

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ÚSTAV NORMÁLNÍ, PATOLOGICKÉ A KLINICKÉ FYZIOLOGIE

PŘEDNOSTA: DOC. MUDR. JAN MAREŠ, CSc.

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

**MUDr. Ing. Lukáš Lambert**

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

Electrophysiological changes during development of  
cortical photothrombotic ischemic lesion and epilepsy

**Disertační práce**

Školitel: Doc. MUDr. Jan Mareš, CSc.

Konzultant: MUDr. Klára Bernášková, CSc.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.11.2013

MUDr. Ing. Lukáš Lambert

Identifikační záznam:

LAMBERT, Lukáš. *Elektrofyzilogické změny během rozvoje kortikální fototrombotické ischemické léze a epilepsie. [Electrophysiological changes during development of cortical photothrombotic ischemic lesion and epilepsy]*. Praha, 2013. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Ústav normální, patologické a klinické fyziologie. Školitel Mareš, Jan.

Klíčová slova: ischemie, epilepsie, jednotkový potenciál, evokovaný potenciál, laser, fototrombóza

Keywords: ischemia, epilepsy, action potential, evoked potential, laser, photothrombosis



## SOUHRN

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 nález méně vyjádřených změn u kontrolní skupiny a kontralaterálně k místu, kam dopadal parsek, 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 vytěžování dat (filtrace dat, neuronová síť, algoritmus k-means, analýza hlavních komponent). V porovnání s ostatními popsány 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 iontů 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.

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.

## SUMMARY

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, less pronounced 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 data mining 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 findings, 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 ions 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.



# OBSAH

Souhrn .....	5
Summary .....	7
Obsah .....	9
Seznam použitých zkratek .....	11
1. Úvod .....	13
1.1. Ischémie, hypoxie a penumbra v CNS .....	13
1.1.1. Ischémie a hypoxie .....	13
1.1.2. Ischemická kaskáda .....	14
1.1.3. Modely ischémie mozku u potkana .....	15
1.1.3.1. Globální ischémie .....	16
1.1.3.2. Ischémie jedné hemisféry .....	17
1.1.3.3. Multifokální a fokální ischémie .....	17
1.2. Hodnocení elektrické aktivity mozku .....	20
1.2.1. Extracelulární záznamy: .....	20
1.2.1.1. Jednotková aktivita .....	20
1.2.1.2. Potenciálová pole .....	21
1.2.2. Intracelulární záznamy: .....	21
1.2.2.1. Napěťový zámeček .....	21
1.2.2.2. Proudový zámeček .....	21
1.2.2.3. Terčikový zámeček .....	22
1.3. Evokované potenciály .....	22
1.3.1. Senzorické evokované potenciály .....	22
1.3.2. Motorické evokované potenciály .....	22
1.3.3. Hodnocení evokovaných potenciálů .....	23
1.4. Jednotkové potenciály .....	25
1.4.1. Hodnocení jednotkových potenciálů .....	26
1.5. Optimalizační algoritmy v hodnocení záznamu evokovaných potenciálů .....	26
1.5.1. Datamining a hodnocení záznamů jednotkových potenciálů .....	28
1.5.1.1. Vyhledávání jednotkových potenciálů .....	29
1.6. Účinek světla na mozkovou kůru .....	37
1.7. Postiktální inhibice .....	39
1.8. Hypotézy a cíle .....	39
2. Metodika .....	43
2.1. Metodika použitá ve více experimentech .....	43
2.1.1. Zvířata .....	43
2.1.2. Anestézie .....	43
2.1.3. Operační protokol .....	43
2.1.4. Elektrody .....	44
2.1.5. Fototrombóza, laser .....	44

2.1.6. Sběr dat .....	45
2.1.7. Elektrická stimulace .....	45
2.1.8. Morfologické zpracování mozku .....	46
2.1.9. Statistické hodnocení .....	46
2.2. Speciální metodiky .....	46
2.2.1. Experimentální model ischemie .....	46
2.2.2. Analýza evokovaných potenciálů v čase .....	49
2.2.3. Analýza jednotkových potenciálů v čase .....	53
2.2.4. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG .....	60
2.2.5. Průlom postiktální inhibice salvou pulsů o nižší intenzitě .....	65
3. Výsledky .....	67
3.1. Morfologické ověření experimentálního modelu ischemie .....	67
3.2. Akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze .....	68
3.3. Akutní změny jednotkových potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze .....	70
3.4. Analýza somatosenzorických evokovaných potenciálů v čase .....	71
3.5. Analýza jednotkových potenciálů v čase .....	73
3.6. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG .....	84
3.7. Průlom postiktální inhibice salvou pulsů o nižší intenzitě .....	97
4. Diskuse .....	100
4.1. Experimentální model ischemie – fototrombotická ischemická kortikální léze ..	100
4.1.1. Morfologické ověření ischemické léze .....	103
4.1.2. Teplota v ozařované oblasti .....	104
4.1.3. Měření velikosti léze .....	105
4.1.4. Srovnání velikostí lézí mezi články .....	106
4.1.5. Množství fotosenzitivního barviva, rychlost a cesta podání .....	108
4.1.6. Vlnová délka paprsku .....	109
4.1.7. Intenzita paprsku .....	109
4.1.8. Rychlost nástupu účinku .....	110
4.1.9. Celkové zhodnocení modelu fototrombotické ischemické kortikální léze ...	110
4.2. Akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze .....	111
4.3. Akutní změny jednotkových potenciálů u modelu fototrombotické ischemické léze .....	113
4.4. Analýza somatosenzorických evokovaných potenciálů v čase .....	113
4.5. Analýza časového vývoje jednotkových potenciálů .....	116
4.6. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG .....	120
4.7. Průlom postiktální inhibice salvou pulsů o nižší intenzitě .....	123
5. Závěr .....	124
6. Literatura .....	127
7. Vědecká činnost autora .....	137
8. Práce autora in extenso .....	139

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A/D	analogově - digitální (převodník)
ADC0, ADC1	označení snímaných kanálů na A/D převodníku
ART	Adaptive Resonance Theory, umělá neuronová síť
ATP	adenosintrifosfát
B.Č.	bengálská červeň
BAEP	brainstem auditory evoked potentials
BG	bazální ganglia
CBF	cerebral blood flow, průtok krve mozkem
CBV	cerebral blood volume, objem krve v mozku
cCBF	cortical cerebral blood flow, průtok krve mozkovou kůrou
CED	Cambridge electronic design, výrobce hardware a software pro digitalizaci a záznam signálu
CFS	CED filling system, proprietární formát ukládání dat firmy Cambridge electronic design
CNS	centrální nervový systém
CSD	cortical spreading depression, korově se šířící deprese
CT	computed tomography, výpočetní tomografie
DPSS	diode-pumped solid-state laser, typ diodového laseru
E.B	erythrosin B, fotosenzitivní barvivo
ECoG	elektrokortikografie
EEG	elektroencefalografie
EKG	elektrokardiografie
EMG	elektromyografie
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery, MRI sekvence používaná k zobrazení mozku v T2 vážených obrazech s potlačením signálu tekutiny
GAME	Group of Adaptive Models of Evolution, ensemblová hybridní samoorganizující umělá neuronová síť
GMDH	Group Method of Data Handling, hybridní samoorganizující umělá neuronová síť
H <sub>2</sub> O	voda
HbO <sub>2</sub>	oxygenovaná krev
HbR	deoxygenovaná krev
$\chi^2$	chí-kvadrát, statistický test a rozložení
i.p.	intraperitoneálně
i.v.	intravenózně, nitrožilně
ICA	independent component analysis, analýza nezávislých komponent
ISI	inter-spike intervals, intervaly mezi hroty (jednotkovými potenciály)
KTP	kaliumtitanylfosfát

