). V našem souboru byli ve skupině se zlepšením GCS skóre na 13-15 bodů po 10 dnech hospitalizace 3 pacienti operovaní pro expanzní kontuzi mozku. V této skupině nedošlo k úmrtí žádného pacienta v průběhu hospitalizace.

Popsali jsme kinetiku změn sérových hladin biochemických ukazatelů u ložiskového a difuzního poranění mozku, která byla diskutována v Příloze č. 3, 4, 6. Herrmann a spolupracovníci publikovali studii (*Herrmann et al., 2000*), ve které sledovali hodnoty proteinu S-100B a NSE u pacientů s různým nálezem v zobrazení CT a s různě závažným poraněním (lehké, střední a těžké poranění). U obou ukazatelů byl zjištěn významný pokles koncentrací ve čtyřdenním intervalu. Hodnoty S-100B u pacientů s lehkým poraněním (vstupní GCS nad 13 bodů) průběžně klesly na fyziologické hodnoty, na druhé straně koncentrace S-100B u pacientů se středním až těžkým poraněním mozku zůstaly nezměněné. Rozdíly mezi skupinami byly pozorovány 73-96 hodin po poranění hlavy. Nejvýznamnější rozdíly hladin NSE mezi skupinami byly zjištěny během prvních 24 hodin po nehodě. U pacientů se závažným poraněním byly zaznamenány výrazně vyšší a delší delší dobu přetrvávající koncentrace obou ukazatelů. Hodnoty S-100B a NSE korelovaly s GCS skóre zjištěným na místě nehody. Herrmann a spol. také zjistil, že pacienti se závažným difuzním poraněním a pacienti s ložiskovou lezí měli významně vyšší hodnoty S-100B a NSE v porovnání s pacienty s difuzním poraněním mírného stupně. U pacientů se známkami difuzního poranění axonů byly zjištěny vrcholy koncentrace obou proteinů třetí den po poranění následované poklesem 4. den po poranění. U pacientů s pohmožděním mozkové kůry bylo zjištěno maximum koncentrací NSE v prvních hodinách po poranění, zatímco nejvyšší hodnoty koncentrace proteinu S-100B bylo dosaženo až 25-48 hodin po poranění. Hodnoty koncentrace S-100B a NSE byly ve významném vztahu k objemu ložiska pohmoždění. U pacientů se

známkami zvýšeného ICP bylo zjištěno setrvalé zvýšení koncentrací obou ukazatelů s nejvyšší koncentrací 49-72 hodin po poranění. Koncentrace NSE klesla k hladinám nalezeným v prvních hodinách po poranění, zatímco S-100B hodnoty zůstaly zvýšené.

Z našich analýz (uvedených rovněž v Příloze č.3) vyplývá, že koncentrace NSE a proteinu S-100B při 10 denní hospitalizaci klesají v průměru od prvního dne po úrazu až k referenčnímu intervalu a to u obou sledovaných ukazatelů. Při sledování rychlosti poklesu NSE a S-100B během prvních dnů po přijetí lze rozlišit pacienty, u kterých oba sledované markery 1.-3. den klesají z vysokých hodnot k referenčnímu rozmezí hodnot. V našem souboru se jednalo o pacienty přežívající po dobu delší než 10 dnů. U malého procenta pacientů se hodnoty sledovaných markerů zvýšily od 1. do 3. dne. Toto zvýšení koncentrací bylo pozorováno u pacientů, u kterých došlo k malignímu otoku mozku a ke smrti mozku a v anamnéze byly uvedeny některé z rizikových faktorů. Herrmann a kol. popsal kazuistiku pacienta, který zemřel 76 hodin po přijetí. V této studii autoři sledovali hodnoty proteinu S-100B a NSE u pacientů s různě závažným poraněním mozku (lehké, střední a těžké poranění). Koncentrace proteinu S-100B u tohoto pacienta se zvýšila z 1,5 µg/l (24 hodin) na 13,2 µg/l (48 hodin) a 10,5 µg/l (72 hodin) a koncentrace NSE se zvýšila z 11,9 µg/l na 20,3 µg/l a 29,8 µg/l. V naší studii jsme pozorovali obdobný vzestup průměrných hodnot NSE a S-100B (2.-3.den na hodnoty 86,95 µg/l u NSE a u proteinu S-100B z 3,41 µg/l na 5,8 µg/l) u 5 pacientů bez zlepšení GCS po 10 dnech (v Příloze č.3 byly pacienti zařazeni do skupiny II), kteří zemřeli. U jednoho pacienta, který zemřel bylo v autoptickém obraze (viz obr.13 na str. 64; fotodokumentace krvácení do mozkového kmene) pozorováno posunové krvácení do mozkového kmene. Toto pozorování lze vysvětlit tak, že nitromozkový přetlak a tvorba otlakových konusů, které jsou příčinou vysoké mortality pacientů po kraniocerebrálním poranění, způsobí vytvořením temporálního konusu

ischemii kmene, při které vznikají drobná krvácení do mozkového kmene. Při tentoriální herniaci vznikají drobné vícečetné hemorhagie (posunová krvácení) nebo i infarkty v mozkovém kmeni.

Zavedli jsme stanovení zánětlivého markeru interleukinu-6 na analyzátoru DPC Immulite soupravou Immulite IL-6. Souprava je určena ke stanovení interleukinu-6 v séru. Při zjišťování kinetiky zánětlivého markeru během hospitalizace pro poranění mozku jsme prokázali, že skupina pacientů s expanzními kontuzemi měla vyšší hodnoty IL-6 ve srovnání s pacienty bez expanzního procesu, kteří nebyli operováni. Podle některých prací mají vysoké hodnoty IL-6 protektivní roli při poškození BBB. Včasné neurochirurgické odstranění expanzní kontuze tak může zabránit rozvoji biochemické kaskády reakcí, které spouští sekundární poranění mozku. Holmin a kol. ve svých studiích dokazoval hypotézu, že poškození BBB je zčásti způsobeno aktivací prozánětlivých faktorů (*Holmin et al., 1998, Holmin and Hojeberg, 2004*). Aktivace prozánětlivé kaskády může přispívat ke tkáňovému poškození, které v konečném důsledku vede i k poškození BBB po traumatu hlavy. Výrazná exprese prozánětlivých cytokinů (IL-1-beta a IL-6) byla pozorována do 24 hodin po úraze mozku (*Holmin et al., 1998, Holmin and Hojeberg, 2004*). Při pozorování kinetiky změn koncentrací jednotlivých ukazatelů mezi sebou (ukazatele poranění NSE a S-100B a ukazatel zánětu IL-6), jsme zjistili, že hodnoty IL-6 po operaci vzrostly (průměrné hodnoty 1.-3. den byly  $302,2 \pm 119,9$  ng/l a 4.-6. den byly hodnoty  $408,5 \pm 280,8$  ng/l) zatímco hodnoty NSE a S-100B po operaci expanzního ložiska u pacientů se 4.-6. den snížily. Naše data monitorující zvýšení hladin IL-6 jsou ve shodě se závěry autorů, kteří prokázali expresi pro-zánětlivých cytokinů interleukinu (IL)-1-beta, a IL-6 u pacientů, kteří byli podrobeni operačnímu odstranění kontuzních ložisek do 24-48 hodin po traumatu (*Holmin and Hojeberg, 2004*). V naší práci jsme dokumentovali rozvíjející se zánětlivou odpověď po poranění hlavy, která byla patrná v mikroskopickém

zobrazení. Pozorovali jsme přichycení a nabalení polymorfonukleárních leukocytů na stěnu cév i průnik PMN do neuropilu. Neuronofagie byla pozorována i v ultrastrukturálním obraze, kde bylo patrné narušení buněčné membrány polymorfonukleárním leukocytem v místě kde byl neuron obklopen oligodendroglíí (satelitní gliosa). Zánětlivá odpověď je úzce spojena s reparativní procesy, které jsou aktivované v průběhu prvních dnů po poranění s úpravou funkce do 6 dnů (Hamm et al., 2004) a mohou být provázené změněnou produkcí markerů zánětu (cytokinů). Reparativní procesy poškozené hematoencefalické bariéry u expanzních procesů mohou být v příčinné souvislosti s imunitní reakcí retikuloendotelového systému a změnami hladin interleukinů, TNF $\alpha$  a VEGF. Vyšší hodnoty IL-6 byly u pacientů s expanzním ložiskovým procesem 1. až 6.den po přijetí ve srovnání se skupinou pacientů se stacionárním vývojem ložiskového poranění ( $273,8 \pm 57,32$  ng/l vs  $116,4 \pm 35,87$  ng/l,  $p < 0,03$ ).

