

Experimentální model intrakraniálních aneuryzmat

Experimental model of intracranial aneurysms

Souhrn

Ruptura intrakraniálního aneuryzmatu představuje pro pacienta život ohrožující stav s dodnes vysokou mortalitou a morbiditou. Patogeneze vývoje a případné ruptury aneuryzmatu jsou pořád zahaleny rouškou tajemství, což pro vědce představuje velký prostor pro možnosti bádání. Přes určité limitace mají experimentální modely intrakraniálních aneuryzmat své nenahraditelné místo. Přehledový článek shrnuje dosavadní publikované výsledky experimentálních modelů zaměřených na modely hlodavců, jejich výhody a také limitace. Zároveň čtenáře seznamuje s výsledky naší pilotní studie experimentálního modelu u laboratorní myši.

Abstract

Rupture of an intracranial aneurysm represents a life-threatening condition with a still high mortality and morbidity. The pathogenesis of aneurysm development and eventual aneurysm rupture are still shrouded in mystery, representing a great field of research opportunities for scientists. Despite certain limitations, experimental models of intracranial aneurysms have their invaluable place. The review article summarizes the published results of current experimental rodent-focused models, their advantages, as well as limitations. At the same time, it introduces the reader to the results of our pilot study of an experimental laboratory mice model.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

**M. Hundža Stratilová^{1,2},
K. Kárová³, L. Machová Urdzík³,
P. Jendelová³, M. Koblížek²,
M. Sameš¹, J. Zámečník², A. Hejčl^{1,3,4}**

¹ Neurochirurgická klinika Fakulty zdravotnických studií univerzity J.E. Purkyně v Ústí nad Labem a Krajské zdravotní, a.s. – Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem, o.z.

² Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

³ Ústav experimentální medicíny Akademie věd České republiky

⁴ Mezinárodní centrum klinického výzkumu, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně



doc. MUDr. Aleš Hejčl, Ph.D.

Neurochirurgická klinika
Fakulty zdravotnických studií
univerzity

J. E. Purkyně a Krajské zdravotní,
a.s. – Masarykovy nemocnice
v Ústí nad Labem, o.z.

Sociální péče 3316

400 11 Ústí nad Labem

e-mail: ales.hejcl@gmail.com

Přijato k recenzi: 29. 10. 2023

Přijato do tisku: 9. 1. 2024

Klíčová slova

intrakraniální aneuryzma – experimentální model – myší model – subarachnoideální krvácení – chronický zánět

Key words

intracranial aneurysm – experimental model – rodent model – subarachnoid hemorrhage – chronic inflammation

Úvod

Ruptura intrakraniálního aneuryzmatu (IA) představuje nejčastější příčinu spontánního subarachnoidálního krvácení (SAH), dodnes s vysokou mortalitou a morbiditou [1,2]. Incidence SAH je přibližně 10–11/100 000 obyvatel v západních zemích, v japonské populaci je to dvojnásobek [3]. Zároveň jsou u populací se zvýšeným výskytem aneuryzmat popsány určité společné jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms; SNPs) [4]. V posledních 20 letech došlo k nárůstu zachytu neprasklých IA [5]. Vzhledem k tomu, že odhad rizika ruptury u těchto aneuryzmat není dobře kvantifikovatelný, může být často náročné v debatě s pacienty vysvětlit indikaci preventivního ošetření či naopak jeho sledování. Existuje několik skórovacích systémů, které toto riziko odhadují, ale jsou převážně zaměřeny na demografické a deskriptivní faktory než na patogenezi IA [6,7]. Okolnosti vzniku, progresu a ruptury aneuryzmatu totiž zdaleka nejsou objasněny [8]. Ukazuje se, že důležitou roli v evoluci IA hrají aberantní hemodynamika a chronický zánět; avšak přesné mechanismy buď nejsou doposud známy, nebo není možná jejich klinická aplikace [9,10]. Jednou z možností, jak lépe pochopit patogenezi IA, je využití experimentálního modelu, případně matematického modelování hemodynamiky [11]. Výhodou experimentálního modelu je možnost genetické manipulace, a to hlavně u myší [12]. Přirozený výskyt aneuryzmat u zvířat je velmi vzácný, proto se vyvíjejí techniky arteficiální indukce IA [13]. Cílem tohoto přehledového článku je seznámit odbornou veřejnost se základními technikami indukce aneuryzmatu u myší, konkrétním využitím modelů ve výzkumu patogeneze IA a popsat naše pilotní zkušenosti s vybraným modelem IA u myší.

Experimentální model IA u laboratorních myší

Myší model IA vychází z původního potkaního modelu. První model IA u potkanů představili v roce 1978 Hashimoto et al., kteří vycházeli z hypotézy indukce aneuryzmatu působením hemodynamického stresu na fragilní arteriální stěnu [14]. V této studii byl hemodynamický stres čili chronická arteriální hypertenze, indukován podvázáním jedné z a. carotis communis a podvázáním zadních větví pravé renální arterie. Dále byla zvířatům podávána dieta s obsahem deoxykortikosteronu a vysokým obsahem soli. K oslabení cévní stěny byl do diety přidán

beta-aminopropionitril, který inhibuje zesíťování kolagenu a elastinu.