LTP	long-term potentiation, dlouhodobá potenciace
MCAO	middle cerebral artery occlusion, experimentální model ischemie
MITA	Maximum Integral Transform Alignment, metoda detekce hrotů (jednotkových potenciálů) v záznamu
Mpix	megapixel
MRI	magnetic resonance imaging, magnetická rezonance
Nd:YVO <sub>4</sub>	yttriumvanad dotovaný neodymem
NIR	normal information radius, metoda určování vzdálenosti dvou vektorů
NP	třída problému, u kterých lze v polynomiálně omezeném čase pomocí Turingova stroje rozhodnout, zda mají řešení
NPH	NP-hard, NP-těžký problém
NpHR	chloridová pumpa řízená světlem
NPO	NP problém v optimalizační variantě
O(f(x))	notace výpočetní složitosti algoritmu, která je shora asymptoticky omezená funkcí f(x)
Θ(f(x))	notace výpočetní složitosti algoritmu, která je shora i zdola asymptoticky omezená funkcí f(x)
OR	logický součet
PCA	principal component analysis, analýza hlavních komponent
PMMA	polymethylmetakrylát
RAM	random-access memory, paměť s přímým přístupem
RBF	Radial Basis Function, umělá neuronová síť
RGB	barvený model červená-zelená-modrá
SNR	signal-to-noise ratio, odstup signál-šum
SOM	Self-Organising Map, umělá neuronová síť
spont.	spontánní
SSEP	somatosenzorický evokovaný potenciál
TIFF	tagged image file format, formát digitálního obrazu
TSO	problém obchodního cestujícího (traveling salesperson) v optimalizační variantě
TTC	2,3,5-triphenyltetrazoliumchlorid
VLSI	very large scale integration, elektronický obvod s vysokou integrací
YAG	yttrio-hlinitý granát

# 1. ÚVOD

## 1.1. Ischémie, hypoxie a penumbra v CNS

Ischémie mozku je celosvětově častou příčinou invalidity a úmrtnosti. Incidence cévní mozkové příhody dosahuje 4 – 4,5 na 1000 obyvatel za rok a roste exponenciálně s věkem. Po 55. roce života se každou dekádu zdvojnásobuje [1]. Ischémie znamená nedostatečný průtok krve tkání. Vzniká nejčastěji v důsledku obstrukce toku v lumen zásobující tepny.

V mozku je ischémie charakterizována nektrózou ve svém centru a metabolickými a funkčními poruchami ve tkáni, které nektrózu lemují. Tato oblast je označována jako penumbra [2,3]. Buňky v centru odumírají velmi rychle. Obvykle zde buněčná smrt nastává již během jedné až dvou minut po úplné okluzi cévy. Buňky v okrajové oblasti jsou „omráčeny“, metabolicky i synapticky kompromitované (nedostatečné zásobení kyslíkem a glukózou cestou ojedinelých kolaterál), ztrácejí svou funkci postupně, a pokud není včas (do několika málo hodin) obnovena perfúze, podléhají rovněž nektróze nebo apoptóze [4,5]. V této oblasti rovněž nastává excitotoxická smrt buněk [6]. Pokud však dojde k obnově perfúze, mohou se zotavit. Lassen tyto neurony označil jako spící krasavice „sleeping beauties“ [7]. Tato oblast především je terčem nejen intervenčních výkonů v řečišti magistrálních tepen, ale i významného farmakologického úsilí o prodloužení životnosti či dokonce zachování viabilních neuronů.

### 1.1.1. Ischémie a hypoxie

Ischémie znamená nedostatečný průtok krve, který nezajistí dostatečnou oxygenaci tkáně (nepoměr mezi potřebou perfúze a aktuální perfúzí tkáně či orgánu). Název pochází z řeckého *isch-* (ἴσχω) = omezení a *haima* (αἷμα) = krev. Vede ke tkáňové hypoxii či anoxii. Ischémie vždy vede k hypoxii, nicméně hypoxie může existovat bez ischémie. Příčin ischémie je celá řada: nejčastěji se však setkáváme s trombózou, embolií, zevní kompresí tepny, s traumatem, aterosklerózou a hypotenzí. Ischémie může způsobit nektrózu, pokud se nepodaří včas obnovit perfúzi. Ischémie je patofyziologickým mechanismem mnoha onemocnění – ischemické choroby srdeční, ischemické cévní mozkové příhody, ischemické choroby dolních končetin a dalších. Orgány nejcitlivějšími na ischémii jsou mozek, srdce a ledviny. Ischémie mozku spouští ischemickou kaskádu, kdy dochází k uvolňování proteolytických enzymů, reaktivních kyslíkových radikálů a dalších substancí, které přispívají k buněčné smrti [8].

Byla popsána celá řada mechanismů a kaskád, které vedou k buněčné smrti neuronů v zasažené oblasti. Na jejich počátku stojí deplece intracelulárního adenosintrifosfátu (ATP), depolarizace a zvýšení permeability buněčné membrány, se snížením

intracelulárního pH, zastavením Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy se zvýšením intracelulárního sodíku a influxem kalcia [9].

### 1.1.2. Ischemická kaskáda

Ischemická kaskáda je množina dějů, biochemických reakcí, které jsou vyvolány v mozku a jiných tkáních, které se ocitnou ve stavu nedokrevnosti, např. mozek při ischemické cévní mozkové příhodě. Pokud nedojde k obnovení oběhu, většina neuronů v centru umírá formou nekrózy. Ischemická kaskáda, která se na jejím vzniku může podílet, obvykle probíhá dvě až tři hodiny, ale může přetrvávat i dny, dokonce i po obnovení krevního oběhu. Ischemická kaskáda není kaskádou v pravém slova smyslu – děje se vzájemně ovlivňují a vytvářejí tzv. „bludné kruhy“ [10]. Nedostatek kyslíku potlačí produkci ATP, buňka přejde do anaerobního metabolismu. Přestanou fungovat ATP-dependentní transportní mechanismy, buněčná membrána se depolarizuje. To umožní prostup iontů (včetně kalcia) skrz buněčnou membránu vedoucí k uvolnění neurotransmitterů, zejména glutamátu. Ten stimuluje NMDA a AMPA receptory, s nimi spojené iontové kanály dále zvyšují propustnost buněčné membrány pro kalcium. Nadbytek kalcia způsobí nadměrnou excitaci buněk, tvorbu volných radikálů, reaktivního kyslíku a enzymů závislých na kalcium – endonukleáza, ATPáza, fosfolipáza v procesu nazvaném excitotoxicita [6]. Dochází k porušení buněčné membrány (fosfolipáza), což dále ještě zvyšuje její permeabilitu. Poškozené mitochondrie uvolňují další látky a apoptotické faktory do cytoplazmy, dochází k expresi proapoptického proteinu bax, je aktivována apoptóza cestou kaspáz [11,12]. Smrt buňky způsobí uvolnění glutamátu a toxických chemických látek do okolí a dochází k prohloubení poškození okolních buněk. Vzniká zánět, který přitahuje a aktivuje leukocyty – zejm. fagocyty, ale i neutrofilů, dochází k narušení hematoencefalické bariéry [13,14]. Přestupem molekul z cévního řečiště cestou porušené hematoencefalické bariéry se rozvíjí otok (osmoticky), který způsobuje stlačení a další poškození mozkové tkáně.

Poznání patofyziologie a molekulární podstaty ischemické kaskády vedlo pokusy o ovlivnění jejích některých kroků směřující k omezení rozsahu ischemického poškození. V centru pozornosti byly potenciálně neuroprotektivní látky jako například antagonisté NMDA receptorů nebo blokátory vápníkových kanálů. Nicméně, výsledky klinických studií jejich přínosnost nepotvrdily. Do třetí fáze klinických pokusů se probouval scavenger volných kyslíkových radikálů NXY-059. Jeho účinnost se však v opakovaném klinickém pokusu (Saint-2) nepotvrdila a přestal být dále vyvíjen a používán [15,16]. Volným radikálům, které stojí na cestě k buněčnému poškození při hypoxii, je přičítána i úloha signálních molekul. Předpokládá se, že preconditioning hypoxií (zlepšení tolerance k hypoxii po předchozí expozici hypoxii) je právě dílem způsoben volnými radikály, přinejmenším proto, že je efektivně potlačen podáním scavengerů volných radikálů před expozicí [17,18]. Jeho účinnost je největší, když předchází 24-72 hodin samotnému infarktu. Účinnost hypoxického preconditioningu je připisována časné genové expresi tzv. heat-shock proteinů, avšak přesný mechanismus není ještě plně objasněn [19]. HIF-1 (hypoxia inducible factor) a HIF-2 jsou další transkripční faktory, které regulují

buněčnou odpověď na hypoxii [20]. Tyto faktory jsou neustále exprimovány, při vzniku hypoxie se však prodlužuje jejich poločas a tím i množství a koncentrace a mohou tak ovlivnit expresi řady genů, kde se vážou na tzv. hypoxia responsive element (HRE) [21]. Další slibnou strategií je modulace imunitní odpovědi, která hraje svou úlohu i v reperfučním poškození [22], nebo preconditioning či postconditioning [23]. Relativně nedávno byla diskutována role nekódující ribonukleové kyseliny (ncRNA), která ovlivňuje genovou transkripci a translaci, byť sama proteiny nekóduje, v preconditioningu a při ischemickém poškození mozku s možností jejího neuroprotektivního využití při ischemicko-reperfučním poškození [20].

