

**AKVAPORIINIT SUBARAKNOIDAALIVUODON  
IN VITRO -MALLISSA**

Santeri Jolkkonen  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
IBT Neuroryhmä  
Tammikuu 2015

---

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
IBT Neuroryhmä

JOLKKONEN SANTERI: AKVAPORIINIT SUBARAKNOIDAALIVUODON IN VITRO -  
MALLISSA

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 39 s.  
Ohjaaja: Dosentti Susanna Narkilahti

Tammikuu 2015

Avainsanat: Subaraknoidaalivuodon sekundaarivaurio, patofysiologia, kantasolututkimus,  
akvaporiiinikanavat, qRT-PCR

---

Spontaani subaraknoidaalivuoto (SAV) on pääosin työikäisen väestön aivoverenvuoto, joka usein johtaa kuolemaan tai pysyvään toimintakyvyn alenemaan. Joka kolmannelle neurotehohoitoon asti selvinneelle potilaalle kehittyy sairaalassa aivojen sekundaarivaurio. Sekundaarivaurion nykyinen hoito on heikkotehoista ja vain osittain tutkimusnäyttöön perustuvaa.

Sekundaarivaurion patofysiologian selvittäminen mahdollistaisi uusien kohdennettujen hoitomuotojen kehittämisen. SAV:n kaltaisia neuropatologisia prosesseja voidaan mallintaa ihmisen alkion kantasoluista erilaistetussa hermosoluverkostossa.

Tämä tutkimus oli osa translationaalista SAV:n sekundaarivauriota tutkivaa SpareBrain-projektia, jonka yhdessä koeasetelmassa rakennettiin SAV:n *in vitro* -malli altistamalla hermosoluja verikomponenteille (veriplasma ja sentrifugoidut punasolut). Tarkastelimme hermosolujen akvaporiiinikanavien (AQP1, 4, ja 9) geeniekspression muutoksia eristämällä solunäytteiden lähetti-RNA:n neljästä aikapisteestä (24, 50, 100 ja 124 h). qRT-PCR:llä saadut tulokset analysoitiin  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -analyysimenetelmällä.

Plasmalle altistettuna hermosolujen AQP1:n ilmentyminen lisääntyi 50 tunnin kohdalla, mutta muita selkeitä muutoksia akvaporiiinikanavien geeniekspressiossa ei havaittu. Eläinkokeissa erityisesti AQP4:n on osoitettu osallistuvan aivoödeeman kehittymiseen simuloidussa SAV:ssa. Ihmiskudoksella vastaavia kokeita ei ole suoritettu. Kantasoluista erilaistetut hermosolut ovat lupaava *in vitro* -malli SAV:n sekundaarivaurion lisätutkimukselle.

# SISÄLLYS

<b>1 JOHDANTO</b> .....	<b>4</b>
1.1 SUBARAKNOIDAALIVUODON ILMAANTUVUUS, ALTISTAVAT TEKIJÄT JA ENNUSTE .....	4
1.2 SUBARAKNOIDAALIVUODON DIAGNOSTIIKKA .....	5
1.2.1 Subaraknoidaalivuodon kliininen kuva .....	5
1.2.2 Subaraknoidaalivuotopotilaan tutkimukset .....	6
1.3 SUBARAKNOIDAALIVUODON PATOFYSIOLOGIA .....	7
1.3.1 Primaarivaurio .....	7
1.3.1.1 Tilapäinen globaalia iskemia .....	8
1.3.1.2 Hematooman neurotoksisuus .....	8
1.3.1.3 Veri-aivoesteen toimintabäiriö ja aivoödeema .....	9
1.3.2 Sekundaarivaurio .....	10
1.3.2.1 Vasospasmi .....	11
1.3.2.2 Aivokuoren laajeneva iskemia .....	12
1.3.2.3 Mikrovasospasmi ja- tromboosi .....	13
1.3.2.4 Immuunivasteen sekä autonomisen hermoston aktivaatio .....	13
1.3.3 Akvaporiinikanavien merkitys subaraknoidaalivuodossa .....	14
1.4 SUBARAKNOIDAALIVUOTOPOTILAAN HOITO .....	15
1.4.1 Uusintavuoto .....	16
1.4.2 Hydrokefalus .....	16
1.4.3 Sekundaarivaurio .....	17
1.5 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET .....	19
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT</b> .....	<b>20</b>
2.1 NEURONIEN ERILAISTAMINEN KANTASOLUISTA .....	20
2.2 VERIKOMPONENTTIALTISTUS .....	21
2.3 KVANTTITATIIVINEN REAALIAIKAINEN KÄÄNTEISTRANSKRIPTIOPOLYMERAASIKETJUREAKTIO (QRT-PCR) .....	21
<b>4 TULOKSET</b> .....	<b>24</b>
4.1 VERTAILU AIKAPISTEEN SISÄLLÄ .....	24
4.2 VERTAILU ALTISTEEN SISÄLLÄ .....	27
<b>5 POHDINTA</b> .....	<b>30</b>
<b>6 LÄHTEET</b> .....	<b>33</b>

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Subaraknoidaalivuodon ilmaantuvuus, altistavat tekijät ja ennuste

Subaraknoidaalivuoto (SAV) on vakava aivoverenvuoto, joka johtaa usein kuolemaan tai pysyvään toimintakyvyn alenemaan. Tapauksia on vuosittain Suomessa noin 1000. Muista aivoverenkiertohäiriöistä poiketen potilaat ovat pääosin työikäisiä (keski-ikä 55 vuotta). (Fogelholm 1981). SAV:n ilmaantuvuus Suomessa on noin kaksinkertainen verrattuna kansainväliseen keskiarvoon eli 19.7 (95 % CI 18.1 - 21.3) 100 000 henkilövuotta kohti (de Rooij ym. 2007).

Spontaani SAV aiheutuu 85 %:ssa tapauksista aivovaltimoaneurysman puhkeamisesta ja verenvuodosta subaraknoidaalitilaan. Subaraknoidaalitila on aivo-selkäydinnesteen täyttämä tila kallon kiinnittyneen kovakalvon ja aivokudosta peittävän pehmeäkalvon välissä. Valtimoaneurysma kehittyy vuosien mittaan circulus Willis'in verisuonten haarautumiskohtiin yleensä karotiskierron alueelle. 5 %:lla spontaanin SAV:n syynä on AV-malformaatio. Muissa tapauksissa vuotokohta ja -syy jäävät usein epäselväksi, ja vuoto rajoittuu keskiaivojen alueelle. (van Gijn ja Rinkel 2001.)

2-3 %:lla aikuisista ilman riskitekijöitä kehittyy intrakraniaalinen valtimoaneurysma, osuus lisääntyy iän myötä. Aneurysmien muodostumiselle altistavia perinnöllisiä tekijöitä ovat autosomaalinen dominantti polykystinen munuaissairaus sekä suvussa esiintyneet SAV-tapaukset. Ateroskleroosi ja sen riskitekijät tupakointi, hypertensio ja alkoholin väärinkäyttö lisäävät myös riskiä. (Rinkel ym. 1998.) Aneurysman puhkeamisen laukaisevia tekijöitä ei täysin tunneta, mutta ainakin osa potilaista on saanut kohtauksen fyysisessä rasituksessa (Anderson ym. 2003).

Subaraknoidaalivuotopotilaiden tapauskuolleisuus Pohjoismaissa on noin 40 % (Nieuwkamp ym. 2009). Potilaista 12 % menehtyy välittömästi. Aneurysman sijainti circulus Willis'in vertebrobasilaarialueella

lisää välittömän menehtymisen riskiä (Huang ja Van Gelder 2002). Kuolleisuus on viime vuosikymmeninä laskenut hieman, mutta on edelleen suurta. Tämä liittyy todennäköisesti

tehostuneeseen primaaripreventioon sekä SAV:n diagnostiikan ja hoidon kehittymiseen (Stegmayr ym. 2004).

SAV muodostaa ainoastaan 5 % kaikista aivohalvauksista, mutta vakavuutensa ja potilasryhmänsä alhaisen keski-ikä vuoksi SAV:n takia menetetään yhtä paljon tuottavia elinvuosia kuin aivoinfarktin ja aivojen sisäisen verenvuodon takia (Johnston ym. 1998).

Valtaosalla sairaalahoitosta kotiutuneilla potilailla on ongelmia muistin, toiminnanohjauksen ja kielellisen ymmärtämisen kanssa. Tämä kognition alenema heikentää päivittäisistä toiminnoista selviytymistä (ADL), työhönpaluuta sekä elämänlaatua. Lisäoireina kaikesta tästä on masennusta, väsymystä ja unihäiriöitä. (Al-Khindi ym. 2010.)

## **1.2 Subaraknoidaalivuodon diagnostiikka**

### **1.2.1 Subaraknoidaalivuodon kliininen kuva**

Subaraknoidaalivuodon pääoire on äärimmäisen kova muutamissa sekunneissa alkanut päänsärky. Yhdellä kolmesta potilaasta tämä on ainoa oire. SAV:n päänsärky leviää koko pään alueelle ja sitä kuvataan elämän kovimmaksi päänsärkyksi. 10 %:lla perusterveydenhuoltoon äkillisen kovan päänsärlyn vuoksi hakeutuneista potilaista selittävänä syynä on subaraknoidaalivuoto. Päänsärkyyn liittyy noin puolella potilaista oksentelua. (Linn ym. 1998.) Lisäksi 10–43 %:lla SAV-potilaista on pienempi “varoitustuoto”, joka ilmenee äkillisen kovan päänsärkynä 6-20 päivää ennen varsinaista vuotoa (Polmear 2003).

Ensiapuun päässeistä potilaista kahdella kolmesta on alentunut tajunnan taso ja puolet näistä ovat koomassa (Brilstra ym. 2000). Niskajäykkyys on yleinen oire, joka kehittyy 3-12 tunnissa inflammatorisesta vasteesta subaraknoidaalitalan veriärsytykselle. Sitä ei välttämättä esiinny syvästi tajuttomilla tai vain vähän vuotavilla potilailla, joten niskajäykkyyden poissaolo ei riitä poissulkemaan SAV:ta päänsärkypotilailta. (Vermeulen ja van Gijn 1990.)

Akuutin vaiheen kallon sisäisen paineen nousun vuoksi verkkokalvon keskuslaskimo saattaa jäädä puristuksiin. Tästä seurauksena on yhdellä seitsemästä SAV-potilaasta oftalmoskopiassa havaittavissa olevia verkkokalvovuotoja (Tersonin oireyhtymä). (McCarron ym. 2004.) Vaihtelevia fokaalisia neurologisia oireita esiintyy mikäli aneurysma painaa aivohermoa, vuoto tihkuu aivoparenkyyymiin tai aivoverisuonet vuotoalueella vasokonstriktoituvat heti aneurysman puhkeamisen jälkeen. Tästä johtuen SAV voi oireistoltaan ajoittain suuresti muistuttaa aivoinfarktia. (van Gijn ym. 2007.)

Kaksi käytetyintä SAV:n kliinisen kuvan luokitteluasteikkoa ovat Huntin ja Hessin asteikko (Hunt ja Hess 1968) sekä maailman neurokirurgiyhdistyksen WFNS-luokittelu (World Federation of Neurological Surgeons Grading System for Subarachnoid Hemorrhage)(Teasdale ym. 1988).

Aivoverenvuodon laukaisema voimakas sympaattinen vaste voi aiheuttaa hypertensiivisen kriisin, ja katekoliamiinipitoisuuden nopea nousu rytmihäiriöitä, jotka alkuvaiheessa saattavat virheellisesti ohjata hoitoketjua akuutin sydäninfarktin suuntaan (Khechinashvili ja Asplund 2002). Lisäksi osalla potilaista ilmenee neurogeenista pulmonaarista ödemaa samasta yliaktiivisesta sympaattisesta vasteesta johtuen (Muroi ym. 2008).

### **1.2.2 Subaraknoidaalivuotopotilaan tutkimukset**

Tietokonetomografia (TT-kuvaus) on ensisijainen diagnostinen SAV-potilaan kuvausmenetelmä. Vuotopäivänä 95 %:lla potilaista on TT-kuvauksessa akuuttiin SAV:hen sopivat kuvantamislöydökset tavallisimmin sella turcican alueella, lateraalisissa sulcuksissa, hemisfäärien välissä tai takakuopassa. Vuoto voi myös suuntautua aivoparenkyyymiin ja -kammioihin sekä subduraalitalaan. (van der Wee ym. 1995.)