Morimoto et al. představili první myší model v roce 2002 [15]. Použili k tomu kmen myší C57BL/6, stáří 7–9 týdnů. U myší byla provedena ligace levé a. carotis communis a zadní větve pravé a. renalis. O týden později byla myším podvázána zadní větev levé a. renalis a do pitné vody se jim přidával 1% roztok NaCl. Narušení cévní stěny elastázou ani beta-aminopropionitrem v dané studii neproběhlo. Pokus byl ukončen po 4 měsících, kdy aneuryzma vykazovala třetina myší. Elastázou indukovaný model IA u hypertenzních myší jako první popsal Nuki et al. v roce 2009 [16]. V daném modelu byla arteriální hypertenze u myší starých 8–10 týdnů, kmene C57BL/6, navozena kontinuálním podáváním angiotenzinu II a degradace cévní stěny byla indukována pomocí jedné injekce elastázy do pravé bazální cisterny použitím stereotaktických metod. Ligace a. carotis communis ani aa. renales v dané studii nebyla provedena. Autoři popisují 77% incidenci aneuryzmat po 2 týdnech od operace.

Makino et al. popsal další model, kdy k navození arteriální hypertenze u 8–10 týdnů starých myší kmene C57BL/6J nejdříve provedl nefrektomii a o týden později začali krmit myši peletami deoxykortikosteronacetátu a do vody přidali roztok 1% NaCl. Téhož dne byla myším zároveň aplikována injekce elastázy do pravé bazální cisterny. Incidence prasklých aneuryzmat byla 50 %, incidence těch neprasklých 12,5 %. Pokud byly u myší pozorovány určité příznaky, jako významné snížení hmotnosti (> 2 g) nebo kroužení do jedné strany při klidovém normálním postavení, tak byla myš usmrcena. U asymptomatických myší byl pokus ukončen 28 dní po indukci aneuryzmatu [17].

Spíše pro zajímavost než pro experimentální využití je popsán model, kdy jsou myši kmenů CF1 a A/J infikované konkrétním kmenem původce malárie, a to Plasmodium berghei yoelii. Daný model využívá zvýšené sekvestrace infikovaných erytrocytů, které blokují kapiláry v mozku, což vede k rozvoji aneuryzmat [18]. Obr. 1 shrnuje možnosti indukce IA u myší.

Definice IA u experimentálních modelů

Definice IA u experimentálních modelů není jednotná [12]. Téměř každá publikace a model obsahuje vlastní definici. Určité práce popisují aneuryzma jako lokální výduť cévní stěny [16,17,19–22]. Někteří autoři ve své

publikaci definovali aneuryzma jako oblast cévy s průměrem větším než 150 % průměru tepny, ze které aneuryzma vychází [23], případně jako výduť cévy větší než 150 % průměru a. basilaris [16]. Další publikace aneuryzma definovala jak výduť cévní stěny, tak i fragmentací nebo vymizením lamina elastica interna (IEL) [24–28].

Podobnost se vzorky lidských aneuryzmat

Sakulární IA mají u lidí typickou lokalizaci v oblasti větvení cév. Shodnou lokalizaci mají indukovaná aneuryzmata u experimentálních modelů laboratorních myší [12].

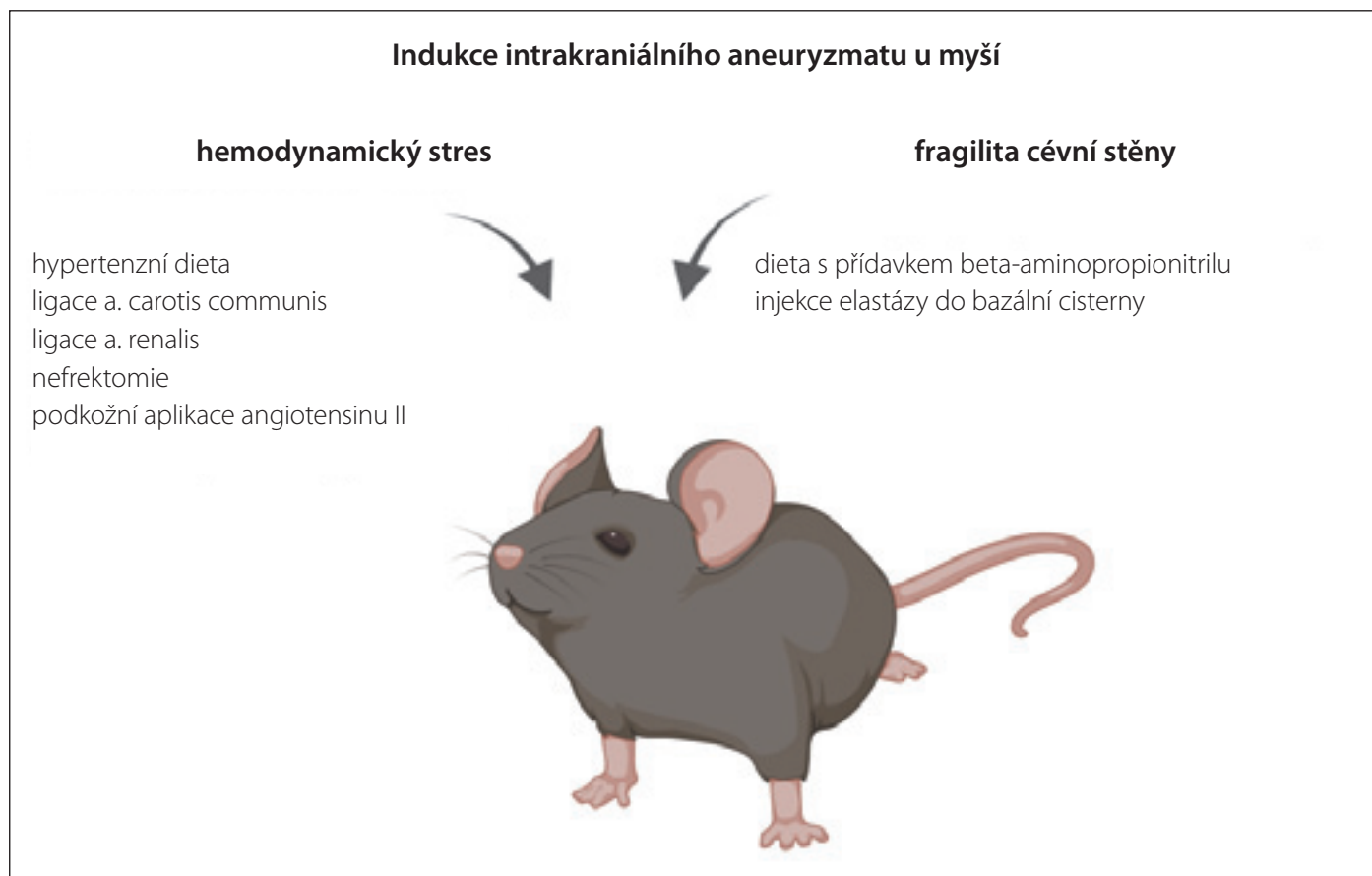
Histologické vzorky lidských aneuryzmat vykazují degradaci nebo fragmentaci IEL, a to jak u prasklých, tak neprasklých aneuryzmat [29]. Stavba stěny IA u myšího modelu je určitými charakteristikami podobná jako stěna aneuryzmatu u lidí. Jedním ze společných rysů je hypocelularita hladkých svalových buněk, nebo naopak přítomnost zánětlivých buněk ve stěně aneuryzmatu. Nicméně drobné rozdíly ve stavbě stěny cévy, resp. IA, jsou např. absence lamina elastica externa v cévní stěně myší [12].