### 1.1.3. Modely ischemie mozku u potkana

Výzkum patofyziologických pochodů a jejich fyzikální a farmakologické ovlivnění zpravidla nelze z etických důvodů provádět na pacientech. Z tohoto důvodu byla vyvinuta řada experimentálních modelů ischemie, jak in vivo (zvířecí modely), tak in vitro (tkáňové či buněčné modely).

Třídění experimentálních modelů ischemie mozku dělí modely podle distribuce ischemie na ischemii globální, postihující celý mozek, hemisferální, postihující hemisféru, multifokální, s mnoha drobnými ložisky, a fokální, vznikající v určitém ohnisku [24–28]. Etiologie ischemie může být jak extravaskulární, kdy etiologické agens působí mimo lumen cévy, či intraluminální, kdy agens působí uvnitř dotčené cévy. Dělení přehledně shrnuje následující tabulka (Tab. 1):

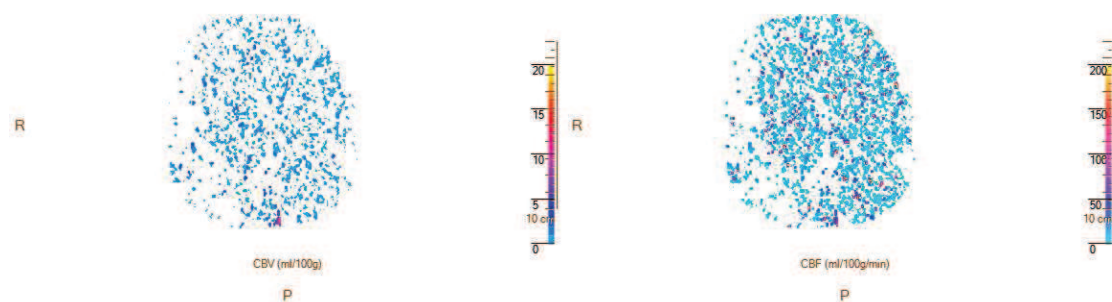
**Tab. 1: Dělení modelů ischemie.**

Distribuce ischemie	Etiologie ischemie	
	Extravaskulární	Intravaskulární
Globální	ligace, elektrokauterizace, komprese obou a. carotis int. nebo com. a a. vertebralis	hypotenze, asystolie (srdeční zástava)
Hemisféra	ligace magistrálních tepen s nekompletním arteriálním kruhem	intraarteriální perfúze voskem, polyvinyl acetátem
Multifokální		embolizace mikročásticemi či autologní koagulovanou krví
Fokální – bodová	klip	selektivní embolizace
Fokální – segmentální	vícečetné klipování, elektrokauterizace, vazospasmus	Fogartyho katetr, embolizace elastickými válečky, uzávěr intraluminálně uloženým vláknem, fototrombóza

Použité experimentální zvíře by mělo mít co největší anatomickou i funkční podobnost s člověkem – ideální jsou pro tento účel primáti. Hypotézy je možno testovat na menších živočiších s nižšími náklady. Výsledky a závěry lze pak někdy jen velmi omezeně vztahovat ke klinickému stavu člověka postiženého iktem.

### 1.1.3.1. Globální ischémie

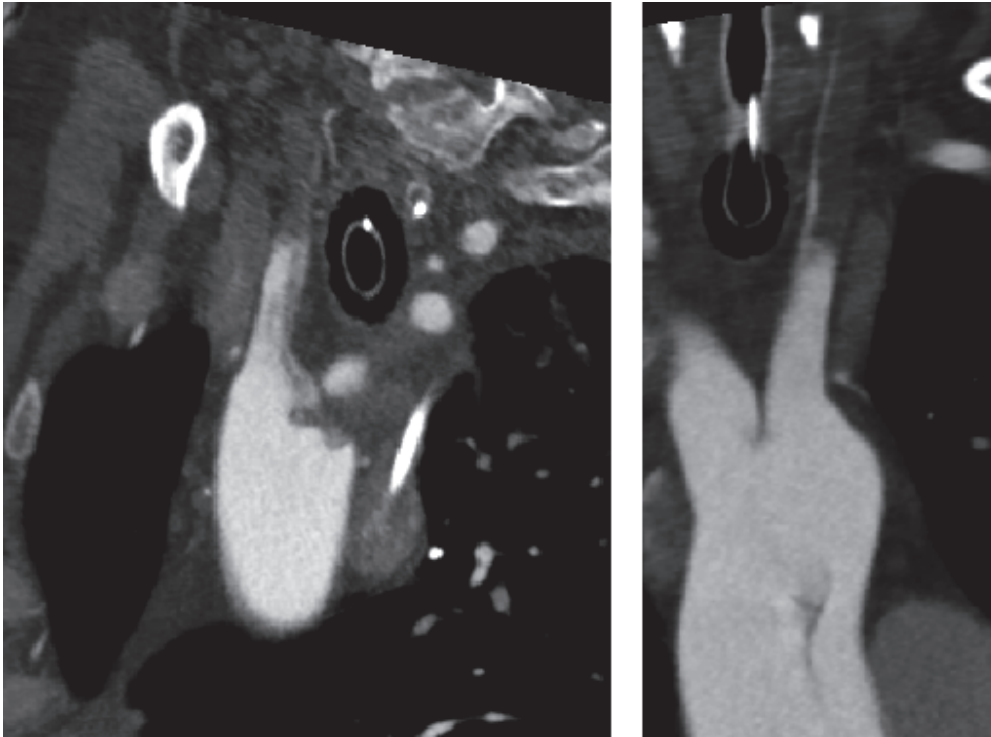
Ligací a elektrokauterizací krčních tepen lze vytvořit vysoce účinný model globální ischémie, který se ale v praxi příliš nevyskytuje (např. disekce aorty s uzávěrem společných karotid – Obr. 1, Obr. 2). Tzv. *four vessel occlusion model* (uzávěr čtyř tepen) byl zaveden v roce 1979 a spočívá v elektrokauterizaci vertebrálních tepen s naložením rozevratelných svorek na obě a. carotis com. [29]. Varianta tohoto modelu s uzávěrem obou a. carotis com. a a. basilaris byla doplněna v roce 1985 pod názvem *three vessel occlusion model* – uzávěr tří tepen [30]. Vnější komprese krčních cév vytváří model globální ischémie, který lze časově jednoduše dávkovat, model však napodobuje vzácnou



**Obr. 1: Hypoperfúze mozku jako klinický obraz globální ischémie u pacienta: vypočítané mapy cerebral blood volume (CBV) vlevo a cerebral blood flow (CBF) vpravo z perfúzního CT vyšetření mozku. Obrázek z archívu autora.**

situaci – strangulaci. Zvláštností je rovněž, že jsou komprimovány jak tepny tak i žíly. Manžeta často naléhá i na karotický sinus a navozuje tak stimulaci parasympatiku. Avšak většina událostí, které v lidském těle zapříčiňují globální ischémii mozku, pramení z dysfunkce kardiovaskulárního systému (např. systémová hypotenze, srdeční zástava). Srdeční zástavu lze pochopitelně vyvolat i u potkana např. kompresí cévní stopky ke sternu avšak s rizikem toho, že většina zvířat nepřežije - např. tři čtvrtiny zvířat nepřežijí po 10 minutách [12].