V naší studii jsme dále zjistili vyšší hodnoty S-100B a markeru GFAP u ložiskového poranění mozku ve srovnání s difuzním axonálním poraněním. U 37 vyšetřených pacientů byly hodnoty S-100B a GFAP v séru vyšší u skupiny pacientů s ložiskovým poraněním mozku ( $1,72 \pm 0,4$  vs.  $0,37 \pm 0,1$   $\mu$ g/l pro S-100B,  $p < 0,05$  a  $4,21 \pm 1,1$  vs.  $0,49 \pm 0,3$   $\mu$ g/l pro GFAP,  $p < 0,05$ ) v porovnání se skupinou pacientů s difuzním axonálním poraněním mozku. Hodnoty S-100B a GFAP v séru se zvýšily v prvních 3 dnech u pacientů s ložiskovým poraněním mozku. Od 4. do 10. dne byl u těchto pacientů pozorován významný pokles obou ukazatelů.

Zavedli jsme imunohistochemickou metodu (ELISA) pro stanovení neurofilament, která patří mezi nové markery difuzního axonálního poranění mozku. Porovnali jsme hladiny NSE, S-100B a NF-H v séru. Průměrné hodnoty neurofilament v séru (NF-H) byly vyšší u pacientů s DAI než u pacientů s ložiskovým poraněním ( $0,625 \pm 0,14$  vs.  $0,139 \pm 0,02$  ng/l,  $p < 0,05$ ) při 10. denní hospitalizaci. U obou skupin

(ložiskové poranění a DAI) jsme pozorovali zvýšení hodnot NF-H od 4. do 10. dne hospitalizace po poranění. Hodnoty se zvýšily z koncentrace 0,263 ng/l až na koncentrace 1,325 ng/l u pacientů s DAI a z koncentrace 0,103 ng/l na 1,108 ng/l u pacientů s ložiskovým poraněním mozku.

Ultrastrukturální morfologické změny hematoencefalické bariery u expanzních kontuzí a imunohistochemické rozdíly v expresi proteinů u pacientů s difuzním a ložiskovým poraněním mozku jsou diskutovány v Příloze č. 6.

Při morfologickém vyšetření bioptického materiálu u našich pacientů byly v kontuzním ložisku nalezeny zduřelé denzní i světlé mitochondrie v gangliových buňkách. U pacientů s horší prognózou (GCS skóre po 10 dnech bylo nižší než 13 bodů) byly mitochondrie v některých buňkách výrazně deformované. Mitochondrie mohou být významným iniciátorem procesů apoptózy v mozku. Ultrastrukturální studie poškození mitochondrií po ischemii a anoxii ukázaly, že mitochondrie podléhají postupné změně struktury a funkcí a přispívají k buněčné smrti (*Castejon and de Castejon, 2004*). Vznik apoptozómu uvolněním faktorů (Apaf-1) z mitochondrií, který aktivuje kaspázy v procesu apoptózy je v současnosti intenzivně studován (*Lau et al., 2006, Ashraf et al., 2007*). Efekt cyklosporinu A (inhibitor mitochondriálního póru (PTP)), který váže cyklofilin D a brání otevření membránového nosiče nukleotidu adeninu (*Sullivan et al., 2005, Mbye et al., 2008*) byl pozorován v experimentálním modelu korového ložiskového poranění mozku příznivý. V okolí cév jsme našli perivaskulární krvácení a průnik proteinů do Virchowova-Robinova prostoru. Huang a kol. prokázal, že infuze erytrocytů do mozku způsobuje akutní mozkové poškození (*Huang et al., 2002*). Intracerebrální krvácení může vést k oxidativnímu poškození mozkové tkáně a uvolněné železo z erytrocytů může přispět k utváření volných kyslíkových radikálů (*Doyle et al., 2008, Slemmer et al., 2008*), které mohou poškozovat membrány

buněk při nedostatku antioxidantů např. metalothioneinu (diskuze v Příloze č.4). Z našich morfologických analýz dále vyplývá, že funkce pericytů byla zachována spolu s přítomností telolyzozomů a pozitivitou proti receptoru CD68. Schopnost fagocytózy v perivaskulárním kompartmentu byla dokumentována přítomností telolyzozomů s natráveným materiálem. Při imunohistochemické detekci se protilátka proti CD68 váže na epitop PG M1 lokalizovaný na membránách makrofágů a v mozkové tkáni na mikroglia (*Oehmichen et al., 1999*). Pericyty podporují funkci hematoencefalické bariéry při poškození astroglie. Hayashi a spol. prokázali v experimentu vztah mezi endoteliemi, pericyty a astroglialními výběžky jako složkami hematoencefalické bariéry. Hypoxie v jedné vrstvě endotelových buněk vedla k disrupci BBB, oproti tomu dvojí vrstva endotelií a pericytů si i za hypoxických podmínek udržela těsné spojení při minimální dysfunkci BBB (*Hayashi et al., 2004*). V astroglialních výběžcích byla u našich pacientů zjištěna přítomnost proteinů, avšak ve výběžcích byly pozorovány známky cytotoxického edému. Jádra a jádérka gliových elementů nevykazovaly patologické znaky. V endoteliích byla v našem souboru nalezena jádra a invaginace membrány. Také jsme prokázali přichycení neutrofilních leukocytů na endotelie a jejich vycestování do tkáně. Při ultrastrukturálním vyšetření endotelií pacientů s traumatickou kontuzí mozku byly pozorované známky intracelulárního edému, těsná spojení byla nepoškozená; pinocytická aktivita endotelií byla zvýšená a astrocytární výběžky byly zduřené, v makrofázích byly pozorovány objemné lysozomy (*Vaz et al., 1997*).

Podle předpokladu některých autorů (*Kapural et al., 2002*) je protein S-100B považován za specifický marker porušení BBB. V našich studiích (diskuze v Příloze č.6) jsme potvrdili, že vyšší hladiny proteinu S-100B jsou ve shodě s vystupňovanými patologickými ultrastrukturálními změnami BBB (endoteliálních buněk a astroglie) u expanzních kontuzí mozku.



Při imunohistochemickém vyšetření byly nalezeny rozdíly v expresi proteinů, které jsou součástí BBB (vimentin, S-100B, vinkulin, GFAP, NF-H) u pacientů s DAI (bez známek expanzního procesu) a u pacientů s expanzními kontuzemi mozku. Imunohistochemické vyšetření prokázalo výraznou pozitivitu protilátek proti GFAP, vimentinu, proteinu S-100B a vinkulinu v perivaskulárním prostoru lokalizovanou do astroglálních zakončení a endotelií pacientů s DAI a slabou imunopozitivitu až vymizení imunoreaktivity u pacientů s expanzními kontuzemi ve vzorcích kontuzní tkáně odebraných při operaci do 24-48 hodin po přijetí. Imunohistochemické vyšetření s protilátkami proti neurofilamentům prokázalo imunoreaktivitu v bílé hmotě u obou skupin, výraznější pozitivita byla nalezena u pacientů s DAI. Ultrastrukturálním vyšetřením byly prokázány varikózní změny axonů a hromadění multivesikálních tělísek i u pacientů s expanzními kontuzemi.

## 6. ZÁVĚR

V naší práci jsme podali přehled současného stavu znalostí o významu biochemických ukazatelů závažnosti poranění mozku a zhodnotili jsme jejich význam pro klinickou praxi. V úvodu jsme také podali přehled patofyziologických a patobiochemických pochodů probíhajících v poraněné mozkové tkáni u kontuzí mozku a difuzního axonálního poranění.

Získali jsme soubor pacientů s ložiskovým a difuzním (primárním) poraněním mozku, které jsme rozčlenili do skupiny s rozvojem expanzní kontuze a skupiny pacientů se stacionárními kontuzemi mozku, které nepůsobí nitrolební expanzi.

Zavedli jsme metodu pro stanovení neurofilament o vysoké molekulové hmotnosti a stanovení fibrilárního kyselého proteinu GFAP enzymovou imunoanalýzou (ELISA) a markeru zánětu interleukinu-6 u pacientů s poraněním mozku chemiluminiscenční imunochemickou metodou.

