



**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce

**Elektrofyzilogické změny během rozvoje kortikální  
fototrombotické ischemické léze a epilepsie**

**Lukáš Lambert**

Praha 2013

**Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav normální, patologické a klinické fyziologie 3.  
lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Autor: MUDr. Ing. Lukáš Lambert

Školitel: Doc. MUDr. Jan Mareš, CSc.

Školitel konsultant: MUDr. Klára Bernášková, CSc.

Oponenti: .....

.....

.....

Autoreferát byl rozeslán dne: .....

Obhajoba se koná dne: ..... v ..... hod.

kde .....

.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty  
Univerzity Karlovy v Praze

# 1. Obsah

1.	Obsah .....	3
2.	Souhrn v češtině .....	5
3.	Souhrn v angličtině .....	7
4.	Úvod.....	9
4.1.	Hypotézy a cíle práce .....	10
4.1.1.	Experimentální model ischemie .....	10
4.2.	Analýza evokovaných potenciálů v čase.....	10
4.2.1.	Analýza jednotkových potenciálů v čase.....	11
4.2.2.	Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG .....	11
4.2.3.	Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě	12
5.	Materiál a metodika .....	12
5.1.	Metodika použitá ve více experimentech.....	12
5.2.	Speciální metodiky .....	13
5.2.1.	Experimentální model ischemie .....	13
5.2.2.	Analýza evokovaných potenciálů v čase .....	14
5.2.3.	Analýza jednotkových potenciálů v čase.....	14
5.2.4.	Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG .....	15
5.2.5.	Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě	15
6.	Výsledky.....	16
6.1.	Morfologické ověření experimentálního modelu ischemie .....	16
6.2.	Akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze .....	16
6.3.	Akutní změny jednotkových potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze.....	17
6.4.	Analýza somatosenzorických evokovaných potenciálů v čase..	18
6.5.	Analýza jednotkových potenciálů v čase .....	18
6.6.	Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG.....	19
6.7.	Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě .....	21
7.	Diskuse .....	22
7.1.	Experimentální model ischemie .....	22
7.2.	Akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze .....	22
7.3.	Akutní změny jednotkových potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze.....	23
7.4.	Analýza somatosenzorických evokovaných potenciálů v čase..	23

7.5.	Analýza jednotkových potenciálů v čase .....	24
7.6.	Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG.....	25
7.7.	Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě .....	26
8.	Závěr .....	27
9.	Použitá literatura .....	30
10.	Seznam publikací doktoranda .....	35

## 2. Souhrn v češtině

Tato práce pojednává o vícečetných aspektech změn excitability mozkové tkáně, které lze pozorovat během rozvoje ischemické léze a při epilepsii.

V úvodu práce jsme se zabývali experimentálními modely ischemie z nichž byl posléze v naší laboratoři zvolen a zaveden model fototrombotické ischemické léze u potkana. Účinnost tohoto modelu byla ověřena morfologicky na koronárních řezech barvených TTC.

Dále jsme zkoumali změny somatosenzorických evokovaných potenciálů zaznamenávaných na povrchu kůry během rozvoje fototrombotické ischemické léze. Zjistili jsme, že dochází ke snížení amplitudy komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu, což je v souladu se současnými poznatky. Neočekávaný nálezn podobných změn i u kontrolní skupiny a kontralaterálně k místu svícení přičítáme vlivu dopadu laserového světla na mozkovou kůru. Stejně si vysvětlujeme i zkrácení latence vlny N2 u obou skupin na obou stranách.

V další části práce jsme zjistili, že akutní změny jednotkové aktivity zaznamenávané v blízkosti rozvíjejícího se ischemického ložiska volně kopírují předpokládané změny perfúze této oblasti. To rovněž svědčí pro účinnost modelu fototrombotické ischemické kortikální léze. Neočekávané však byly méně výrazné a přechodné změny podobného charakteru u kontrolní skupiny, které vysvětlujeme účinkem samotného laserového světla na mozkovou kůru.

Ve čtvrté části této práce popisujeme implementaci semiautomatického hodnocení průběhu komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu v čase, které jsme byli nuceni vytvořit pro analýzu dat z našich výše uvedených experimentů. Vybrali jsme a upravili pro naše speciální potřeby některé programovací techniky (nejbližší soused, simulované ochlazování s vícerozměrným optimalizačním kritériem). Výstup programu jsme ověřili porovnáním s reprezentací průběhu záznamu v trojrozměrném grafu.

Pátá část této práce zahrnovala návrh a implementaci algoritmu s cílem hodnocení našich záznamů jednotkových potenciálů z třetí části této práce. Vytvořený program vyhověl našim požadavkům. V programu jsme použili a upravili některé obecné programovací postupy a metody dataminingu (filtrace dat, neuronová síť, algoritmus k-means, analýza

hlavních komponent). V porovnání s ostatními popsányými metodami bylo dosaženo velmi dobré úrovně detekce jednotek.

Vzhledem k pozorováním v předchozích experimentech jsme se v předposlední části práce rozhodli prozkoumat vliv samotného laserového světla na excitabilitu mozkové tkáně. Tyto změny srovnáváme i s nálezy u kontrolních skupin z předchozích experimentů. Předpokládáme, že změny excitability (změny latencí a amplitud vln evokovaného potenciálu a jednotkové aktivity) jsou vzhledem k časovým konstantám způsobeny změnami hladin intracelulárních molekul vyvolané laserovým světlem. To je zřejmě i mechanismem zodpovědným za posun frekvenčního maxima směrem k vyšším hodnotám po ukončení rytmické kortikální stimulace laserem nebo během opakované stimulace kůry krátkým laserovým pulsem. Podobné změny odpovědi na korovou elektrickou stimulaci a elektrickou stimulaci periferního nervu na straně kontralaterální ke svícení lze zčásti vysvětlit působením ambientního světla a mechanismem diaschízy.

V poslední části práce jsme ukázali, že i v období postiktální inhibice lze prokázat zvýšenou excitabilitu na pozadí převládající inhibice pomocí stimulace salvou čtyř pulzů o nižší intenzitě v interiktálním období. Domníváme se, že snaha o vyvolání opakovaného epileptického záchvatu stejnou nebo vyšší intenzitou stimulace paradoxně může akcentovat inhibiční systémy a tak vést k zesílení refraktivity v období postiktální inhibice. Pro úplnost dodáváme, že pomocí stejného stimulačního schématu, ale s použitím laserových místo elektrických pulsů, se nám epileptické fenomény vyvolat nepodařilo.

### **3. Souhrn v angličtině**

This thesis deals with multiple aspects of changes in excitability of brain tissue that can be observed during development of cortical ischemic lesion and epilepsy.

Firstly, we thoroughly explored experimental models of cerebral ischemia and we introduced and adapted a model of a cortical photothrombotic ischemic lesion in a rat. This model was morphologically verified on coronal slices incubated in TTC.

Next, we researched changes in somatosensory evoked potentials recorded on cortex during development of cortical ischemic photothrombotic lesion. The observed decrease in amplitude of components of the somatosensory evoked potential is congruent with the current state of knowledge. Unexpectedly, similar changes were apparent in the control group and in the contralateral hemisphere. They can be attributed to the influence of the laser light alone on the cortex. Similar effect can be expected to cause shortening of latency in both groups and both hemispheres.

Thirdly, we confirmed that acute changes of single unit activity recorded in the vicinity of a developing ischemic focus resemble expected changes of local perfusion. This also confirms efficacy of the model of cortical photothrombotic ischemic lesion. We also observed similar, but less conspicuous and transitory changes of single unit activity in the control group, which we attribute to the effect of the laser light.

In the fourth part, we described the implementation of semi-interactive detection of components of somatosensory evoked potential in time, that was necessary for the evaluation of our aforementioned experiments. We deliberately employed several programming techniques (nearest neighbour, simulated annealing with multidimensional optimization criterion). The output of the program was verified by comparison with the recording in a three dimensional chart.

The fifth part of the work involved the design and implementation of an algorithm for detection and evaluation of single unit activity recorded in the third part of this work. The program we designed met our requirements. We used and adapted several common programming techniques and datamining methods (data filtration, neuronal network, k-

means algorithm, principal component analysis). In comparison with other methods, the level of detection achieved with our program was excellent.

In the light of our previous finding, we researched the influence of laser light in the visible spectrum on excitability of brain tissue. These changes were compared with findings in previous experiments as well. We assume, that changes in excitability (changes of latency, amplitude of components of evoked potentials and single unit activity) are with regard to the latency of their onset caused by changes in concentration of intracellular molecules induced by exposure to laser light. This is also the suggested mechanism responsible for shift of frequency maximum after cessation of rhythmic cortical stimulation with laser or during repeated stimulation of cortex by short laser pulses. Similar changes in response to electric cortical stimulation or electric stimulation of peripheral nerve observed in the contralateral hemisphere can be explained by the influence of ambient light or by diaschisis.

Finally, in the last part of the research work, we showed that a burst of four electrical pulses can unmask persistently increased excitability overshadowed by massive inhibition even in the interictal period when postictal inhibition sets in. We believe that repeated stimulation of the same or increased intensity may paradoxically stimulate inhibitory systems and ultimately lead to increased refractivity in the postictal inhibition period. In comparison, with the same stimulation scheme and laser instead of electric pulses, we were unable to provoke any epileptic phenomena.



## 4. Úvod

Ischémie mozku je častou příčinou invalidity a úmrtnosti evropské populace. V mozku je ischémie charakterizována nekrózou ve svém centru a metabolickými a funkčními poruchami ve tkáni, které nekrózu lemují – v tzv. penumbře [1,2]. Poznání patofyziologie a molekulární podstaty ischemické kaskády vedlo pokusy o ovlivnění jejích některých kroků směřující k omezení rozsahu ischemického poškození, které kromě trombolýzy a intervenční radiologie nezaznamenaly většího úspěchu.

In vivo experimenty se ve značné části provádějí z etických důvodů na zvířecích modelech, kterých byly popsány desítky a které i v současné době procházejí vývojem tak, aby co nejvěrněji napodobovaly patofyziologické změny v cévním řečišti mozku při mozkové ischémii u člověka [3–7].

Elektrofyziologické hodnocení funkce neuronů lze provádět na různých úrovních – od částí neuronu až po korové oblasti jak při spontánní aktivitě tak po podnětu. Záznamy lze v triviálních případech hodnotit interaktivně, u většího množství dat a složitějších měření pak automaticky či semiinteraktivně za použití integrovaných obvodů nebo obecně výpočetní techniky. Používané programy zpravidla využívají obecné algoritmy (např. heuristiky) a datové struktury (např. neuronové sítě) přizpůsobené danému úkolu [8–11].

Ovlivnění světločivných buněk světlem a složkami spektra blízkými světlu (infrachervené, ultrafialové záření) na všech úrovních fylogeneze je dobře prozkoumané. Existují práce zabývající se přítomností fotosenzitivních neuronů u dalších bezobratlých a jejich ovlivnění [12]. Méně se však ví o ovlivnění buněk, které nejsou k fotorecepci určeny u vyšších živočichů (obratlovců), zejména samotných korových neuronů [13].

Po epileptickém záchvatu obvykle následuje období postiktální inhibice, kdy je obtížné vyvolat další epileptický záchvat. Během postiktální inhibice lze sledovat řadu jevů jako například změny chování [14,15], změny v EEG [15] a v evokovaných potenciálech [16], změny na molekulární úrovni [17,18]. Mechanismy, které vedou k postiktální inhibici, jsou aktivovány již během epileptického záchvatu a mají vliv na jeho ukončení zejména prostřednictvím výrazné aktivní inhibice [19,20].

Při hodnocení excitability neuronů k dalšímu záchvatu během postiktální inhibice se obvykle používá stimulace o vyšší intenzitě [21] s cílem překonat sníženou excitabilitu v tomto období.

## **4.1. Hypotézy a cíle práce**

### **4.1.1. Experimentální model ischemie**

Prvním cílem této práce bylo zavést a ověřit experimentální model fokální ischemie u potkana v naší laboratoři, abychom mohli sledovat pomocí elektrofyziologických metod změny funkce CNS během vzniku a rozvoje ischemického ložiska. Rozhodli jsme se zavést, upravit a ověřit model fototrombotické ischemické léze [22,23], který je dobře popsanou a reprodukovatelnou metodou, která je navíc málo invazivní. Stanovili jsme si následující hypotézy:

**Hypotéza H<sub>0a</sub>:** model fototrombotické léze nevytváří morfologicky detekovatelnou lézi.

**Hypotéza H<sub>0b</sub>:** u modelu fototrombotické léze se nemění somatosensorické evokované potenciály (SSEP) zaznamenávané na povrchu kůry.

**Hypotéza H<sub>0c</sub>:** u modelu fototrombotické léze se nemění jednotková odpověď neuronů (tzv. single-unit activity).