**Obr. 2: Disekce aorty s uzávěrem obou společných karotid (zobrazena levá) zobrazená na CT-angiografii aorty jako klinický příklad globální ischemie u pacienta. Obrázek z archívu autora.**

#### **1.1.3.2. Ischémie jedné hemisféry**

Selektivně lze modelovat ischemii jedné hemisféry u části populace Mongolského pískomila, která postrádá obdobu Willisova okruhu [31]. Tuto vlastnost mají i další savci, např. přežvýkavci, u kterých vertebrální tepny zásobují pouze svaly krku. Tato situace ale opět modeluje vzácnou situaci u člověka – ligaci karotidy u pacientů s nefunkčním Willisovým okruhem pro aterosklerózu či kongenitální malformaci. Perfúze hemisféry některými látkami obvykle vyvolá unilaterální mozkový infarkt. Tyto látky však vyvolávají delší okluze přilehlých cév, a tím je zamezeno kolaterální cirkulaci, a to se v praxi při cévní mozkové příhodě nikdy nestane. Nevznikne tedy penumbra, která je předmětem výzkumu. Jde totiž o oblast, jejíž osud lze terapeuticky ovlivnit.

#### **1.1.3.3. Multifokální a fokální ischemie**

U vyšších živočichů je oblíbená přímá aplikace klipů na větve a. cerebri media. Jednotlivé klipy ale mohou vytvořit pouze malou segmentální okluzi, zřídka větší než je samotný klip. Navíc komprese cévy zvenčí může vyvolat jinou patofyziologickou odpověď než trombus a stát se tak zdrojem artefaktů. Průtok cévami mozku je totiž řízen jak metabolicky, tak i neurogenně. Elektrokauterizace mozkových cév vyvolává vazospasmus a ničí přilehlé vaskulární nervstvo.

Embolizační metody ovlivňují vaskulární nervy minimálně. V roce 1955 byl na Mayo Clinic vyvinut model, který využíval autologní embolizaci injekcí krevního koagula. Vzhledem k fragmentaci koagula jsou oblasti ischemie mnohočetné [32]. Přesto

je tato metoda v určitých typech studií vhodná. Injekce materiálu přesně definované velikosti do karotického řečiště vede k rozsáhlé prekapilární okluzi a nabízí i možnost např. radioaktivního značení [33,34]. V některých případech ale vede k fatálním následkům, a proto lze použít spíše jen u akutních experimentů. Tato metoda navíc nemá oporu v reálném životě člověka.

Z běžných postupů intervenční radiologie vychází metoda přímé embolizace a. cerebri media intraluminálně zavedeným katetrem jako obdoba embolizačních výkonů u člověka [35]. Z pochopitelných důvodů lze použít jen u větších zvířat, než jsou laboratorní hlodavci. Embolizaci lze provést i mikrosférami injikovanými cestou zevní karotidy do vnitřní karotidy a to nejen u primátů [36], ale i u hlodavců [37].

Oblíbeným modelem je podvaz a. cerebri media, tzv. *MCAO model* (middle cerebral artery occlusion), jehož první zmínku jsme našli v roce 1951 [38]. Tento model byl dále rozvíjen, zdokonalován, testován a zejména hojně používán. Okluzi a. cerebri media lze provést i bez kraniotomie transorbitálním přístupem [39,40]. Uzávěru a. cerebri media lze docílit i zavedením tenkého vlákna do jejího lumen z arteriotomie [41–43] nebo přes vnitřní karotickou tepnu [44], a to nejen u hlodavců, ale i u primátů – např. Freret et al. zavedli model uzávěru a. cerebri media vložením nylonového vlákna cestou zevní karotidy u primáta [45]. Vytažením vlákna po určené době ischemie dosáhneme reperfúze, která v klinice často nastává. Použití potaženého nylonového vlákna snižuje variabilitu infarktu mezi zvířaty [46]. Model ischemie po uzávěru a. cerebri media u psa nebo opice způsobuje změny blížící se nálezům z klinické praxe humánní medicíny [47] a má i podobné histologické charakteristiky. Experimentální chirurgický uzávěr a. cerebri media u potkana popsal a ověřil Tamura et al. v roce 1981 [48,49].

Přechodnou vazokonstrikci s výrazným snížením toku tepnou s navozením ischemie v jejím teritoriu lze vyvolat injekcí endothelinu-1 do její blízkosti. Injekci lze provést i stereotakticky. Výrazné snížení průtoku trvá kolem 20 minut a poté se průtok opět postupně zvyšuje [50].

Experimentální model fototrombotické ischemické léze byl poprvé popsán v roce 1985 [51] a dále rozvíjen nejen jeho autory [52–55]. Jedná se o dobře reprodukovatelnou metodu, kde k uzávěru cév dochází v oblasti ozářené světlem určité vlnové délky ( $\lambda$ ). Tak lze docílit plošného uzávěru drobných tepének na povrchu mozku při osvětlení větší plochy nebo světlo zaměřit na větší cévu a vyvolat její uzávěr. Jako fotosenzitizující látka se nejčastěji používá bengálská červeň (Rose Bengal dye), která reaguje na zelené světlo (maximum okolo vlnové délky 560nm). Vznikají volné radikály, které, pokud jsou v dostatečné koncentraci, způsobují lézi endotelu cévní stěny v ozářené oblasti. Poruchou smáčivosti stěny následně dojde k trombotizaci lumen, uzávěru cév a ischemizaci dané oblasti [56,57].

Funkční průkaz selektivní účinnosti experimentálního modelu fototrombotické léze přinesla studie z roku 1992 [58,59], která ukázala funkční postižení potkanů, u kterých byla léze vyvolána ve frontálních lalocích. Zvířata vykazovala zhoršení krátkodobé paměti, které ale nebylo doprovázeno motorickým deficitem. Histologické ověření

modelu fototrombotické léze v oblasti distální a. cerebri media provedli v roce 1993 Markgraf et al., kteří navíc prokázali podstatnou skutečnost, že rozsah ischemického postižení mozkové kůry při stejné metodice je u kmene Wistar odlišný od kmene Sprague-Dawley v tom, že u potkanů kmene Wistar jsou ischemické léze celkově menší, nestejněměrné a vykazují větší zónu nekompletní ischémie [60]. K průkazu ischemické léze lze použít jak tlusté řezy a histologické preparáty, tak i fluorescenční mikroskopii, a dokonce i in vivo zobrazovací metody, které umožňují sledování jejího rozvoje [61]. Na magnetické rezonanci lze kromě nativních sekvencí (difúze, T2 a T1 vážených obrazů a sekvence FLAIR s potlačením signálu vody) systémově podat kontrastní látku, která během aktivace fotosenzitivního barviva zůstává v trombózaných cévách a dále po ukončení iradiace se již nevychyťává [62]. Tak lze porovnat iniciální velikost postižené s oblasti s jejím rozsahem po terapeutickém zásahu či bez něho. V morfologickém hodnocení rozsahu léze lze uplatnit i speciální kontrastní látky a dedikované přístroje pro výpočetní tomografii a magnetickou rezonanci vyvinuté pro účely výzkumu [63,64].



**Obr. 3: Obecné schéma modelu fototrombotické léze zahrnuje systémové podání fotosenzitivní látky a ozáření cílového místa světlem (laserem). Obrázek vytvořen autorem.**

Kromě přímého ozáření korové oblasti, kterou chceme ischemizovat, nabízí model fototrombotické léze vyvolání selektivní ischémie i v hlubokých mozkových strukturách pomocí stereotakticky zavedeného optického vlákna. Tím se světlo přivede do zvolené oblasti bez výraznějšího porušení okolních struktur [65]. Fototrombotickou lézi lze vytvořit i ve větší tepně – s modelem fototrombotického uzávěru a. cerebri media pracovali například Nakayama et al., kteří tuto tepnu napřed chirurgicky odhalili [66]. Otázkou je, zda by bylo možno oba výše uvedené přístupy kombinovat, tj. zda je možno spolehlivě vyvolat fototrombotickou lézi větší tepny ozářením pomocí stereotakticky zavedeného optického vlákna. Kromě dobře reprodukovatelného uzávěru větví a. cerebri media je možno provést i její neinvazivní rekanalizaci. Jak ukázali Yao et al., tu lze indukovat ozářením YAG laserem (yttrio-hlinitý granát) v ultrafialovém pásmu [67]. Pro

vyvolání fototrombotické léze není ani nutné provádět kraniotomii. Jak ukázal již zakladatel metody Brant D. Watson, po aplikaci bengálské červeně stačí pro vyvolání ischemie provést ozáření distálního řečiště a. cerebri media světlem i přes intaktní kalvu zbarvenou měkkých pokrývek [51,68]. Zjednodušením pro laboratorní podmínky je použití bílého spektra (s tepelným filtrem) místo laserového světla, které vyvolává podobné ischemické léze [69,70].