Vuotopäivää seuraavina päivinä TT-kuvauksen diagnostinen herkkyys laskee nopeasti. Tämän vuoksi lumbaalipunktiolla kerättävä aivo-selkäydinnesteenäyte on otettava kaikilta SAV:hen kliinisen kuvan perusteella sopivilta potilailta, joilla TT-kuvaus on negatiivinen. Lumbaalipunktio tulisi suorittaa vasta kuuden, mielellään 12 h kuluttua oireiden alkamisesta, sillä muuten ei voida erottaa, onko likvornäytteestä löytyvä veri peräisin vuodosta vai onko kyseessä pistoksen aikaansaama artefaktiveri. Ero näiden välille syntyy tuntien kuluessa subaraknoidaalitilassa punasolujen hajoamisessa (ainoastaan *in vivo*) entsyymaattisesti muodostuvasta bilirubiinista, joka välittömästi näytteenoton jälkeen suoritettavassa sentrifugoinnissa jättää koeputken pinnalle kellertävän ksantokromiakerroksen. Näytettä voidaan vielä tutkia spektrofotometrisesti ja PAD-tutkimuksella (erytrofagit) löydösten varmistamiseksi. (Saastamoinen 2009.)

Neurokirurgisessa klinikassa SAV-potilaalle tehdään jatkotutkimuksia operatiivisen hoidon suunnittelemiseksi. Tavoitteena on löytää rupturoitunut aneurysma eristämistä varten. Invasiivinen angiografia (digital subtraction angiography, DSA) on pisimpään käytössä ollut menetelmä ja sillä uskotaan olevan tarkin erottelukyky aneurysmien havaitsemiseksi. (Connolly ym. 2012.)

Noninvasiivinen TT-angiografia on kuitenkin syrjäyttämässä DSA:n ensisijaisena menetelmänä (Velthuis ym. 1999). TT-angiografian suuri etu on se, että tutkimus voidaan suorittaa TT-kuvauksen jälkeen potilaan ollessa vielä kuvauslaitteessa. Tämä on erityisen tärkeää hoidettaessa huonokuntoisia SAV-potilaita, jotka tarvitsevat välittömän hemikraniektomian hematooman evakuoimiseksi. Teknisen kehityksen myötä TT-angiografian tarkkuus ja herkkyys ovat jo invasiivisen angiografian tasoa. (Westerlaan ym. 2011.)

## **1.3 Subaraknoidaalivuodon patofysiologia**

### **1.3.1 Primaarivaurio**

Aivoaltimoaneurysman puhjetessa veri purkautuu lähes systolisella paineella subaraknoidaalitilaan. Primaarivaurio (early brain injury, EBI) tarkoittaa ensimmäistä 72 tuntia vuodosta (Kusaka ym. 2004).

Se aiheutuu aivojen tilapäisestä globaalista iskemiasta sekä aivokudoksen altistumisesta ekstravaskulaariselle neurotoksiselle verelle (Macdonald 2014).

### **1.3.1.1 Tilapäinen globaalia iskemia**

Aivoverenvuodosta seuraa kallonsisäisen paineen nousu, joka oletettavasti on usean osatekijän summa. Tällaisia tekijöitä ovat varhainen aivoödeema, aivo-selkäydinnestekierron häiriintyminen, vasoparalyysi ja aivojen verivolumin hetkellinen kasvu sekä muodostuvan hematooman painevaikutus itsessään. (Cahill ym. 2006.)

Subaraknoidaalivuoto ja kallonsisäisen paineen nousu aiheuttavat aivojen verenvirtauksen vähenemisen. Verenvirtaus vähenee, vaikka aivojen perfuusiopaine ei selkeästi alene (Schubert ym. 2009). Verenvirtauksen väheneminen selittyneekin pienempien aivoverisuonien mikrovasospasmeilla ja tromboosilla, mitkä aiheuttavat aivokudoksen tilapäisen globaalisen iskeemisen vaurion (Friedrich ym. 2012). Kliinisesti tämä ilmenee potilaan tajuttomuutena.

### **1.3.1.2 Hematooman neurotoksisuus**

Subaraknoidaalitalan hematooma aiheuttaa aivokuoren solutuhoa sekä turvotusta (Xi ym. 1998). Hematooman hemolyysistä vapautuu useita neurotoksisia aineita kuten punasolujensisäisiä kaliumioneja sekä rautapitoista hemoglobiinia. Näiden yhdisteiden on osoitettu aiheuttavan hermosolujen nekroosia sekä DNA:n pilkkoutumista. (Dreier ym. 2000, Matz ym. 2000.)

Verikomponentit edesauttavat myös vasospasmin (Pluta ym. 2009) sekä aivokuoren laajenevan iskemian kehittymistä (Dreier 2011).



### 1.1.1.3 Veri-aivoesteen toimintahäiriö ja aivoödeema

Ensiavussa SAV-potilaista 8 %:lla on TT-kuvauksessa laaja-alainen aivoödeema, ja kuuden päivän sisällä se kehittyy vielä 12 %:lle potilaista. Ödeema heikentää potilaiden ennustetta selkeästi (Claassen 2002). Aivoödeeman ajatellaan liittyvän kallon sisäisen paineen nousuun sekä veri-aivoesteen toimintahäiriöön (Mocco ym. 2007).

40 %:lla SAV-potilaista oli havaittavissa aivojen väriainetehosteisessa TT-kuvauksessa veri-aivoesteen toimintahäiriö viiden päivän sisällä vuodosta (Doczi 1985). Veri-aivoesteen toiminnan häiriintyminen aikaansaa aivoturvotukseen kahdella eri mekanismilla, jotka ovat sytogeeninen ja vasogeeninen ödeema (Mocco ym. 2007).

Tilapäinen globaali aivoiskemia johtaa hermosolujen anaerobiseen energiantuotantoon, hapettomaan depolarisaatioon sekä moninkertaiseen glutamaatin ylimäärään synapsiraossa. Tästä seurauksena on sytotoksinen ödeema, jossa intrasellulaaritila turpoaa osmoottisen virtauksen myötä (Paschen 1996). Ekstrasellulaaritalan ionivaje synnyttää transkapillaarisen gradientin molekyylien ja veden siirtymiselle intravaskulaaritalasta veri-aivoesteen läpi aivokudoksen ekstrasellulaaritalaan. Gradientin suuntaisen nestesiirtymän myötä aivojen kokonaistilavuus alkaa kasvaa (Liang ym. 2007). Molekyylit siirtyvät ehjän veri-aivoesteen läpi aktiivisella sekundaarisella kuljetuksella ja vesi akvaporiiinkanava 4:n läpi (Bloch ja Manley 2007).

Vasogeeninen ödeema johtuu veri-aivoesteen vaurioitumisesta. Vaurioituneen veri-aivoesteen läpi filtroituu aivokudoksen ekstrasellulaaritalaan makromolekyylejä, nestettä ja pahimmassa tapauksessa verisolujakin. Endoteelin tiiviiden liitosten pettäminen johtuu endoteelisolujen apoptoosista sekä soluväliaineen metalloproteiinaasien entsyymaattisesta hajotuksesta (Cahill ym. 2006). Soluväliaineen metalloproteiinaasien on toisaalta osoitettu osallistuvan myös aivokudoksen ja verisuonituksen korjautumisprosessiin (Rosenberg ja Yang 2007).

### 1.3.2 Sekundaarivaurio

Subaraknoidaalivuotoon liittyvä iskeeminen sekundaarivaurio (delayed cerebral ischemia, DCI) kehittyy joka kolmannelle potilaista (Dorsch 2011). Sekundaarivaurion kehittyminen huonontaa potilaan ennustetta selvästi (Rosengart ym. 2007).

Sekundaarivaurio kehittyy 3–14 päivää primaarivuodosta, tosin ainoastaan 5 % tapauksista enää kymmenen vuorokauden jälkeen (Petruk ym. 1988). Potilaan oirekuvaan liittyy neurologisia puoli-oireita sekä tajunnan tason laskua, jotka asteittain pahenevat tuntien kuluessa (Hijdra ym. 1986, de Rooij ym. 2011). Iskeeminen sekundaarivaurio voi olla myös oireeton ja sen huomaaminen on vaikeaa erityisesti sedatoiduilla potilailla. Oireettomista potilaista 10–20 %:lla näkyykin infarktaatiota pään TT-kuvauksessa (Schmidt ym. 2008).

Yleisesti ottaen noin 40 %:lla SAV-potilaista näkyy pään TT-kuvauksessa aivoinfarkteja, jotka voidaan luokitella kahteen lähes yhtä suureen ryhmään. Osalla potilaista on aivokuorella yksittäisiä infarkteja tyypillisesti lähellä ruptoitunutta aneurysmaa olettavasti primaarivaurioon liittyen. Toisilta taas löytyy lukuisia molemmille aivopuoliskoille levinneitä hajanaisia subkortikaalia infarkteja, jotka sijaitsevat usein kaukana rupturoituneesta aneurysmasta. (Rabinstein ym. 2005.) Jälkimmäiset aivoinfarktit todennäköisesti liittyvät sekundaarivaurioon.

Vergouwenin ym. (2010) määritelmä iskeemiselle sekundaarivauriolle: “Subaraknoidaalivuotopotilaalla ilmenevä uusi vähintään tunnin kestävä neurologinen fokaalioire tai tajunnantason lasku kahdella pisteellä Glasgow'n kooma-asteikolla. Muutos ei ilmene välittämättömästi aneurysman eristämisen jälkeen eikä sille löydy muuta selittävää syytä kliinisessä tutkimuksessa, pään TT- tai MRI-tutkimuksissa tai laboratoriokekeissa.”

Sekundaarivaurion diagnostiikassa apuna käytettäviä tutkimuksia ovat perinteinen invasiivinen angiografia, TT-angiografia, TT-perfuusiokuvaus sekä transkraniaalinen dopplerkaikukuvaus. Muita vähemmän käytettyjä menetelmiä ovat EEG, NIRS (near infrared spectroscopy), mikrodialyysi ja TDF (thermal diffusion flowmetry). (Macdonald 2014.)

Sekundaarivaurion patofysiologian tutkimus on keskittynyt vuosikymmeniä vasospasmin ympärille. Vasospasmin ehkäisy ei ole kuitenkaan parantanut potilaiden ennustetta (Cahill ja Zhang 2009). Sekundaarivaurion kehittymisen oletetaan alkavan jo primaarivaurion aiheuttamissa muutoksissa erityisesti mikrovaskulaarijärjestelmässä sekä veri-aivoesteessä. Sekundaarivaiheessa neuropatologiaan mukaan tulevat vasospasmi, aivokuoren laajeneva iskemia, mikrovasospasmi ja tromboosi sekä inflammaatio. (Macdonald 2014.)

### **1.3.2.1 Vasospasmi**

Vasospasmi on aivovaltimoiden paikallinen tai yleistynyt supistustila, joka kehittyy kahdelle kolmasosalle SAV-potilasta 3–14 päivää primaarivuodosta (Dorsch 2011). Subaraknoidaalitilan hematooman määrä on yhteydessä sekundaarivaurion kehittymisen todennäköisyyteen sekä vasospasmin kestoon ja vaikeusasteeseen (Reilly ym. 2004).

Hematooman hemolyysin kautta vapautuvat neurotoksiset aineet kuten vapaat happiradikaalit sekä hemoglobiini aiheuttavat oksidatiivista stressiä, inflammaatiota sekä endoteelivauriota (Pluta ym. 2009). Tämän seurauksena endoteliini 1:n ilmentyminen lisääntyy ja typpioksidipitoisuus laskee, mikä vasokonstriktioi verisuonia ja edesauttaa vasospasminin kehittymistä (Etminan ym. 2011).