## **4.2. Analýza evokovaných potenciálů v čase**

Kromě samotného experimentu se dalším cílem práce stal vývoj a implementace algoritmu pro vyhledávání průběhu komponent somatosensorického evokovaného potenciálu pro účely jeho dynamického hodnocení v čase. Změny latencí a amplitud komponent evokovaného potenciálu, které jsou měřeným parametrem a odpovědí na vyvolanou patologii, totiž probíhají spojitě. Pokud bychom vybrali pouze několik (jednotky) časových okamžiků, ve kterých bychom hodnotili vlny evokovaného potenciálu, dopustili bychom se nadměrné simplifikace problému s tím, že by nám unikly významné změny jinde. Tuto víceméně metodickou část práce ponecháváme bez hypotézy, kterážto zde nemá významu, protože kvalitu výstupu nelze objektivně hodnotit jinak než výpočetní složitostí.

### 4.2.1. Analýza jednotkových potenciálů v čase

Vzhledem k tomu, že jsme nenašli vhodný nástroj pro izolaci jednotkových potenciálů z našich záznamů, stalo se naším dalším cílem vytvoření nástroje pro detekci jednotkových potenciálů. Bez tohoto by totiž nebylo možné vyhodnotit záznamy z našich experimentů v rozumném čase.

Práce zahrnovala rešerši možností hodnocení jednotkových potenciálů, která předcházela vlastní implementaci. K návrhu a implementaci algoritmu jsme si stanovili následující hypotézy (podmínky):

**Hypotéza H<sub>a</sub>:** lze vytvořit takový algoritmus pro identifikaci jednotkových potenciálů, který v obvyklém záznamu z naší laboratoře označí více jak 98% hrotů správně, resp. falešná negativita a falešná pozitivita nepřesáhne 2%.

**Hypotéza H<sub>b</sub>:** rozložení hrotů ve fyziologickém záznamu jednoho neuronu nalezených implementovaným algoritmem má náhodné rozdělení – Poissonovo nebo logaritnicko-normální [24].

### 4.2.2. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG

V předchozích experimentech jsme vyvolávali ischemickou lézi mozkové kůry metodou fototrombózy. Při této metodě se fotoaktivní látka (bengálská červeň) aktivuje zeleným laserovým světlem o dané vlnové délce (případně bílým světlem), kdy dochází k přímému osvit mozkové kůry. Zajímalo nás proto, jaký vliv na funkci mozkové kůry má pouhý přímý osvit laserovým světlem bez přidání fotoaktivní látky, která by způsobila ischemii. K této myšlence nás vedly již provedené experimenty s cílem zhodnotit ovlivnění somatosenzorických evokovaných potenciálů při ischemii, kde jsme pozorovali a prokázali jisté změny i u kontrolní skupiny, kde byl místo fotoaktivního barviva podán pouze fyziologický roztok. Dalším cílem práce bylo objasnit vliv samotného přímého osvětlení mozkové kůry laserovým světlem. Kromě samotné pulsní stimulace prováděné různými stimulačními vzory (jednotlivé pulzy různé délky a salvy pulzů) jsme se rozhodli pokusit se vyvolat epileptiformní aktivitu rytmickou stimulací kůry laserovým světlem a ovlivnit kontinuálním svícením laserovým světlem odpověď na korovou elektrickou stimulaci. Stanovili jsme si následující hypotézy:

**Hypotéza H<sub>0a</sub>:** Pulsní stimulace kůry laserovým světlem nemá odpověď v ECoG a nevyvolá změny ve výkonovém frekvenčním spektru.

**Hypotéza H<sub>0b</sub>:** Rytmická stimulace mozkové kůry laserovým světlem není schopna vyvolat epileptiformní aktivitu ani změny výkonového frekvenčního spektra.

**Hypotéza H<sub>0c</sub>:** Kontinuální iradiace mozkové kůry laserovým světlem nemá vliv na odpověď na kortikální elektrickou stimulaci.

**Hypotéza H<sub>0d</sub>:** Kontinuální svícení na mozkovou kůru laserovým světlem nemá vliv na jednotkovou aktivitu.

**Hypotéza H<sub>0e</sub>:** Kontinuální iradiace mozkové kůry laserovým světlem nemá vliv na somatosenzorické evokované potenciály.

### **4.2.3. Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě**

V další části naší práce jsme se rozhodli ověřit náš předpoklad, že v průběhu postiktální inhibice se souběžně s rozsáhlou inhibicí vyskytuje i přetrvávající hyperexcitabilita neuronů. Tu jsme se pokusili odhalit salvou čtyř elektrických pulzů o frekvenci 8Hz o nižší intenzitě, než která byla použita pro vyvolání epileptického záchvatu.

**Hypotéza H<sub>0a</sub>:** salva čtyř pulsů o nižší intenzitě než která byla použita pro vyvolání epileptického záchvatu rytmičnou korovou elektrickou stimulací není schopna demaskovat reziduální hyperexcitabilitu mozkové tkáně a vyvolat následný výboj v interiktálním období

## **5. Materiál a metodika**

### **5.1. Metodika použitá ve více experimentech**

K provedení experimentů in vivo jsme zvolili samce laboratorního potkana kmene Wistar stáří 6-9 týdnů. Používali jsme dva druhy celkové injekční (resp. intraperitoneální) anestézie – Ketamin + Xylazin nebo Pentobarbital. Operační technika zahrnovala preparaci měkkých tkání hlavy a vytvoření trepanačních otvorů. Pro snímání ECoG záznamu byly použity stříbrné kuličkové elektrody potažené chloridem sodným. Jednotkové potenciály jsme snímali tenkou skleněnou elektrodou naplněnou elektrolytem.

Pro vyvolání fokální ischemie v primární somatosensorické oblasti jsme zavedli do naší laboratoře model fototrombózy. Cestou periferní kanyly zavedené do ocasní žíly potkana bylo podáváno fotosenzitivní barvivo bengálská červeň (u kontrolních skupin pak fyziologický roztok). Cílové místo pak bylo osvětleno diodovým laserem. Doba ozáření pro vyvolání fototrombózy byla stanovena na 9 minut. Laserové světlo mělo vlnovou délku 532nm, udávaný výkon 50mW/mm<sup>2</sup> a ozářená plocha byla ve tvaru kruhu o ploše menší než 1mm<sup>2</sup>. V dalších experimentech bylo laserové světlo spínáno pomocí hradlového obvodu.

V experimentech jsme použili dva druhy elektrické stimulace: kortikální stimulaci a stimulaci periferního nervu (n. ischiadicus).

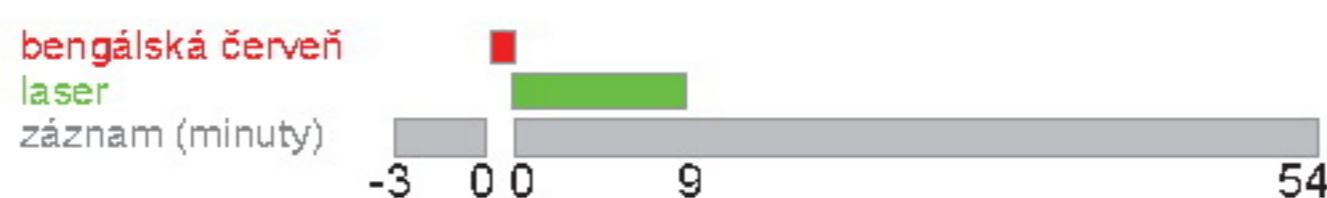
Morfologické zpracování mozku bylo provedeno prokrájením na jednomilimetrové řezy v koronární rovině na ocelové matici. Řezy byly následně inkubovány pomocí redukčního testu TTC.

Pro testování, zda má zkoumaná proměnná normální rozložení, jsme zvolili D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Pro testování významnosti rozdílů mezi skupinami zvířat a hemisférami jsme použili buď t-test nebo Mann-Whitney U-test, při párových porovnáních párový t-test nebo Wilcoxonův párový test. Pro testování závislosti dat v kontingenční tabulce jsme použili  $\chi^2$  test. Za významnou jsme považovali p hodnotu menší než 0,05.

## **5.2. Speciální metodiky**

### **5.2.1. Experimentální model ischemie**

Pro hodnocení akutních změn somatosensorických evokovaných potenciálů jsme 21 zvířat rozdělili do experimentální (12 jedinců) a kontrolní (9 jedinců) skupiny. Tři minuty záznamu evokovaných potenciálů byly následovány injekcí a aktivací fotosenzitivního barviva se záznamem dalších 54 minut (Obr. 1). Zvířatům v kontrolní skupině byl místo bengálské červeně podán fyziologický roztok v odpovídajícím oběmu. Mozky zvířat byly morfologicky zpracovány barvením TTC.



**Obr. 1:** Schéma záznamu somatosenzorických evokovaných potenciálů (šedivá) a časový vztah k injekci bengálské červeně (červená) a svícení laserem na kůru (světle zelená).

V dalším experimentu, kde byly hodnoceny akutní změny jednotkových potenciálů v čase, jsme zvířata rozdělili do 3 skupin – jedna experimentální skupina (n=10), kde bylo svíceno laserem do blízkosti mikroelektrody, dvě kontrolní skupiny (n=10 a 12), kde bylo svíceno na opačnou stranu nebo podán fyziologický roztok místo bengálské červeně (Obr. 2).



**Obr. 2:** Schéma záznamu jednotkových potenciálů (šedivá) a časový vztah k injekci bengálské červeně (červená) a svícení laserem na kůru (světle zelená).

### 5.2.2. Analýza evokovaných potenciálů v čase

Pro nalezení průběhu komponent evokovaného potenciálu v průběhu celého záznamu jsme byli nuceni navrhnout vlastní řešení (program). Pro optimalizaci iniciálního řešení (nalezeného algoritmem nejbližšího souseda) jsme zvolili metaheuristiku simulovaného ochlazování, která nejvíce odpovídala našemu zadání [25]. Algoritmus byl implementován v jazyce C++. Pro přenos zpracovaných dat mezi programy jsme použili tabulky s hodnotami oddělenými tabulátorem, aby šla přímo importovat do tabulkových kalkulátorů pro další (statistické) zpracování. Kvalitu výsledného řešení jsme vizuálně porovnali s trojrozměrnou reprezentací průběhu evokovaného potenciálu v čase (Obr. 8).

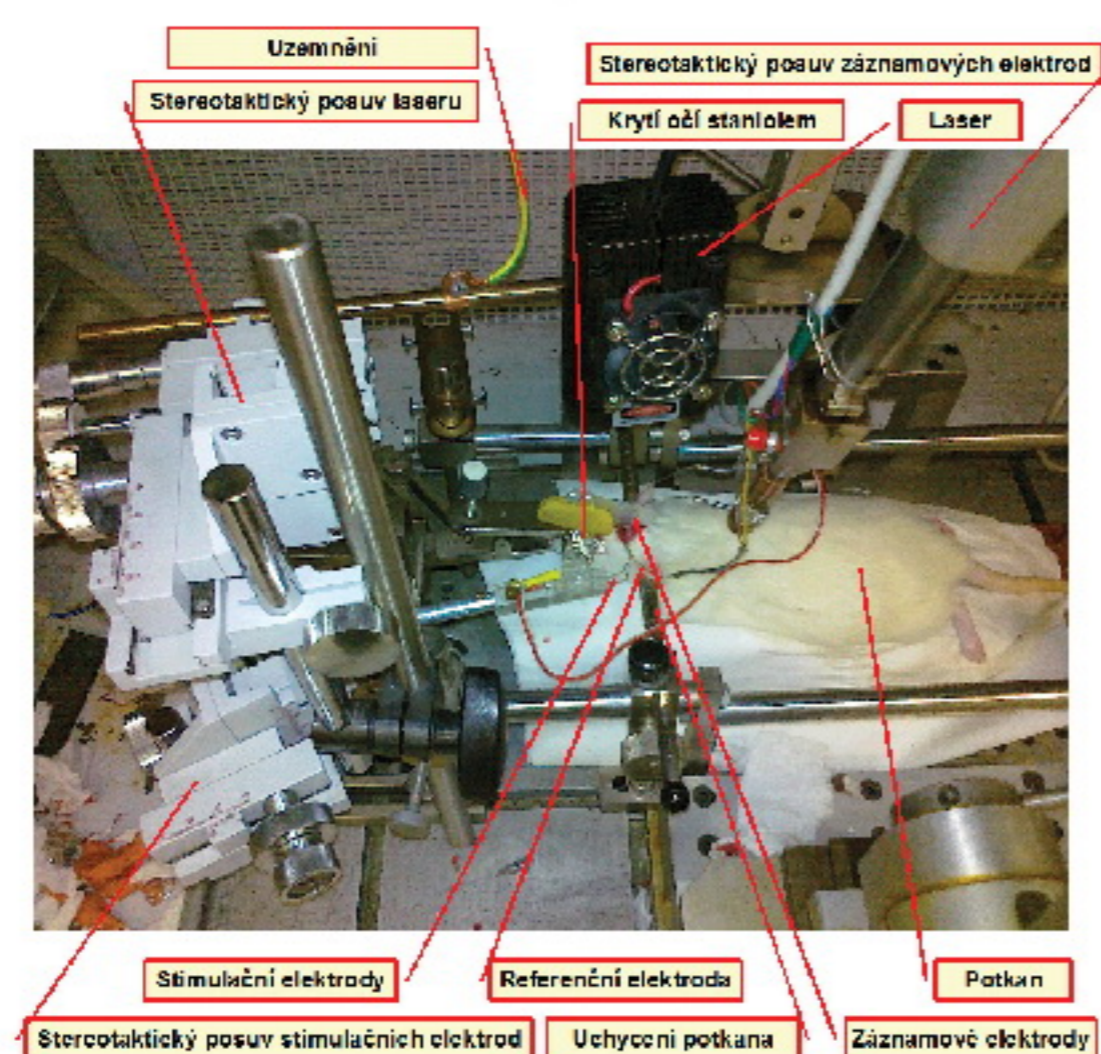
### 5.2.3. Analýza jednotkových potenciálů v čase

Pro hodnocení nestacionárního záznamu jednotkových potenciálů jsme byli opět nuceni navrhnout a vytvořit program pro jejich vyhledávání a třídění. Porovnali jsme jednotlivé programovací techniky a koncepty umělé inteligence (neuronové sítě), které by byly k danému úkolu vhodné.