Model fototrombotické léze je univerzální. Hayasaka et al. popisují použití fototrombózy i v oblasti jater chirurgickým otevřením dutiny břišní a zavedením světelného vodiče do centra levého laloku jater [64], Yano et al. zase vyvinuli model ischemické kolitidy u potkana [71].

Od prvního článku o experimentálním modelu fototrombózy již uplynulo více jak čtvrt století [51,53]. Model byl použit v řadě experimentů studujících ischemii nejen mozku, ale i v jiných oblastech – mezi druhou nejstudovanější skupinu patří léčba neovaskularizace rohovky [72] nebo choroidey v rámci věkem podmíněné makulární degenerace [73]. O tom, že fototrombóza je stále na pořadu dne svědčí množství publikací v posledních letech používající tento model.

## **1.2. Hodnocení elektrické aktivity mozku**

Elektrofyzilogie získává informace o elektrických vlastnostech buněk a tkání a jejich změnách. Jsou to změny napětí a proudu a další vypočítávané hodnoty. Měřit je je možné na úrovni iontových kanálů i sumy změn elektrického pole celých orgánů. Elektrické projevy činnosti jednotlivých neuronů (jednotek) jsou změny polarizace jejich povrchové membrány – otevírání a uzavírání jednotlivých iontových kanálů, postsynaptické potenciály a potenciály akční. Měření elektrické aktivity neuronů lze rozdělit následovně:

### **1.2.1. Extracelulární záznamy:**

#### **1.2.1.1. Jednotková aktivita**

Ke snímání elektrických projevů vně buňky (extracelulárně) jsou obvykle využívány skleněné nebo metalické mikroelektrody. Velikost a tím i odpor jejich hrotu odpovídají velikosti oblasti, z níž jsou schopny zaznamenat změny potenciálového pole, které popisuje Coulombův zákon a třetí Maxwellova rovnice (Gaussův zákon elektrostatiky) [74].

Záznam změn membránového potenciálu buňky je možné získat po penetraci povrchové membrány. Jeho tvar je vzhledem k podmínkám snímání konstantnější než záznam extracelulární, který je závislý na vzdálenosti hrotu elektrody od neuronu a jeho lokalizaci vůči jednotlivým částem neuronu.

Skleněnými mikroelektrodami s menším odporem nebo kovovými jehlovými elektrodami lze sledovat aktivitu i většího počtu jednotek současně (tzv. *multi-unit activity*). Analýzou vzájemných časových vztahů jejich akčních potenciálů je možné do určité míry popsat funkci neuronálních okruhů, v nichž jsou zapojeny [75].

### 1.2.1.2. Potenciálová pole

Extracelulární potenciálová pole představují elektrický potenciál generovaný většími skupinami buněk. To lze rovněž formálně popsat třetí Maxwellovou rovnicí, která říká, že elektrický tok libovolně vně orientovanou plochou  $\mathbf{S}$  je roven celkovému volnému náboji v prostorově ohraničené oblasti. Rovnice v integrálním tvaru zní:

$$\oint_S \mathbf{D} \cdot d\mathbf{S} = Q,$$

kde

$$Q = \int_V \rho dV$$

je celkový volný elektrický náboj v objemu  $V$ ,  $\rho$  je objemová hustota náboje [ $C/m^3$ ],  $\mathbf{D}$  je elektrická indukce [ $C/m^2$ ] a  $\mathbf{S}$  je plocha ohraničující prostorový náboj [ $m^2$ ].

V praxi jsou známé aplikace měření extracelulárních potenciálových polí jako (vzhledem k rozsahu tématu pouze stručný výčet):

- elektroencefalografie (EEG) – sumační potenciály mozku snímané z povrchu hlavy,
- elektrokortikografie (ECoG) – sumační potenciály mozku snímané z kůry mozku,
- elektrokardiografie (EKG) – elektrické potenciály srdeční aktivity snímané končetinovými, prekordiálními a dalšími svody,
- elektromyografie (EMG) – elektrické potenciály aktivity svalových buněk,
- elektroneurografie (ENG) – elektrické potenciály aktivity neuronů v centrálním nervovém systému.

### 1.2.2. Intracelulární záznamy:

Intracelulární záznam elektrické aktivity buňky je měřením napětí či proudu podél buněčné membrány. Aby bylo možno měřit membránový potenciál, musí být hrot elektrody zanořen do buňky. Používají se skleněné mikroelektrody s hrotem menším než 1 mikrometr naplněné tekutinou svými fyzikálně chemickými vlastnostmi podobnou tekutině intracelulární.

#### 1.2.2.1. Napěťový zámek

Pro některá pozorování je výhodné udržet za všech okolností stálý transmembránový potenciál. K tomu se využívá metoda napěťového zámku, která umožňuje lépe popsat vlastnosti příslušné biologické membrány. Využívá se i pro studium charakteristik membránových receptorů spojených s iontovými kanály i iontových kanálů samotných. Principiálně se jedná o zpětnovazební obvod, který udržuje konstantní hodnotu membránového potenciálu [76].

#### 1.2.2.2. Proudový zámek

Metoda proudového zámku zaznamenává membránový potenciál tak, že sice také přivádí proud do buňky cestou registrační elektrody, ale na rozdíl od napěťového zámku se zde může membránový potenciál volně měnit, transmembránový proud je však

udržován stabilní. Technika je používána pro sledování odpovědi buněk na vstup proudu (což simuluje otevírání membránových iontových kanálů).

### **1.2.2.3. Terčíkový zámek**

Tato technika umožňuje studium činnosti jednotlivých kanálů buněčné membrány. Elektroda, opět skleněná mikropipeta s otevřeným koncem průměru kolem jednoho mikrometru po speciálních úpravách, tvoří na svém konci plochý kruh, který se přiloží na buněčnou membránu. Pipeta je naplněna roztokem vhodným pro daný experiment (např. roztok podobný intracelulární tekutině). Kovová elektroda, která je v kontaktu s tímto roztokem vede proud do zesilovače. Po přiložení konce mikropipety na buňku je vyvinuto sání, které přitáhne buněčnou membránu na špičku elektrody. Takto je možné sledovat membránu celé buňky, nebo membránu oddělit tak, aby bylo možné její vnitřní nebo vnější povrch vložit do roztoku se sledovanými látkami.

## **1.3. Evokované potenciály**

Evokovaný potenciál (nebo evokovaná odpověď) je elektrický potenciál zaznamenaný u člověka či zvířete jako odpověď na zevní podnět. Liší se od potenciálů spontánních. Základním znakem evokovaného potenciálu je tvarová uniformita při aplikaci shodných podnětů. Amplituda může být poměrně nízká, obvykle od jednoho do několika mikrovoltů. Pro srovnání, amplitudy EEG dosahují desítky mikrovoltů a EMG jednotky milivoltů. Aby bylo možno tyto malé amplitudy na pozadí jiných biologických elektrických signálů a okolního šumu rozeznat, je obvykle nutno zprůměrovat mnoho zaznamenaných evokovaných potenciálů. Signál je časově vázaný na podnět a většina šumu probíhá náhodně nebo s jinou frekvencí než aplikovaný podnět. Proto je možno šum potlačit jednoduchým průměrováním opakovaných odpovědí.

### **1.3.1. Senzorické evokované potenciály**

Senzorické evokované potenciály jsou zaznamenávány z centrálního nervového systému po stimulaci sensorických orgánů nebo drah. Obvykle jsou vyvolávány definovaným přirozeným podnětem (dotyk, tlak, záblesk světla, zvuk atp.) nebo elektrickou či elektromagnetickou stimulací. Senzorické evokované potenciály jsou široce používány v klinické praxi k objektivní diagnostice nejčastěji poruch vedení vzruchu, při patologických stavech s fokálním postižením (např. neurinom akustiku, poruchy zrakové dráhy) či difúzním postižením (degenerativní onemocnění jako např. roztroušená skleróza). Senzorické evokované potenciály lze u člověka i u laboratorních zvířat zaznamenávat pomocí EEG (ev. ECoG) buď v jednoduchém zapojení (unipolární záznam nad primární somatosenzorickou oblastí) nebo klasicky pomocí elektrod uložených podle systému 10-20.