Potvrdili jsme pozorování dalších autorů, že rizikové faktory a nízká vstupní hodnota GCS u pacientů korelují s vyššími hodnotami markerů poranění mozku (NSE a S-100B). V našem souboru pacientů, kde na místě poranění byly dokumentované lékařem Rychlé Záchrané Služby rizikové faktory (aspirace žaludečního obsahu, hypotense, nebo zjištěna srdeční zástava s úspěšnou resuscitací) jsme nacházeli průměrné hodnoty NSE  $76,95 \pm 22,1 \mu\text{g/l}$  a S-100B  $3,81 \pm 1,70 \mu\text{g/l}$ . U pacientů s klinickým zlepšením a úpravou hodnot GCS v průběhu 10 dnů od přijetí na hodnoty 13-15 (tyto hodnoty jsou považované za lehké poranění mozku) byly hodnoty NSE (33,53 vs. 61,76  $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ ) a proteinu S-100B (0,61 vs. 4,45  $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ ) nižší 1.-3. den po přijetí ve srovnání s hodnotami u pacientů bez zlepšení skóre GCS. Od 4. do 10. dne nebyly mezi oběma soubory statistické rozdíly. U 5 pacientů s rizikovými faktory jsme dále pozorovali skutečnost, že hodnoty sledovaných markerů se zvýšily od 1. do 3. dne po poranění

mozku, rozvinul se maligní otok mozku a došlo ke smrti mozku; u 5 pacientů, kteří zemřeli bez zlepšení GCS jsme pozorovali zvýšení průměrných hodnot NSE 2.-3. den na hodnoty 86,95 µg/l; u proteinu S-100B z 3,41 µg/l na 5,8 µg/l. Popsali jsme kinetiku změn hodnot biochemických ukazatelů u ložiskového a difuzního poranění mozku v průběhu hospitalizace pacientů. Pokud jsme porovnávali koncentrace proteinu S-100B u ložiskových a difuzních poranění mozku, zjistili jsme, že průměrná hodnota proteinu S-100B byla vyšší u pacientů s ložiskovým TBI ve srovnání s DAI ( $1,72 \pm 0,4$  µg/l vs.  $0,37 \pm 0,1$  µg/l,  $p < 0,05$ ) v průběhu 10 denní hospitalizace. Nejvyšší koncentrace proteinu S-100B ( $4,21 \pm 1,1$  µg/l) byly pozorovány u pacientů s expanzními lézemi mozku. Při sledování kinetiky zánětlivých markerů jsme prokázali, že skupina pacientů s expanzními kontuzemi měla vyšší hodnoty IL-6 ve srovnání s pacienty bez expanzního procesu, kteří nebyli operováni. Pokud jsme porovnávali kinetiku vývoje jednotlivých ukazatelů mezi sebou (ukazatele poranění NSE a S-100B a ukazatel zánětu IL-6), zjistili jsme, že hodnoty IL-6 se po operaci zvýšily (průměrné hodnoty 1.-3. den byly  $302,2 \pm 119,9$  ng/l a 4.-6. den byly hodnoty  $408,5 \pm 280,8$  ng/l). Na druhou stranu koncentrace NSE a proteinu S-100B po operaci expanzního ložiska u pacientů 4.-6. den snížily. Při měření koncentrací dalších markerů jsme zjistili, že průměrná hodnota neurofilament NF-H byla vyšší u DAI ve srovnání s ložiskovým TBI ( $0,625 \pm 0,14$  vs  $0,139 \pm 0,02$  ng/l,  $p < 0,05$ ) v průběhu 10 denní hospitalizace. Hladiny NF-H se zvýšily 4. až 10. den a to jak u skupiny pacientů s DAI, tak i u skupiny pacientů s ložiskovým poraněním mozku. Průměrná hodnota GFAP byla vyšší u pacientů s ložiskovým TBI ve srovnání s DAI ( $4,21 \pm 1,1$  vs  $0,49 \pm 0,3$  µg/l,  $p < 0,002$ ) v průběhu 10 denní hospitalizace. Hladiny GFAP se snížily od 1.-3. dne do 4.-10. dne u obou skupin ( $8,34 \pm 1,9$  na  $1,12 \pm 0,6$  µg/l,  $p < 0,003$ ).

Analyzovali jsme poškození BBB u ložiskového a difuzního poranění mozku metodami imunohistochemie a elektronové mikroskopie.

V časném stádiu (pacienti operovaní do 24-48 hodin po přijetí) bylo prokázáno ultrastrukturálním vyšetřením astrogliálních buněk vymizení proteinů v perivaskulárních gliálních pochvách, edém astrogliálních buněk, ztráta fibrilárních proteinů byla potvrzena i imunohistochemicky, byly pozorovány glykogenem přeplněné perivaskulární gliální pochvy, ale i ztráta glykogenu v těchto zakončeních. Při ultrastrukturálním vyšetření endotelií pacientů s traumatickou kontuzí mozku byly pozorované známky intracelulárního edému, těsná spojení byla nepoškozená, pouze na některých místech jsme pozorovali vymizení proteinů v těsných spojeních, pinocytotická aktivita endotelií byla zvýšená, nacházeli jsme četné intracytoplasmatické vakuoly a výběžky astroglie byly zduřené. V našich morfologických analýzách expanzí ložisek mozku byly zjištěny rozdíly v imunohistochemické pozitivitě proteinů u ložiskového poranění a u difuzního poranění mozku. Imunohistochemické vyšetření prokázalo vymizení GFAP, vimentinu v oblastech expanzních kontuzí u pacientů operovaných do 28-48 hodin ve srovnání se silnou imunoreaktivitou protilátek proti GFAP a vimentinu v astrogliálních perivaskulárních zakončeních u pacientů s DAI. Imunohistochemické vyšetření prokázalo silnou imunoreaktivitu dalších cytoskeletálních proteinů vinculinu a tubulinu v cévách a S-100 pozitivitu v astrogliálních zakončeních u pacientů s DAI ve srovnání se slabým značením v expanzních kontuzích. Imunohistochemické vyšetření s protilátkami proti neurofilamentům prokázalo imunoreaktivitu v bílé hmotě u obou skupin, výraznější pozitivita byla zjištěna u pacientů s DAI.

## 7. SOUHRN

**Úvod:** Traumatické poranění mozku (TBI) je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality. Vyléčení a uzdravení pacientů je závislé na typu, závažnosti a lokalizaci poranění, ischemii a zánětlivé odpovědi po traumatu mozku. Jednou z nečastějších příčin smrti je nárůst nitromozkového tlaku, a postupný nekontrolovatelný otok mozku u pacientů. TBI spouští řadu reakcí jejichž výsledkem jsou změny astroglíí a proteinů cytoskeletu u ložiskového a difuzního poranění. Kontuze mozku může být dynamická a expanzivní. Bylo prokázáno, že expanzní kontuze mozku je způsobena poškozením mozkové tkáně, zejména hematoencefalické bariéry (BBB). Poškození BBB je zčásti zapříčiněna aktivací prozánětlivých faktorů, a protektivní kaskáda zahrnuje uvolnění IL-6 z glie. Proteiny uvolňované do krevního oběhu z poškozených tkání v průběhu primárního nebo sekundárního poranění mozku mohou být využity jako ukazatelé poškození gliových a gangliových buněk (NSE, S-100B, GFAP a NF-H). S-100B astrogliální protein je ukazatel TBI a ve studiích byl prokázán jeho význam jako markeru poškození BBB po poranění mozku. GFAP je strukturální gliální protein, NSE je protein neuronální. Sérové NF-H mohou monitorovat disrupci a narušení axonů u pacientů s DAI. **Cíl:** Cílem této práce bylo podat přehled o významu biochemických ukazatelů závažnosti poranění mozku pro klinickou diagnostiku u pacientů, získat soubor pacientů s poraněním mozku a rozdělit pacienty s ložiskovým a difuzním (primárním) poraněním mozku. V naší práci jsme se zaměřili na význam rizikových faktorů, na kinetiku ukazatelů v krvi odrážející různé patofyziologické změny BBB u ložiskových a difuzních poranění mozku. Analyzovali jsme porušení BBB u difuzního a ložiskového poranění mozku prokazatelné imunohistochemickým a ultrastrukturálním vyšetřením. **Metody:** *Skupina pacientů:* Všichni pacienti v našem souboru (n=38) byli rozděleni do skupiny s difuzním poškozením axonů

(DAI, n=10) a ložiskovým (n=28) poraněním mozku. Dále jsme rozdělili pacienty s ložiskovým poraněním mozku do podskupin podle následujících nálezů na CT: (1) pacientů u nichž převažuje expanzní kontuzní ložisko (n=16); (2) pacienti (n=12) bez expanzního procesu.

*Biochemické vyšetření:* Vzorky krve byly shromážděny v průběhu 10 denní hospitalizace po přijetí do nemocnice. Koncentrace NSE a S-100B v séru byly měřeny imunoanalyzátozem Roche Cobas e411 s electrochemiluminiscenční imunoassays (Roche, Switzerland). GFAP bylo měřeno Biotrak activity assay system (GE Healthcare, USA) a sérové hyperfosforylované neurofilamenta byly měřeny ELISA immunoassay (Biovendor).

*Elektronová mikroskopie:* Ultrastrukturální vyšetření v elektronové mikroskopii bylo provedeno u operovaných pacientů (n=12). Barvené ultratenké řezy byly prohlíženy na přístroji Philips CM100 (FEI, Philips EO, the Netherlands) a vybrané oblasti byly digitálně zobrazené kamerou MegaViewII slow-scan camera.