Implementaci samotného programu jsme provedli v jazyce C++. Program je rovněž výsledek práce a proto je dále rozveden ve výsledcích.

Testování schopnosti algoritmu vyhledávat akční potenciály bylo prováděno na uměle vytvořeném záznamu délky 2 minut, který byl sestaven superpozicí záznamu bez akčních potenciálů a akčních potenciálů bez šumu, a to v různém poměru amplitud od 1:0 po 1:1,5 (Obr. 10). Výstup vytvořeného programu jsme dále porovnali s deseti minutovými záznamy hodnocenými manuálně.

#### 5.2.4. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG



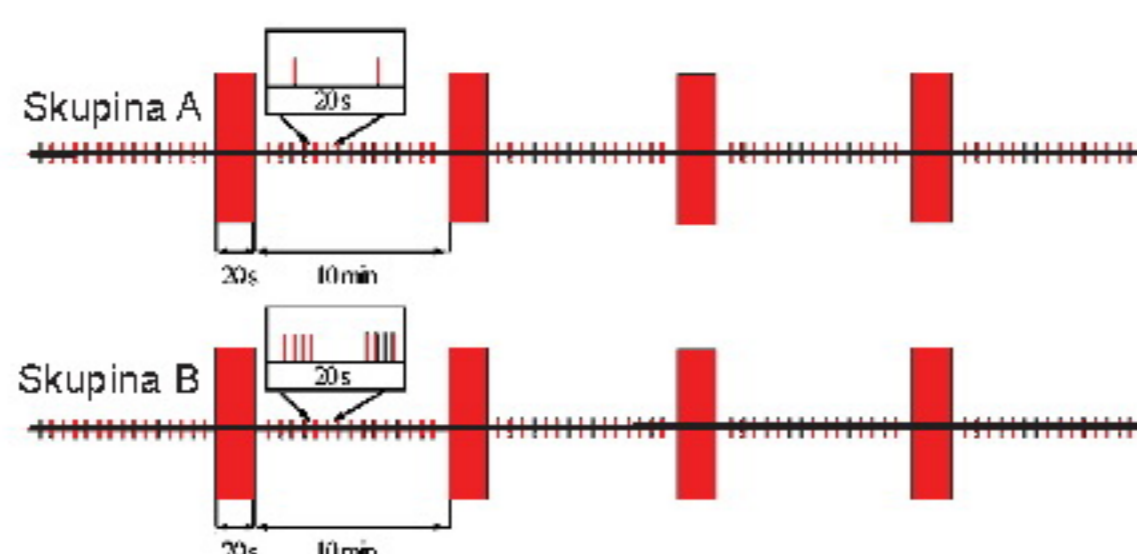
Pro studium vlivu přímého ozáření mozkové kůry laserem jsme provedli řadu in vivo experimentů, které zahrnovaly různé vzory přímé kortikální laserové stimulace, záznam odpovědi na kortikální elektrickou stimulaci před, po a během svícení laserem na somatosensorickou kůru (Obr. 3). Záznamy jsme hodnotili ručně. Experiment jsme dále zopakovali na rozkrojeném jablku a navlhčené houbě.

Obr. 3: Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG: uspořádání experimentálního prostoru. Obrázek vytvořen autorem.

#### 5.2.5. Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě

V této části práce jsme 18 zvířat rozdělili do dvou skupin po devíti jedincích. Po chirurgické přípravě byly implantovány bipolární stimulační elektrody na povrch pravé somatosensorické kůry, registrační elektrody na povrch somatosensorické a zrakové kůry oboustranně. Elektrody byly vodivě spojeny s konektorem, který byl upevněn ke kalvě akrylátovou pryskyřicí. Epileptický záchvat jsme v obou skupinách vyvolávali 8Hz stimulací obdélníkovými pulzy o 5-násobné intenzitě než byl stanovený práh po dobu 20s. Na začátku a mezi těmito stimulacemi jsme prováděli

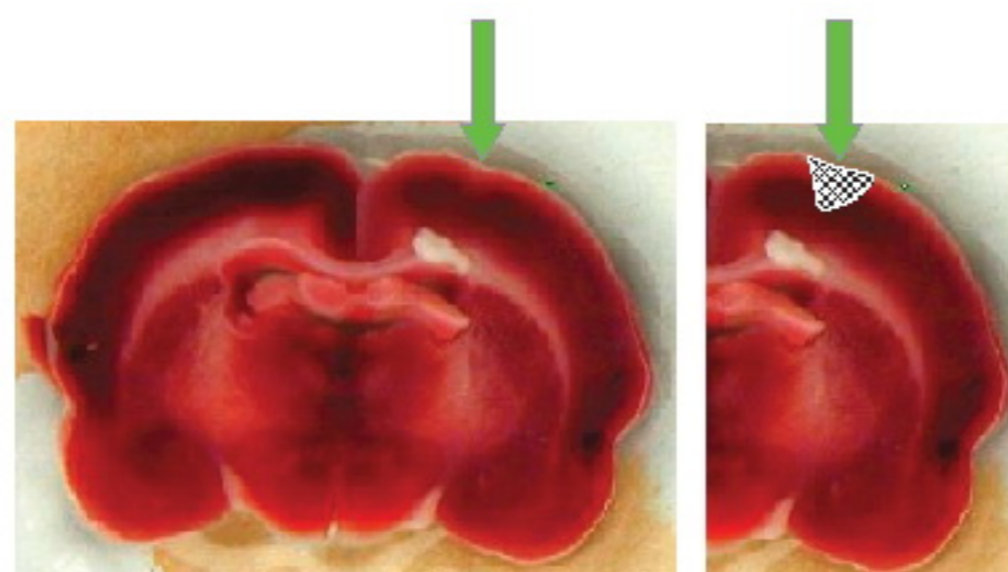
po dobu 10 minut stimulaci 2,5 násobkem stanoveného prahu u skupiny A jedním obdélníkovým pulzem a u skupiny B salvou čtyř obdélníkových pulzů o frekvenci 8Hz (Obr. 4). U obou skupin jsme měřili délku následného výboje po 20s stimulaci a vyhledávali následný výboj po interiktálních stimulacích. Během stimulací jsme zaznamenávali změny chování zvířat (zejména ztrátu rovnováhy s pádem).



Obr. 4: Schéma stimulačního protokolu. Zvířata ve skupině A byla mezi 20s stimulacemi (interiktálně) stimulována pouze jedním pulzem s odstupem 20s, zatímco zvířata ve skupině B salvou čtyř 8Hz pulzů. Vlastní ilustrace.

## 6. Výsledky

### 6.1. Morfologické ověření experimentálního modelu ischemie



Plocha výpadku barvení TTC byla u experimentální skupiny  $7,7 \pm 4,4 \text{ mm}^2$  a u kontrolní skupiny  $1,2 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,0001$  (Obr. 5).

Obr. 5: Výpadek barvení TTC jako zn. fokální ischemie indukované fototrombózou. Zelená šipka označuje

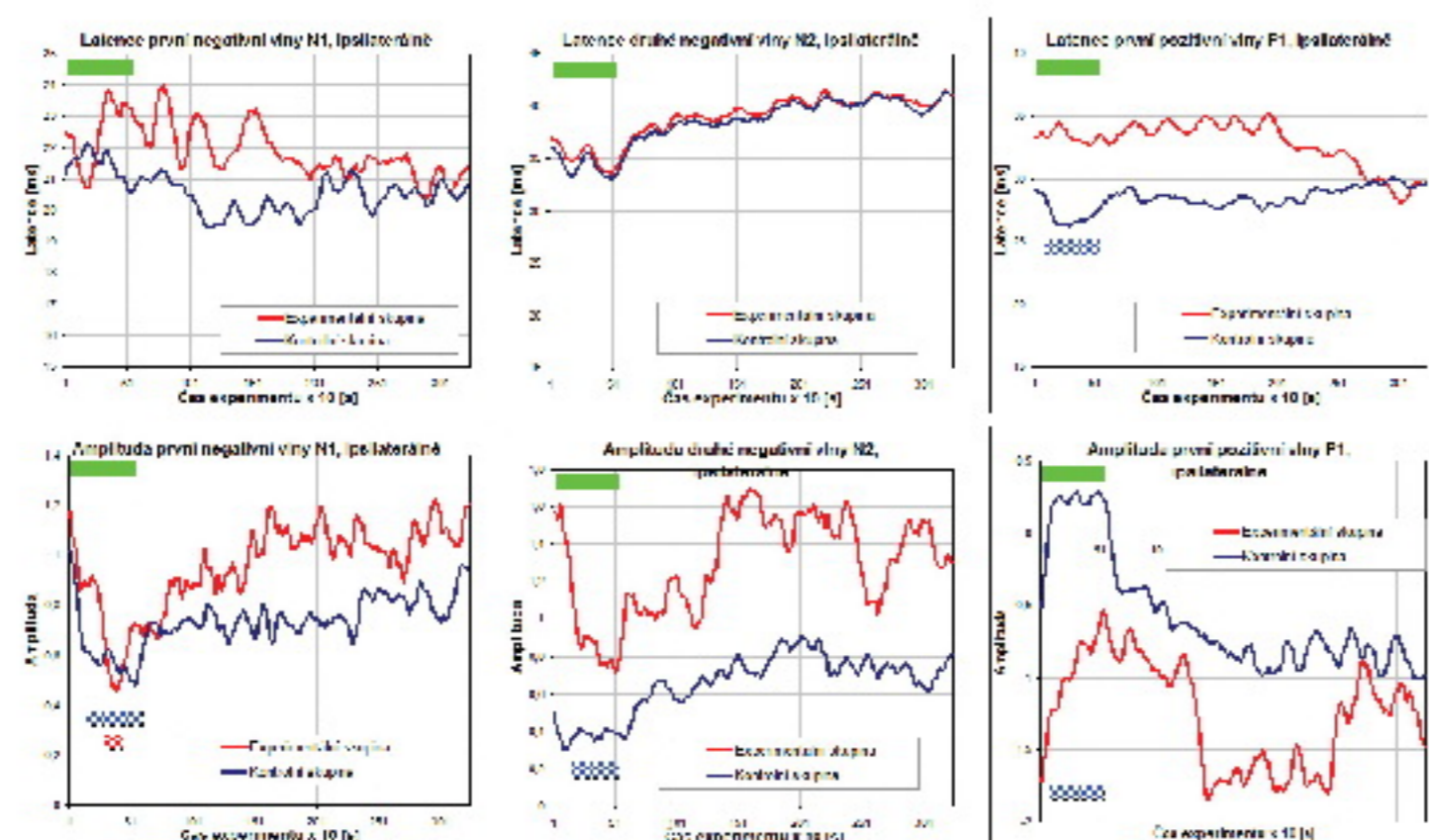
místo ozáření laserovým paprskem. Šrafovaná plocha vpravo zobrazuje rozsah ischemického ložiska.

### 6.2. Akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze

V této části experimentu zjistili, že během svícení dochází ke snížení amplitudy komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu v primární projekční oblasti jak u kontrolní tak i experimentální skupiny. Ipsilaterálně ke straně stimulace docházelo rovněž ke snížení amplitudy u



obou skupin, u experimentální skupiny však je statistická významnost vzhledem k většímu rozptylu hodnot prokazatelná jen u vlny N1. Změny latencí komponent, které jsme prokázali u obou skupin a na obou stranách, jsou komplexnější (Obr. 6).