Zkoumaná patogeneze IA na modelech hlodavců Kritická role makrofágů při vzniku IA

Incidence IA byla signifikantně nižší u myší, které postrádaly makrofágy (1 z 10 vs. 6 z 10; $p < 0,05$) [21]. Zároveň bylo zjištěno, že incidence aneuryzmat u myší postrádajících monocytární chemotaktický protein-1 (CCL-2), důležitý pro přichycení makrofágů, byla signifikantně nižší ve srovnání s jejich wild-type protějšky [26].

Matrix metaloproteinázy a inhibitory matrixových metaloproteináz

Integrita cévní stěny je závislá na rovnováze mezi syntézou a degradací extracelulární matrix. Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou odpovědné za remodelaci cévní stěny, přičemž kontrolu nad jejich aktivitou mají inhibitory matrixových metaloproteináz (TIMPs). Ve vzorcích lidských aneuryzmat dominuje exprese MMP-2 a MMP-9, čímž dochází k dysbalanci z hlediska extracelulární matrix [30,31]. Aoki et al. publikovali studii, ve které byla nalezena asociace mezi progresí aneuryzmat a makrofágy produkovaných MMP-2 a MMP-9 u potkaního modelu [32]. Aoki et al. se ve své další studii zaměřili naopak právě na protektivní roli



Obr. 1. Možností indukce intrakraniálního aneuryzmatu u myší. Ve většině modelů se používá kombinace hemodynamického stresu a fragility cévní stěny.

Obrázek vytvořen v BioRender.com (Toronto, Ontario, Kanada).

Fig. 1. Options of inducing intracranial aneurysm in mice. Predominantly, a combination of hemodynamic stress and vascular wall fragility is used.

Image was created at BioRender.com (Toronto, Ontario, Canada).

TIMPs [24]. TIMPs byly zvýšené v časných stádiích IA (0–1 měsíce), v pozdějších stádiích IA (1–3 měsíce) naopak dramaticky vzrostla exprese MMP-2 a MMP-9.

Prostaglandin E2 receptory

Prostaglandin E2 (PGE2) je lipidový mediátor uplatňující se v zánětu. Syntetizuje se prostřednictvím cyklooxygenázy-2 (COX-2) a PGE-syntázy 1 (PGES-1). PGE-2 receptor deficientní myši měly nižší výskyt IA asociován s nižší infiltrací makrofágů [33].

Tumor necrosis factor-alfa a nukleární faktor-kappaB

Tumor necrosis factor (TNF)-alfa je cytokin sehrávající klíčovou roli v zánětu. U IA ovlivňuje zánětlivou odpověď makrofágů, hladkých svalových buněk a endotelu mimo jiné prostřednictvím nukleární faktor-kappaB (NF-kappaB). Starke et al. publikovali studii, ve které TNF-alfa knokoutované myši a myši, jež byly krmené inhibitory TNF-alfa,

měly proti jejich wild-type protějškům sníženou incidenci formace a ruptury IA [23]. Aoki et al. publikovali studii, ve které prokázali klíčovou roli transkripčního faktoru NF-kappa B, který je důležitým regulátorem exprese genů při zánětlivé odpovědi [25]. Ve své práci prokázali hlavně úlohu NF-kappa B v infiltraci makrofágů do stěny aneuryzmatu a jejich aktivaci.

Interleukin-1beta

Interleukin (IL)-1beta je prozánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými makrofágy v jejich odpovědi na zánět nebo poškození. Myši, které postrádaly IL-1beta, měly aneuryzmata, ale vykazovaly signifikantně nižší výskyt jejich pokročilých forem [34].

NADPH oxidáza

V zánětlivých procesech obecně dochází ke zvýšené tvorbě volných kyslíkových radikálů. Komplex NADPH oxidáza je jedním z enzymů odpovědných za tvorbu těchto

radikálů. Jednou z podjednotek komplexu NADPH oxidázy je p47phox, která je exprimována dominantně v neutrofilech a makrofázích. Formace aneuryzmat byla nižší s knokoutovanou podjednotkou p47phox. Zároveň byl ve stěně aneuryzmatu nižší podíl zánětlivých změn ve stěně IA [27].