Ainoastaan vakava-asteinen vasospasmi on selkeästi yhteydessä sekundaarivaurion aiheuttamaan aivoinfarktiin (Crowley ym. 2011). Aivoinfarktin syntymiseen vaikuttaa myös aivokudoksen kyky kestää iskemiaa. Tähän liittyviä tekijöitä ovat geeniperimä, aivokudoksen kollateraali- ja anastomoosiverisuonitus, sydämen minuuttitulavuus sekä aivojen aineenvaihdunnan taso (Macdonald 2014).

### 1.3.2.2 Aivokuoren laajeneva iskemia

Normaaliolosuhteissa hermosolujen sähkökemiallinen signalointi ja energia-aineenvaihdunta ovat tasapainossa. Laajeneva depolarisaatio (spreading depolarization) on yleisnimitys keskushermoston hermosolujen jatkuvalla depolarisaatiolle. Hermosolujen jatkuva depolarisaatio johtaa aivokuoren hermosolujen ionigradienttien sekä sähköisen toiminnan purkautumiseen, sytotoksiseen ödeemaan, dendriittihaarakkeiden vääristymiseen ja aktiopotentiaalien kulun estymiseen. (Dreier 2011.)

Laajenevasta depolarisaatiosta seuraa aivojen sähköisen toiminnan hitaita muutoksia (slow potential changes) ja vaimentumista (spreading depression). Nämä muutokset raportoitiin jo vuonna 1944. (Leao 1944.)

Normaalissa fysiologisessa tilanteessa sähköisesti aktiivisella aivoalueella verenkierto lisääntyy (neurovascular coupling). Laajeneva depolarisaatio saa aikaan ensin normaalia voimakkaamman verenkierron lisääntymisen (spreading hyperemia), jota seuraa verenkierron väheneminen (spreading oligemia). Tämä on normaali fysiologinen vaste, josta ei synny pysyvää aivovauriota. (Dreier 2011.)

Aivojen tasapainotilanteen häiriytyminen esimerkiksi subaraknoidaalivuodossa voi kuitenkin muuttaa hemodynaamisen vasteen päinvastaiseksi. Tällöin aivokuoren arteriolit supistuvat jatkuvasti vasteena laajenevaan depolarisaatioon, mikä aiheuttaa aivokuoren verenvirtauksen vähemisen ja iskeemisen vaurion. Ilmiötä kutsutaan aivokuoren laajenevaksi iskemiaksi (cortical spreading ischaemia.) (Koide ym. 2012.)

Aivokuoren arteriolien vasokonstriktio selittyy mahdollisesti astrosyyttien suurentuneella kalsiumpitoisuudella, mikä aktivoi solukalvon kaliumkanavia. SAV:ssa subaraknoidaalitilan hematoomasta aiheutuva kaliumpitoisuuden nousu sekä typpioksidipitoisuuden lasku voimistavat vasokonstriktiota. (Dreier 2011.)

Eräessä tutkimuksessa 18:lle SAV-potilaalle asetettiin aneurysman klipsauksen takia suoritettavan kraniotomian yhteydessä subduraaliset elektrodit sillä laajeneva depolarisaatio ei näy pinta-EEG:ssä. Näistä potilaista 72 %:lta löydettiin laajeneva depolarisaatio aivosähkökäyrässä. Seitsemälle potilaalle kehittyi sekundaarivaurio, joka oli anatomisesti ja ajallisesti yhteydessä angiografialla todettavaan

vasospamiin sekä laajenevaan depolarisaatioon. Neljällä potilaalla laajenevan depolarisaation kesto oli yli 60 minuuttia, mikä johti aivoinfarktaatioon. Aivokuoren laajeneva iskemia onkin todennäköisesti hyvin tärkeä tekijä sekundaarivaurion synnyssä. (Dreier ym. 2009.)

### **1.3.2.3 Mikrovasospasmi ja- tromboosi**

Aivojen verenvirtaus vähenee muutaman tunnin kuluttua primaarivuodosta sekä uudestaan sekundaarivaurion aikaan (Schubert ym. 2009). Verenvirtauksen väheneminen liittyy pienempien aivoverisuonien mikrovasospasmiin ja -tromboosiin (Friedrich ym. 2012). Post-mortem koepaloissa mikrotromboosia löytyy samoilta aivoalueilta, joissa oli todettavissa angiografinen vasospasmi ja sekundaarivaurio potilaan vielä eläessä. Koepalojen perusteella mikrotromboosi alkaa joko kahden vuorokauden sisällä primaarivuodosta tai sitten useita päiviä myöhemmin sekundaarivaurioon liittyen. (Stein ym. 2006.)

Eäinkokeissa subaraknoidaalitilaan valuva veri aiheuttaa aivokuoren sekä parenkyymien arteriolien vasokonstriktiota, mikrotromboosia ja veri-aivoesteen hajoamista. Vasokonstriktio liittyy mahdollisesti endoteelivaurioon ja edeltää mikrotromboosia. Endoteelivaurion taustalla on tilapäinen globaali aivoiskemia sekä hematooman hemolyysi. (Sabri ym. 2012.)

Hyytymisjärjestelmän aktivoituminen aneurysman puhjetessa hillitsee verenvuotoa, mutta voi mahdollisesti aiheuttaa myös embolioita distaalisempiin pieniin verisuoniin (Peltonen ym. 1997).

### **1.3.2.4 Immuunivasteen sekä autonomisen hermoston aktivaatio**

Tilapäinen globaali aivoiskemia voi laukaista voimakkaan autonomisen hermoston sympaattisen vasteen. Seurauksena tästä on systeemisiä komplikaatioita kuten neurogeeninen pulmonaariödeema,

hypertensiivinen kriisi sekä rytmihäiriöitä (Hinson ja Sheth 2012). Jopa 60 %:lle SAV-potilaista kehittyy lisäksi tulehdusreaktio-oireyhtymä (systemic inflammatory response syndrome, SIRS). (Tam ym. 2010.)

Eläinkokeissa subaraknoidaalivuoto lisää useiden inflammaatioon liittyvien proteiinien ilmentymistä (Rothoerl ja Ringel 2007). SAV-potilaan aivo-selkäydinnesteen tulehduksen välittäjäaineiden korkea pitoisuus on yhteydessä huonoon ennusteeseen (Molyneux ym. 2002). Inflammaatiovasteesta saattaa kuitenkin olla myös hyötyä korjausvaiheessa aivotapahtuman jälkeen (Iadecola ja Anrather 2011).

### 1.3.3 Akvaporiniikanavien merkitys subaraknoidaalivuodossa

Akvaporiniitit (aquaporin, AQP) ovat integraalisia solukalvoproteiineja. Ne ovat rakenteeltaan tetrameereja, joiden jokainen alayksikkö koostuu kuudesta kierteisestä domeenista. Jokaisessa tällaisessa alayksikössä (monomeeri) on aukko vesimolekyylien kululle molempiin suuntiin. Vesi liikkuu ainoastaan rajallista nopeutta kaksoislipikalvon läpi osmoottisen gradientin mukaisesti. Akvaporiniikanavat lisäävät solukalvon läpäisevyyttä vedelle. (Agre 2004.)

Ihmisestä on löydetty 13 AQP-kanavaa, jotka jaetaan kahteen alaryhmään läpäisyominaisuuksien perusteella. Osa kanavista läpäisee ainoastaan vesimolekyyliä (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 ja 8), mutta akvaglyseroporiinit (AQP3, 7, 9, 10 ja 12) läpäisevät lisäksi glyserolia sekä muita varauksettomia pienyhdisteitä. AQP11 ei ole luokittelussa mukana. Kolme akvaporiniikanavaa (AQP1, 4 ja 9) on löydetty aivoista. (Magni ym. 2006.)

AQP1 ilmentyy kolmannen aivokammion suonipunoksen solujen apikaalipinnalla ja osallistuu aivo-selkäydinnesteen tuotantoon. Lisäksi sitä löytyy pienistä tuntohermoista selkäytimen takasarvesta sekä trigeminus- ja vagushermon hermosolmusta. (Tait ym. 2008.)

AQP9 löytyy astrosyyteistä sekä katekoliamiinergisissä neuroneissa. Sen päätehtävä on glukoneogeenin aikana maksimoida glyserolin kulkua sisään hermosoluun sekä urean kulkua ulos hermosolusta. AQP9:n ajatellaan osallistuvan aivojen energia-aineenvaihdunnan säätelyyn. Eläinkokeissa AQP9:n ilmentyminen

lisääntyy useissa neuropatologioissa ja on ehdotettu, että kanava helpottaa laktaatin puhdistumista solun ulkoisesta tilasta iskemian jälkeen. (Badaut 2010.)

AQP4 on keskushermoston parenkyymien ja viereisen nesteaition rajapinnan hermotukikudoksesta löytyvä vesikanava, joka säätelee veden virtausta sisään ja ulos aivoista. Se ilmentyy voimakkaasti veri-aivoesteen astrozyttien päätelevyissä, pehmeäkalvon alaisessa glia limitansissa, aivokammioiden ependymaalisoluissa sekä subependymaalisissa astrozytteissa. AQP4:n ilmentyminen yleisesti ottaen lisääntyy aivoödeemassa. (Tait ym. 2008.)

Poistogeenisissä eläinkokeissa on osoitettu, että AQP4:llä on keskeinen mutta kaksijakoinen rooli aivoödeeman synnyssä (Manley ym. 2000). Yhtäältä se voimistaa sytotoksista ödeemaa mutta toisaalta vähentää vasogeenista ödeemaa. Mikäli aivoödeeman hoitoa tavoitellaan AQP-kanavien kautta, tulisi lääkemolekyylin olla samalla tavoin kaksoisvaikutteinen tai sitten inhibitorisen vaikutuksen tulisi olla ajallisesti tarkasti rajattu. Tämä edellyttäisi tarkempaa ajallista tietämystä AQP4:n ilmentymisen muutoksista aivoödeeman patofysiologiassa. (Tait ym. 2008.)

## **1.4 Subaraknoidaalivuotopotilaan hoito**

Neurotehohoitoon selvinneiden SAV-potilaiden hoidon päätavoite on pyrkiä ehkäisemään ja hoitamaan neurologisia komplikaatioita sekä systeemioireita. Päivystyksellistä neurokirurgista hoitoa vaativia tilanteita ovat massiivisen hematooman evakuaatio, hemikraniektomiolla hoidettava akuutti aivoödeema sekä ventrikulostomiaa ja aivopainemittarin asennusta edellyttävä akuutti hydrokefalus (van Gijn ym. 2007). Systeemioireiden onnistunut hoito vaikuttaa potilaan ennusteeseen jopa neurologisten oireiden hoitoa merkittävämmiin (Schuiling ym. 2005).

### 1.4.1 Uusintavuoto

Aneurysman uusintavuoto on SAV-potilaan keskeisin estettävä neurologinen komplikaatio. Suurin osa uusintavuodoista (73 %) tapahtuu 72 tunnin kuluttua primaarivuodosta (Naidech ym. 2005).

Uusintavuoto ilmenee potilaan neurologisen tilan äkillisenä laskuna ja se diagnosoidaan pään TT-kuvauksella.

Rupturoitunut aneurysma pyritään eristämään mahdollisimman nopeasti, viimeistään 3–4 päivän kuluessa hoitoon pääsystä. Optimaalisimmasta leikkausajankohdasta ei toistaiseksi ole tutkimustietoa (Whitfield ja Kirkpatrick 2001). Antifibrinolyttinen hoito ennen leikkausta vähentää uusintavuodon riskiä. Kohonneen aivoiskemiariskin vuoksi sillä ei ole kuitenkaan vaikutusta lopulliseen ennusteeseen (Baharoglu ym. 2013).

Aneurysmien eristäminen kirurgisesti kraniotomian avulla (klipsaus) on viime vuosina tehnyt tilaa endovaskulaariselle menetelmälle (koilaus). Vuoden 2005 Cochrane-katsauksen perusteella koilauksella saatiin aikaan parempia hoitotuloksia yhden vuoden seuranta-aikana kuin klipsauksella (RR 0.76, 95 % CI 0.67–0.88). Absoluuttinen riskin vähenemä oli 7 % (95 % CI 4–11 %). (Van der Schaaf ym. 2005.)