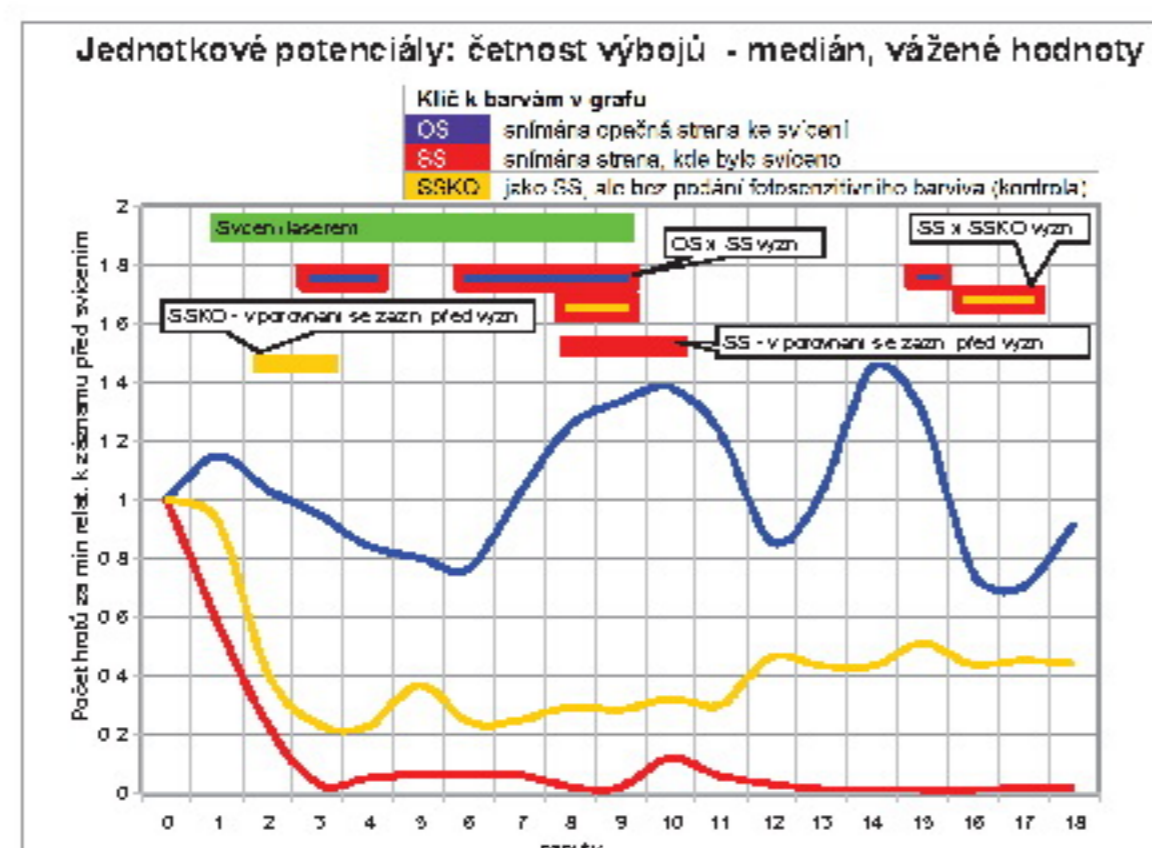


**Obr. 6: Latence a amplituda komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu na straně ipsilaterální ke straně stimulace n. ischiadicus, tj. nesvícené straně. Zelený proužek ukazuje dobu svícení laserem, modrý a červený**

**proužek zase statistickou významnost změn amplitudy nebo latence jednotlivých vln oproti baseline. Amplituda je uváděna v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů).**

### 6.3. Akutní změny jednotkových potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze

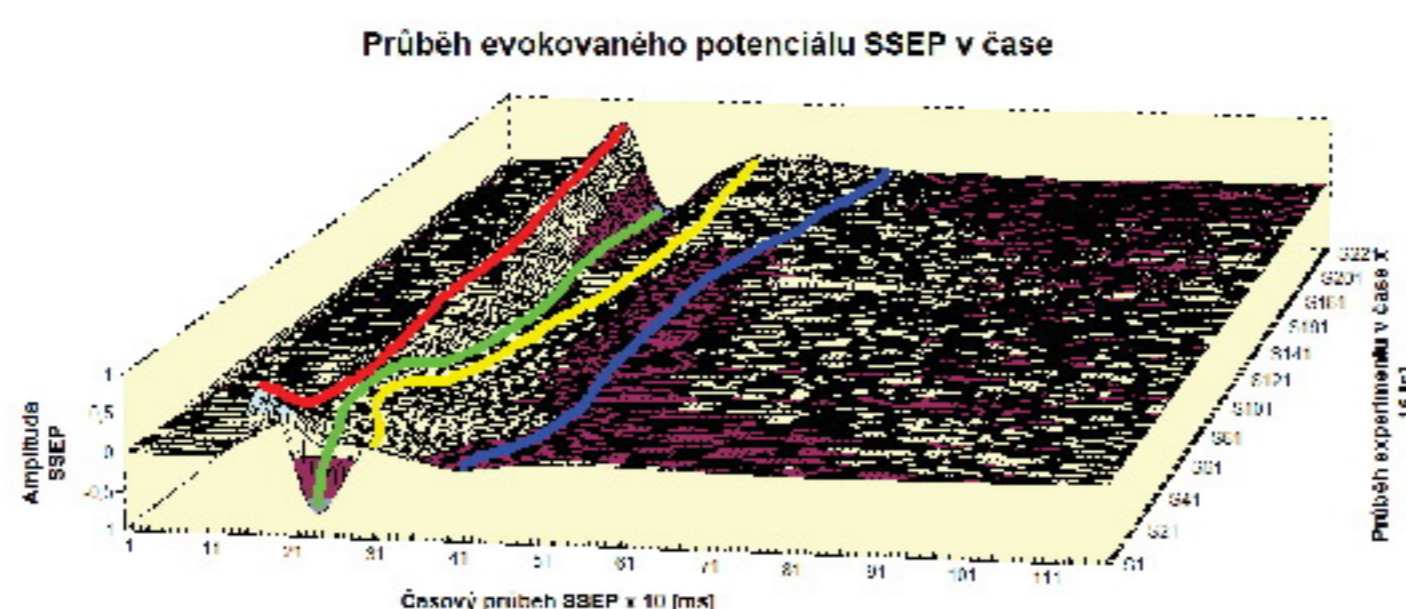
V této části jsme prokázali snížení aktivity na svícené straně, které má u kontrolní skupiny (SSKO) tendenci po ukončení svícení k postupnému návratu k původním hodnotám, zatímco u experimentální skupiny přetrvává (Obr. 7).



**Obr. 7: Průběh aktivity jednotkových potenciálů během a po vzniku kortikální fototrombotické léze. Zeleně je vyznačena doba svícení laserem. Další proužky označují statistickou významnost rozdílů mezi skupinami (dvě barvy) nebo v porovnání se záznamem před experimentálním zásahem (jedna barva). Klíč k barvám je umístěn pod nadpisem.**

## 6.4. Analýza somatosenzorických evokovaných potenciálů v čase

Výsledkem této části práce je program implementovaný v jazyce C++ a řešení jednotlivých částí zpracování záznamu. Celkově jsme vyhodnotili průběh 108 negativních (N1 a N2) a 72 pozitivních (P1) vln – z programu jsme získali celkem 99360 měřených hodnot, které bychom ručním měřením neměli šanci získat [26]. Díky tomuto programu jsme mohli sestavit grafy vývoje jejich latence a amplitudy v čase a tyto dále v celém rozsahu statisticky vyhodnotit a tak prokázat změny, které by nám při manuálním hodnocení pouze několika vybraných bodů zcela jistě unikly (Obr. 8).

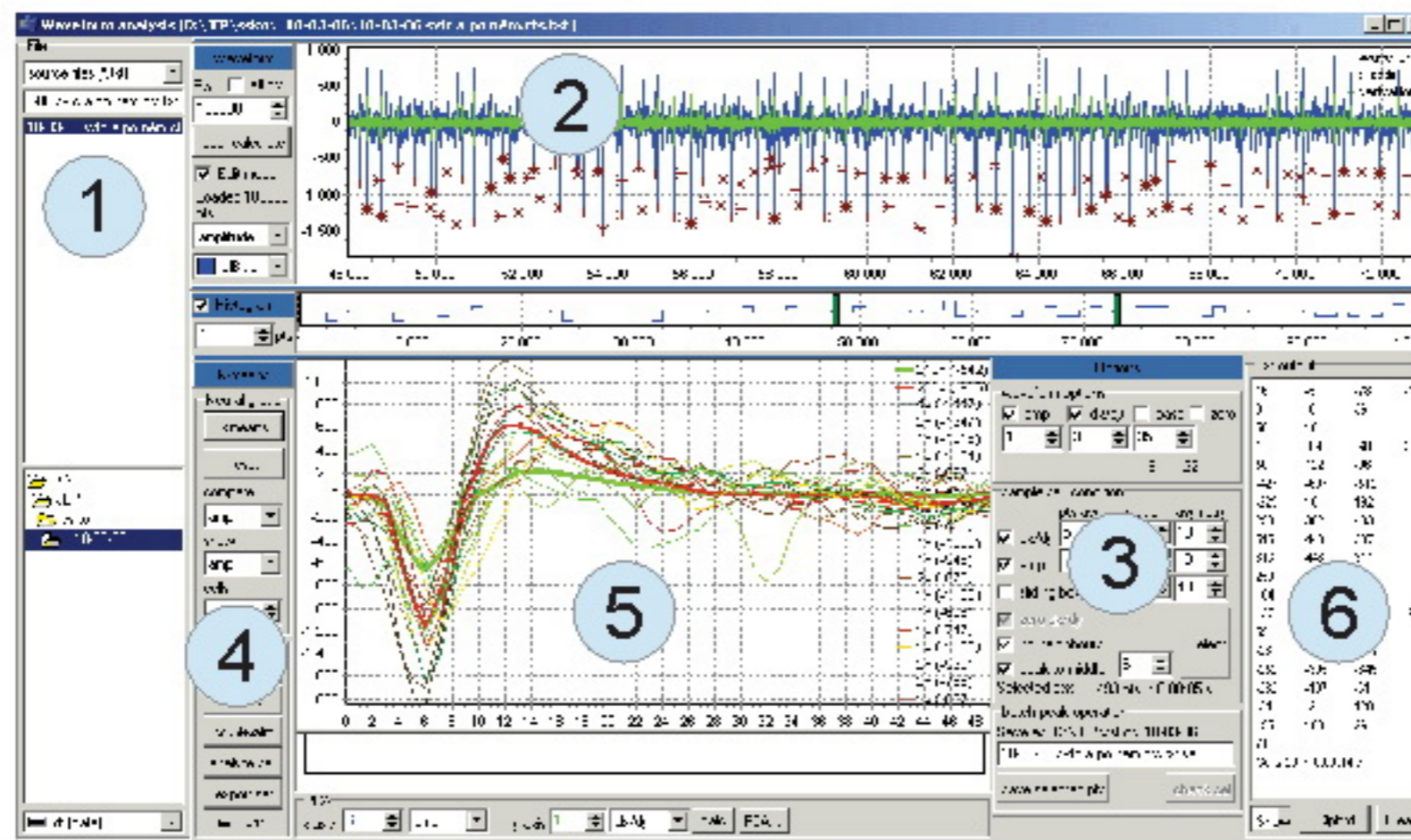


Obr. 8: Časový průběh jednotlivých komponent evokovaného potenciálu v průběhu celého experimentu a jejich porovnání s trojrozměrným grafem. Ze znalosti okolí lze nalézt

komponentu evokovaného potenciálu v okamžiku, kdy je tato špatně vyjádřena např. v důsledku experimentálního zásahu. Červená a žlutá jsou první a druhá negativní vlna (N1, N2). Zelená a modrá jsou první a druhá pozitivní vlna (P1, P2).

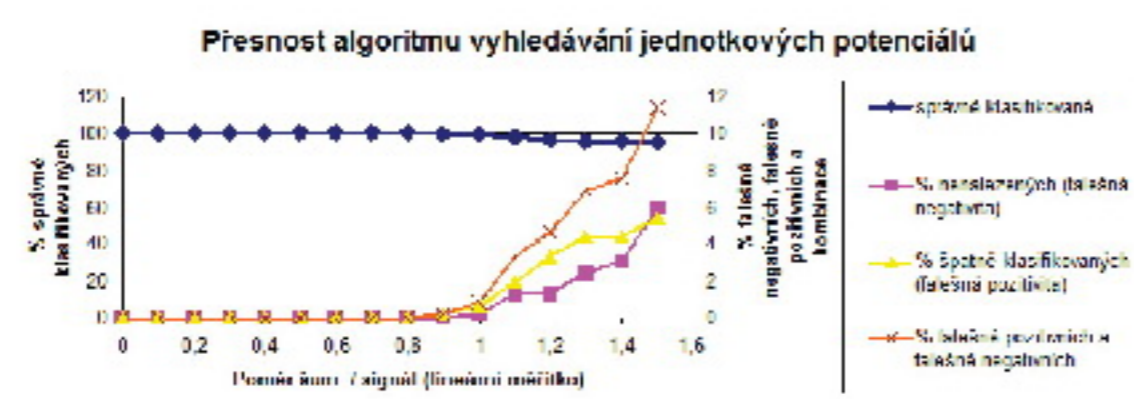
## 6.5. Analýza jednotkových potenciálů v čase

Výsledkem této části práce je program, který umožňuje semiautomatickou detekci jednotkových potenciálů v čase a jejich třídění, a který nám umožnil kontinuální hodnocení vývoje aktivity jednotkových potenciálů v čase (Obr. 9). Výpočet se sestává v zásadě ze tří kroků – preprocessing, detekce a shlukování pomocí modifikované RBF sítě, algoritmu K-means s možností analýzy hlavních komponent. Kromě této sítě jsme testovali i neuronovou síť GAME, SOM a Backpropagation.