Inducibilní nitrid oxid syntáza, endoteliální nitrid oxid syntáza a neuronální nitrid oxid syntáza

Inducibilní nitrid oxid syntáza (iNOS) je enzym, který je exprimován dominantně makrofágy a hladkými svalovými buňkami při zánětlivé odpovědi a cévním poškození. Sehrává důležitou roli v chronické zánětlivé reakci a degradaci poškozené pojivové tkáně. U knokoutovaných myši pro iNOS byl výskyt pokročilých forem aneuryzmatu nižší ve srovnání s jejich wild-type protějšky [35]. Endoteliální nitrid oxid syntáza (eNOS, NOS-3) je enzymem podílejícím se na regulaci vaskulárního tonu. Myši postrádající

Tab. 1. Přehled zkoumaných mechanismů patogeneze zánětu ve stěně IA u experimentálních modelů.

| Autoři | Název práce | Zkoumaná patogeneze IA | Použitý model |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kanematsu et al. [21] | Critical role of macrophages in the formation of intracranial aneurysm | význam makrofágů při vzniku IA | elastázou indukované IA u hypertenzních myši |
| Aoki et al. [26] | Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation | význam makrofágů při vzniku IA | potkaní model – Nagata et al. (1980) [38] myší model – Morimoto et al. (2002) [15] |
| Aoki et al. [32] | Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats | makrofágy derivované MMP-2 a -9 a jejich role v progresi IA | potkaní model – ligace levé karotidy a zadních větví renálních arterií, hypertenzní dieta, perorální podání lysyl oxidázy |
| Aoki et al. [24] | Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms | protektivní role TIMP-1 a TIMP-2 v progresi IA | potkaní (viz výše popsany model) a myší model s knockoutem v TIMP-1 a -2. IA navozeny pomocí ligace levé karotidy a zadních větví renálních arterií, myši byly krmeny stejnou dietou jako potkani |
| Starke et al. [23] | Critical role of TNF-alpha in cerebral aneurysm formation and progression to rupture | úloha TNF-alfa v progresi a ruptuře IA | nefrektomie, dieta s podáváním kortikosteron acetátu, elastáza do bazálních cisteren |
| Aoki et al. [25] | NF-kB is a key mediator of cerebral aneurysm formation | klíčová role NF-kB při vzniku IA | potkaní model – Hashimoto et al. (1978) [14] myší model – Morimoto et al. (2002) [15] |
| Aoki et al. [33] | PGE2-EP2 signalling in endothelium is activated by haemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF-kB | snížení výskytu IA u myši s inhibicí cyklooxygenázy-2 nebo EP2 | potkaní model – Hashimoto et al. (1978) [14] myší model – Morimoto et al. (2002) [15] |
| Aoki et al. [27] | Reactive oxygen species modulate growth of cerebral aneurysms: a study using the free radical scavenger edaravone and p47phox(-/-) mice | snížená formace IA u myši postrádajících podjednotku NADPH oxidázy | potkaní model – Hashimoto et al. (1978) [14] myší model – Morimoto et al. (2002) [15] |
| Moriwaki et al. [34] | Impaired progression of cerebral aneurysms in interleukin-1beta-deficient mice | snížení výskytu pokročilých forem IA u myších postrádajících IL-1beta | myší model – Morimoto et al. (2002) [15] |
| Sadamasa et al. [35] | Disruption of gene for inducible nitric oxide synthase reduces progression of cerebral aneurysms. | snížení výskytu pokročilých forem IA u myších postrádajících iNOS | myší model – Morimoto et al. (2002) [15] |
| Abruzzo et al. [19] | Cerebral aneurysm formation in nitric oxide synthase-3 knockout mice | zvýšená produkce IA u myši postrádajících eNOS (NOS-3) | myší model – ligace levostranné karotidy |
| Aoki et al. [36] | Complementary inhibition of cerebral aneurysm formation by eNOS and nNOS | zvýšená tvorba IA u myši postrádajících eNOS a nNOS, kompenzační mechanismus nNOS u eNOS deficientních myši | potkaní model – Hashimoto et al. (1978) [14] myší model – Morimoto et al. (2002) [15] |
| Tada et al. [37] | Estrogen protects against intracranial aneurysm rupture in ovariectomized mice | protektivní role estrogenu-beta před rupturou IA | arteriální hypertenze (deoxykortikosteron-acetát v dietě) + injekce elastázy do pravé bazální cisterny |