### **1.3.2. Motorické evokované potenciály**

Změny elektrického pole je možno vyvolat i směrem opačným – stimulací mozkové kůry a registrací elektrických změn ve svalech. Někdy se pro záznam těchto změn

používá termín motorické evokované potenciály. Elektrická stimulace se provádí při chirurgických výkonech, kdy je potřeba co nejpřesněji zmapovat funkční topografii centrálního nervového systému. U bdících pacientů se využívá transkraniální magnetické stimulace, kdy stimulem je elektromagnetický pulz. Motorické evokované potenciály jsou pak zaznamenávány ze svalů.

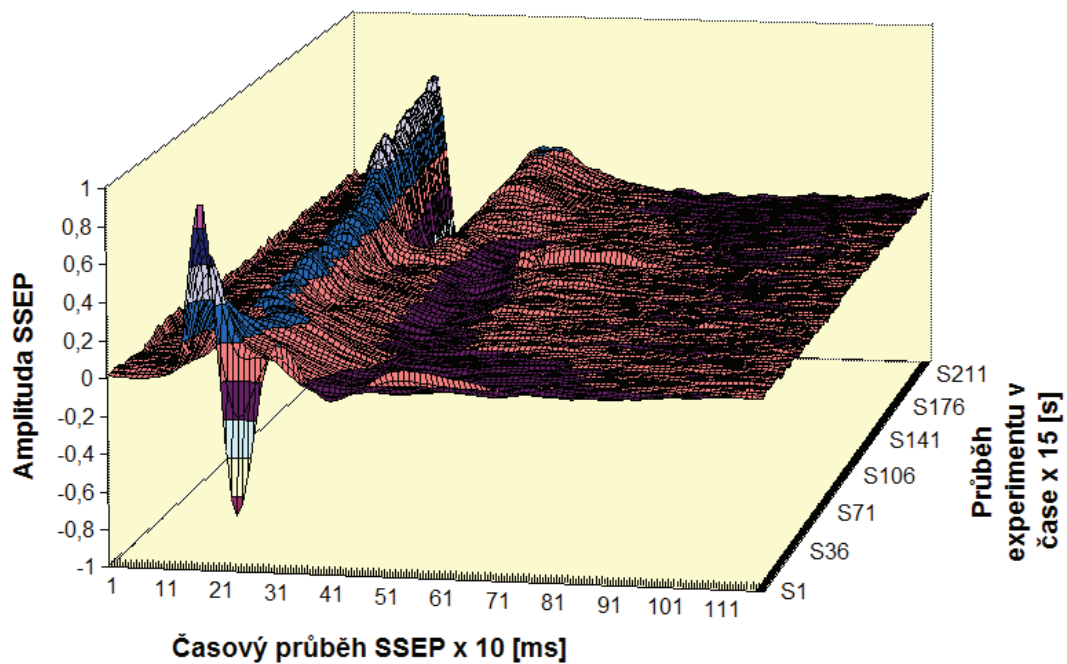
### 1.3.3. Hodnocení evokovaných potenciálů

Jak již bylo uvedeno, zpravidla nelze pro nízkou amplitudu signálu hodnotit záznam jedné odezvy na podnět. Je nutné nashromáždit těchto odpovědí více (v praxi desítky, stovky) a vytvořit z nich aritmetický průměr. Pokud předpokládáme, že odpověď je uniformní a přesně časově lokalizovaná se známou latencí po podnětu na rozdíl od okolního šumu (spontánní EEG, EKG, vnější elektrický a elektromagnetický šum), který je náhodný a zejména nemá časovou souvislost s podnětem, pak právě šum můžeme odstranit zprůměrováním této odezvy.

Statické hodnocení evokovaných potenciálů se odvíjí od měření odchylek amplitud a latencí daných komponent vlny od normálu. Standardní označení vln značí P jako pozitivní a N jako negativní vlnu s dodatkem latence v ms (např. P100 je pozitivní vlna s latencí 100 ms) nebo pořadí vlny (např. N1 je první negativní vlna).

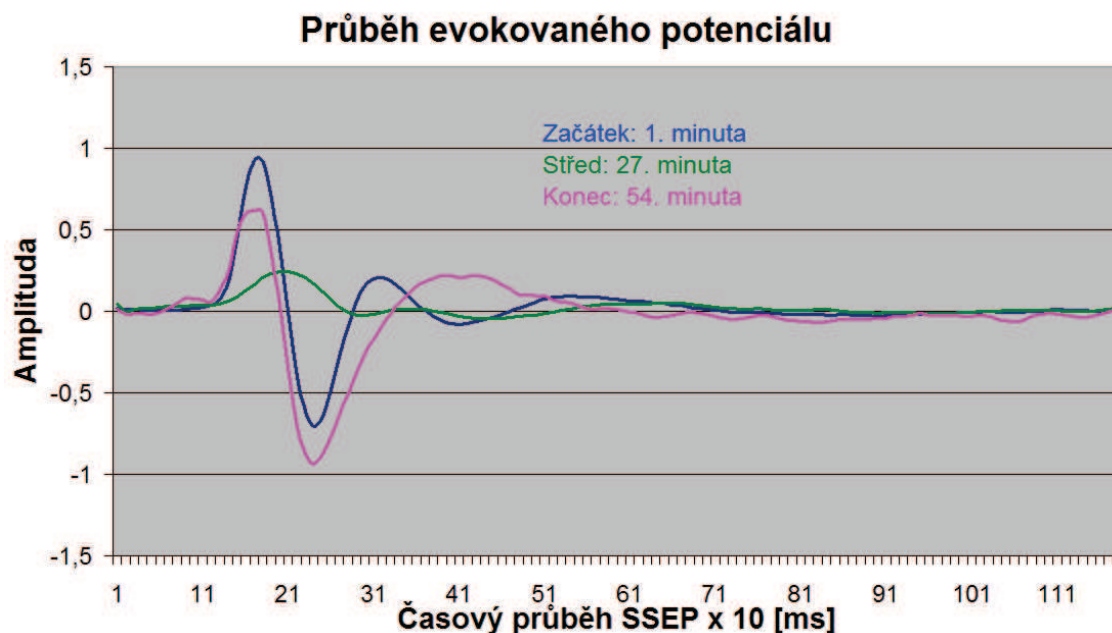
Dynamické hodnocení evokovaných potenciálů nachází své opodstatnění v průběhu akutních experimentů. Záznam evokovaných potenciálů během rozvoje iktu je nestacionární, protože dochází ke změnám latence jednotlivých vln – nejčastěji je popisováno prodloužení latence první negativní a první pozitivní vlny [77–79]. Rovněž může dojít k přechodnému vymizení vln [80] a jejich znovuobjevení v průběhu experimentu [77]. Změny jsou v čase spojité [81,82]. Pokud bychom zaznamenávali somatosensorické evokované potenciály v primární projekční oblasti a kontralaterálně po dobu jedné hodiny s opakováním stimulu každou vteřinu, dostali bychom  $60 \times 60 = 3600$  záznamů na jeden kanál. Jak již bylo uvedeno výše, pro hodnocení evokovaných potenciálů používáme jejich zprůměrování v časovém okně, např. 15 vteřin (Obr. 4). Při vytvoření průměru každých 10 vteřin dostaneme  $60 \times 6 - 15 = 345$  záznamů evokovaného potenciálu na jeden kanál. Hodnotíme-li u každého evokovaného potenciálu první tři vlny, u nich dále amplitudu a latenci, dostaneme  $345 \times 3 \text{ vln} \times 2 \text{ hodnoty} \times 2 \text{ hemisféry (kanály)} = 4140$  hodnot na jedno zvíře. To dělá celkem 99360 hodnot na 3 skupiny po 8 zvířatech. Toto množství je v reálném čase manuálně nehodnotitelné. Vezmeme-li v úvahu změření a zapsání dvou hodnot (amplitudy a latence) za 30 vteřin, dostaneme 35 dnů čisté práce – v případě osmihodinové pracovní doby pak 5 měsíců. Zjednodušením problému na vyhodnocení pouze vybraných okamžiků v záznamu ale ztratíme velkou část dat a stěží tak nalezneme body, ve kterých se záznamy liší nejvíce (Obr. 4, Obr. 5).

## Průběh evokovaného potenciálu SSEP v čase



Obr. 4: Trojrozměrný graf zobrazuje vývoj somatosenzorického evokovaného potenciálu (SSEP) v čase. Na ose x je čas průběhu experimentu od 0 do 54. minuty, na ose y průběh jednotlivých evokovaných potenciálů sestavených v daném okamžiku experimentu. Amplituda evokovaných potenciálů je v arbitrárních jednotkách (normalizována vůči záznamu před experimentem). Vlastní experimentální data.