Obr. 9: Grafické uživatelské rozhraní programu na vyhledávání a třídění hrotů (jednotkových potenciálů) po první iteraci shlukování. Po otevření záznamu (1) se tento zobrazí v

horním okně (2). Po vybrání hrotů na podkladě definovaných kritérií (3) se tyto hroty označí. Panel třídění hrotů (4) se nalézá nalevo od zobrazených vzorů (5), kde je lze rovněž dále ručně třídít. Datový výstup s nalezenými hroty (poloha v záznamu, křivka a strmost) se nalézá vpravo (6). Použita vlastní experimentální data.



Přesnost algoritmu je vyhovující a závisí na úrovni šumu ve vstupních datech (Obr. 10).

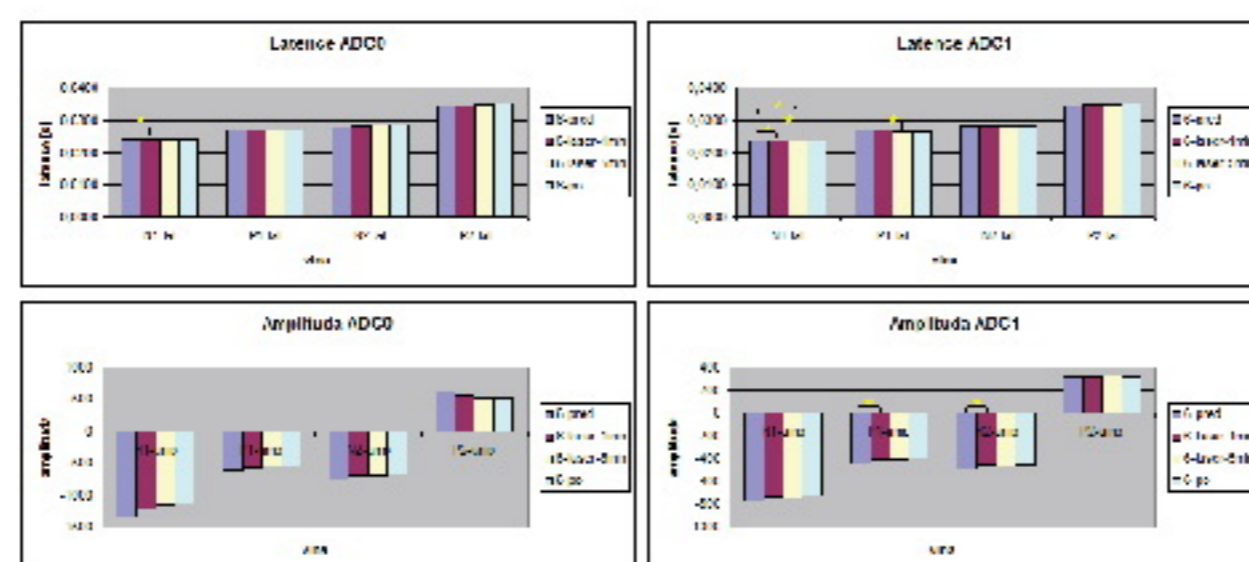
Obr. 10: Přesnost algoritmu

vyhledávání jednotkových potenciálů je vynesena v procentech pro různé poměry signálu a šumu.

Statistickým testem jsme neprokázali odlišnost distribuce latence nalezených jednotkových potenciálů od logaritmicke-normálního ani Poissonova rozdělení.

## 6.6. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG

Zjistili jsme, že na pravé straně (kam svítil laser) se při svícení a po svícení zkracuje latence první vlny. Navíc se na pravé straně přechodně při svícení snižuje amplituda druhé vlny (Obr. 11).

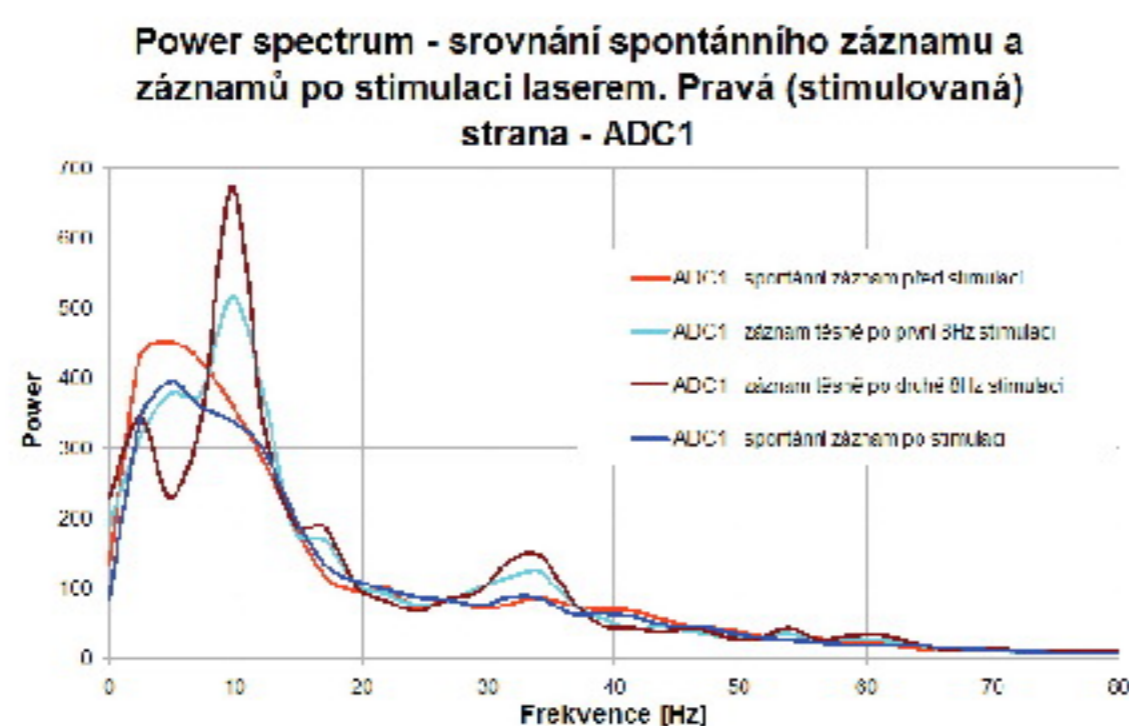


**Obr. 11: Naměřené hodnoty jednotlivých komponent odpovědi na korovou elektrickou stimulaci. \* označuje statistickou významnost mezi kategoriemi spojenými svorkou dle párového t-testu.**

**ADC0: levá strana, kde se stimulovalo. ADC1: pravá strana, kam svítil laser. Modrý sloupec: záznam před svícením, fialový sloupec: záznam na začátku svícení, žlutý sloupec: záznam na konci svícení, tyrkysový sloupec: záznam po svícení.**

Ve výkonovém spektru byl statisticky významný rozdíl prokázán u stimulace 10ms pulsem ve frekvencích 2,4 – 4,9Hz a 9,8 – 22,0Hz v nestimulovaném kanále a ve frekvencích do 12,2Hz a 24,4 – 26,9Hz ve stimulovaném kanále. U stimulace 70ms pulsem lze statisticky významný rozdíl prokázat v nestimulovaném kanále ve frekvenci kolem 2,4Hz; ve stimulovaném kanále statisticky významný rozdíl prokázat nelze.

Po ukončení rytmické stimulace kůry laserovým světlem dochází k posunu prvního maxima do vyšších frekvencí, na našem vzorku jsme toto prokázali hraničně statisticky významné pouze mezi záznamem před stimulací a první stimulací na pravé straně ( $p = 0,0497$ , Obr. 12).



**Obr. 12: Power spectrum před stimulací, po ukončení první a druhé 20s korové stimulace laserem a po stimulaci. Pravá hemisféra a (ADC1), kde bylo stimulovalo laserem.**

Neprokázali jsme přítomnost epileptických fenoménů po ukončení 8 Hz stimulace laserem. U zvířat v této části experimentu, kde jsme provedli morfologické zpracování mozku do tlustých řezů barvených TTC, jsme výpadek barvení neprokázali.

U 8Hz stimulace laserovým světlem délky 20s jsme v ECoG záznamech neprokázali žádné změny, které by měly charakter

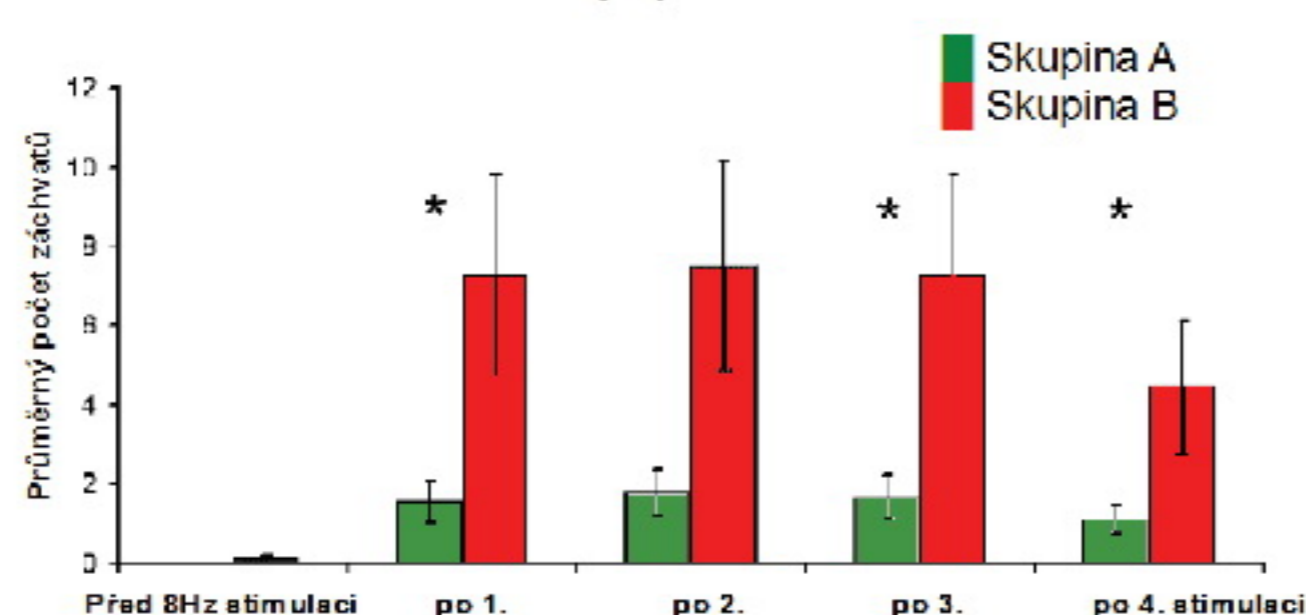
epileptických fenoménů. Při 8Hz stimulaci elektrickými obdélníkovými impulsy bylo u třech zvířat patrně několik epileptických fenoménů (hroty) a u jednoho zvířete se podařilo vyvolat krátký záchvat délky 4s.

Při pulsech laserového světla směřovaných na jablko z blízka i z dálky se zobrazil stimulační artefakt, který byl tím výraznější, čím blíže paprsek dopadal k dané snímací elektrodě. Při zopakování pokusu s navlhčenou houbou byly výsledky obdobné.

### 6.7. Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě

Po 20s stimulacích jsme v interiktálním období prokázali u skupiny (A) stimulované interiktálně jedním pulzem pouze několik krátkých epileptiformních fenoménů, zatímco u skupiny (B) stimulované salvou čtyř pulzů jich bylo významně více po první, druhé a čtvrté stimulaci ( $p < 0,05$ ). Rovněž celkový počet krátkých záchvatů byl významně vyšší u skupiny B ( $p < 0,01$ , Obr. 13).