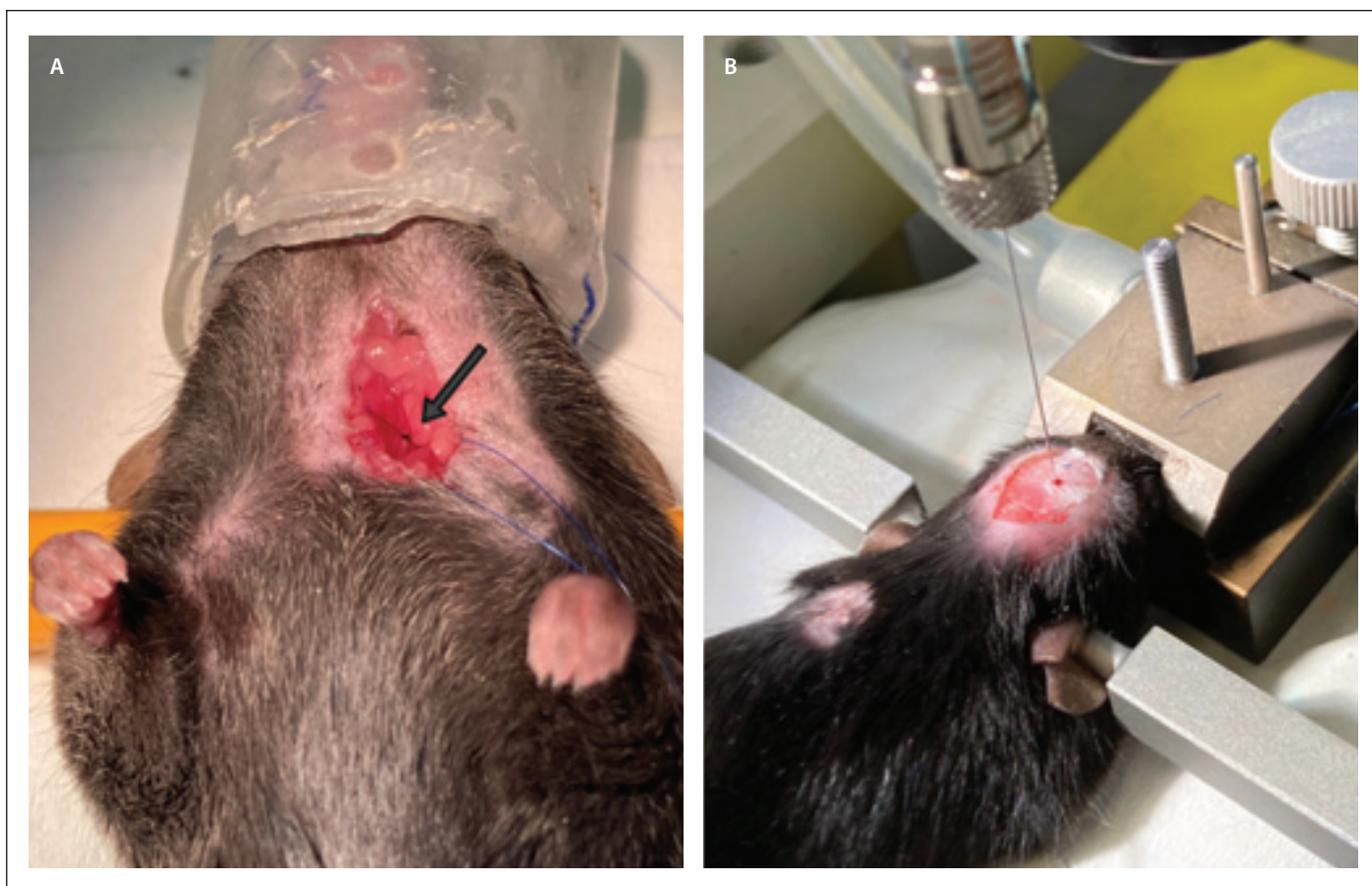
eNOS – endoteliální nitrid oxid syntáza; IA – intrakraniální aneurysma; IL – interleukin; iNOS – inducibilní nitrid oxid syntáza; MMP – matrixové metaloproteinázy; NF – nukleární faktor; nNOS – neuronální nitrid oxid syntáza; TIMP – inhibitory matrixových metaloproteináz; TNF – tumor necrosis factor

tento enzym měly signifikantně vyšší výskyt IA [19]. Další studie autorů Aoki et al. se zaměřovala jak na eNOS, tak neuronální NOS (nNOS), a to se zjištěním, že myši postrádající eNOS mají stejnou incidenci formace IA jako jejich wild-type protějšky. Zároveň zjistili, že

knokautované myši pro eNOS mají kompenzačně vyšší expresi nNOS ve srovnání s wild-type jedinci. Myši, které měly vyřazen gen jak v eNOS, tak v nNOS, vykazovaly zvýšenou incidenci formování IA provázenou infiltrací makrofágů [36].

Protektivní role estrogenu

Určité studie ukazují vyšší výskyt prasklých IA u postmenopauzálních žen. Ve stěně lidských vzorků IA byla nalezena silná exprese estrogenových receptorů (ER), a to jak ER-alpha, tak ER-beta. Ve studii autorů Tada et al.



Obr. 2. Navození intrakraniálního aneuryzmatu u myši (model podle [20]) – (A) podvazání levé a.carotis communis u myši; (B) návrt a aplikace elastázy.

Fig. 2. Induction of intracranial aneurysm in mice (model by [20]) – (A) ligation of the left common carotid artery in mice; (B) burr hole and application of elastase.

byl na myších samičkách s bilaterální ovariectomií (tj. u postmenopauzálních myši) pozorován protektivní účinek estrogenu-beta ve smyslu signifikantního snížení ruptury IA [37].

Zkoumané mechanismy patogeneze IA u hlodavců jsou zpracovány v tab.1.

Potencionální terapeutické cíle vedoucí ke snížení výskytu IA

Pacienta s neprasklým aneuryzmatem můžeme v současné době dispenzarizovat nebo mu nabídnout aktivní ošetření, ať již chirurgicky, či endovaskulárně. Korekce krevního tlaku je dnes již součástí prevence, stejně jako zanechání kouření. V budoucnu by mohla přicházet v úvahu možnost terapeutického ovlivnění redukcí zánětu, který je dominantním rysem progresu a event. ruptury IA [9], např. aspirinem, u kterého již studie prokázaly snížení výskytu ruptury IA [39], případně inhibicí MMP doxycyklinem [16] nebo inhibicí TNF-alfa [23]. U postmenopauzálních žen by přicházelo do úvahy podávání estrogenů [37]. V současné době ani

jedna z uvedených možností není v běžné klinické praxi rozšířená.