### 1.4.2 Hydrokefalus

Akuutti hydrokefalus kehittyy 48–72 tuntia primaarivuodon jälkeen noin 20 %:lle potilaista. Diagnoosi perustuu aivokammioiden laajentumisen osoittamiseen (bicaudate index) pään TT-kuvauksessa. Lisäksi 2–3 %:lle SAV-potilaista kehittyy subakuutti hydrokefalus 3–7 vuorokautta primaarivuodosta.

(Germanwala ym. 2010.)

Kahdella kolmesta hydrokefalus ilmenee kliinisesti tajunnan tason laskuna tai pretektaalialueen kompressio-oireina (valojäykät pupillit, silmien deviaatio). Neurologinen oireisto paranee spontaanisti



noin puolella tapauksista. Tästä johtuen on perusteltua seurata tokkuraisten, mutta muuten vakaiden, potilaiden tilaa 24 tunnin ajan ja pidättäytyä operatiivisesta hoidosta. (Germanwala ym. 2010.)

Aivo-selkäydinnestekierron häiriö hydrokefaluksen taustalla jaetaan perinteisesti etiologialtaan kahteen luokkaan: obstruktiiviseen ja kommunikoivaan. Subaraknoidaalivuodossa anatomisen obstruktion voi aiheuttaa aivokammionsisäinen tai *circulus Willis'*in takakierron alueen vuoto, mikä johtaa aivokammioiden laajentumiseen obstruktion proksimaalipuolella. Kommunikoivassa hydrokefaluksessa aivo-selkäydinnesteen absorptio lukinkalvojuvosten kautta on vähentynyt leptomengien permeabiliteetin laskun takia. Tämä on useammin mekanismina subakuutissa hydrokefaluksessa ja siihen liittyy korkeampi todennäköisyys pysyvään ventrikuloperitoneaaliseen suuntiin kuin obstruktiivisessa mekanismissa. (Graff-Radford ym. 1989.)

Lumbaalipistos voi palauttaa tajunnan tason neurologisesti vakailta potilailla, joilla ei ole aivoissa tilaa vievää hematoomaa tai runsasta aivokammionsisäistä vuotoa (Hasan ym. 1991). Ongelmina tässä hoitolinjassa ovat obstruktiotason määrittämisen epävarmuus sekä mahdollinen kohonnut uusintavuotoriski (Ruijs ym. 2005).

Ylivoimaisesti käytetyin hydrokefaluksen hoito on kuitenkin ventrikulostomia. Tähänkin liittyy mahdollinen kohonnut uusintavuotoriski sekä yleisenä komplikaationa ventrikuliitti, erityisesti mikäli katetrisaatio jatkuu yli kolme päivää (Hasan ym. 1989).

### **1.4.3 Sekundaarivaurio**

Sekundaarivaurioriskin pienentämiseen tähtäävän hoidon päätavoite on maksimoida aivojen hapen- ja glukoosinsaanti sekä ylläpitää potilaan elintoiminnot ja veriarvot mahdollisimman lähellä fysiologista tilaa. Tämän hetkisestä hoidosta vai pieni osa on näyttöön perustuvaa. (Macdonald 2014.)

Nimodipiini vähentää huonon ennusteen ja sekundaarivaurion riskiä (RR 0.67, 95 % CI 0.55-0.81)(Dorhout ym. 2007a). Alkuvaiheen suonensisäisen hoidon jälkeen suositusannos on 60 mg nimodipiinia suun kautta neljän tunnin välein, mikäli verenpainetaso tämän sallii. Tavallisimmin kalsiumkanavan salpaajia käytetään verenpainelääkkeinä. Ne salpaavat verisuonten seinämien sileiden lihassolujen kalsiumkanavia ja laajentavat täten verisuonia. Nimodipiini on erittäin lipofiilinen yhdiste ja se läpäisee veri-aivoesteen. (Connolly ym. 2012.)

Odotusten vastaisesti nimodipiinin hyödyllinen vaikutus ei näytä perustuvan vasospamin ehkäisyyn (Dorhout ym. 2007a). Mahdollisia hyödyllisiä mekanismeja ovat fibrinolyysin lisääntyminen, neuroprotektio sekä aivokuoren laajenevan iskemian estäminen (Macdonald 2014).

Antitromboottisella lääkehoidolla voitaisiin vähentää embolisaatiota ja meta-analyyseissä onkin saatu parannettua potilaiden ennustetta. Ongelmana tässä on aivoverenvuotojen lisääntyminen. (Dorhout ym. 2007b).

Mikäli potilaalle havaitaan kehittyvän sekundaarivaurio, suositellaan aloitettavaksi verenpainetta nostava hoito kuitenkin pysytellen normaalissa nestetäytössä. Jos tilanne ei tällä hoidolla parane on vaihtoehtona vielä hypoperfuusiosta kärsivän aivoalueen aivoaltimon pallolaajennus tai paikallinen suonensisäinen lääkkeellinen vasodilataatiohoito (Connolly ym. 2012). Nämä hoitomuodot ovat yleisesti käytettyjä viimeisenä keinona, vaikkei tehosta olekaan kunnollista tutkimustietoa (Kimball ym. 2011).

Lisäksi SAV-potilailla on useita systeemikomplikaatioita, joita kaikkia tulisi pyrkiä mimimoimaan kokonaisennusteen parantamiseksi. Yleisimpiä komplikaatioita ovat kuume, anemia, hypo- tai hypertensio, hyperglykemia, hyper- tai hyponatremia, hypomagnesemia, sydämen vajaatoiminta ja rytmihäiriöt sekä neurogeeninen pulmonaarinen ödeema sekä keuhkokuume. (Solenski ym. 1995, Wartenberg ym. 2006.)

## 1.5 Tutkimuksen tavoitteet

Tämä tutkimus on osa translationaalista SpareBrain-projektia (ClinicalTrials.gov - tunniste NCT02026596), jossa pyritään käyttämään perustutkimuksesta kertynyttä tietoa suoraan kliiniseen tutkimukseen. Projektin tutkimuskohteena on subaraknoidaalivuodon sekundaarivauriomekanismi.

Tämän tutkimuksen tavoitteena on tutkia erilaisten verikomponenttialtisteiden vaikutusta ihmisen alkion kantasoluista erilaistettujen hermosolujen akvaporiiinkanavaekspressioon simuloiden *in vitro* -mallissa subaraknoidaalivuotoa. Oletuksena on, että akvaporiiinkanavaekspression muutokset ovat ajallisesti sidoksissa SAV:n sekundaarivaurion kliiniseen ilmentymiseen primaarivuodon jälkeisinä päivinä.

Tutkimuksen toisena tavoitteena on testata koasetelman soveltuvuutta neuropatologisten prosessien *in vitro* -mallintamiselle. Tämä on uusi vaihtoehto perustutkimukseen eläinkokeiden ja post-mortem koepalojen rinnalle. Koasetelman suurena etuna olisi se, että se pohjautuisi ihmiskudokseen, mutta siinä silti pystyisi simuloimaan prosesseja, jotka eivät mitenkään olisi eettisesti mahdollisia lääketieteellisinä ihmiskokeina.

Vuosikymmenien tutkimustyöstä huolimatta SAV:n patofysiologia on edelleen pitkälti mysteeri ja nykyinen hoito ei pohjaudu kunnolliseen tutkimusnäyttöön. Vaurion taustalla olevien mekanismien selviäminen avaisi uusia mahdollisuuksia tämän hengenvaarallisen tilan parantamiseen.

Akvaporiikanavilla on osoitettu olevan rooli useissa neuropatologissa prosesseissa ja ne ovat todennäköisesti mukana myös subaraknoidaalivuodon vauriomekanismeissa.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Neuronien erilaistaminen kantasoluista

Tampereen yliopiston biolääketieteellisen teknologian yksiköllä (BioMediTech) on Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto Valviran hyväksyntä tehdä tutkimusta ihmisen alkioilla ja erilaistaa alkion kantasoluja (Dnro 1426/32/300/05). Lisäksi yksiköllä on Pirkanmaan sairaanhoitopiirin eettisen toimikunnan lupa kerätä aivo-selkäydinnestettä sekä verta terveiltä elektiiviseen kirurgiseen operaation tulevilta vapaaehtoisilta, joille suoritetaan spinaalianestesia (Tenhunen, R09006) sekä viljellä ja kasvattaa ihmisen alkion kantasolulinjoja hedelmättömyyshoidoista ylijääneistä alkiosta (Skotmann, R05116).

Tutkimuksen *in vitro* -mallia varten tarvittavat hermo- ja hermotukisolut erilaistetaan ihmisen alkion kantasoluista (human embryonic stem cells, hESC) Tampereen yliopiston biolääketieteellisen teknologian yksikön käyttämää menetelmää soveltaen (Nat ym. 2007, Lappalainen ym. 2010).

Tässä menetelmässä pluripotentteja kantasoluja viljellään ensin erilaistumattomassa soluvaiheessa elatusaineessa kasvatusmaljalla, jonka pohjalla on ihmisperäinen mitoottisesti-inaktiiviseksi käsitelty tukisolukko. Elatusneste vaihdetaan useita kertoja viikossa ja soluviljelmää dissekoidaan säännöllisesti mekaanisesti uusille kasvatusmaljoille pienempiin solurykelmiin. Erilaistumattomassa soluvaiheessa (hESC) pysyminen varmistetaan ajoittaisilla vasta-ainevärjäyksillä.

Kantasoluviljelmää varten optimoitu elatusaine sisältää KO-DMEM –mediumipohjaa, seerumin korvaajaa, glutamiinia, ei-välttämättömiä aminohappoja,  $\beta$ -merkaptotetanolia, penisilliiniä ja streptomysiiniä sekä fibroblasti-kasvutekijää. Inkubaatio tapahtuu 37 °C:een lämpötilassa 5 % hiilidioksidia sisältävässä normaalipaineisessa ilmassa.

Lopullista hermosoluiksi erilaistamista varten solut siirretään uusille kasvatusalustoille, joissa ne kelluvat aggregaateina elatusnesteessä pohjaan kiinnittymättömiä 20. viikkoon asti. Jälleen kerran elatusnestettä

vaihdetaan ja soluviljelmää dissekoidaan mekaanisesti sekä erilaistumisastetta seurataan vasta-ainevärjäyksillä säännöllisesti.

Eriilaistamisen tuloksena syntyneiden hermosoluverkoston sähköistä toimintaa testataan vielä mikroelektrodiverkostoilla (MEA: non-invasive microelectrode array) BioMediTechin protokollan mukaisesti (Heikkilä ym. 2009). Lopputuloksena kasvatusmaljalla on siis ihmisen toiminnallisesti aktiivista hermokudosta.

## **2.2 Verikomponenttialtistus**

Eriilaistamisprotokollan tuloksena saadut hermosolut altistettiin kasvatusmaljalla yhden tilavuusprosentin plasmaa (PL1) sekä yhden tilavuusprosentin sentrifugoiden hajotettuja punasoluja (PS1) sisältäville liuoksille. Näiden kahden altisteen kontrolliksi valittiin laimentamaton aivoselkäydinneste (CSF). Näitä kolmea altistetta kohden kerättiin solunäytteet kasvatusmaljalta neljässä aikapisteessä (24, 50, 100 ja 124 h). Solunäytteet sentrifugoitiin ja elatusaine pipetoitiin pois. Soluja huuhdeltiin vielä fosfaatilla puskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella ja lopuksi näytteet säilöttiin  $-70^{\circ}\text{C}$ :een RA1 -lyysis-puskuriin (Macherey-Nagel). Verikomponenttialtistuksen sekä näytteiden keräyksen suoritti Heikki Kiiski (SpareBrain-projekti).

## **2.3 Kvantitatiivinen reaaliaikainen käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio (qRT-PCR)**

Geenin ilmentymisen nopeutta kuvaa geenistä transkriptoidun lähetti-RNA:n (mRNA) määrä solussa. Näytteistä eristetty mRNA käännetään komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA), jota käytetään qRT-PCR:ssä. Polymeerasiketjureaktiossa alleelispesifit alukkeet kiinnittyvät cDNA:han monistuvien

geenisekvenssien päähän ja täten pystytään monistuskierroksien toistuessa tarkastelemaan haluttujen geenien määrää näytteissä.