Krátké záchvaty po jednotlivých pulsech nebo salvě čtyř pulzů



Obr. 131: Průměrný počet krátkých záchvatů po stimulaci jedním pulsem (skupina A) nebo salvou čtyř pulzů (skupina B). Chybové úsečky udávají směr od datnou odchylku. Hvězdičky označují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

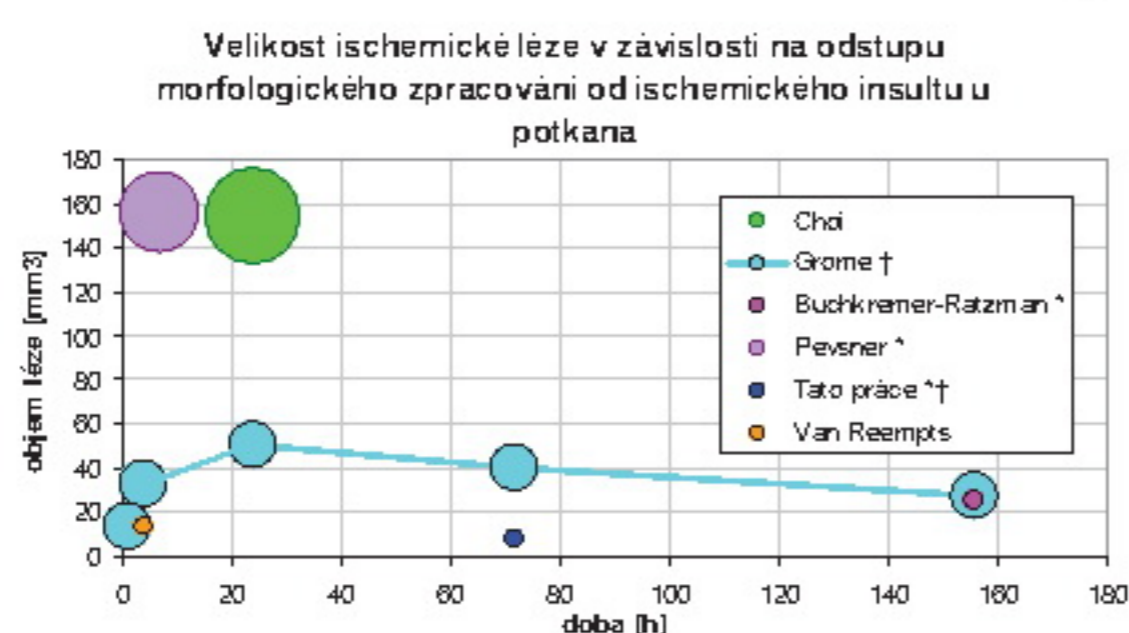
Průměrná doba trvání záchvatu po 8Hz stimulaci délky 20s byla vyšší u skupiny B, ale pouze po druhé stimulaci byl rozdíl statisticky významný ( $p < 0,05$ ).

U skupiny B jsme prokázali významně vyšší počet zvířat, u kterých došlo ke ztrátě rovnováhy v souvislosti s 8Hz stimulací délky 20ms ( $p < 0,05$ ).

## 7. Diskuse

### 7.1. Experimentální model ischemie

V práci jsme provedli porovnání modelu fototrombotické ischemické léze, jak byl zaveden v naší laboratoři, s literárními údaji. Na velikost a charakter ischemické léze má vliv jak zdroj světla – spektrum u polychromatického světla či vlnová délka u monochromatického světla, intenzita, tvar paprsku, doba svícení, zda bylo svíceno přes kalvu, tak i podání fotosenzitivního barviva (cesta podání, typ barviva), kmen laboratorního hlodavce a doba mezi vytvořením léze a morfologickým



zpracováním mozku (Obr. 14). V porovnání s jinými autory patří námi vytvořené léze k menším, nicméně i menší byl průřez paprsku. Větší část prací používá svícení přes obnaženou kalvu, méně pak, podobně jako zde, svícení přímo na

kůru.

**Obr. 14:** Velikost ischemické léze v závislosti na odstupu morfologického zpracování od ischemického insultu. Hvězdička (\*) označuje studie, kde byla velikost ischemického ložiska přepočítána extrapolací na polokouli. † označuje studie, kde bylo použito monochromatického (zeleného) světla. Velikost bodů znázorňuje relativní velikost paprsku (1 až 6mm).

### 7.2. Akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze

Vliv ischemie na somatosenzorické evokované potenciály byl popsán v mnoha pracích. Typickým projevem je snížení amplitudy první negativní a pozitivní vlny, často i prodloužení jejich latencí [27–29]. Shao ve své práci popisuje postupné prodloužování latence první vlny evokovaného potenciálu s odstupem od ischemie vyvolané uzávěrem a. cerebri media u potkana [30,31]. V literatuře se uvádí i vymizení evokovaných potenciálů během rozvoje ischemie [32] s jejich návratem po ukončení ischemického

insultu [28]. Latence vln je daleko variabilnější. Během ischemie mozku však může dojít i ke zvýšení amplitudy komponent evokovaného potenciálu, které Wang et al. vysvětlují vyšší vulnerabilitou inhibičních systémů k nedostatku kyslíku [33]. Snížení amplitudy evokovaného potenciálu může prohlubovat fakt, že ischemická tkáň má vyšší impedanci [34].

V této části práce jsme prokázali snížení amplitudy vln somatosenzorického evokovaného potenciálu během rozvoje kortikální fototrombotické ischemické léze. To je v souladu s různými pozorováními jiných autorů. Nález podobných změn i u kontrolní skupiny a kontralaterálně k místu svícení přičítáme vlivu ozáření laserového světla na mozkovou kůru stejně jako zkrácení latence vlny N2 u obou skupin na obou stranách.

### **7.3. Akutní změny jednotkových potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze**

V této části práce jsme zjistili, že jednotková aktivita zaznamenávaná z primární somatosenzorické oblasti během ischemického insultu rychle klesá a tak zůstává do konce experimentu. Tyto změny volně kopírují předpokládané změny průtoku v této oblasti zobrazené na [35]. Podobné změny popsali i Heiss et al. u koček, u kterých v závislosti na průtoku krve mozkovou kůrou (CBF) došlo až k vymizení aktivity. Ojediněle bylo pozorováno i přechodné zvýšení aktivity neuronu, které lze vysvětlit vyšší vulnerabilitou inhibičních systémů ke sníženému CBF [36].

Překvapivé naopak bylo to, že u kontrolní skupiny jsme na osvětlené straně rovněž prokázali pokles jednotkové aktivity. Ta se však postupně po ukončení svícení regenerovala, tj. přibližovala k aktivitě zaznamenávané před iniciací ischemie. To mimo jiné svědčí pro fakt, že samotné svícení laserem na mozkovou kůru má vliv na její excitabilitu, kterou jsme dále prozkoumali v samostatném experimentu.

### **7.4. Analýza somatosenzorických evokovaných potenciálů v čase**

Zmínky o semiautomatickém či automatickém hodnocení evokovaných potenciálů se v literatuře objevují již od 70. let, kdy začaly být pro tento účel použitelné a zejména relativně dostupné počítače. V

roce 1970 se objevuje práce, ve které je zmiňováno použití analýzy hlavních komponent (PCA) na záznamech z primární sluchové oblasti u koček [37], užití minipočítače pro tento účel bylo popsáno v roce 1976 [38]. Dále existuje řada prací, které zdokonalují analýzu signálu, používají filtrace, transformace, fuzzy logiku, neuronové sítě, nebo se snaží odlišit patologické záznamy [30] [39] [40,41]

V naší práci měl problém vyhledávání vrcholů další parametr, časový průběh, t.j. kromě lokálních vlastností evokovaného potenciálu i globální charakteristiky, zejména vývoj v okolí [42]. Navíc, vzhledem k délce záznamu a experimentálnímu zásahu jsme museli předpokládat, že se tvar evokovaného potenciálu bude v průběhu experimentu zásadně měnit. Program v této podobě vyhovuje našim požadavkům a umožnil nám, že jsme mohli vyhodnotit naše experimenty (akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické ischemické kortikální léze) v celém jejich trvání. Jedině tak jsme mohli najít všechna místa, kde byly změny amplitudy a latence vln statisticky významné a vytvořit grafickou reprezentaci vývoje jejich amplitudy a latence v čase.

### **7.5. Analýza jednotkových potenciálů v čase**

Automatizované hodnocení jednotkových potenciálů je v současné době prerekvizitou analýzy neustálených stavů vyvolaných experimentálním zásahem – v našich experimentech jsme hodnotili vývoj jednotkových potenciálů při vzniku ischemické léze vyvolané fototrombózou [22,43,44]. Tyto změny pravděpodobně vznikají v důsledku edému [45] s následnou dislokací neuronu [46], rozdílnou impedancí ischemické tkáně [34], odpovědí neuronu na ischemický insult, případně jeho lýzou. Wood et al. ve své práci dokumentovali značnou variabilitu hodnocení záznamů jednotkových potenciálů člověkem, kdy falešná negativita či pozitivita dokázala přesáhnout hranici 50% [47].

Detekce jednotkových potenciálů či jejich skupin z jedno- či vícekanálových záznamů byla řešena v mnoha pracích. Naše implementace využívá shlukové analýzy sítě RBF metodou k-means. V literatuře bylo popsáno použití vlnkové (wavelet) transformace a analýzy hlavních komponent [48], analýzy nezávislých komponent (independent component analysis, ICA) [49], detekce a třídění ve frekvenční doméně s použitím statistického modelu a Fourierovy



transformace [50] [51], použití směrodatné odchylky amplitud záznamu v okolí [51], filtrace ale i jednoduchých metod jako je integrál (*Maximum Integral Transform Alignment*) [52,53].

Při navrhování postupu výpočtu jsme použili a upravili některé obecné programovací postupy a metody dataminingu (filtrace dat, neuronové sítě, algoritmus k-means, analýza hlavních komponent). V porovnání s ostatními popsanými metodami bylo dosaženo velmi dobré úrovně detekce jednotek, která je na špičce toho, co udávají jiní autoři, kteří si ovšem své řešení, stejně jako my, chválí. Nicméně vzájemné srovnání jednotlivých prací je svízelné, protože porovnávají záznamy různých typů co do definice úrovně šumu, aktivity zaznamenávané buňky a záznamu signálu více neuronů.

## **7.6. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG**

Vliv laseru na fyziologické pochody a případný léčebný vliv na tkáně byly popsány v mnoha pracích. To, že svícení laserem má na cellulární úrovni vliv na samotné korové neurony, však není příliš známé. Přímé ovlivnění neuronů lze prokázat změnou koncentrace intracelulárních a extracelulárních iontů a molekul včetně neurotransmitterů, membránového potenciálu, nebo průtoku stimulovanou oblastí v krátkém odstupu od světelné stimulace [54,55]. světla [56]. [57]. i [58] [59]. Mechanismus však není přesně znám.

Změny v odpovědi na korovou elektrickou stimulaci během svícení laserovým světlem, které jsme v experimentu prokázali, jsou malé, avšak dosahují statistické významnosti. Pozorované zkrácení latence na svícené straně, které je indukováno účinkem laserového světla, můžeme s ohledem na jeho časové konstanty připsat změnám hladin intracelulárních substancí při osvětlení laserem [55]. Při dané vlnové délce se zřejmě termický účinek světla uplatní zcela minimálně. Neočekávané bylo mírné zkrácení latence na straně kontralaterální ke svícení u první komponenty (N1) odpovědi na kortikální stimulaci a druhé komponenty somatosezorického potenciálu (N2) při odpovědi na stimulaci n. ischiadicus, které lze vysvětlit kromě působení ambientního světla i mechanismem diaschízy, neboli ovlivněním vzdálených oblastí při lokálním insultu [60–62].

Existuje zde ovšem určitá diskrepance s jinými studiemi, kde je obvykle při téměř jakémkoliv insultu prokazováno prodloužení latencí

komponent evokovaného potenciálu. Snížení amplitudy somatosenzorického evokovaného potenciálu jak v místě svícení tak i na opačné straně nebo útlum jednotkové aktivity v místě svícení na mozkovou kůru v primární somatosenzorické oblasti u kontrolních skupin v předchozích experimentech, stejně jako změny frekvenčního spektra s posunem do vyšších frekvencí při stimulaci krátkými pulsy laserového světla nebo po ukončení repetitivní 8Hz stimulace délky 20s laserem v této části práci lze vysvětlit obdobnými mechanismy, jejichž jmenovatelem jsou změny excitability osvětlených neuronů.

Překvapivý je i nález odpovědi na stimulaci mozkové kůry krátkým laserovým pulsem, která má latenci mezi 40-140 ms, jak na stimulované, tak na nestimulované straně. Přímá závislost laserového pulsu a kortikální odpovědi nebyla ještě u geneticky nemodifikovaných laboratorních hlodavců popsána. Známé je to, že změny, které je laserové světlo schopno u neuronů (nikoliv fotoreceptorů) vyvolat, jsou typicky časově nezávislé na jednotlivých pulsech [63]. Stimulační artefakt, který jsme pozorovali, popisují i Han et al. při stimulaci kůry makaka světlem a uvádějí, že jim nečinil žádné problémy v hodnocení záznamu [64]. Význam této studie spatřujeme i v tom, že přináší výhrady k in-vitro záznamům jednotkových potenciálů na tenkých řezech za kontroly konfokálního mikroskopu [65]. Právě osvětlení neuronu může mít vliv na jeho excitabilitu. To pak může ovlivnit výsledek studií, kde se pomocí konfokální mikroskopie měří změny hladiny kalcia [66–68].

### **7.7. Průlom postiktální inhibice salvou pulzů o nižší intenzitě**

V období postiktální inhibice, které přechodně nastává po epileptickém záchvatu, zpravidla nelze vyvolat další epileptický záchvat ani při použití stimulace o vyšší intenzitě [21,69]. V této části práce se nám podařilo v interiktálním období vyvolat epileptické fenomény salvou čtyř elektrických pulzů o slabší intenzitě a ojediněle i jednotlivými pulzy. Ve skupině, kde bylo stimulováno salvami, jsme rovněž pozorovali častější ztrátu rovnováhy zvířete při druhé 20s stimulaci. Nepozorovali jsme prodlužování epileptických záchvatů, které by svědčilo pro akutní kindling.