*Imunohistochemické vyšetření:* K imunohistochemickému vyšetření proteinů ve světelné mikroskopii byly použity monoklonální protilátky (Chemicon) proti antigenům GFAP, vimentinu, NF-H, vinculinu, proti receptoru CD-68, P-selektinu a S-100 proteinu. Statistické metody: Rozdíly v koncentracích jednotlivých markerů byly vyjádřeny jako aritmetický průměr, rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnány metodou ANOVA v programu StatView. Hodnoty  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné.

**Výsledky:** *Biochemické výsledky:* při pozorování kinetik ukazatelů NSE a S-100B jsme zjistili pokles hodnot NSE a S-100B u přežívajících pacientů s ložiskovým poraněním během 10 dnů hospitalizace, naopak jsme pozorovali zvýšení NSE (32,72  $\mu\text{g/l}$  na 86,95  $\mu\text{g/l}$ ) a S-100B proteinu (3,41  $\mu\text{g/l}$  na 5,80  $\mu\text{g/l}$ ) od 2 do 3 dne u 5 pacientů, kteří zemřeli. U pacientů s rizikovými faktory (aspirace, hypotense) byly průměrné hodnoty NSE  $76,95 \pm 22,1$   $\mu\text{g/l}$  a S-100B proteinu  $3,81 \pm 1,70$   $\mu\text{g/l}$ . Měřili jsme NSE, S-100B a IL-6 v krvi u pacientů operovaných pro expanzní kontuzi mozku a u pacientů

bez expanzního chování kontuze. Od 1. do 3. dne po poranění mozku byl pozorován nárůst S-100B proteinu ( $3,064 \pm 1,064$  vs.  $0,649 \pm 0,182$   $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ ) a IL-6 ( $302,2 \pm 119,9$  vs.  $59,6 \pm 11,9$   $\text{ng/l}$ ,  $p < 0,02$ ) u pacientů s expanzní lézí (skupina I) ve srovnání s pacienty bez expanzní kontuze (skupina II). Nevýznamné změny byly u ukazatele NSE. Vyšší hladiny byly rovněž zjištěny u IL-6 u skupiny I ( $408,5 \pm 280,8$  vs.  $51,94 \pm 12,27$   $\text{ng/l}$ ,  $p < 0,05$ ) od 4. do 6. dne. Nevýznamné rozdíly byly zjištěné u NSE od 4. do 6. dne mezi oběma skupinami. Průměrná hodnota NF-H byla vyšší u DAI ve srovnání s ložiskovým TBI ( $0,625 \pm 0,14$  vs.  $0,139 \pm 0,02$   $\text{ng/l}$ ,  $p < 0,05$ ) v průběhu 10 denní hospitalizace. Hladiny NF-H vzrostly mezi 4. až 10. dnem u obou skupin. Hodnoty se pohybovaly od  $0,263$  do  $1,325$   $\text{ng/l}$  u DAI; a od  $0,103$  do  $1,108$   $\text{ng/l}$  u ložiskového poranění. Pacienti s expanzními lézemi měli podobné hladiny NF-H jako pacienti bez expanzní léze. Průměrná hodnota S-100B byla vyšší u pacientů s ložiskovým TBI ve srovnání s DAI ( $1,72 \pm 0,4$   $\mu\text{g/l}$  vs.  $0,37 \pm 0,1$   $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,05$ ) v průběhu 10 denní hospitalizace. Nejvyšší hodnoty S-100B ( $4,21 \pm 1,1$   $\mu\text{g/l}$ ) byly nalezeny u expanzních lézí. Průměrná hodnota GFAP byla vyšší u pacientů s ložiskovým TBI ve srovnání s DAI ( $4,21 \pm 1,1$  vs.  $0,49 \pm 0,3$   $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,002$ ) v průběhu 10 denní hospitalizace. Hladiny GFAP poklesly od 1.-3. dne do 4.-10. dne u obou skupin ( $8,34 \pm 1,9$  na  $1,12 \pm 0,6$   $\mu\text{g/l}$ ,  $p < 0,003$ ). Vyšší hodnoty GFAP byly u pacientů s ložiskovým TBI ve srovnání s DAI a nejvyšší hodnoty GFAP byly nalezeny u expanzních kontuzí. *Morfologické výsledky:* V časném stádiu (pacienti operovaní do 24-48 hodin po přijetí) bylo prokázáno ultrastrukturálním vyšetřením astrogliálních buněk vymizení proteinů v perivaskulárních gliálních pochvách. Formoval se edém astrogliálních buněk, podobně jako zduření v perivaskulárních gliálních pochvách, ztráta fibrilárních proteinů byla potvrzena imunohistochemicky, byly pozorovány glykogenem přeplněné perivaskulární gliální pochvy ale i ztráta glykogenu v těchto zakončeních. Imunohistochemické výsledky: Vyšetření prokázalo

vymizení GFAP, vimentinu v oblastech expanzních kontuzí u pacientů operovaných do 28-48 hodin ve srovnání se silnou imunoreaktivitou protilátek proti GFAP a vimentinu v astrogliálních perivaskulárních zakončeních u pacientů s DAI. Imunohistochemické vyšetření prokázalo silnou imunoreaktivitu dalších cytoskeletálních proteinů vinculinu a tubulinu v cévách a S-100 pozitivitu v astrogliálních zakončení u pacientů s DAI ve srovnání se slabým značením v expanzních kontuzích.

**Závěr:** Potvrdili jsme význam měření ukazatelů NSE, S-100B, GFAP a NF-H v krvi pro diferenciální diagnosu u pacientů. Vyšetření může napomoci klinickému monitorování a sledování pacientů a pomoci upřesnit prognozu uzdravení. Kinetika všech markerů je závislá na různých patofyziologických změnách BBB u ložiskového a difuzního poranění.



## 8. Summary

**Introduction:** TBI is one of the major causes of morbidity and mortality. Outcome for brain-injured patients is determined by the type, severity, location of the injury, ischemia and inflammatory response following TBI. The most frequent causes of death are the intra cranial pressure increasing, and subsequently uncontrollable swelling in TBI patients. Traumatic brain injury (TBI) triggers a series of reactions result in astroglial and cytoskeletal-related changes in focal and diffuse injuries. Focal cerebral contusion can be dynamic and expansive. It has been proved that subsequent expansive contusion is caused by brain parenchyma damage, especially BBB damage. Blood-brain barrier (BBB) failure is in part caused by activation of proinflammatory factors, and the BBB protective cascade includes NO-mediated interleukin 6 releasing by glia. Proteins released to circulation from affected tissues during primary or secondary trauma brain injury might be used as serum markers of glial or ganglial cells damage (neuron specific enolasis, S-100B protein, GFAP, and NF-H considered as specific for diffuse axonal injury. S-100B, an astroglial protein, is marker of TBI, and several studies established the relevance of S-100B in blood as a marker of blood brain barrier damage after traumatic brain injury. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a structural glial protein and NSE is a neuroglial protein. Serum hyperphosphorylated neurofilaments (NF-H) can monitor axonal disruption in patients with DAI. **Aim of the study:** To summarize the relevance of biochemical markers for clinical diagnostics and managgement of patients, to collect the group of patients with TBI, to separate the patients with focal and diffuse brain injury. We focused on the relevance of a risk factor, kinetics of all markers in the blood reflecting different types of pathophysiological changes of the BBB in focal and diffuse injuries. We analyzed the BBB impairment in focal and diffuse brain injuries by immunohistochemistry and electon microscopy.

**Methods:** *Group of patients:* The patients (n=38) were divided into group of diffuse axonal (DAI, n=10) and focal (n=28) brain injuries. We divided the patients with focal TBI into two subgroups according to the following CT-scan findings: (1) patients showing predominantly expansive cortical contusions (n=16); (2) patients (n=12) without expansive proces. *Biochemical investigation:* Blood samples were collected during 10 days after admission to the hospital. Serum S-100B protein and NSE concentrations were measured on immunoassay analyzer Roche Cobas e411 by electrochemiluminescence immunoassays (Roche, Switzerland). GFAP was measured by Biotrak activity assay system (GE Healthcare, USA). Serum NF-H was measured by ELISA immunoassay (Biovendor), and inflammatory markers interleukinu-6 was measured on immunoassay analyzer DPC Immulite by immunoassays Immulite IL-6. *Electron microscopy:* Cortical biopsies were processed in patients with craniocerebral trauma submitted to surgery due to expansive lesion. The tissue samples were fixed in 3% glutaraldehyde. The samples were embedded into Epon resin according to the classical procedure. The stained ultrathin sections were examined in Philips CM100 electron microscope (FEI, formerly Philips EO, the Netherlands) and selected areas were digitally recorded using MegaViewII slow-scan camera. *Immunohistochemistry:* Formalin-fixed cortical biopsies and also tissues obtained during autopsies of patients who died and patients submitted to neurosurgery were cut coronally in a way as to make paraffin-embedded sections, which were labeled with anti-GFAP, anti-vimentin, anti-NF-H, anti-vinculin, anti-S100 antibodies (Chemicon). The colour was developed using a chromogenic substrate di-amino-benzidine (DAB). *Statistical methods:* Differences in concentrations between groups were tested by the unpaired t-test, ANOVA in StatView. Differences at  $p < 0.05$  were considered as statistically significant. **Results:** *Biochemical results:* With regard to the kinetics of NSE and S-100B we found the decrease of value of NSE and