Naše pilotní zkušenosti s modifikovaným modelem (Hosaka et al., 2014)

V naší pilotní studii jsme u 20 pokusných myši použili experimentální model autorů Hosaka et al. K navození chronické arteriální hypertenze byla provedena ligace levé a. carotis communis a pravé a. renalis. Myši byly krmené hypertenzní dietou, která obsahovala 8% NaCl a 0,12% beta-aminopropionitril. Týden po první operaci byla myšim aplikována pomocí stereotaktických metod injekce elastázy do bazální cisterny a do podkoží aplikována mikropumpa s angiotenzinem II. Pokus byl ukončen 3 týdny po injekci elastázy nebo v případě suspekce na rupturu na základě neurologických příznaků myši, jakými byly lateralizace myši nebo významný úbytek na váze, tj. více než 10 %. Prasklé aneuryzma jsme pozorovali u 2 z 20 pokusných myši. Autoři popisují 100% incidenci aneuryz-

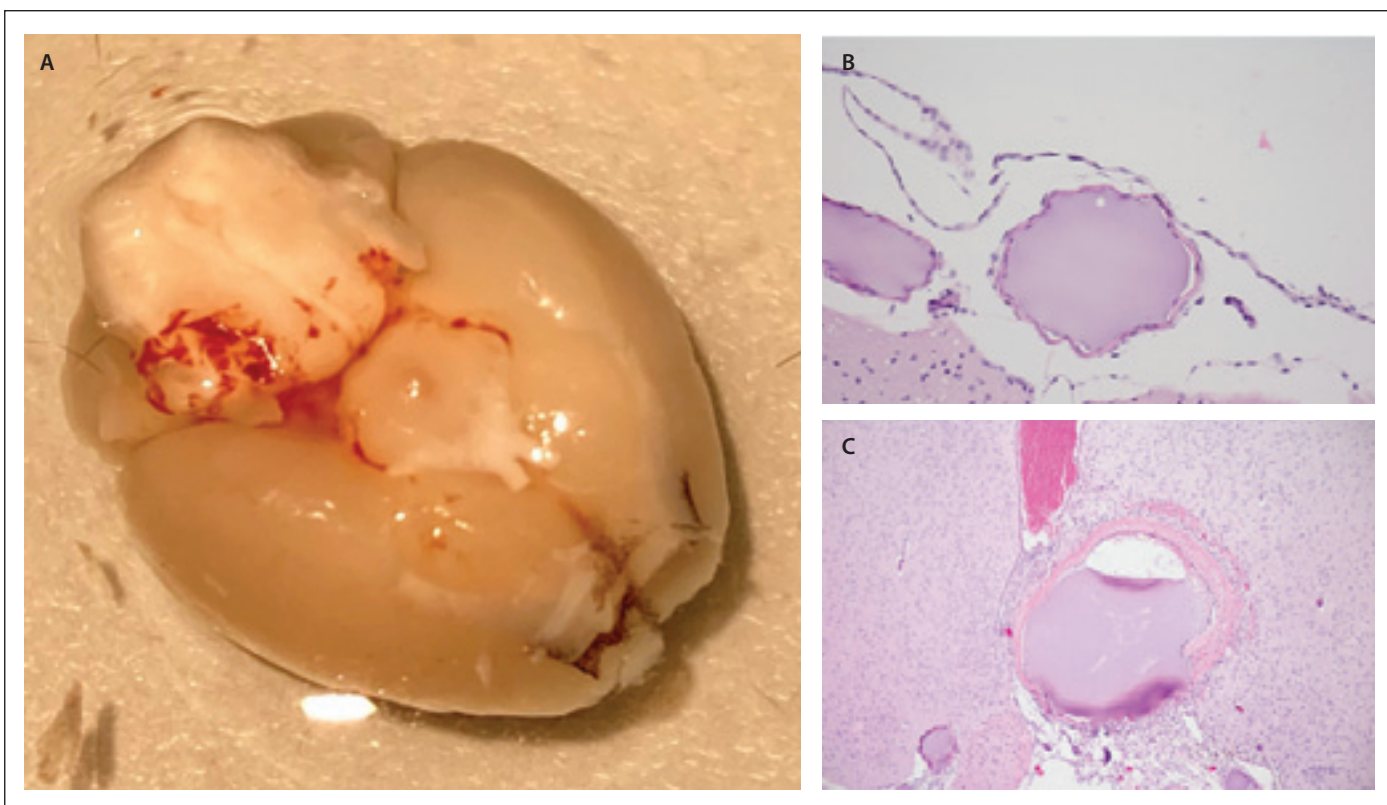
mat u myši a rupturu dle dávky elastázy v rozmezí 20–50 %. Na základě našich prvotních zkušeností je dle našeho názoru efektivita tohoto modelu nižší, než autoři deklarují. Jedním z důvodů může být účinnost elastázy, která se může u jednotlivých výrobců lišit. Autoři dané studie jsme kontaktovali a máme v plánu postupy dále optimalizovat.

Shrnutí naší pilotní studie je na obr. 2 a 3.

Diskuze a závěr

Patogeneze aneuryzmat je komplexní děj, ve kterém důležitou roli sehrávají aberantní hemodynamika a zánět, vč. hereditárních a hlavně získaných faktorů [9].

Experimentální modely jsou nápomocné z hlediska objasnění aspektů patologických změn ve stěně aneuryzmatu. V klinických datech jsme limitováni např. v oblasti studia časové posloupnosti zánětlivých změn ve vztahu k ruptuře či vlivu klíčových působků ovlivňujících stabilitu stěny výdutí. Dosud byly publikovány články, které se zabývají rolí makrofágů u vzniku IA [21], dysbalancí mezi



Obr. 3. Výsledky – (A) subarachnoidální krvácení u myši; (B) céva myši bez známek aneuryzmatu; (C) céva myši s prasklým aneuryzmatem.

Fig. 3. Results – (A) subarachnoid hemorrhage in mice; (B) mice vessel with no evidence of aneurysm; (C) ruptured intracranial aneurysm in mice.

matrixovými metaloproteinázami a jejich inhibitory [24,32], konkrétními cytokiny nebo transkripčními faktory [25,33,34]. V tuto chvíli ale žádné konkrétní výsledky využitelné v klinické praxi nejsou publikovány.