Näytteiden mRNA-eristys suoritettiin NucleoSpin RNA XS – sarjalla valmistajan ohjeiden mukaisesti (Macherey-Nagel). Eristetyn RNA:n konsentraatio määritettiin NanoDropilla, jonka jälkeen näytteistä otettiin 50 ng RNA:ta cDNA-kääntöön High Capacity cDNA reverse transcription – sarjalla valmistajan ohjeiden mukaisesti (Applied Biosystems).

qRT-PCR:ssä tarkasteltiin akvaporiinikanavageenien ilmentymistä kanavista numero 1, 4 ja 9. Lisäksi mukana oli qRT-PCR -analyysimenetelmän edellyttämä endogeenikontrolli glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi (GAPDH) sekä näytteiden suhteellista solujakaumaa kuvaava neurofilamentti (NF-68) hermosoluille ja gliaalinen fibrillaarinen hapan proteiini (GFAP) astrosyyteille. Kaikkien alukkeiden tuottaja oli Applied Biosystems.

qRT-PCR toteutettiin Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR – laitteistolla (Applied Biosystems). Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme 15 µl:n replikaattia, joiden koostumus oli seuraava: 1 µl cDNA:ta, 0,75 µl TaqMan Gene – alukkeita, 7,5 µl TaqMan Gene Expression Master Mixiä sekä 5,75 µl nukleaasivapaata vettä. Polymeraasiketjureaktion denaturaatiovaihe oli kymmenen minuuttia 95 °C:ssa ja tätä seurasi neljäkymmentä monistuskierrosta, joissa alukkeiden liittymisvaihe oli 15 sekuntia 95°C:ssa ja pidentymisvaihe yhden minuutin 60 °C:ssa.

Jokaisen näytteen kolmen replikaatin kynnysarvokierroksista ( $C_t$ ) laskettiin keskiarvo, jota käytettiin  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  – analyysimenetelmässä (Livak ja Schmittgen 2001), joka on yleisin relatiivinen qRT-PCR:n analyysimenetelmä. Mikäli replikaatin kynnysarvokierrosluku erosi näytteen kahdesta muusta replikaatista yli 0,5 kierrosta, jätettiin se pois analyysistä.

Vertailtaessa näytteitä saman aikapisteen sisällä  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  – analyysimenetelmän kaava oli seuraava:

$$2^{-((KohdeC_t - EndoC_t) - (KohdeCalC_t - EndoCalC_t))}$$

- KohdeC<sub>t</sub> - EndoC<sub>t</sub> = Altiste
  - KohdeC<sub>t</sub> = Tarkasteltava geeni (AQP1, AQP4, AQP9, NF-68, GFAP)

- EndoC<sub>t</sub> = Endogeenikontrolli (GAPDH) samasta aikapisteestä ja samassa altisteessa
- KohdeCalC<sub>t</sub> - EndoCalC<sub>t</sub> = Kontrolli
  - KohdeCalC<sub>t</sub> = Tarkasteltavan geenin replikaattien keskiarvo samassa aikapisteessä aivo-selkäydinnesteessä
  - EndoCalC<sub>t</sub> = Endogeenikontrollin replikaattien keskiarvo saman aikapisteen aivo-selkäydinnesteessä

Vertailtaessa näytteitä saman altisteen sisällä  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -analyysimenetelmän kaava oli seuraava:

$$2^{-((KohdeC_t - EndoC_t) - (KohdeCalC_t - EndoCalC_t))}$$

- KohdeC<sub>t</sub> - EndoC<sub>t</sub> = Altiste
  - KohdeC<sub>t</sub> = Tarkasteltava geeni (AQP1, AQP4, AQP9, NF-68, GFAP)
  - EndoC<sub>t</sub> = Endogeenikontrolli (GAPDH) samasta aikapisteestä ja samassa altisteessa
- KohdeCalC<sub>t</sub> - EndoCalC<sub>t</sub> = Kontrolli
  - KohdeCalC<sub>t</sub> = Tarkasteltavan geenin replikaattien keskiarvo samassa altisteessa ensimmäisessä aikapisteessä
  - EndoCalC<sub>t</sub> = Endogeenikontrollin replikaattien keskiarvo samassa altisteessa ensimmäisessä aikapisteessä

Kaavalla saaduista replikaattikohtaisista suhdeluvuista laskettiin edelleen keskiarvo näytteelle lopulliseen analyysiin. Tällä asetelmalla saatiin tieto altisteen vaikutuksesta geenin ilmentymiseen oletusarvoisesti vakiona ilmentyvän endogeenikontrollin suhteen. Yhdessä polymeraasiketjureaktiossa oli yhtäaikaaisesti kaikki saman aikapisteen näytteet. Eri aikapisteiden välisten suhdelukujen vertailun oletuksena oli vakiona ilmentyvän endogeenikontrollin lisäksi oletus muuttumattomia säilyneistä reaktio-olosuhteista.

## 4 TULOKSET

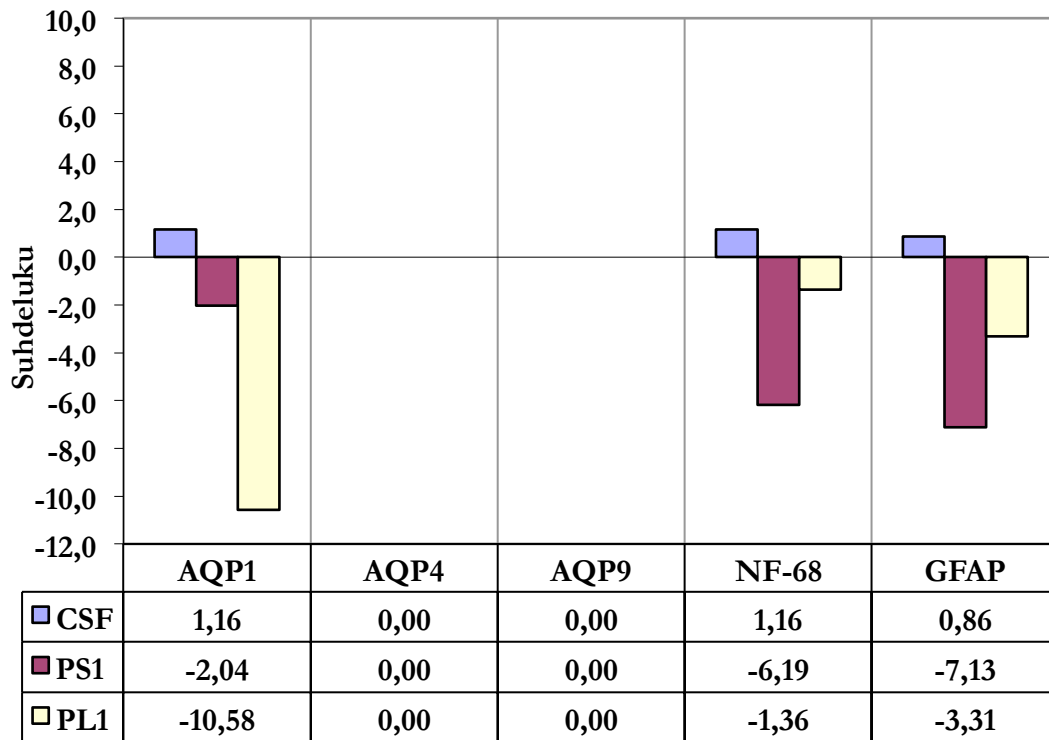
Tässä koeasetelmassa näytteitä oli yhteensä kaksitoista kolmessa altisteessa neljästä eri aikapisteestä. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme replikaattia polymeraasiketjureaktioon. Yleisesti ottaen altisteiden pitoisuudet olivat mahdollisesti liian korkeita hermosoluille ja useissa näytteissä endogeenikontrollinkin kynnysarvokierrosluvut jäivät hyvin korkeiksi soluvaurion merkkinä.

### 4.1 Vertailu aikapisteen sisällä

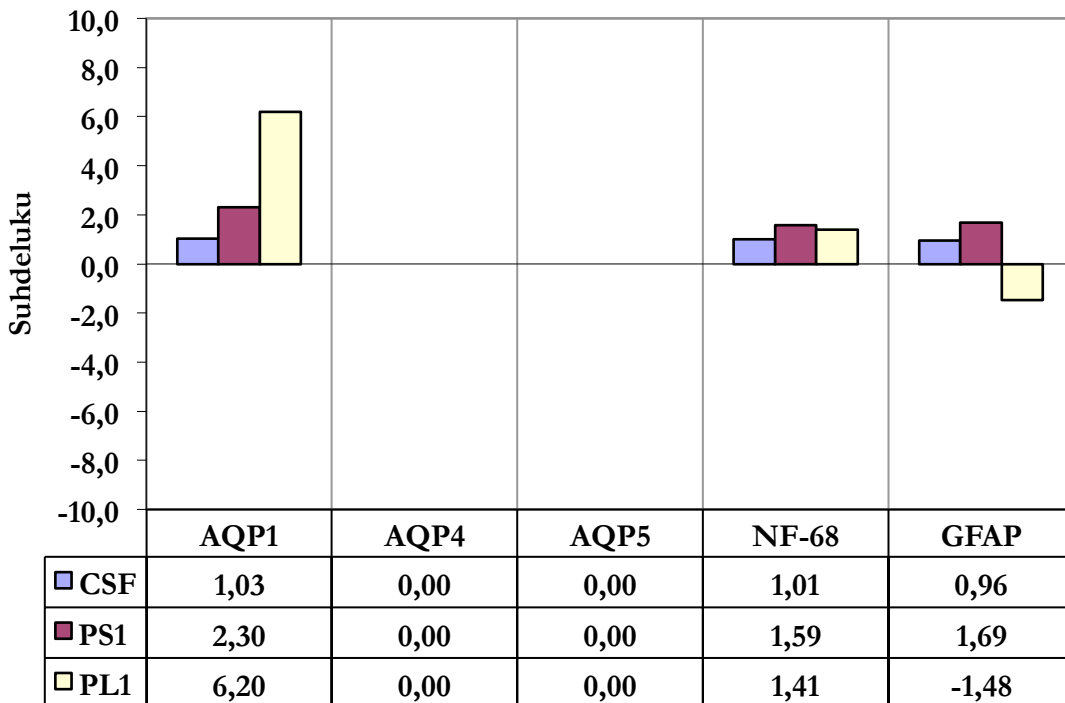
Tarkasteltaessa geenien ilmentymisen suhdetta saman aikapisteen sisällä on havaittavissa kaksivaiheinen muutos akvaporinikanava 1:n geeniekspressiossa plasmalle altistettuna. 24 tunnin kohdalla AQP1:n suhdeluku on -10,58, mutta 50 tunnin kohdalla samaisessa altisteessa AQP1:n suhdeluku on noussut arvoon 6,20. Tämä tosin selittyy 24 tunnin kohdalla sillä, että CSF-näytteen GAPDH:n  $C_t$ -luku on suurempi kuin PL1-näytteessä ja AQP1:n  $C_t$ -luvut ovatkin näytteissä itse asiassa lähes samaa tasoa. CSF-näytteen korkea AQP1:n suhdeluku selittyy siis näytteenkäsittelyn aiheuttamasta solutuhosta. 50 tunnin kohdalla kaikkien näytteiden  $C_t$ -luvut ovat kuitenkin vertailukelpoisia, joten tässä tutkimussarjassa todetaan AQP1:n ilmentymisen lisääntymistä plasmalle altistettuna tässä aikapisteessä. Myöhemmissä aikapisteissä geenin ilmentyminen tasoittuu samaan tasoon endogeenikontrollin suhteen.

Akvaporinikanavien 4 ja 9 kynnysarvokierrosluvut ovat niin korkeita, ettei niitä voi ottaa mukaan analyysiin. 24 tunnin kohdalla sekä NF-68 (-1,36) että GFAP (-3,31) ovat plasma- ja punasolualtisteessa selkeästi suppressoituina edellä mainittuun näytteenkäsittelyn aiheuttamaan solutuhoon liittyen.