S-100B protein in survived patients with focal brain injury during 10 days of hospitalisation, on the other hand the increase of NSE (32,72 µg/l up to 86,95 µg/l) and S-100B protein (3,41 µg/l up to 5,80 µg/l) 2 up to 3 day was observed in 5 patients who died. We found out in patients with risk factors (aspiration, hypotension) average values of NSE  $76,95 \pm 22,1$  µg/l and S-100B protein  $3,81 \pm 1,70$  µg/l. We measured NSE, S-100B proteins, and IL-6 in the blood of patients submitted to neurosurgery due to expansive lesion and in patients with contusion without expansive behavior. Within 1 up to 3 days after traumatic brain injury, an increased values of S-100B protein ( $3.064 \pm 1.064$  vs.  $0.649 \pm 0.182$  µg/l,  $p < 0.05$ ), and IL-6 ( $302.2 \pm 119.9$  vs.  $59.6 \pm 11.9$  ng/l,  $p < 0.02$ ) were proved in patient with expansive lesion (group I) compared to patients without expansive contusion (group II). No significantly changes were found in levels of NSE. Also higher values of IL-6 have been found in group I ( $408.5 \pm 280.8$  vs.  $51.94 \pm 12.27$  ng/l,  $p < 0.05$ ) during 4 up to 6 days. No significant difference has been found in values of NSE during 4 up to 10 days between both groups. The median serum NF-H was higher in DAI compared to focal TBI ( $0,625 \pm 0,14$  vs  $0,139 \pm 0,02$  ng/l,  $p < 0,05$ ) during all 10 days after admission. Time-dependent profile of serum NF-H demonstrated the increase of values within 4th up to 10th day in both groups. Values ranged from 0,263 up to 1,325 ng/l in DAI, and from 0,103 up to 1,108 ng/l in focal injuries. Patients with expansive contusions had similar levels of serum NF-H as patients without expansive lesions. The median serum S-100B concentration was higher in patients with focal mass lesions ( $1.72 \pm 0.4$  µg/l vs.  $0.37 \pm 0.1$  µg/l,  $p < 0,05$ ) compared to patients with DAI during 10 days of hospitalisation. With respect to all patients, the highest peak of serum S-100B values ( $4.21 \pm 1.1$  µg/l) were found in expansive lesions. The median serum GFAP was higher in group with focal injury compared to group with diffuse injury ( $4.21 \pm 1.1$  vs  $0.49 \pm 0.3$  µg/l,  $p < 0.002$ ) during 10 days of hospitalization. The

kinetics of GFAP revealed the decrease of value from 1st-3rd day up to 4st-10st day ( $8.34 \pm 1.9$  down to  $1.12 \pm 0.6 \mu\text{g/l}$ ,  $p < 0.003$ ). Higher values of GFAP were found in focal TBI in contrast with lower values in diffuse injury, and the highest values of GFAP were found in expansive contusions. *Morphological results:* In the early stages (patients submitted to neurosurgery up to 24-48 hours after admission) an ultrastructural investigation of astroglial cells revealed the loss of proteins in their end-feet surrounded the capillary wall. Cytotoxic oedema of astroglial cells was formed, as well as swelling astrocytic end-feet, loss of fibrillary proteins confirmed by immunohistochemistry and glycogen-rich and glycogen-depleted end-feet. Immunohistochemical investigation: proved the loss of GFAP, vimentin immunoreactivity in expansive cortical contusions of patients submitted to neurosurgery within 28-48 hour compared to the local strong immunoreaction of anti-GFAP and anti-vimentin antibodies in astroglial end-feet in DAI. Immunohistochemistry of other cytoskeletal proteins shown strong staining of vinculin, and tubulin in vessels, and S-100 positivity of astroglial end feet in DAI compared to weak staining in expansive lesions. **Conclusions:** We confirmed the importance of NSE, S-100B, GFAP, NF-H measuring in the blood for differential diagnosis. The investigation can assist during clinical monitoring of patients and can help to precise the prognosis of outcome. The kinetics of all markers may reflect different types of pathophysiological changes of the BBB in focal and diffuse injuries.

## 9. Literatura

- Aarabi, B., Hesdorffer, D. C., Ahn, E. S., Aresco, C., Scalea, T. M. and Eisenberg, H. M. Outcome following decompressive craniectomy for malignant swelling due to severe head injury. *J Neurosurg.* 2006; 104: 469-479.
- Ashraf, Q. M., Mishra, O. P. and Delivoria-Papadopoulos, M. Mechanisms of expression of apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) in nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions of the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurosci Lett.* 2007; 415: 253-258.
- Baldwin, S. A. and Scheff, S. W. Intermediate filament change in astrocytes following mild cortical contusion. *Glia.* 1996; 16: 266-275.
- Berger, R. P. The use of serum biomarkers to predict outcome after traumatic brain injury in adults and children. *J Head Trauma Rehabil.* 2006; 21: 315-333.
- Berger, R. P., Beers, S. R., Richichi, R., Wiesman, D. and Adelson, P. D. Serum biomarker concentrations and outcome after pediatric traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2007; 24: 1793-1801.
- Brenman, J. E., Christopherson, K. S., Craven, S. E., McGee, A. W. and Bredt, D. S. Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci.* 1996; 16: 7407-7415.
- Bykovnikov, L. D. [Volume dynamics of contusion foci of the cerebrum]. *Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 1985; 85: 670-673.
- Castejon, O. J. Electron microscopic analysis of cortical biopsies in patients with traumatic brain injuries and dysfunction of neurobehavioural system. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1998; 30: 145-156.
- Castejon, O. J. Astrocyte subtypes in the gray matter of injured human cerebral cortex: a transmission electron microscope study. *Brain Inj.* 1999a; 13: 291-304.
- Castejon, O. J. Ultrastructural pathology of Golgi apparatus of nerve cells in human brain edema associated to brain congenital malformations, tumours and trauma. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1999b; 31: 203-213.

- Castejon, O. J. and de Castejon, H. V. Structural patterns of injured mitochondria in human oedematous cerebral cortex. *Brain Inj.* 2004; 18: 1107-1126.
- Castejon, O. J., Valero, C. and Diaz, M. Synaptic degenerative changes in human traumatic brain edema. An electron microscopic study of cerebral cortical biopsies. *J Neurosurg Sci.* 1995; 39: 47-65.
- Coles, J. P. Regional ischemia after head injury. *Curr Opin Crit Care.* 2004; 10: 120-125.
- Connolly, E. S., Jr., Winfree, C. J., Prestigiacomo, C. J., Kim, S. C., Choudhri, T. F., Hoh, B. L., Naka, Y., Solomon, R. A. and Pinsky, D. J. Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ Res.* 1997; 81: 304-310.
- Crespo, A. R., Da Rocha, A. B., Jotz, G. P., Schneider, R. F., Grivicich, I., Pinheiro, K., Zanoni, C. and Regner, A. Increased serum sFas and TNFalpha following isolated severe head injury in males. *Brain Inj.* 2007; 21: 441-447.
- Cucullo, L., Marchi, N., Marroni, M., Fazio, V., Namura, S. and Janigro, D. Blood-brain barrier damage induces release of alpha2-macroglobulin. *Mol Cell Proteomics.* 2003; 2: 234-241.
- Doyle, K. P., Simon, R. P. and Stenzel-Poore, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology.* 2008; 55: 310-318.
- Dringen, R. and Hamprecht, B. Differences in glycogen metabolism in astroglia-rich primary cultures and sorbitol-selected astroglial cultures derived from mouse brain. *Glia.* 1993; 8: 143-149.
- Dringen, R., Wiesinger, H. and Hamprecht, B. Uptake of L-lactate by cultured rat brain neurons. *Neurosci Lett.* 1993; 163: 5-7.
- Engel, D. C., Mies, G., Terpolilli, N. A., Trabold, R., Loch, A., De Zeeuw, C. I., Weber, J. T., Maas, A. I. and Plesnila, N. Changes of cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical contusion assessed by <sup>14</sup>C-iodoantipyrine autoradiography in mice using a non-invasive protocol. *J Neurotrauma.* 2008; 25: 739-753.
- Fano, G., Biocca, S., Fulle, S., Mariggio, M. A., Belia, S. and Calissano, P. The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol.* 1995; 46: 71-82.