Obr. 5: Vývoj somatosenzorického evokovaného potenciálu (SSEP) zachycený pouze ve třech bodech - na začátku, uprostřed a na konci záznamu s nadměrnou simplifikací problému a ztrátou informace. Srovnání s trojrozměrnou reprezentací celého průběhu experimentu na Obr. 4. Vlastní experimentální data.

#### 1.4. Jednotkové potenciály

Pod termínem záznam jednotkového potenciálu rozumíme registraci elektrické aktivity jednoho neuronu extra- nebo intracelulárně. Když zavedeme do mozku žijícího zvířete elektrodu o nižším odporu, můžeme zaznamenávat elektrickou aktivitu větší skupiny neuronů (tzv. *multi-unit activity*). Pokud tamtéž zavedeme mikroelektrodu se špičkou o průměru 3 až 10 mikrometrů, můžeme zaznamenávat aktivitu jediného nebo několika neuronů. Zaznamenávaná aktivita je způsobena změnami elektrického pole, jejichž podkladem jsou přesuny iontů napříč plazmatickou membránou neuronu při změnách membránových potenciálů vyvolaných postsynaptickými proudy, kapacitně a při vzniku akčního potenciálu.

Vzhledem k tomu, že extracelulární i intracelulární registrace je zaměřena na shodné děje téhož subjektu, lze tyto přiřadit k jednotlivým fázím změn membránového potenciálu. Akční potenciály jsou jediným způsobem elektrického přenosu informace neuronem do blízkosti dalšího neuronu. Pokud pomineme u savců vzácné elektrické synapse, přenos z neuronu na neuron je chemický. Akční potenciál je vlastně binární přenos informace.

Mikroelektrody pro záznam jsou vyrobeny buď z jemných drátků (wolfram) nebo ze skla. Kovové mikroelektrody jsou obvykle chemicky broušené a jejich hrot umožňuje kvalitní záznam extracelulární aktivity více jednotek. Běžněji jsou užívány skleněné mikropipety, jejichž hrot je tažením tvarován podle účelu, k němuž mají sloužit. Velikost hrotu se pohybuje v mikrometrech. Pro kvalitu záznamu je důležitá impedance (jednotky

M $\Omega$ ). Impedance elektrody menší než 1 M $\Omega$  obvykle umožňuje záznam signálu z více neuronů v okolí jejího hrotu. Vyšší impedance umožňují lepší záznam aktivity jednotlivé buňky a jsou-li spojeny s ostřejším hrotem i průnik do buňky a intracelulární záznam její aktivity. Skleněné elektrody pro extracelulární záznam jsou obvykle plněny 3 molárním roztokem NaCl.

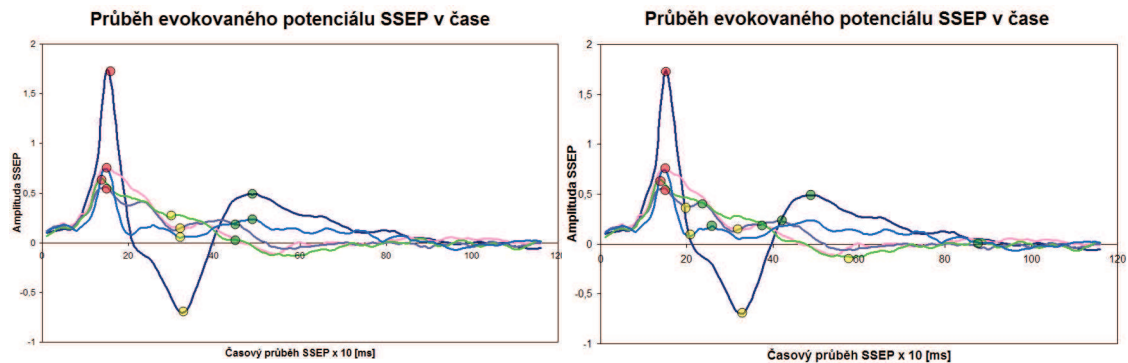
#### **1.4.1. Hodnocení jednotkových potenciálů**

Vzhledem k unitární odpovědi neuronu, známé jako „vše nebo nic“, nemá význam hodnotit extracelulární záznam jeho akčních (jednotkových) potenciálů jinak než z časového hlediska. Změny amplitudy vznikají nejčastěji na základě změn extracelulárního prostředí (např. edém), či geometrického vztahu neuronu a elektrody. Na rozdíl od evokovaných potenciálů zde hodnotíme záznam spontánní elektrické aktivity, která se zvnějšku jeví jako stochastický (Poissonův) děj, jehož konstantu lze ovlivnit změnou experimentálních podmínek. Vzhledem k nízkému výkonovému poměru signálu a šumu je při vyhledávání jednotkových potenciálů v záznamu nutno data předzpracovat a šum potlačit. V záznamu lze hodnotit jak četnost výbojů za zvolený časový interval (aktivita), tak jejich eventuální vazbu (párování) a vývoj těchto znaků v čase. V jednom záznamu *multi-unit* aktivity lze do určité míry odlišit jednotkové potenciály malého počtu buněk a následně se pokusit analyzovat jejich vztahy.

Vzhledem k tomu, že jsou intervaly mezi výskytem jednotkových potenciálů (tzv. inter-spike intervals, ISI) různé, neužíváme termínu frekvence, který je spíše vyhrazen pro periodické jevy. Píšeme proto o jednotkové aktivitě, aktivitě, nebo četnosti jednotkových potenciálů (hrotů) za časovou jednotku.

### **1.5. Optimalizační algoritmy v hodnocení záznamu evokovaných potenciálů**

Při vyhledávání latence určité vlny evokovaného potenciálu obvykle vycházíme z jeho okamžitého průběhu a z našich empirických znalostí o průběhu jednotlivých komponent. V místech, kde se tvar evokovaného potenciálu zásadněji mění, dochází k rychlé změně extrémů křivky. Při výraznější změně tvaru evokovaného potenciálu nemusíme být schopni rozhodnout, který z extrémů patří které vlně, jež byla dříve jasně vyjádřena (Obr. 6). Tyto problémy mimo jiné řeší automatické hodnocení evokovaného potenciálu pomocí výpočetní techniky.



**Obr. 6: Komponenty evokovaného potenciálu při hodnocení s ohledem na okolí (vlevo) a bez ohledu na okolí (vpravo). Na obou grafech jsou průběhy stejného somatosenzorického evokovaného potenciálu v různých časech v průběhu experimentu. Body stejné barvy označují, jak byla označena stejná komponenta evokovaného potenciálu (vrchol vlny). Při hodnocení s ohledem na okolí je vývoj vlny spojité, i když vlna není na první pohled zřetelně vyjádřena. Pokud hodnotíme evokované potenciály izolovaně, nelze zejména při oploštění záznamu s jistotou identifikovat, který extrém křivky odpovídá dalším komponentám evokovaného potenciálu (první negativní vlna je vždy zřejmá), a proto dochází při manuálním hodnocení k jejich “rozmíchání”. Vlastní experimentální data.**

*Optimalizační kritérium* je funkce, která určuje, jak dobré je nalezené lokální řešení problému pomocí daného algoritmu, resp. umožní porovnat dva body ve stavovém prostoru stran optimalizace. V našem případě je *stavový prostor* vícerozměrný – čas experimentu (osa x) a latence (osa y) evokovaného potenciálu. Třetí rozměr, amplituda evokovaného potenciálu (osa z), slouží k výpočtu optimalizačního kritéria. *Optimalizační problém* je nalezení cesty ve stavovém prostoru odpovídající průběhu komponenty evokovaného potenciálu. Obecně se jedná o tzv. problém obchodního cestujícího v optimalizační variantě („traveling salesperson“, TSO), kdy existuje  $x^y$  cest, kde x je počet uvažovaných datových bodů v záznamu jednoho evokovaného potenciálu (rozsah latencí, kde předpokládáme lokální extrém) a y je počet evokovaných potenciálů v pokusu, který závisí na kroku, po kterém evokované potenciály sestavujeme a celkové délce záznamu. Pro úplnost doplňme, že tento optimalizační problém spadá do třídy NP (NPO).