V této práci jsme použili stejné parametry 20s stimulace, jako v práci předchozí [21]. Tehdy bylo prokázáno, že při použití intenzivní stimulace

se v několika prvních minutách projevuje fenomén postiktální inhibice [21,69]. Vyvolání epileptických fenomenů v tomto experimentu pomocí salvy čtyř pulzů o nižší intenzitě lze vysvětlit přítomností přetrvávající zvýšené excitability na pozadí masivní aktivní inhibice a deplece presynaptických váčků [20,70].

Výsledky této části práce ukazují, že i ve fázi postiktální inhibice lze demaskovat zvýšenou excitabilitu, která je skryta za inhibičními systémy. Snaha o vyvolání opakovaného epileptického záchvatu stejnou nebo vyšší intenzitou stimulace paradoxně může akcentovat inhibiční systémy a tak vést k zesílení refraktivity [71].

## 8. Závěr

V první části této části práce jsme vybrali a zavedli experimentální model fototrombotické ischemické kortikální léze v naší laboratoři. Prokázali jsme, že model vytváří morfologicky detekovatelnou ischemickou lézi. Vzniklé ischemické léze jsou v porovnání s pracemi jiných autorů menší, což je dáno menším průřezem světelného paprsku, který dopadá na kůru přímo, vlnovou délkou použitého laserového světla a použitým kmenem laboratorního potkana. Hlavní nevýhodou modelu fototrombotické ischemické léze je vznik relativně malé penumbry. Tuto nevýhodu lze kompenzovat úpravou tvaru světelného paprsku, či přímým svícením na makroskopicky patrnou tepnu na povrchu mozku. Model fototrombotické léze je možno dále zjednodušit intraperitoneálním podáním fotosenzitivní látky, použitím polychromatického světla a světelného vodiče.

V druhé části této práce jsme zjistili, že během rozvoje kortikální fototrombotické ischemické léze dochází ke snížení amplitudy komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu. To je v souladu s různými pozorováními jiných autorů. Nález podobných změn i u kontrolní skupiny a kontralaterálně k místu svícení přičítáme vlivu laserového světla na mozkovou kůru. Stejně si vysvětlujeme i zkrácení latence vlny N2 u obou skupin na obou stranách. Podrobné hodnocení vývoje somatosenzorického evokovaného potenciálu jsme mohli provést pouze díky programu, který je součástí této práce a je popsán v samostatné kapitole.

V další části práce jsme prozkoumali akutní změny jednotkové aktivity zaznamenávané z blízkosti rozvíjejícího se ischemického ložiska. Zjistili jsme, že volně kopírují předpokládané změny perfúze v této

oblasti. To rovněž svědčí pro účinnost modelu fototrombotické ischemické kortikální léze, jak byl zaveden v naší laboratoři. Neočekávané však byly méně výrazné a přechodné změny podobného charakteru u kontrolní skupiny, které vysvětlujeme účinkem samotného laserového světla na mozkovou kůru a dále podrobněji rozebíráme v samostatné části práce. Hodnotit vývoj aktivity jednotek v čase v průběhu celého experimentu nám umožnil program, který jsme pro tento účel navrhli a implementovali.

Ve čtvrté části této práce popisujeme implementaci semiautomatického hodnocení průběhu komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu v čase, který jsme museli vytvořit, protože jsme nenalezli jiný nástroj, který by nám pro tento účel posloužil. Vybrali jsme a upravili pro naše speciální potřeby některé programovací techniky (nejbližší soused, simulované ochlazování s vícerozměrným optimalizačním kritériem). Výstup programu jsme ověřili porovnáním s reprezentací průběhu záznamu v trojrozměrném grafu. Tento program nám umožnil, že jsme mohli vyhodnotit naše experimenty (akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické kortikální ischemické léze) v celém jejich trvání. Jedině tak jsme mohli najít všechna místa, kde byly změny amplitudy a latence vln statisticky významné, a vytvořit grafickou reprezentaci vývoje jejich amplitudy a latence v čase.

Pátá část této práce zahrnovala návrh a implementaci algoritmu s cílem hodnocení záznamů našich experimentů, ve kterých jsme zaznamenávali jednotkové potenciály v blízkosti rozvíjející se kortikální fototrombotické ischemické léze a hodnotili jejich akutní změny. Vytvořený program vyhověl našim požadavkům. Díky němu jsme byli schopni vyhodnotit záznamy jednotkových potenciálů z naší laboratoře v celém průběhu experimentu a najít tak všechna místa, kde došlo k významným změnám. V programu jsme použili a upravili některé obecné programovací postupy a metody dataminingu (filtrace dat, neuronová síť, algoritmus k-means, analýza hlavních komponent). V porovnání s ostatními popsány metodami bylo dosaženo velmi dobré úrovně detekce jednotek – v typickém záznamu z naší laboratoře program správně identifikoval všechny jednotkové potenciály (srovnáno s manuálním hodnocením záznamu). Neprokázali jsme odlišnost rozložení intervalů mezi hroty od námi předpokládané distribuce. Dostupné komerční programy, které nabízejí detekci hrotů, jsou často limitované množstvím

zpracovávaných dat a velmi obecnou definicí hrotu, což přináší riziko ztráty části výsledků nebo přidání arteficiálních dat. Podle našich zkušeností je v experimentální praxi vhodnější propojení programovacích technik a algoritmů za účelem vytvoření funkce ušité na míru než použití obecných nástrojů v běžných komerčních programech.

V předposlední části práce jsme se zabývali vlivem laserového světla ve viditelném spektru na excitabilitu mozkové tkáně. Samotné ozáření mozkové kůry laserovým světlem vede ke zkrácení latence vlny N1 odpovědi na kortikální elektrickou stimulaci, dále k přechodnému zkrácení latence vlny N2 korové odpovědi na stimulaci n. ischiadicus v primární somatosenzorické oblasti a k přechodnému snížení jednotkové aktivity. Předpokládáme, že tyto změny excitability jsou vzhledem k časovým konstantám způsobeny změnami hladin intracelulárních molekul vyvolanými laserovým světlem. To je zřejmě i mechanismem zodpovědným za posun frekvenčního maxima směrem k vyšším hodnotám po ukončení rytmické kortikální stimulace laserem nebo během opakované stimulace kůry krátkým laserovým pulsem. Podobné změny odpovědi na korovou elektrickou stimulaci a elektrickou stimulaci periferního nervu na straně kontralaterální ke svícení lze zčásti vysvětlit působením ambientního světla a mechanismem diaschízy. Stimulační artefakt, který byl patrný u některých experimentů při stimulaci mozkové kůry krátkými laserovými pulsy, vysvětlujeme interakcí hmoty (kov elektrody) a záření (jistě avšak ne elektromagnetický artefakt, spíše fotoelektrický jev) a zčásti přímým účinkem světla na mozkovou kůru. Přímou odpověď na stimulaci mozkové kůry laserovými pulsy typu evokovaného potenciálu jsme však neprokázali. Rytmickou stimulací mozkové kůry pulsy laserového světla se nám nepodařilo vyvolat epileptickou aktivitu, která byla jinak snadno prokazatelná při stimulaci pulsy elektrickými v další části práce.

V poslední části práce jsme ukázali, že i v období postiktální inhibice (epileptický záchvat byl vyvoláván rytmickou korovou elektrickou stimulací) lze najít zvýšenou excitabilitu na pozadí převládající inhibice pomocí stimulace salvou čtyř pulsů o nižší intenzitě v interiktálním období. Domníváme se, že snaha o vyvolání opakovaného epileptického záchvatu stejnou nebo vyšší intenzitou stimulace paradoxně může akcentovat inhibiční systémy a tak vést k zesílení refraktivity v období postiktální inhibice. Zatímco rytmickou kortikální elektrickou stimulací se

nám daří vyvolat epileptické fenomény pokaždé, při stimulaci kůry stejným stimulačním vzorem ale laserovým paprskem namísto elektrického pulsu jsme v předchozích experimentech epileptické fenomény nezaznamenali.

## 9. Použitá literatura

1. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke*. 1977 Jan 1;8(1):51–7.
2. Hakim AM. Ischemic penumbra The therapeutic window. *Neurology*. 1998 Sep 1;51(3 Suppl 3):S44–S46.
3. Molinari GF, Laurent JP. A Classification of Experimental Models of Brain Ischemia. *Stroke*. 1976 Jan 1;7(1):14–7.
4. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989 Dec 1;20(12):1627–42.
5. Braeuninger S, Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med*. 2009 Nov 25;1(1):8.
6. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010 Aug;30(8):1412–31.
7. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003;44(2):85–95.
8. Šnorek M. Neuronové sítě a neuropočítače. Praha: Vydavatelství ČVUT; 2004.
9. Subasi A, Erçelebi E. Classification of EEG signals using neural network and logistic regression. *Comput Methods Programs Biomed*. 2005 May;78(2):87–99.
10. Subasi A, Kiymik MK, Alkan A, Koklukaya E. Neural Network Classification of EEG Signals by Using AR with MLE Preprocessing for Epileptic Seizure Detection. *Math Comput Appl*. 2005;10(1).
11. Schmidt J. Problémy a algoritmy - přednášky z předmětu D36PAA ČVUT FEL. ČVUT Praha; 2004.
12. Kartelija G, Nedeljkovic M, Radenovic L. Photosensitive neurons in mollusks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003 Mar;134(3):483–95.
13. Wade PD, Taylor J, Siekevitz P. Mammalian cerebral cortical tissue responds to low-intensity visible light. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(23):9322–6.
14. Aldenkamp AP. Effect of Seizures and Epileptiform Discharges on Cognitive Function. *Epilepsia*. 1997;38:S52–S55.

15. Daniel WF, Crovitz HF, Weiner RD, Scott Swartzwelder H, Michael Kahn E. ECT-induced amnesia and postictal EEG suppression. *Biol Psychiatry*. 1985 Mar;20(3):344–8.
16. Kriss A, Halliday AM, Halliday E, Pratt RT. Evoked potentials following unilateral ECT. II. The flash evoked potential. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1980 May;48(5):490–501.
17. Stastný F, Mares J, Trojan S. Rapid modulation of rat cortical Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase during recovery following self-sustained afterdischarges. *Physiol Bohemoslov*. 1981;30(1):79–83.
18. Vanore G, Giraldez L, Rodríguez de Lores Arnaiz G, Girardi E. Seizure activity produces differential changes in adenosine A1 receptors within rat hippocampus. *Neurochem Res*. 2001 Mar;26(3):225–30.
19. Rocha L, Ackermann RF, Engel J Jr. Effects of chronic morphine pretreatment on amygdaloid kindling development, postictal seizure and suppression and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsy Res*. 1996 Apr;23(3):225–33.
20. Young D, Dragunow M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience*. 1994 Jan;58(2):245–61.
21. Mares J, Mares P, Kadlecová-Jursíková D. Changes in the excitability of rat cerebral cortex after a self-sustained after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1982 Mar;53(3):283–8.
22. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985 May;17(5):497–504.
23. Watson BD, Prado R, Dietrich WD, Ginsberg MD, Green BA. Photochemically induced spinal cord injury in the rat. *Brain Res*. 1986 Mar 5;367(1-2):296–300.
24. Ikegaya Y, Sasaki T, Ishikawa D, Honma N, Tao K, Takahashi N, et al. Interpyramid Spike Transmission Stabilizes the Sparseness of Recurrent Network Activity. *Cereb Cortex*. 2013 Feb;23(2):293-304.
25. Kirkpatrick S, Gelatt CD, Vecchi MP. Optimization by simulated annealing. *Science*. 1983;220:671–80.
26. Tůma L, Bernášková K, Mareš J. Semi-interactive detection of action potentials using local wave features and clustering. *Acta Medica Martiniana J Biomed Sci Clin Med Nurs*. 2007;7(2):3–8.
27. Henninger N, Heimann A, Kempfski O. Electrophysiology and neuronal integrity following systemic arterial hypotension in a rat model of unilateral carotid artery occlusion. *Brain Res*. 2007 Aug 13;1163(0):119–29.
28. Kocher M, Miyazawa T, Bauer R, Hossmann KA. [Evoked potentials following cerebral ischemia in the rat: the effect of the stimulus frequency]. *EEG-EMG Z Für Elektroenzephalographie Elektromyographie Verwandte Geb*. 1992 Sep;23(3):144–6.