- Fano, G., Mariggio, M. A., Angelella, P., Nicoletti, I., Antonica, A., Fulle, S. and Calissano, P. The S-100 protein causes an increase of intracellular calcium and death of PC12 cells. *Neuroscience*. 1993; 53: 919-925.
- Fischer, S., Wobben, M., Kleinstuck, J., Renz, D. and Schaper, W. Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279: C935-944.
- Fitzpatrick, M. O., Dewar, D., Teasdale, G. M. and Graham, D. I. The neuronal cytoskeleton: an insight for neurosurgeons. *Br J Neurosurg*. 1996; 10: 483-487.
- Fitzpatrick, M. O., Maxwell, W. L. and Graham, D. I. The role of the axolemma in the initiation of traumatically induced axonal injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998; 64: 285-287.
- Geddes, J. F., Vowles, G. H., Nicoll, J. A. and Revesz, T. Neuronal cytoskeletal changes are an early consequence of repetitive head injury. *Acta Neuropathol*. 1999; 98: 171-178.
- Geeraerts, T., Launey, Y., Martin, L., Pottecher, J., Vigue, B., Duranteau, J. and Benhamou, D. Ultrasonography of the optic nerve sheath may be useful for detecting raised intracranial pressure after severe brain injury. *Intensive Care Med*. 2007; 33: 1704-1711.
- Greenwood, J. A., Troncoso, J. C., Costello, A. C. and Johnson, G. V. Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of the 200-kDa and 160-kDa neurofilament proteins. *J Neurochem*. 1993; 61: 191-199.
- Guan, W., Yang, Y. L., Xia, W. M., Li, L. and Gong, D. S. Significance of serum neuron-specific enolase in patients with acute traumatic brain injury. *Chin J Traumatol*. 2003; 6: 218-221.
- Hamm, S., Dehouck, B., Kraus, J., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Risau, W., Cecchelli, R., Engelhardt, B. and Dehouck, M. P. Astrocyte mediated modulation of blood-brain barrier permeability does not correlate with a loss of tight junction proteins from the cellular contacts. *Cell Tissue Res*. 2004; 315: 157-166.
- Hayakata, T., Shiozaki, T., Tasaki, O., Ikegawa, H., Inoue, Y., Toshiyuki, F., Hosotubo, H., Kieko, F., Yamashita, T., Tanaka, H., Shimazu, T. and Sugimoto, H. Changes in

- CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock*. 2004; 22: 102-107.
- Hayashi, K., Nakao, S., Nakaoke, R., Nakagawa, S., Kitagawa, N. and Niwa, M. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept*. 2004; 123: 77-83.
- Heizmann, C. W. S100B protein in clinical diagnostics: assay specificity. *Clin Chem*. 2004; 50: 249-251.
- Herrmann, M., Curio, N., Jost, S., Grubich, C., Ebert, A. D., Fork, M. L. and Synowitz, H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 70: 95-100.
- Herrmann, M., Jost, S., Kutz, S., Ebert, A. D., Kratz, T., Wunderlich, M. T. and Synowitz, H. Temporal profile of release of neurobiochemical markers of brain damage after traumatic brain injury is associated with intracranial pathology as demonstrated in cranial computerized tomography. *J Neurotrauma*. 2000; 17: 113-122.
- Holmin, S. and Hojeberg, B. In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neurosci Lett*. 2004; 369: 108-114.
- Holmin, S., Soderlund, J., Biberfeld, P. and Mathiesen, T. Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery*. 1998; 42: 291-298; discussion 298-299.
- Hovsepian, M. R., Haas, M. J., Boyajyan, A. S., Guevorkyan, A. A., Mamikonyan, A. A., Myers, S. E. and Mooradian, A. D. Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neurosci Lett*. 2004; 369: 224-227.
- Huang, F. P., Xi, G., Keep, R. F., Hua, Y., Nemoianu, A. and Hoff, J. T. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J Neurosurg*. 2002; 96: 287-293.
- Chi, J. H., Knudson, M. M., Vassar, M. J., McCarthy, M. C., Shapiro, M. B., Mallet, S., Holcroft, J. J., Moncrief, H., Noble, J., Wisner, D., Kaups, K. L., Bennick, L. D. and Manley, G. T. Prehospital hypoxia affects outcome in patients with traumatic brain injury: a prospective multicenter study. *J Trauma*. 2006; 61: 1134-1141.



- Ingebrigtsen, T., Muller, K., Waterloo, K. and Romner, B. Mild head injury. *J Neurosurg.* 2005; 102: 184; author reply 185.
- Ingebrigtsen, T. and Romner, B. Biochemical serum markers for brain damage: a short review with emphasis on clinical utility in mild head injury. *Restor Neurol Neurosci.* 2003; 21: 171-176.
- Jing, S., Ju, Y., He, Y., He, M. and Mao, B. Clinical features of diffuse axonal injury. *Chin J Traumatol.* 2001; 4: 204-207.
- Jonsson, H., Johnsson, P., Backstrom, M., Alling, C., Dautovic-Bergh, C. and Blomquist, S. Controversial significance of early S100B levels after cardiac surgery. *BMC Neurol.* 2004; 4: 24.
- Kalvach, P. and Gregova, D. Cerebral microangiopathy in the mosaic of new discoveries. *J Neurol Sci.* 2005; 229-230: 7-12.
- Kapural, M., Krizanac-Bengez, L., Barnett, G., Perl, J., Masaryk, T., Apollo, D., Rasmussen, P., Mayberg, M. R. and Janigro, D. Serum S-100beta as a possible marker of blood-brain barrier disruption. *Brain Res.* 2002; 940: 102-104.
- Klatzo, I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.* 1987; 72: 236-239.
- Kukacka J., Vajtr D., Huska D., Prusa R., Houstava L., Samal F., Diopan V., Kotaska K., Kizek R. Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 ; 27 (Suppl2):116-120
- Kukačka J., Vajtr D., Lepej J., Průša R.: Biochemické markery poranění mozku. *Labor Aktuell*, 2008; 01/08, p:18-23.
- Lafuente, J. V., Bulnes, S., Mitre, B. and Riese, H. H. Role of VEGF in an experimental model of cortical micronecrosis. *Amino Acids.* 2002; 23: 241-245.
- Lau, A., Arundine, M., Sun, H. S., Jones, M. and Tymianski, M. Inhibition of caspase-mediated apoptosis by peroxynitrite in traumatic brain injury. *J Neurosci.* 2006; 26: 11540-11553.

- Li, R., Fujitani, N., Jia, J. T. and Kimura, H. Immunohistochemical indicators of early brain injury: an experimental study using the fluid-percussion model in cats. *Am J Forensic Med Pathol.* 1998; 19: 129-136.
- Longhi, L., Pagan, F., Valeriani, V., Magnoni, S., Zanier, E. R., Conte, V., Branca, V. and Stocchetti, N. Monitoring brain tissue oxygen tension in brain-injured patients reveals hypoxic episodes in normal-appearing and in peri-focal tissue. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 2136-2142.
- Lumpkins, K. M., Bochicchio, G. V., Keledjian, K., Simard, J. M., McCunn, M. and Scalea, T. Glial fibrillary acidic protein is highly correlated with brain injury. *J Trauma.* 2008; 65: 778-782; discussion 782-774.
- Mayhan, W. G. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol.* 1999; 276: C1148-1153.
- Mazzetti, S., Librizzi, L., Frigerio, S., de Curtis, M. and Vitellaro-Zuccarello, L. Molecular anatomy of the cerebral microvessels in the isolated guinea-pig brain. *Brain Res.* 2004; 999: 81-90.
- Mbye, L. H., Singh, I. N., Sullivan, P. G., Springer, J. E. and Hall, E. D. Attenuation of acute mitochondrial dysfunction after traumatic brain injury in mice by NIM811, a non-immunosuppressive cyclosporin A analog. *Exp Neurol.* 2008; 209: 243-253.
- McCracken, E., Hunter, A. J., Patel, S., Graham, D. I. and Dewar, D. Calpain activation and cytoskeletal protein breakdown in the corpus callosum of head-injured patients. *J Neurotrauma.* 1999; 16: 749-761.
- McKeating, E. G., Andrews, P. J. and Mascia, L. Relationship of neuron specific enolase and protein S-100 concentrations in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl.* 1998; 71: 117-119.
- Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K. and Galla, H. J. Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* 1990; 514: 305-309.
- Mussack, T., Biberthaler, P., Kanz, K. G., Heckl, U., Gruber, R., Linsenmaier, U., Mutschler, W. and Jochum, M. Immediate S-100B and neuron-specific enolase