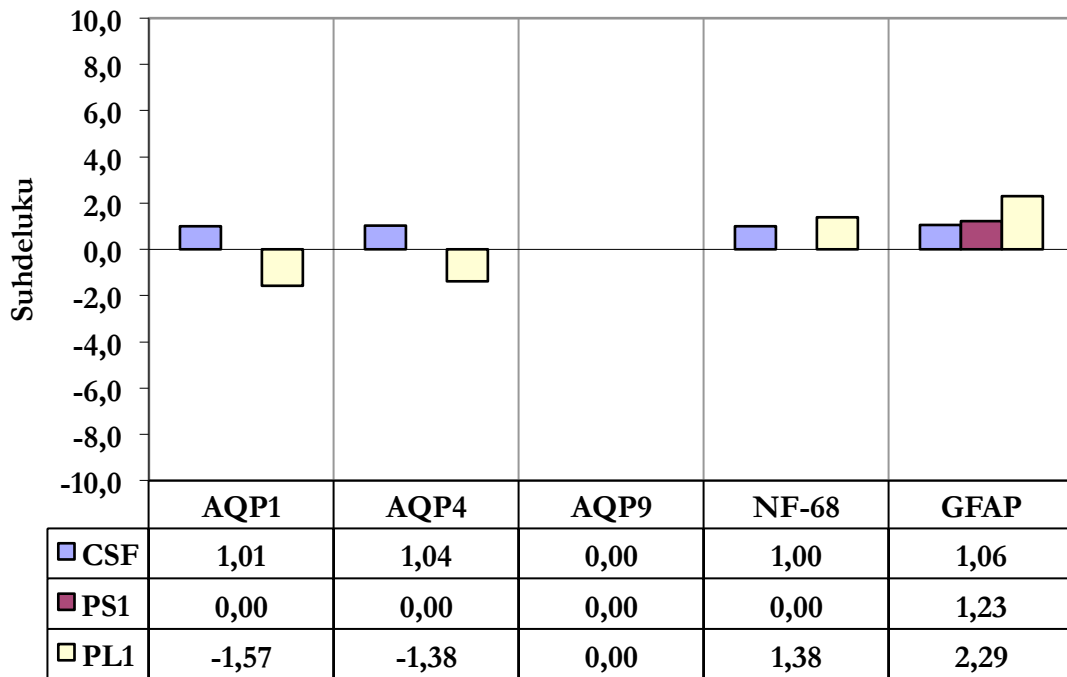




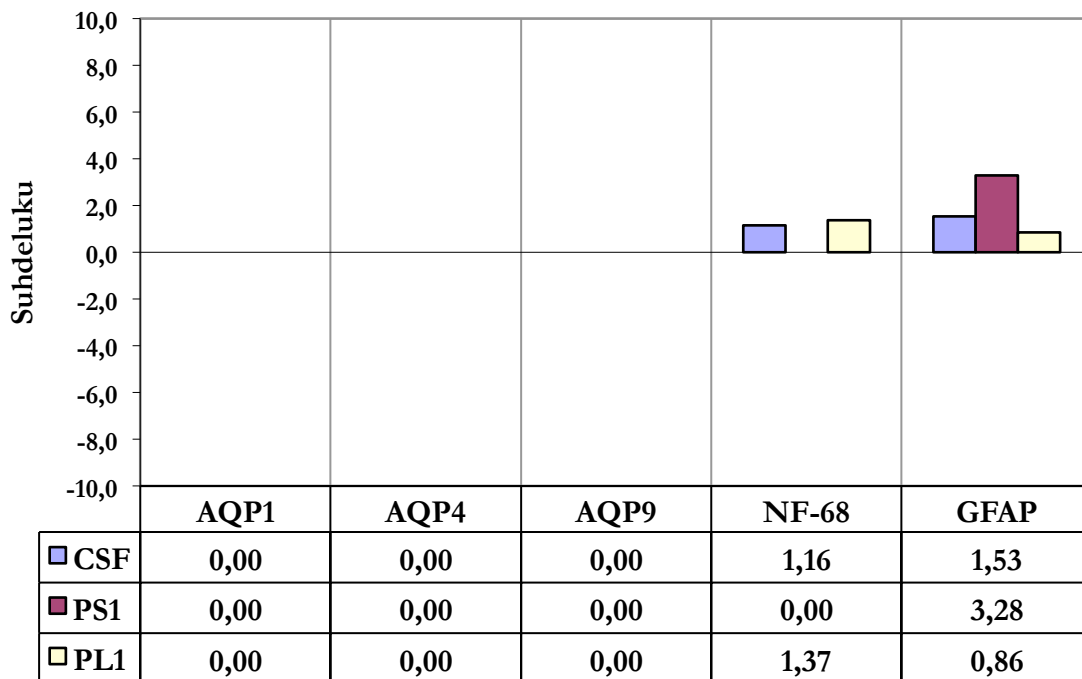
Kuvio 1. Vertailu aikapisteen sisällä 24 tunnin kohdalla.



Kuvio 2. Vertailu aikapisteen sisällä 50 tunnin kohdalla.



Kuvio 3. Vertailu aikapisteen sisällä 100 tunnin kohdalla.



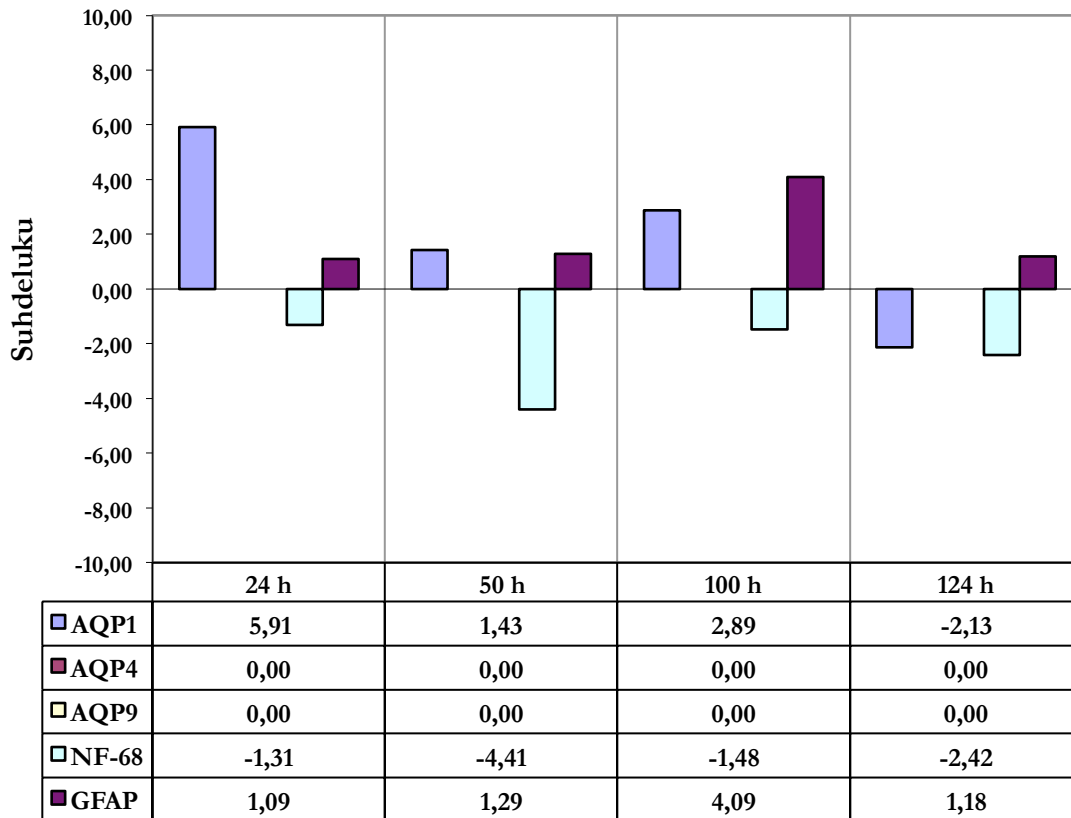
Kuvio 4. Vertailu aikapisteen sisällä 124 tunnin kohdalla.

## 4.2 Vertailu altisteen sisällä

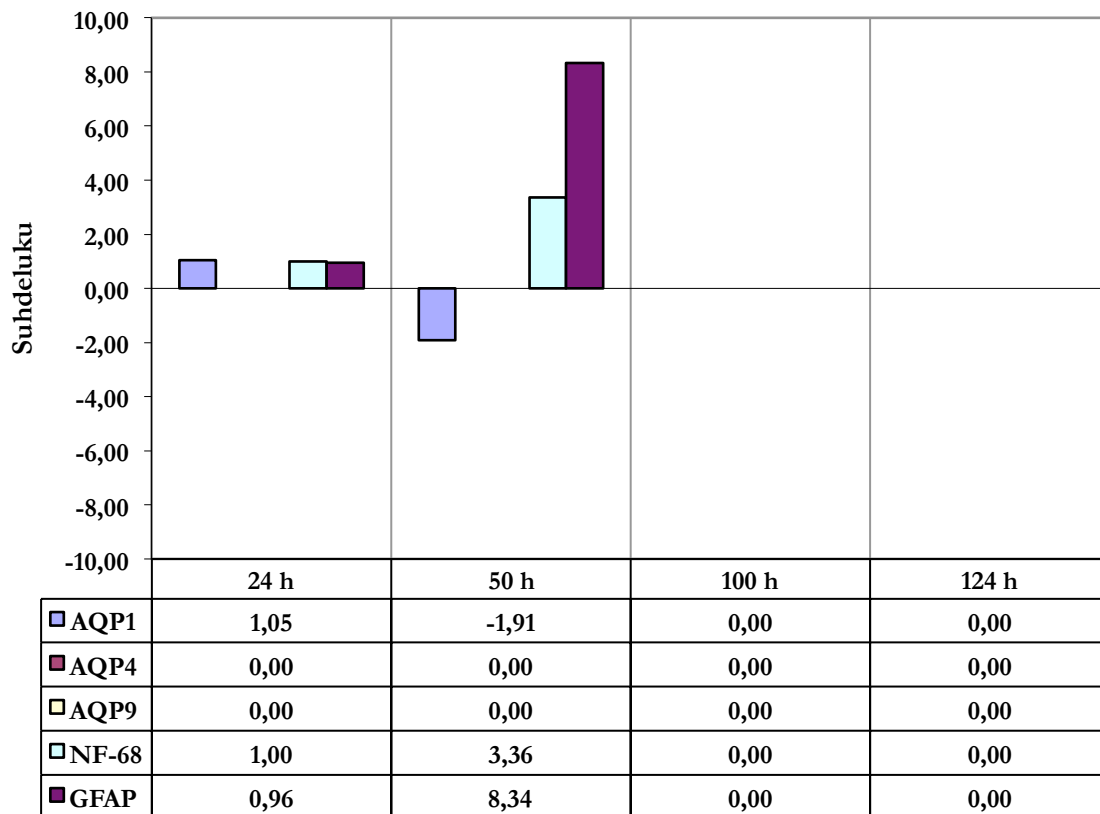
Tarkasteltaessa geenien ilmentymisen suhdetta saman altisteen sisällä oli kontrollinäytteen ensimmäinen aikapiste aivo-selkäydinnesteessä kerätty 12 tunnin kohdalla. Näyte on endogeenikontrollin suhteen vertailukelpoinen muiden aikapisteiden näytteisiin, mutta AQP1:n suhdelukuun se antaa virheellisesti liian suuren arvon 24 tunnin kohdalla (5,91) sillä  $C_t$ -luku on AQP1:lle liian korkea (36,36). Mitään merkittävää muutosta tarkasteltavien geenin ekspressiossa ei tapahdu CSF:ssä myöhemmissä aikapisteissä.

Punasolujen hajoamistuotteille altistettuna 124 tunnin näytteessä ei ekspressoitunut yksikään geeni. Useissa näytteissä  $C_t$ -luvut jäivät GAPDH:lle niin korkeiksi, että ne vaikuttavat virheellisesti  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -kaavaan. GFAP:n suhdeluku on 50 tunnin kohdalla 8,34, mutta tämä selittyy GFAP:n korkealla  $C_t$ -luvulla kontrollinäytteessä (24 tuntia) eikä todellisuudessa ole merkittävä. Samasta syystä 100 tunnin aikapisteessä NF-68:n ja GFAP:n suhdeluvut olisivat yli sata. Tästä johtuen niitä ei otettu huomioon taulukoinnista.