29. Wu D, Anastassios B, Xiong W, Madhok J, Jia X, Thakor NV. Study of the Origin of Short- and Long-latency SSEP during Recovery from Brain Ischemia in a Rat Model. *Neurosci Lett*. 2010 Nov 26;485(3):157–61.
30. Abolhasani MD, Jafari AH, Salimpour Y, Khalili G, Marami B. Automated identification and interpretation of auditory brainstem evoked potentials. The 3rd European Medical and Biological Engineering Conference in Prague; 2005.
31. Shao Y. Cortical evoked potential changes in a rat model of acute ischemic stroke. Detection of somatosensory evoked potential and motor evoked potential. *Neural Regen Res*. 2010;5(7):5.
32. Lee KC, Joo JY, Huh SK, Kim TS. Effects of Repeated Short versus Single Long Episodes of Focal Ischemia on Somatosensory Evoked Potentials and Development of Cerebral Infarction in Cats. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1997;37(6):447–52.
33. Wang Y, Nakashima K, Shiraishi Y, Kawai Y, Takahashi K. The recovery function of paired somatosensory evoked potentials in cerebral ischemic rabbits. *Exp Brain Res*. 1995;106(2):233–8.
34. Ropper AH. Evoked potentials in cerebral ischemia. *Stroke*. 1986 Jan 1;17(1):3–5.
35. Hu X, Wester P, Brännström T, Watson BD, Gu W. Progressive and reproducible focal cortical ischemia with or without late spontaneous reperfusion generated by a ring-shaped, laser-driven photothrombotic lesion in rats. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2001 Apr;7(1):76–85.
36. Heiss W HT. Cortical neuronal function during ischemia: Effects of occlusion of one middle cerebral artery on single-unit activity in cats. *Arch Neurol*. 1976 Dec 1;33(12):813–20.
37. Suter CM. Principal component analysis of average evoked potentials. *Exp Neurol*. 1970 Nov;29(2):317–27.
38. Hartwell J, Erwin C. Evoked potential analysis: On-line signal optimization using a mini-computer. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1976 Oct;41(4):416–21.
39. Navara M, Olšák P. *Základy fuzzy množin*. 1st ed. Vydavatelství ČVUT; 2007.
40. Hoppe U, Weiss S, Stewart RW, Eysholdt U. An Automatic Sequential Recognition Method for Cortical Auditory Evoked Potentials. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2001;48(2).
41. Sivakumar R, Ravindran G. Automatic Discrimination of Abnormal Subjects Using the Visual Evoked Potential Spectral Components. *J Biomed Biotechnol*. 2004 Apr 27;2004(1):5–9.
42. Kittler J, Roli F. *Multiple Classifier Systems: Second International Workshop, MCS 2001 Cambridge, UK, July 2-4, 2001 Proceedings*. Springer; 2001.
43. Matějovská I, Bernášková K, Krýsl D, Mareš J. Influence of melatonin pretreatment and preconditioning by hypobaric hypoxia on the development of cortical photothrombotic ischemic lesion. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov*. 2008;57(2):283–8.



44. Pevsner PH, Eichenbaum JW, Miller DC, Pivawer G, Eichenbaum KD, Stern A, et al. A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2001 Jun;45(3):227–33.
45. Hu X, Brännström T, Gu W, Wester P. A photothrombotic ring stroke model in rats with or without late spontaneous reperfusion in the region at risk. *Brain Res*. 1999 Dec 4;849(1-2):175–86.
46. Franke F, Natora M, Boucsein C, Munk MHJ, Obermayer K. An online spike detection and spike classification algorithm capable of instantaneous resolution of overlapping spikes. *J Comput Neurosci*. 2010 Aug;29(1-2):127–48.
47. Wood F, Black MJ, Vargas-Irwin C, Fellows M, Donoghue JP. On the variability of manual spike sorting. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2004 Jun;51(6):912–918.
48. Hulata E, Segev R, Ben-Jacob E. A method for spike sorting and detection based on wavelet packets and Shannon's mutual information. *J Neurosci Methods*. 2002 May 30;117(1):1–12.
49. Takahashi S, Anzai Y, Sakurai Y. A new approach to spike sorting for multi-neuronal activities recorded with a tetrode--how ICA can be practical. *Neurosci Res*. 2003 Jul;46(3):265–72.
50. Rinberg D, Bialek W, Davidowitz H, Tishby N. Spike sorting in the frequency domain with overlap detection. *Arxiv Prepr Physics*. 2003.
51. Rutishauser U, Schuman EM, Mamelak AN. Online detection and sorting of extracellularly recorded action potentials in human medial temporal lobe recordings, in vivo. *J Neurosci Methods*. 2006 Jun 30;154(1-2):204–24.
52. Zviagintsev A, Perelman Y, Ginosar R. Algorithms and architectures for low power spike detection and alignment. *J Neural Eng*. 2006 Mar 1;3(1):35–42.
53. Zviagintsev A, Perelman Y, Ginosar R. A Low-Power Spike Detection and Alignment Algorithm. 2nd Int IEEE EMBS Conf Neural Eng 2005 Conf Proc. 2005. 317–320.
54. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y-Y, De Taboada L, McCarthy T, Hamblin MR. Effects of 810 nm laser on mouse primary cortical neurons. *Proc SPIE*. 2011 Feb 10;7887:07.
55. Sharma SK, Kharkwal GB, Sajo M, Huang Y-Y, De Taboada L, McCarthy T, et al. Dose Response Effects of 810 nm Laser Light on Mouse Primary Cortical Neurons. *Lasers Surg Med*. 2011 Sep;43(8):851–9.
56. Cayce JM, Friedman RM, Jansen ED, Mahavaden-Jansen A, Roe AW. Pulsed infrared light alters neural activity in rat somatosensory cortex in vivo. *Neuroimage*. 2011 Jul 1;57(1):155–66.
57. Izzo AD, Walsh JT, Ralph H, Webb J, Bendett M, Wells J, et al. Laser Stimulation of Auditory Neurons: Effect of Shorter Pulse Duration and Penetration Depth. *Biophys J*. 2008 Apr 15;94(8):3159–66.

58. Feng H-J, Kao C, Gallagher MJ, Jansen ED, Mahadevan-Jansen A, Konrad PE, et al. Alteration of GABAergic Neurotransmission by Pulsed Infrared Laser Stimulation. *J Neurosci Methods*. 2010 Sep 30;192(1):110–4.
59. Ahmed NAEH, Radwan NM, Ibrahim KM, Khedr ME, El Aziz MA, Khadrawy YA. Effect of three different intensities of infrared laser energy on the levels of amino acid neurotransmitters in the cortex and hippocampus of rat brain. *Photomed Laser Surg*. 2008 Oct;26(5):479–88.
60. Buchkremer-Ratzmann I, August M, Hagemann G, Witte OW. Electrophysiological Transcortical Diaschisis After Cortical Photothrombosis in Rat Brain. *Stroke*. 1996 Jun 1;27(6):1105–11.
61. Kempinsky WH. Experimental study of distant effects of acute focal brain injury; a study of diaschisis. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1958 Apr;79(4):376–89.
62. Krysl D, Deykun K, Lambert L, Pokorny J, Mares J. Perifocal and remote blood-brain barrier disruption in cortical photothrombotic ischemic lesion and its modulation by the choice of anesthesia. *J Physiol Pharmacol*. 2012 Apr;63(2):127–32.
63. Wells J, Kao C, Konrad P, Milner T, Kim J, Mahadevan-Jansen A, et al. Biophysical Mechanisms of Transient Optical Stimulation of Peripheral Nerve. *Biophys J*. 2007 Oct 1;93(7):2567–80.
64. Han X, Qian X, Bernstein JG, Zhou H, Franzesi GT, Stern P, et al. Millisecond-Timescale Optical Control of Neural Dynamics in the Nonhuman Primate Brain. *Neuron*. 2009 Apr 30;62(2):191–8.
65. McNally HA, Rajwa B, Sturgis J, Robinson JP. Comparative three-dimensional imaging of living neurons with confocal and atomic force microscopy. *J Neurosci Methods*. 2005 Mar 30;142(2):177–84.
66. Brain KL, Trout SJ, Jackson VM, Dass N, Cunnane TC. Nicotine induces calcium spikes in single nerve terminal varicosities: a role for intracellular calcium stores. *Neuroscience*. 2001;106(2):395–403.
67. Eilers J, Callewaert G, Armstrong C, Konnerth A. Calcium signaling in a narrow somatic submembrane shell during synaptic activity in cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Oct 24;92(22):10272–6.
68. Eshete F, Fields RD. Spike Frequency Decoding and Autonomous Activation of Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Neurosci*. 2001 Sep 1;21(17):6694–705.
69. Marešová D, Valkounová I, Jandová K, Bortelová J, Trojan S. Excitability changes of cortical neurons during the postnatal period in rats exposed to prenatal hypobaric hypoxia. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov*. 2001;50(2):215–9.
70. Langmeier M, Mares J, Fischer J. Number of synaptic vesicles in rat cortex immediately after cessation of the self-sustained afterdischarge during kindling. *Epilepsia*. 1983 Oct;24(5):616–27.
71. Tůma L, Krýsl D, Mareš J. Short Bursts of Weak Pulses Break Postictal Inhibition in the Neocortex of Wistar Rats. *Epilepsia*. 2003;44(5):636–9.

## Seznam publikací doktoranda

### Publikace in extenso se vztahem k tématu s IF:

Tuma L, Krysl D, Mares J. Short bursts of weak pulses break postictal inhibition in the neocortex of Wistar rats. *Epilepsia*. 2003; 44(5): p. 636-9. IF=3.549

Krysl D, Deykun K, Lambert L, Pokorny J, Mares J. Perifocal and remote blood-brain barrier disruption in cortical photothrombotic ischemic lesion and its modulation by the choice of anesthesia. *J. Physiol. Pharmacol.* 2012 Apr;63(2):127–32. IF=2.476

### Publikace in extenso bez vztahu k tématu s IF:

Grus T, Lindner J, Vidim T, Tosovsky J, Matecha J, Rohn V, Lambert L, et al. The anastomosis angle is a key to improved long-term patency of proximal femoropopliteal bypass. *Ann Vasc Surg.* 2009 Oct;23(5):598–605. IF=1.169

Peter R, Malinsky M, Ourednicek P, Lambert L, Jan J. Novel registration-based framework for CT angiography in lower legs. *Medical & Biological Engineering & Computing.* 2013.

### Publikace in extenso se vztahem k tématu bez IF:

Tůma L, Bernášková K, Mareš J. Semi-interactive detection of action potentials using local wave features and clustering. *Acta medica martiniana* 2007;7(2):3-8.

### Publikace bez vztahu k tématu bez IF:

Tůma L, Lukáš K, Dvořák K: Duodenitida - srovnání endoskopických a laboratorních nálezů. 9. vzdělávací a diskusní gastroenterologické dny, Karlovy Vary, 16.-18.11.2006. Abstrakt. Česká a slovenská

gastroenterologie a hepatologie. 2007, roč. 61, Suppl. 1, s. 25. ISSN: 1213-323X.

Ténaiová J, Tůma L, Hrubant K, Brůha R, Švestka T, Novotný A, Petrtýl J, Jirásek V, Urbánek P, Lukáš K. Výskyt hiátové hernie v běžné endoskopické praxi. Čas. Lék. čes., 2007, 146, pp. 74–76.

Grus T, Lambert L, Grusová G, Rohn V, Lindner J. Endoscopic versus mini-invasive radial artery graft harvesting for purposes of aortocoronary bypass. Prague Med Rep. 2011;112(2):115-23.

#### **Monografie:**

Kapitoly v: Lukáš K, Žák A, et al. Chorobné znaky a příznaky. Grada publishing 2011.

#### **Online publikace:**

Lambert L. Atlas of radiological images. Internet: <http://atlas.mudr.org>.

Lambert L. Lékařské klasifikace a tabulky. Internet: <http://www.mudr.org>

#### **Přednášky:**

16.12.2010: Pražský den (FNKV). Lambert L: Atlas radiologických obrazů 1. LF UK

1.-4.9.2009: 9. Valtické kurzy abdominální a gastrointestinální radiologie. Lambert L: Kolorektální karcinom.

4.-6.11.2012: V. Sjezd České společnosti kardiologické chirurgie. Brno. Grus T, Rohn V, Grusová G, Lambert L, Janák D, Brlicová L, Linder J. Výskyt gastrointestinálních komplikací po kardiologické operaci.

4.-5.3.2013: Telemedicína Brno:

- Lambert L, Daneš J, Šimáková L. Atlas radiologických obrazů, portál radiologie na Wikiskriptech, klasifikace a tabulky v radiologii.

- Lambert L, Daneš J, Šimáková L. Radiolog v práci: efektivně a bez následků.

23.-25.5.2013: PHILIPS Healthcare days. Lambert L, Daneš J, Šimáková L. Snížení dávky při CT.

24.-25.5.2013: IX. radiologické dny Karla Chylíka. Lambert L, Daneš J, Šimáková L. CT kolografie.

6.-8.9.2013: 11. Valtické kurzy abdominální a gastrointestinální radiologie, Lambert L.: Virtuální kolonoskopie.

#### **Postery:**

19. – 21.11.2005: Fifth Conference of the Czech Neuroscience Society. Tůma L, Mareš J, Krýsl D. Changes in somatosensory evoked cortical potentials during development of cortical photothrombotic ischemic lesion.

21.-22.9.2013: Second International Gulf Clinical Skills and Simulation Conference: Innovation and Evidence in Clinical Skills Education for Safe Practice. Kuwait, University of Dundee. Grus T, Mitas P, Hruba J, Novotny R, Rohn V, Krajicek M, Lambert L, Grusova G, Lindner J. POSTER: Surgical treatment of diabetic foot syndrome complete / full revascularization.