- plasma measurements for rapid evaluation of primary brain damage in alcohol-intoxicated, minor head-injured patients. *Shock*. 2002; 18: 395-400.
- Nag, S., Takahashi, J. L. and Kilty, D. W. Role of vascular endothelial growth factor in blood-brain barrier breakdown and angiogenesis in brain trauma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56: 912-921.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S. and Itohara, S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 4037-4042.
- Oehmichen, M., Meissner, C., Schmidt, V., Pedal, I. and Konig, H. G. Pontine axonal injury after brain trauma and nontraumatic hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Legal Med*. 1999; 112: 261-267.
- Ogata, M. and Tsuganezawa, O. Neuron-specific enolase as an effective immunohistochemical marker for injured axons after fatal brain injury. *Int J Legal Med*. 1999; 113: 19-25.
- Okumura, Y., Sakaki, T., Hiramatsu, K., Tominaga, M., Yabuno, T. and Takeshima, T. [Ultrastructural morphological changes of cortical microvessels following transient cerebral ischemia--a transmission electron microscopic study]. *No To Shinkei*. 1994; 46: 963-969.
- Paemeleire, K. Calcium signaling in and between brain astrocytes and endothelial cells. *Acta Neurol Belg*. 2002; 102: 137-140.
- Pelinka, L. E., Szalay, L., Jafarmadar, M., Schmidhammer, R., Redl, H. and Bahrami, S. Circulating S100B is increased after bilateral femur fracture without brain injury in the rat. *Br J Anaesth*. 2003; 91: 595-597.
- Persidsky, Y. Model systems for studies of leukocyte migration across the blood - brain barrier. *J Neurovirol*. 1999; 5: 579-590.
- Petzold, A. and Shaw, G. Comparison of two ELISA methods for measuring levels of the phosphorylated neurofilament heavy chain. *J Immunol Methods*. 2007; 319: 34-40.
- Pineda, J. A., Wang, K. K. and Hayes, R. L. Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. *Brain Pathol*. 2004; 14: 202-209.

- Pleines, U. E., Morganti-Kossmann, M. C., Rancan, M., Joller, H., Trentz, O. and Kossmann, T. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2001; 18: 491-498.
- Plesnila, N., Friedrich, D., Eriskat, J., Baethmann, A. and Stoffel, M. Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neurosci Lett*. 2003; 345: 85-88.
- Portela, L. V., Tort, A. B., Schaf, D. V., Ribeiro, L., Nora, D. B., Walz, R., Rotta, L. N., Silva, C. T., Busnello, J. V., Kapczynski, F., Goncalves, C. A. and Souza, D. O. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem*. 2002; 48: 950-952.
- Raabe, A., Grolms, C. and Seifert, V. Serum markers of brain damage and outcome prediction in patients after severe head injury. *Br J Neurosurg*. 1999; 13: 56-59.
- Ragaisis, V. [Brain contusion: morphology, pathogenesis and treatment]. *Medicina (Kaunas)*. 2002; 38: 243-249; quiz 354.
- Ray, S. K., Dixon, C. E. and Banik, N. L. Molecular mechanisms in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Histol Histopathol*. 2002; 17: 1137-1152.
- Ringel, F., Baethmann, A. and Plesnila, N. Lactacidosis-induced glial cell swelling depends on extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Neurosci Lett*. 2006; 398: 306-309.
- Ross, S. A., Cunningham, R. T., Johnston, C. F. and Rowlands, B. J. Neuron-specific enolase as an aid to outcome prediction in head injury. *Br J Neurosurg*. 1996; 10: 471-476.
- Rumpel, H., Nedelcu, J., Aguzzi, A. and Martin, E. Late glial swelling after acute cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat: a combined magnetic resonance and histochemical study. *Pediatr Res*. 1997; 42: 54-59.
- Shaw, G., Yang, C., Ellis, R., Anderson, K., Parker Mickle, J., Scheff, S., Pike, B., Anderson, D. K. and Howland, D. R. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 336: 1268-1277.
- Shore, P. M., Jackson, E. K., Wisniewski, S. R., Clark, R. S., Adelson, P. D. and Kochanek, P. M. Vascular endothelial growth factor is increased in cerebrospinal

- fluid after traumatic brain injury in infants and children. *Neurosurgery*. 2004; 54: 605-611; discussion 611-602.
- Shreiber, D. I., Bain, A. C., Ross, D. T., Smith, D. H., Gennarelli, T. A., McIntosh, T. K. and Meaney, D. F. Experimental investigation of cerebral contusion: histopathological and immunohistochemical evaluation of dynamic cortical deformation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999; 58: 153-164.
- Scholler, K., Trinkl, A., Klopotoski, M., Thal, S. C., Plesnila, N., Trabold, R., Hamann, G. F., Schmid-Elsaesser, R. and Zausinger, S. Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res*. 2007; 1142: 237-246.
- Singhal, A., Baker, A. J., Hare, G. M., Reinders, F. X., Schlichter, L. C. and Moulton, R. J. Association between cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations and outcome after severe human traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2002; 19: 929-937.
- Skogseid, I. M., Nordby, H. K., Urdal, P., Paus, E. and Lilleaas, F. Increased serum creatine kinase BB and neuron specific enolase following head injury indicates brain damage. *Acta Neurochir (Wien)*. 1992; 115: 106-111.
- Slemmer, J. E., Shacka, J. J., Sweeney, M. I. and Weber, J. T. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr Med Chem*. 2008; 15: 404-414.
- Spielmann, S., Kerner, T., Ahlers, O., Keh, D., Gerlach, M. and Gerlach, H. Early detection of increased tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) and soluble TNF receptor protein plasma levels after trauma reveals associations with the clinical course. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2001; 45: 364-370.
- Strong, M. J., Strong, W. L., Jaffe, H., Traggert, B., Sopper, M. M. and Pant, H. C. Phosphorylation state of the native high-molecular-weight neurofilament subunit protein from cervical spinal cord in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2001; 76: 1315-1325.
- Sullivan, P. G., Rabchevsky, A. G., Waldmeier, P. C. and Springer, J. E. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 2005; 79: 231-239.

- Suzuki, R., Okuda, M., Asai, J., Nagashima, G., Itokawa, H., Matsunaga, A., Fujimoto, T. and Suzuki, T. Astrocytes co-express aquaporin-1, -4, and vascular endothelial growth factor in brain edema tissue associated with brain contusion. *Acta Neurochir Suppl.* 2006; 96: 398-401.
- Tao, L., Wao, D., Liu, P., Yu, S., Hao, C. and Wu, X. [The changes of GFAP and PCNA after human brain contusion: an immunohistochemical study in forensic pathology]. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2000; 16: 137-138, 140, 190.
- Uden, J., Bellner, J., Reinstrup, P. and Romner, B. Serial S100B levels before, during and after cerebral herniation. *Br J Neurosurg.* 2004; 18: 277-280.
- Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B. and Kiening, K. L. Edema and brain trauma. *Neuroscience.* 2004; 129: 1021-1029.
- Vajtr D., Prusa R., Houst'ava L., Samal F., Kukacka J., Pachtl J. Biochemical and immunohistochemical markers of brain injury. *Soudní lékařství* 2006;51(3):36-41.
- Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámál F., Pachtl J., Pažout J. Dynamika vývoje GCS, hladiny NSE a S100b v séru a morfologie expanzní kontuze u pacientů s poraněním hlavy. *Českoslov. Neurol. Neuroch.* 2007, 70/103 (5): 253-258.
- Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámál F., Pelichovská M., Strejc P., Toupalík P. Hodnocení závažnosti otřesu mozku a poruchy zdraví pomocí monitorování hladin neuron specifické enolázy a proteinu S-100b v séru. *Soudní Lékařství* 2007; 52 (3): 43-46.
- Vajtr D., Benada O., Kukacka J., Prusa R., Houstava L., Toupalik P. and Kizek R. Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Phys Res* 2009; 58 (2).
- van Landeghem, F. K., Weiss, T., Oehmichen, M. and von Deimling, A. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2006; 23: 1518-1528.

- Vaz, R., Sarmiento, A., Borges, N., Cruz, C. and Azevedo, I. Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions. *Acta Neurochir (Wien)*. 1997; 139: 215-220.
- Vecil, G. G., Larsen, P. H., Corley, S. M., Herx, L. M., Besson, A., Goodyer, C. G. and Yong, V. W. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res*. 2000; 61: 212-224.
- Vos, P. E., Lamers, K. J., Hendriks, J. C., van Haaren, M., Beems, T., Zimmerman, C., van Geel, W., de Reus, H., Biert, J. and Verbeek, M. M. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology*. 2004; 62: 1303-1310.
- Wiesinger, H., Hamprecht, B. and Dringen, R. Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*. 1997; 21: 22-34.
- Willis, C. L., Nolan, C. C., Reith, S. N., Lister, T., Prior, M. J., Guerin, C. J., Mavroudis, G. and Ray, D. E. Focal astrocyte loss is followed by microvascular damage, with subsequent repair of the blood-brain barrier in the apparent absence of direct astrocytic contact. *Glia*. 2004; 45: 325-337.
- Winter, C. D., Pringle, A. K., Clough, G. F. and Church, M. K. Raised parenchymal interleukin-6 levels correlate with improved outcome after traumatic brain injury. *Brain*. 2004; 127: 315-320.
- Woertgen, C., Rothoerl, R. D., Holzschuh, M., Metz, C. and Brawanski, A. Comparison of serial S-100 and NSE serum measurements after severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 1997; 139: 1161-1164; discussion 1165.
- Woertgen, C., Rothoerl, R. D., Wiesmann, M., Missler, U. and Brawanski, A. Glial and neuronal serum markers after controlled cortical impact injury in the rat. *Acta Neurochir Suppl*. 2002; 81: 205-207.
- Wollmann, R. L., Szuchet, S., Barlow, J. and Jerkovic, M. Ultrastructural changes accompanying the growth of isolated oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. 1981; 6: 757-769.