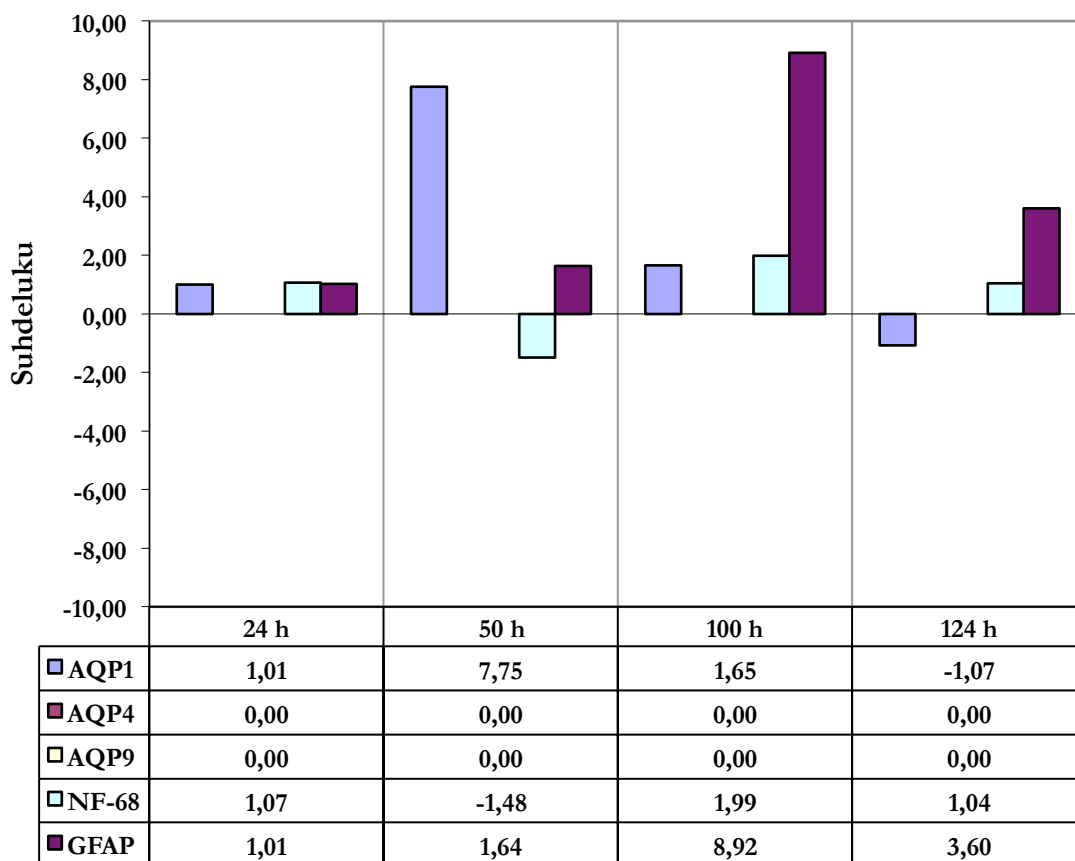
Laimennetulle plasmalle altistettuna on todettavissa jo aikaisemmin mainittu nousu AQP1:n ilmentymisessä 50 tunnin kohdalla (7,75). AQP4:n  $C_t$ -luvut ovat liian korkeita tarkempaan analyysiin. Mainittavanarvoista kuitenkin on, että  $C_t$ -luvut laskevat jokaisessa aikapisteessä korkeamman geeniekspression merkinä: 24 h (34,55), 50 h (32,09), 100 h (31,07) ja 124 h (29,74). AQP9:n pitoisuus on määrittämättömän matala. GFAP:n suhdeluku on 100 tunnin kohdalla 8,92 ja näyte on  $C_t$ -lukujen puolesta vertailukelpoinen. Tutkimushypoteesin testaamiseen tämä ei tosin varsinaisesti liity.



Kuvio 5. Vertailu altisteen sisällä, aivo-selkäydinneste.



Kuvio 6. Vertailu altisteen sisällä, punasolujen hajoamistuoteet.



Kuvio 7. Vertailu altisteeseen sisällä, veriplasma.

## 5 POHDINTA

Tämän tutkimuksen päätavoitteena oli tarkastella qRT-PCR:llä akvaporiinikanavien ilmentymisen muutoksia ihmisen alkion kantasoluista erilaistetuissa hermosoluissa subaraknoidaalivuotoa simuloivien altisteiden seurauksena.

Tutkimus oli osa SpareBrain-projektia ja siinä kokeiltiin koasetelman toimivuutta myöhäisempiä tutkimuksia varten (Küski ym. 2013). SpareBrain-projekti on translationaalinen tutkimus

subaraknoidaalivuodosta, jonka tavoitteena on soveltaa perustutkimuksesta kerättyä tietoa suoraan kliiniseen hoitoon ja tutkimukseen.

AQP-kanavat ovat keskeisiä aivojen vesitasapainon säätelyssä ja niiden merkitystä erilaisissa patofysiologisissa prosesseissa on alettu ymmärtämään kunnolla vasta viime vuosina (Griesdale ym. 2004, Tait ym. 2008). Nykyisen tutkimustiedon perusteella tähän tutkimukseen valituilla akvaporinikanavilla 1, 4 ja 9 on selkein näyttö osuudesta aivojen patofysiologisiin prosesseihin (Badaut ym. 2002).

Tähänastisissa poistogeenisissä eläinkokeissa on osoitettu AQP4-kanavan puuttumisen vähentävän sytotoksista aivoturvotusta mutta toisaalta lisäävän vasogeenista aivoturvotusta (Verkman ym. 2006). AQP4-kanavalla on siis sekä aivoja suojaava että vaurioittava rooli neuropatofysiologisen prosessin mekanismeista ja vaiheesta riippuen. Akvaporinikanavat todennäköisesti ovat mukana myös SAV:n liittyvässä aivoturvotuksessa sekä sekundaarivauriossa. AQP-kanavien toiminnan tutkiminen vuodon jälkeisinä päivinä voisikin tuoda lisätietoa vauriomekanismeista ja tarjota potentiaalisen kohteen uusille hoitomuodoille.

Tämän tutkimuksen hypoteesina oli, että hermosoluissa tapahtuisi AQP-kanavien ilmentymisen lisääntyminen SAV:ta simuloivan verikomponenttialtistuksen seuraksena (Sun ym. 2003). Ilmentymisen lisääntyminen kuvaisi hermosolujen pyrkimystä tasoittaa intra- ja ekstraselulaaritalan välille syntynyttä osmoottista epätasapainotilaa ilmentämällä solukalvoilla vesikanavia. Ilmentyminen voisi myös jossain aikapisteessä vähentyä liittyen soluvaurion korjausmekanismeihin. Nykyaikaisen käsityksen mukaan useimmilla molekyyileillä on tällainen kaksivaiheinen rooli aivovauriossa (Lo 2008).

Tutkimuksen toisena tavoitteena oli testata kantasoluista erilaistettujen toiminnallisesti aktiivisten hermosoluverkostojen mahdollisuuksia neuropatologisten prosessien *in vitro* -mallintamiselle. Tällaisia prosesseja voisivat aivoiskemian lisäksi olla esimerkiksi epilepsia sekä MS-tauti. Tämä olisi uusi vaihtoehto perustutkimukseen eläinkokeiden ja post-mortem koepalojen rinnalle.

Eriyksen kiehtovaksi tämän mallin tekisi sen mahdollisuudet testata helposti koemaljalla hoitomenetelmiä ihmiskudokseen (Jakel ym. 2004). Patofysiologisten mekanismeiden selvittämisen jälkeen voitaisiin jatkossa kokeilla hoitomuotoja suoraan esimerkiksi koemaljalle simuloituun subaraknoidaalivuotoon.

Tässä tutkimuksessa ei saatu esille selkeää muutosta akvaporinikanavien ilmentymisessä verikomponenttialtistuksen jälkeen. Akvaporinikanava 1:n ilmentymisessä oli kuitenkin todettavissa 50 tunnin kohdalla merkittävä ilmentymisen lisääntyminen hypoteesin mukaisesti. Aikaisemmat tutkimustulokset eläinkokeista ovat tukeneet erityisesti akvaporinikanava 4:n osuutta SAV:n aivoturvotuksessa (Tait ym. 2010). Kirjallisuudesta ei löydy vastaavanlaisia tutkimuksia ihmiskudokselle, joten tulokset eivät ole suoraan vertailukelpoisia.

Koeasetelman ongelmat liittyivät altisteiden mahdollisesti liian väkevään neurotoksiseen pitoisuuteen. Useiden näytteiden kynnsarvokierrosluvut olivat korkeita mikä osoittaa matalaa näytepitoisuutta. Tämä todennäköisesti liittyy altisteiden aiheuttamiin vaurioihin nukleiinihappoissa. Lisätutkimuksia varten altisteiden pitoisuutta kannattaisi laskea selkeästi alle yhden tilavuusprosentin ja aivo-selkädinnestettäkin mahdollisesti laimentaa. Akvaporinikanavien geeniekspression tutkiminen mikro-RNA:n avulla voisi olla myös potentiaalinen vaihtoehto (Sepremaniam ym. 2010).

Subaraknoidaalivuodon *in vitro* -mallina koeasetelma vaikuttaa lupaavalta. Verikomponenttien hermosoluihin kohdistaman kemiallisen ärsytyksen lisäksi voisi SAV:hen liittyvää iskemiaa simuloida heikentämällä primaarivaiheessa hetkellisesti kasvatusmaljan kasvuolosuhteita. Tämän tutkimuksen perusteella tarkasteltava aikaikkuna voitaisiin rajata altistamisesta noin kolme vuorokautta eteenpäin. Jatkossa voisi olla mahdollista käyttää koemaljan horisontaalitasoisen hermoverkoston sijaan myös moniulotteisempia verkostoja, jotka mallintaisivat *in vivo* -olosuhteita aidommin (Ylä-Outinen ym. 2014).

Subaraknoidaalivuoto on pääosin työikäisen väestön vakava aivoverenvuoto, joka usein johtaa kuolemaan tai pysyvään toimintakyvyn alenemaan. Primaarivuodosta selvinneille kehittyy sekundaarivaurioita, joiden patofysiologinen mekanismi on tuntematon ja täten myös hoitotulokset heikkoja. SAV-potilaat ovat sekundaarivaurion aikana sairaalahoidossa seurannan alla, joten saatavilla olevat nykyistä tehokkaammat hoitomuodot parantaisivat varmasti hoitotuloksia.

Perustutkimus SAV:n patofysiologiasta on edellytys uusien hoitomuotojen kehittämiseksi. Kantasoluista erilaistetut hermosolut ovat lupaava alusta neuropatologian mallintamiselle sekä uusien hoitomuotojen testaamiselle. Akvaporinikanavien rooli neuropatologisissa prosesseissa kaipaa vielä runsaasti jatkotutkimusta.



## LÄHTEET

Agre P. Aquaporin Water Channels (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed* 2004;43:4278–4290.

Al-Khindi T, Macdonald RL, Schweizer TA. Cognitive and Functional Outcome After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* 2010;41:e519–e536.

Anderson C, Ni Mhurchu C, Scott D, ym. Triggers of subarachnoid hemorrhage: role of physical exertion, smoking, and alcohol in the Australasian Cooperative Research on Subarachnoid Hemorrhage Study (ACROSS). *Stroke* 2003;34:1771–76.

Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, ym. Aquaporins in Brain: Distribution, Physiology, and Pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:367–378.

Badaut J. Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience* 2010;168(4):1047–57.

Baharoglu MI, Germans MR, Rinkel GJ, ym. Antifibrinolytic therapy for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; Issue 8. Art. No.:CD001245. DOI: 10.1002/14651858.CD001245.pub2.

Bloch O, Manley GT. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema. *Neurosurg Focus*. 2007; 22 (5):E3

Brilstra EH, Rinkel GJE, Algra A, ym. Rebleeding, secondary ischemia and timing of operation in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 2000;55:1656–60.

Cahill WJ, Calvert JH, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:1341–1353.

Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid Hemorrhage Is It Time for a New Direction?. *Stroke* 2009;40(3 Suppl):S86–S87.

Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, ym. Global Cerebral Edema After Subarachnoid Hemorrhage: Frequency, Predictors, and Impact on Outcome. *Stroke* 2002;33:1225–1232.

Connolly ES Jr, Rabinstein AA, Carhuapoma JR, ym. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke* 2012;43(6):1711–37.

Crowley RW, Medel R, Dumont AS, ym. Angiographic vasospasm is strongly correlated with cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2011;42:919–923.

Doczi T. The pathogenetic and prognostic significance of blood–brain barrier damage at the acute stage of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. Clinical and experimental studies. *Acta Neurochir* 1985;77:110–132.

Dorhout Mees SM, Rinkel GJE, Feigin VL, ym. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev* 2007a, Issue 3: Art. No.:CD000277. DOI: 10.1002/14651858.CD000277.pub3

Dorhout Mees SM, van den Bergh WM, Algra A, ym. Antiplatelet therapy for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev* 2007b; Issue 4. Art. No.: CD006184. DOI: 10.1161/01.STR.0000083621.44269.3E

Dorsch, N. A clinical review of cerebral vasospasm and delayed ischaemia following aneurysm rupture. *Acta Neurochir. Suppl* 2011;110(1):5–6.

Dreier JP, Ebert N, Priller J, ym. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage?. *J Neurol Neurosurg* 2000;93(4):658–66.

Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, ym. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain* 2009;132:1866–1881.

Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med* 2011;17:439–447.

Etminan N, Vergouwen MD, Ilodigwe D, ym. Effect of pharmaceutical treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2011;31:1443–1451.

Fogelholm R. Subarachnoid hemorrhage in middle-Finland: incidence, early prognosis and indications for neurosurgical treatment. *Stroke* 1981;12:296–301.

Friedrich B, Muller F, Feiler S, ym. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2012;32:447–455.

Germanwala AV, Huang J, Tamargo RJ. Hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg. Clin. N. Am* 2010;21(2):263–70.

van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain* 2001;124(2):249–78.

van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJE. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet* 2007;369:306–18.

Graff-Radford NR, Torner J, Adams HP Jr, ym. Factors associated with hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. A report of the Cooperative Aneurysm Study. *Arch Neurol* 1989;46(7):744–52.

Griesdale D, Honey C, Phil D. Aquaporins and Brain Edema. *Surg Neurol* 2004;61:418–21.

Hasan D, Vermeulen M, Wijdicks EFM, ym. Management problems in acute hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1989;20:747–53.

- Hasan D, Lindsay KW, Vermeulen M. Treatment of acute hydrocephalus after subarachnoid hemorrhage with serial lumbar puncture. *Stroke* 1991;22:190–94.
- Heikkilä, TJ, Ylä-Outinen L, Tanskanen JM, ym. Human embryonic stem cell-derived neuronal cells form spontaneously active neuronal networks in vitro. *Exp. Neurol* 2009;218:109–116.
- Hijdra A, van Gijn J, Stefanko S, ym. Delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: clinicoanatomic correlations. *Neurology* 1986;36:329–33.
- Hinson HE, Sheth KN. Manifestations of the hyperadrenergic state after acute brain injury. *Curr. Opin. Crit. Care* 2012;18:139–145.
- Huang J, Van Gelder JM. The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery* 2002;51:1101–05.
- Hunt WE, Hess RM. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. *J Neurosurg* 1968;28(1):14-20.
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med* 2011;17:796–808.
- Jakel RJ, Schneider BL, Svendsen CN. Using human neural stem cells to model neurological disease. *Nat Rev Gene* 2004;5(2):136–44.
- Johnston SC, Selvin S, Gress DR. The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 1998;50:1413–18.
- Khechinashvili G, Asplund K. Electrocardiographic changes in patients with acute stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis* 2002;14:67–76.
- Kiiski H, Äänismaa R, Tenhunen J, ym. Healthy human CSF promotes glial differentiation of hESC-derived neural cells while retaining spontaneous activity in existing neuronal networks. *Biology Open* 2013;2(6):605–12.
- Kimball MM, Velat GJ, Hoh BL. Critical care guidelines on the endovascular management of cerebral vasospasm. *Neurocrit. Care* 2011;15:336–341.
- Koide M, Bonev AD, Nelson MT, ym. Inversion of neurovascular coupling by subarachnoid blood depends on large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2012;109:E1387–E1395.
- Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, ym. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:916–25.
- Lappalainen RS, Salomäki M, Ylä-Outinen L, ym. Similarly derived and cultured hESC lines show variation in their developmental potential towards neuronal cells in long-term culture. *Regen Med* 2010;5(5):749–62.
- Leao AA. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol* 1944;7:359–390.

- Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, ym. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus*. 2007;22(5):E2.
- Linn FHH, Rinkel GJE, Algra A, ym. Headache characteristics in subarachnoid haemorrhage and benign thunderclap headache. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:791–93.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 2008;14:497–500.
- Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol* 2014;10(1):44–58.
- Magni F, Sarto C, Ticozzi D, ym. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics* 2006; 6(20):5637–49.
- Manley GT, Fujimura M, Ma T, ym. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med* 2000;6:159–163.
- Matz PG, Fujimura M, Chan PH. Subarachnoid hemolysate produces DNA fragmentation in a pattern similar to apoptosis in mouse brain. *Brain Res*. 2000;858(2):312–9.
- McCarron MO, Alberts MJ, McCarron P. A systematic review of Terson’s syndrome: frequency and prognosis after subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:491–93.
- Mocco J, Prickett CS, Komotar RJ, ym. Potential mechanisms and clinical significance of global cerebral edema following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Focus* 2007;22(5):E7.
- Molyneux A, Kerr R, Stratton I, ym. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet* 2002;360:1267–1274.
- Muroi C, Keller M, Pangalu A, ym. Neurogenic pulmonary edema in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol* 2008;20(3):188–92.
- Naidech AM, Janjua N, Kreiter KT, ym. Predictors and impact of aneurysm rebleeding after subarachnoid hemorrhage. *Arch Neurol* 2005;62:410–6.
- Nat R, Nilbratt M, Narkilahti S, ym. Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures. *Glia* 2007;55(4):385–99.
- Nieuwkamp DJ, Setz LE, Algra A, ym. Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol* 2009;8:635–42.
- Paschen W. Glutamate excitotoxicity in transient global cerebral ischemia. *Acta Neurobiol Exp* 1996; 56(1):313–22.

- Peltonen S, Juvela S, Kaste M, ym. Hemostasis and fibrinolysis activation after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1997;87(2):207–14.
- Petruk KC, West M, Mohr G. Nimodipine treatment in poor- grade aneurysm patients. Results of a multicenter double-blind placebo-controlled trial. *J. Neurosurg* 1988;68:505–517.
- Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, ym. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol. Res* 2009;31:151–158.
- Polmear A. Sentinel headaches in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: what is the true incidence? A systematic review. *Cephalalgia* 2003;23:935–41.
- Rabinstein AA, Weigand S, Atkinson JL, ym. Patterns of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2005;36:992–997.
- Reilly C, Amidei C, Tolentino J, ym. Clot volume and clearance rate as independent predictors of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg* 2004;101:255–261.
- Rinkel GJE, Djibuti M, Algra A, ym. Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke* 1998;29:251–56.
- de Rooij NK, Linn FHH, van der Plas JA, ym. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78:1365–72.
- de Rooij NK, Frijns CJ, Velthuis BK, ym. Secondary infarction in single or in multiple vascular territories: two different entities following subarachnoid hemorrhage? *J Neurol* 2011;258(12):2133–9.
- Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus* 2007;22(5):E4.
- Rosengart AJ, Schultheiss KE, Tolentino J, ym. Prognostic factors for outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2007;38:2315–2321.
- Rothoerl RD, Ringel F. Molecular mechanisms of cerebral vasospasm following aneurysmal SAH. *Neurol. Res* 2007;29:636–642.
- Ruijs AC, Dirven CM, Algra A, ym. The risk of rebleeding after external lumbar drainage in patients with untreated ruptured cerebral aneurysms. *Acta Neurochir* 2005;147:1157–62.
- Saastamoinen K. Lannepisto, likvorin tutkiminen ja löydökset. [päivitetty 2.12.2009] *Lääkärin käsikirja*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim 2011. [www.terveysportti.fi](http://www.terveysportti.fi), artikkeli: ykt00878
- Sabri M, Ai J, Lakovic K, ym. Mechanisms of microthrombi formation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* 2012;224:26–37.
- van der Schaaf IC, Algra A, Wermer MJH, ym. Endovascular coiling versus neurosurgical clipping for patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; Issue 4. Art. No.:CD003085. DOI: 10.1002/14651858.CD003085.pub2.

- Sepramaniam S, Armugam A, Lim KY, ym. MicroRNA 320a functions as a novel endogenous modulator of aquaporins 1 and 4 as well as a potential therapeutic target in cerebral ischemia. *J Biol Chem* 2010;285(38):29223-30.
- Schmidt JM, Wartenberg KE, Fernandez A, ym. Frequency and clinical impact of asymptomatic cerebral infarction due to vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg* 2008;109:1052–1059.
- Schubert GA, Seiz M, Hegewald AA, ym. Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study. *J. Neurotrauma* 2009;26:2225–2231.
- Schuling WJ, de Weerd AW, Dennesen PJ, ym. The simplified acute physiology score to predict outcome in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 2005;57:230–36.
- Solenski NJ, Haley EC Jr, Kassell NF, ym. Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. *Crit Care Med* 1995;23:1007–17.
- Stegmayr B, Eriksson M, Asplund K. Declining mortality from subarachnoid hemorrhage: changes in incidence and case fatality from 1985 through 2000. *Stroke* 2004;35:2059–63.
- Stein SC, Browne KD, Chen XH, ym. Thromboembolism and delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage: an autopsy study. *Neurosurgery* 2006;59:781–787.
- Sun MC, Honey CR, Berk C, ym. Regulation of aquaporin-4 in a traumatic brain injury model in rats. *J Neurosurg* 2003;98(3):565–9.
- Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, ym. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 2008;31:37–43.
- Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, ym. Increased brain edema in aqp4-null mice in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* 2010;167(1):60–7.
- Tam AK, Ilodigwe D, Mocco J, ym. Impact of systemic inflammatory response syndrome on vasospasm, cerebral infarction, and outcome after subarachnoid hemorrhage: exploratory analysis of CONSCIOUS-1 database. *Neurocrit. Care* 2010;13:182–189.
- Teasdale GM, Drake CG, Hunt W, ym. A universal subarachnoid hemorrhage scale: report of a committee of the World Federation of Neurosurgical Societies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51(11):1457.
- Velthuis BK, Van Leeuwen MS, Witkamp TD, ym. Computerized tomography angiography in patients with subarachnoid hemorrhage: from aneurysm detection to treatment without conventional angiography. *J Neurosurg* 1999;91:761–67.
- Vergouwen MDI, Vermeulen M, van Gijn J, ym. Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group. *Stroke* 2010;41:2391–2395.

- Verkman AS, Binder DK, Bloch O, ym. Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758(8):1085–93.
- Vermeulen M, van Gijn J. The diagnosis of subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:365–72.
- Wartenberg KE, Schmidt JM, Claassen J, ym. Impact of medical complications on outcome after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med* 2006;12:78–84.
- van der Wee N, Rinkel GJE, Hasan D, ym. Detection of subarachnoid haemorrhage on early CT: is lumbar puncture still needed after a negative scan? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58:357–59.
- Westerlaan HE, van Dijk JM, van Dijk MJ, ym. Intracranial aneurysms in patients with subarachnoid hemorrhage: CT angiography as a primary examination tool for diagnosis--systematic review and meta-analysis. *Radiology* 2011;258:134–45.
- Whitfield PC, Kirkpatrick P. Timing of surgery for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev* 2001, Issue 2. Art. No.: CD001697. DOI: 10.1002/14651858.CD001697.
- Xi G, Wagner KR, Keep RF, ym. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29(12):2580–6.
- Ylä-Outinen L, Joki T, Varjola, ym. Three-dimensional growth matrix for human embryonic stem cell-derived neuronal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2014;8(3):186–94.