Zároveň však existují limity zvířecího modelu IA. Aneuryzmata jsou v modelu uměle indukována, a nejde tedy o počátek jejich přirozeného vývoje. IA se v průběhu života člověka formují řádově několik měsíců až desítek let [40], u modelů je tento proces několikrát rychlejší [12]. Další limity mohou spočívat v odlišnostech v patofyziologii člověka a modelovém zvířeti jak z hlediska aberantní hemodynamiky, tj. anatomie cév Willisova okruhu, tak zánětlivých změn. Experimentální zvířecí modely jsou také časově i technicky náročné na provedení. Model zároveň není jednotný, různé výzkumy přinášejí mírnou technickou modifikaci indukování aneuryzmatu, a tím pádem je o to těžší a náročnější jeho interpretace. Samotná definice aneuryzmatu se v různých publikacích odlišuje. Další velkou nevýhodou modelů je jejich cena. V případě geneticky upravovaných, tj. knokautovaných myši se dostáváme dle konkrétní mutace na cenu několika desítek tisíc korun za kus.

I přes veškeré limity, které zvířecí model má, vidíme jejich nepostradatelnou roli ve výzkumu IA hned v několika směrech. Jedním ze směrů je výzkum molekulárních mechanismů a případné zacílení diagnostiky a terapie. Do budoucna vidíme možné využití experimentálního modelu k posouzení výsledků našeho klinického výzkumu zabývajícího se polarizací makrofágů ve stěně prasklých a neprasklých aneuryzmat v lidských vzorcích [41]. Jednou z největších limitací výše uvedené studie je objasnění časového okna, tj. které změny nastávají před rupturou, a naopak které jsou následkem ruptury IA, což považujeme za jednu z nejzávažnějších limitací při výzkumu lidských aneuryzmat.

Výsledky experimentálního modelu by mohly být v budoucnu nápomocné při objasnění patogeneze IA, která dodnes není zcela prozkoumaná, dále z hlediska indikace dispenzarizace vs. aktivního řešení neprasklých IA, případně nasazení protektivní medicíny.

Etické aspekty

Veškeré experimenty byly prováděny v souladu se Směrnicí Rady Evropy ze dne 22. září 2010 (2010/63/

EU). Projekt pokusů pod číslem 77/2020 byl schválen Etickou komisí Ústavu experimentální medicíny a následně komisí Akademie věd České republiky.

Finanční podpora

Projekt byl podpořen grantem Agentury pro zdravotnický výzkum (NU22-08-00124) a Vnitřní grantovou agenturou Krajské zdravotní, a.s. (IGA-KZ-2019-1-11) a (IG9-217111043).

Konflikt zájmů

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem práce nemají žádný konflikt zájmů.

Literatura

1. Macdonald RL, Schweizer TA. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 2017; 389(10069): 655–666. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30668-7.
2. Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A et al. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol* 2009; 8(7): 635–642. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70126-7.
3. Ingall T, Asplund K, Mähönen M et al. A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke* 2000; 31(5): 1054–1061. doi: 10.1161/01.str.31.5.1054.
4. Bilguvar K, Yasuno K, Niemelä M et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. *Nat Genet* 2008; 40(12): 1472–1477. doi: 10.1038/ng.240.
5. Vlak MH, Algra A, Brandenburg R et al. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on

- sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 2011; 10(7): 626–636. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70109-0.
6. Greving JP, Wermer MJ, Brown RD, Jr. et al. Development of the PHASES score for prediction of risk of rupture of intracranial aneurysms: a pooled analysis of six prospective cohort studies. *Lancet Neurol* 2014; 13(1): 59–66. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70263-1.
7. Ertinç N, Brown RD Jr, Beseoglu K et al. The unruptured intracranial aneurysm treatment score: a multidisciplinary consensus. *Neurology* 2015; 85(10): 881–889. doi: 10.1212/WNL.0000000000001891.
8. Krings T, Mandell DM, Kiehl TR et al. Intracranial aneurysms: from vessel wall pathology to therapeutic approach. *Nat Rev Neurol* 2011; 7(10): 547–559. doi: 10.1038/nrneurol.2011.136.
9. Signorelli F, Sela S, Gesualdo L et al. Hemodynamic stress, inflammation, and intracranial aneurysm development and rupture: a systematic review. *World Neurosurg* 2018; 115: 234–244. doi: 10.1016/j.wneu.2018.04.143.
10. Frösen J, Tulamo R, Paetau A et al. Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 2012; 123(6): 773–786. doi: 10.1007/s00401-011-0939-3.
11. Hejčl A, Stratilová M, Švihlová H et al. Matematické modelování hemodynamiky mozkových aneuryzmat a možný přínos v klinické praxi z pohledu neurochirurgie. *Cesk Slov Neurol N* 2018; 81/114(5): 532–538. doi: 10.14735/amcsnn2018532.
12. Wang Y, Emoto TI, Lee J et al. Mouse models of intracranial aneurysm. *Brain Pathol* 2015; 25(3): 237–247. doi: 10.1111/bpa.12175.
13. Stehbens WE. Cerebral aneurysms of animals other than man. *J Pathol Bacteriol* 1963; 86: 160–168.
14. Hashimoto N, Handa H, Hazama F. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats. *Surg Neurol* 1978; 10(1): 3–8.
15. Morimoto M, Miyamoto S, Mizoguchi A et al. Mouse model of cerebral aneurysm: experimental induction by renal hypertension and local hemodynamic changes. *Stroke* 2002; 33(7): 1911–1915. doi: 10.1161/01.str.0000021000.19637.3d.
16. Nuki Y, Tsou TL, Kurihara C et al. Elastase-induced intracranial aneurysms in hypertensive mice. *Hypertension* 2009; 54(6): 1337–1344. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138297.
17. Makino H, Tada Y, Wada K et al. Pharmacological stabilization of intracranial aneurysms in mice: a feasibility study. *Stroke* 2012; 43(9): 2450–2456. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.659821.
18. Yoeli M, Hargreaves BJ. Brain capillary blockage produced by a virulent strain of rodent malaria. *Science* 1974; 184(4136): 572–573. doi: 10.1126/science.184.4136.572.
19. Abruzzo T, Kendler A, Apkarian R et al. Cerebral aneurysm formation in nitric oxide synthase-3 knockout mice. *Curr Neurovasc Res* 2007; 4(3): 161–169. doi: 10.2174/156720207781387222.
20. Hosaka K, Downes DP, Nowicki KW et al. Modified murine intracranial aneurysm model: aneurysm formation and rupture by elastase and hypertension. *J Neurointerv Surg* 2014; 6(6): 474–479. doi: 10.1136/neurintsurg-2013-010788.
21. Kanematsu Y, Kanematsu M, Kurihara C et al. Critical roles of macrophages in the formation of intracranial aneurysm. *Stroke* 2011; 42(1): 173–178. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.590976.
22. Tada Y, Wada K, Shimada K et al. Roles of hypertension in the rupture of intracranial aneurysms. *Stroke* 2014; 45(2): 579–586. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.003072.
23. Starke RM, Chalouhi N, Jabbour PM et al. Critical role of TNF-alpha in cerebral aneurysm formation and progression to rupture. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 77. doi: 10.1186/1742-2094-11-77.
24. Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T et al. Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke* 2007; 38(8): 2337–2345. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.481838.
25. Aoki T, Kataoka H, Shimamura M et al. NF-κB is a key mediator of cerebral aneurysm formation. *Circulation* 2007; 116(24): 2830–2840. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.728303.
26. Aoki T, Kataoka H, Ishibashi R et al. Impact of monocyte chemoattractant protein-1 deficiency on cerebral aneurysm formation. *Stroke* 2009; 40(3): 942–951. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.532556.
27. Aoki T, Nishimura M, Kataoka H et al. Reactive oxygen species modulate growth of cerebral aneurysms: a study using the free radical scavenger edaravone and p47phox(-/-) mice. *Lab Invest* 2009; 89(7): 730–741. doi: 10.1038/labinvest.2009.36.
28. Aoki T, Frösen J, Fukuda M et al. Prostaglandin E2-EP2-NF-κB signaling in macrophages as a potential therapeutic target for intracranial aneurysms. *Science Signaling* 2017; 10(465): eaah6037. doi: 10.1126/scisignal.aah6037.
29. Frösen J, Piippo A, Paetau A et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke* 2004; 35(10): 2287–2293. doi: 10.1161/01.STR.0000140636.30204.da.
30. Bruno G, Todor R, Lewis I et al. Vascular extracellular matrix remodeling in cerebral aneurysms. *J Neurosurg* 1998; 89(3): 431–440. doi: 10.3171/jns.1998.89.3.0431.
31. Caird J, Napoli C, Taggart C et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in human atherosclerotic and non-atherosclerotic cerebral aneurysms. *Eur J Neurol* 2006; 13(10): 1098–1105. doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01469.x.
32. Aoki T, Kataoka H, Morimoto M et al. Macrophage-derived matrix metalloproteinase-2 and -9 promote the progression of cerebral aneurysms in rats. *Stroke* 2007; 38(1): 162–169. doi: 10.1161/01.STR.0000252129.18605.c8.
33. Aoki T, Nishimura M, Matsuoka T et al. PGE2-EP2 signaling in endothelium is activated by haemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF-κB. *Br J Pharmacol* 2011; 163(6): 1237–1249. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01358.x.
34. Moriwaki T, Takagi Y, Sadamasa N et al. Impaired progression of cerebral aneurysms in interleukin-1beta-deficient mice. *Stroke* 2006; 37(3): 900–905. doi: 10.1161/01.STR.0000204028.39783.d9.
35. Sadamasa N, Nozaki K, Hashimoto N. Disruption of gene for inducible nitric oxide synthase reduces progression of cerebral aneurysms. *Stroke* 2003; 34(12): 2980–2984. doi: 10.1161/01.STR.0000102556.55600.3B.
36. Aoki T, Nishimura M, Kataoka H et al. Complementary inhibition of cerebral aneurysm formation by eNOS and nNOS. *Lab Invest* 2011; 91(4): 619–626. doi: 10.1038/labinvest.2010.204.
37. Tada Y, Wada K, Shimada K et al. Estrogen protects against intracranial aneurysm rupture in ovariectomized mice. *Hypertension* 2014; 63(6): 1339–1344. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03300.
38. Nagata I, Handa H, Hashimoto N et al. Experimentally induced cerebral aneurysms in rats: Part VI. Hypertension. *Surg Neurol* 1980; 14(6): 477–479.
39. Chalouhi N, Atallah E, Jabbour P et al. Aspirin for the prevention of intracranial aneurysm rupture. *Neurosurgery* 2017; 64 (CN_suppl_1): 114–118. doi: 10.1093/neuros/nyx299.
40. Ertinç N, Rinkel GJ. Unruptured intracranial aneurysms: development, rupture and preventive management. *Nat Rev Neurol* 2016; 12(12): 699–713. doi: 10.1038/nrneurol.2016.150.
41. Stratilová MH, Koblížek M, Štekáčková A et al. Increased macrophage M2/M1 ratio is associated with intracranial aneurysm rupture. *Acta Neurochir (Wien)* 2023; 165(1): 177–186. doi: 10.1007/s00701-022-05418-0.