Yamazaki, Y., Yada, K., Morii, S., Kitahara, T. and Ohwada, T. Diagnostic significance of serum neuron-specific enolase and myelin basic protein assay in patients with acute head injury. *Surg Neurol.* 1995; 43: 267-270; discussion 270-261.

Zweckberger, K., Stoffel, M., Baethmann, A. and Plesnila, N. Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma.* 2003; 20: 1307-1314.



## 10. Příloha:

### Seznam vlastních publikací k tématu

#### 10.1. PŮVODNÍ PRÁCE A PŘEHLEDNÉ ČLÁNKY V ČASOPISECH S DEFINOVANÝM IMPAKT FAKTOREM

1. Kukacka J., Vajtr D., Huska D., Prusa R., Houstava L., Samal F., Diopan V., Kotaska K., Kizek R. Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006 ; 27 (Suppl2):116-120  
**IF=0,924**
2. Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámal F., Pacht J., Pažout J. Dynamika vývoje GCS, hladiny NSE a S100b v séru a morfologie expanzní kontuze u pacientů s poraněním hlavy. *Českoslov. Neurol.Neuroch.* 2007, 70/103 (5): 253-258.  
**IF=0,045**
3. Vajtr D., Benada O., Kukacka J., Prusa R., Houstava L., Toupalík P. and Kizek R. Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Phys Res* 2009; 58 (2).  
**IF=2,093**

#### 10.2. ČLÁNKY V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH (BEZ IF)

1. Vajtr D., Prusa R., Houst'ava L., Samal F.,Kukacka J., Pacht J. Biochemical and immunohistochemical markers of brain injury. *Soudní lékařství* 2006;51(3):36-41.
2. Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámal F., Pelichovská M., Strejcek P., Toupalík P. Hodnocení závažnosti otřesu mozku a poruchy zdraví pomocí

monitorování hladin neuron specifické enolázy a proteinu S-100b v séru. *Soudní Lékařství* 2007; 52 (3): 43-46.

3. Kukačka J., Vajtr D., Lepej J., Průša R.: Biochemické markery poranění mozku. *Labor Aktuell*, 2008; 01/08, p:18-23.

### **10.3. OPONOVANÁ ABSTRAKTA V ČASOPISECH S DEFINOVANÝM IMPAKT FAKTOREM**

1. Kukacka J., Vajtr D., Prusa R., Klapkova E., Samal F., Houstava L., Pelichovska M., Kotaska K.: Serum levels of metalloproteinases in expansive and non-expansive contusion in traumatic brain injury, *CCLM* Vol. 45, 2007, Special Supplement, W214.
2. Vajtr D., Kukacka J., Samal F., Prusa R., Houstava L., Merkerova M., Kracmarova A. Pathomorphology, gene expression profile, levels of S-100b protein, and interleukine - 6 in expansive contusion area after trauma brain injury. *J Neuropath Exper Neurology* 2007; 66 (5): 448-449.
3. Vajtr D., Kukacka J., Samal F., Prusa R., Houstava L., Merkerova M., Kracmarova A. Pathomorphology, gene expression profile, levels of S-100b protein, and interleukine - 6 in expansive contusion area after trauma brain injury. *FASEB Journal* 2007;21:A398-A.
4. Vajtr D., Kukacka J., Adam V., Kotaska K., Houstava L., Toupalik P., Kizek R., Prusa R. : Serum levels metallothionein in expansive contusions, interleukine-6, and TNF alfa during reparative phase of the blood brain barrier damage. *Tumor Biology* 2007; 28 (suppl 1): 44-44.
5. Vajtr D., Kukacka J., Houstava L., Prusa R. : Oncomarkers (NSE, S-100B, GFAP, Neurophilaments) facilitated monitoring of fluid permeability-related changes of brain barrier: a study od traumatic perilesional brain oedema. *Tumor Biology* 2008; 29 (suppl 1):58.

#### 10.4. OSTATNÍ ABSTRAKTA V ČASOPISECH A VE SBORNÍCÍCH

1. Vajtr D., Průša R., Hošťava L, Šámal F., Kukačka J. , Zámečník J., Klapková E. Comparasion of cortical biopsy with changes of serum markers after brain injury in two patients. In HOJSÍK, D. (eds.). 46th May Medicolegal conference: May 30-31, Bratislava, Slovakia, 2006, Abstract #23.
2. Vajtr D., Průša R., Hošťava L, Pelichovská M., Šámal F., Kukačka J. Hladiny neuron specifické enolázy a S100B proteinu v séru u pacientů s otřesem mozku v.s. difuzním axonálním poraněním. In HOJSÍK, D. (eds.). 46th May Medicolegal conference: May 30-31, Bratislava, Slovakia, 2006, Abstact #24.
3. Vajtr D., Průša R, Zámečník J., Kukačka J., Pelichovská M.: Hodnocení vitality mozkové tkáně měřením hladin vybraných biochemických markerů a nálezy v elektronové mikroskopii. In ZUNA (eds.). Vědecká konference 2. LF UK: Praha, Czech Republic, 2006, č. 25.
4. Prusa R., Vajtr D., Kukacka J., Houstava L., Samal F., Kracmarova A., Merkerova M., Benada O. Gene Expression Profile and Serum Levels of NSE and S100b Protein in Patients with Trauma Brain Injury during 10 Days of Hospitalization. *Mol.Biol.Cell* 17 (suppl), abstract # 1340/B634. (CD-ROM).
5. Vajtr D., Toupalík P., Zámečník J., Kukačka J., Matlach R., Průša R., Pažout J., Houšťava L. Změny hematoencefalické bariéry u expanzních kontuzí v prvních dnech po poranění mozku. In LOYKA, S. (eds.).XIV. Rozmaričovy soudnělékařské pracovní dny, May 16-18, Kouty nad Desnou, Czech Republic 2007. p.16-17.
6. Vajtr D., Kukačka J., Kotaška K., Houšťava L., Toupalík P., Klapková E., Průša R. Hladiny cytokinů, růstových faktorů a TNF alfa v reparativní fázi po poranění

hematoencefalické bariéry u pacientů s kontuzemi mozku. *Klinická biochemie a metabolismus* 2007; 15 (36) Supplement: 84-84.

## **11. Příloha publikovaných výsledků**

### **11.1. PŘÍLOHA 1**

**Vajtr D., Prusa R., Houst'ava L., Samal F., Kukacka J., Pachi J.**: Biochemical and immunohistochemical markers of brain injury. *Soudní lékařství* 2006;51(3), p:36-41.

## **11.2. PŘÍLOHA 2**

**Kukačka J., Vajtr D., Lepej J., Průša R.:** Biochemické markery poranění mozku. *Labor Aktuell*, 2008; 01/08, p:18-23.

### 11.3. PŘÍLOHA 3

**Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámal F., Pachi J., Pažout J.**: Dynamika vývoje GCS, hladiny NSE a S100b v séru a morfologie expanzní kontuze u pacientů s poraněním hlavy. *Českoslov. Neurol.Neuroch.* 2007, 70/103 (5), p: 515-520.

**IF=0,045**

#### **11.4. PŘÍLOHA 4**

**Kukacka J., Vajtr D., Huska D., Prusa R., Houstava L., Samal F., Diopan V., Kotaska K., Kizek R.:** Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. *Neuro Endocrinol Lett.*, 2006 ; 27 (Suppl2), p:116-120.

**IF=0,924**



## 11.5. PŘÍLOHA 5

**Vajtr D., Průša R., Kukačka J., Houšťava L., Šámal F., Pelichovská M., Strejc P., Toupalík P.:** Hodnocení závažnosti otřesu mozku a poruchy zdraví pomocí monitorování hladin neuron specifické enolázy a proteinu S-100b v séru. *Soudní Lékařství* 2007; 52 (3), p: 43-46.

## **11.6. PŘÍLOHA 6**

**Vajtr D., Benada O., Kukacka J., Prusa R., Houstava L., Toupalik P. and Kizek R.:** Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Physiol Res.* 2009 Apr 1.; 58 (2).

**IF=2,093**