Zhruba řečeno je *optimalizační kritérium* vyjádřeno amplitudou (osa z) a blízkostí bodů v ose y v definovaném okolí na ose x. Při procházení všech možných cest daného stavového prostoru bychom museli spočítat v případě našich záznamů  $10^{370}$  cest. Z tohoto důvodu se užívají heuristické algoritmy, které naleznou optimální řešení v rozumném (resp. polynomiálně ohraničeném) čase.

Z nejznámějších heuristických algoritmů, které řeší optimalizaci, jmenujme následující [83]:

- **Evoluční programování** – *evolutionary programming* [84]
- **Tabu vyhledávání** – *tabu search* [85,86]
- **Simulované ochlazování** - *simulated annealing* [87] a jeho varianty

### **Evoluční algoritmy (simulovaná evoluce)**

Svým principem napodobují evoluci. Algoritmus genetického programování je inicializován množstvím počátečních řešení, která jsou náhodně generována ze stavového prostoru. Z iniciální populace se selekcí na podkladě optimalizačního kritéria (zde tzv. "fitness function") vybere subpopulace, která kombinací vytvoří filiální generaci [84]. Algoritmus je ukončen, je-li nalezeno dostatečně vyhovující řešení, proběhne zadaný počet cyklů, optimalizační funkce nejlepšího řešení dosáhla v několika generacích plateau, nebo vypršel alokovaný výpočetní čas. Hlavní nevýhodou tohoto algoritmu je nutnost výpočtu optimalizační funkce pro každého jedince z každé populace, která zvyšuje výpočetní složitost. Dalším problémem je riziko uváznutí v lokálním minimu. Evoluční algoritmus se uplatňuje i v tvorbě ensemblových hybridních samoorganizujících neuronových sítích (např. GAME, Group of Adaptive Models of Evolution).

### **Tabu vyhledávání (tabu search)**

Tento algoritmus používá datovou strukturu nebo lépe množinu pravidel, která definují body ve stavovém prostoru, které jsou zakázané, neboli tabu [85]. Jedná se nejčastěji o body v okolí lokálního optima, které mají horší optimalizační kritérium. To je jeden z mechanismů, který zabraňuje uváznutí algoritmu. Kromě krátkodobé paměti, která obsahuje prošlé body stavového prostoru po stanovenou dobu, se zavádí i střednědobá a dlouhodobá paměť definovaná jako množina pravidel, která směřují prohledávání do oblastí stavového prostoru, kde je větší pravděpodobnost nalezení optimálního řešení, nebo zajišťují diverzitu vyhledávání tak, aby algoritmus neuvázl v nějakém lokálním minimu. Tabu vyhledávání vychází z jediného iniciálního řešení, které lze vytvořit například algoritmem nejbližšího souseda (nearest neighbour).

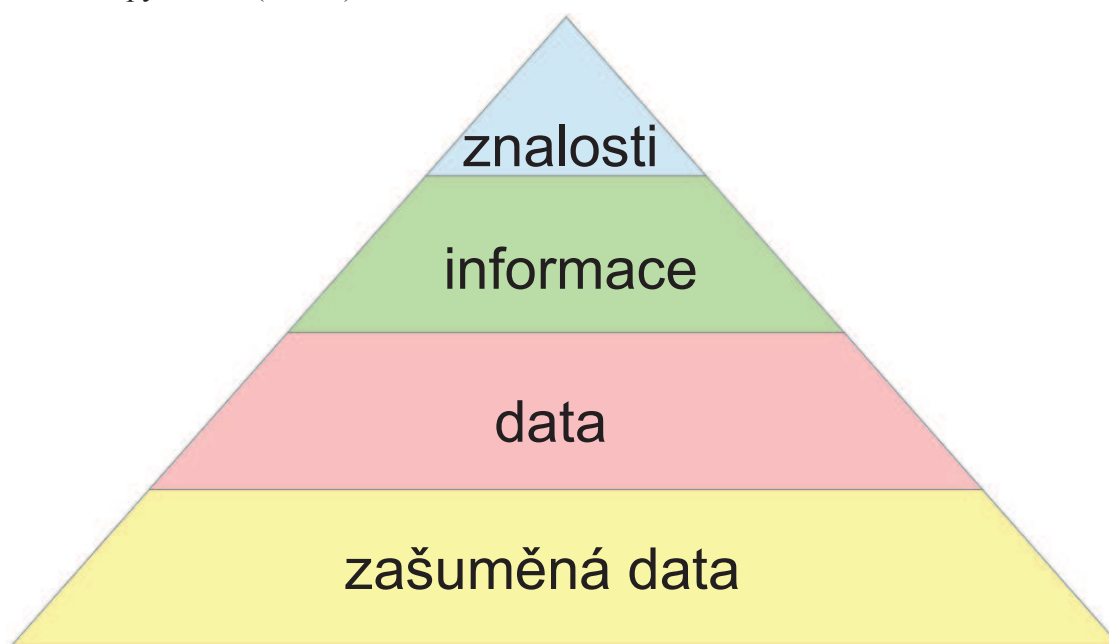
### **Simulované ochlazování (simulated annealing)**

Tato metaheuristika napodobuje fyzikální princip žhání kovů, kdy se atomy o vyšší teplotě pohybují ze své původní polohy přes stavy o vyšší energii tak, že při ochlazování zaujmají jiné polohy o nižší energii [87]. Možnost resp. pravděpodobnost přechodu ze stavu o nižší energii jako funkce teploty, která se v průběhu procesu snižuje, je základním principem, který zabraňuje tomu, aby algoritmus uvázl v lokálním minimu. Simulované ochlazování rovněž vychází z jediného iniciálního řešení. Algoritmus vyžaduje vhodné nastavení iniciální teploty, definování funkce pro ochlazování resp. stanovení aktuální teploty, funkce pro nalezení sousedního stavu a funkce pro výpočet pravděpodobnosti přijetí stavu s vyšší energií (resp. cenou). Funkce pro výpočet optimalizačního kritéria (nebo přesněji v tomto případě energie, ceny) daného řešení je stejná jako u dalších algoritmů. Mezi výhody tohoto algoritmu patří relativně jednodušší definice a nastavení konstant a funkcí simulovaného ochlazování a naše dobré zkušenosti z jiných prací.

#### **1.5.1. Datamining a hodnocení záznamů jednotkových potenciálů**

Výpočetní technika má v hodnocení záznamů elektrické aktivity neuronů nezastupitelnou roli. Vyhledávání grafoelementů v záznamu a vyhledávání závislostí a odlišností mezi skupinami záznamů dobře odpovídá definici vytěžování dat (*datamining*), jak ji vytvořil v roce 1996 Usama Fayyad: „*Datamining je netriviální proces zjišťování*

*platných, neznámých, potenciálně užitečných a snadno pochopitelných závislostí v datech“ [88]. Mezi metody vytěžování dat řadíme regresní analýzu, rozhodovací stromy, rozhodovací pravidla, asociační pravidla, metody založené na analogii, induktivní logické programování, analýzu hlavních komponent a neuronové sítě. Vztah nasbíraných dat a konečného produktu – znalostí, které z nich získáme, lze schématicky zobrazit jako znalostní pyramidu (Obr. 7).*



**Obr. 7: Znalostní pyramida ukazuje vztah zaznamenaných dat a výstupu experimentu (znalostí) jako vícestupňový proces. Obrázek vytvořen autorem.**

#### **1.5.1.1. Vyhledávání jednotkových potenciálů**

Vyhledávání jednotkových potenciálů je klasický problém, kdy se snažíme odstranit šum a získat pouze tento signál. Tento problém je v literatuře opakovaně diskutován a řešen, často však vlastní uspořádání experimentu či měření vyžaduje modifikace co se přesnosti a rychlosti vyhodnocení týče. Některé aplikace např. vyžadují hodnocení v reálném čase nebo při omezené výpočetní síle. Senzitivita a specifita algoritmu je vykoupena jeho vysokou výpočetní složitostí. Metody lze rozdělit na základě časové složitosti, užití umělé inteligence, fuzzy operátorů, shlukování a nutnosti zásahu operátora během vyhodnocování dat.

Hodnocení prakticky každého biosignálu začíná předzpracováním, které hraje roli v kvalitě dalších stupňů hodnocení. Hlavními úkoly předzpracování jsou:

1. čištění dat: doplnění chybějících hodnot, identifikace a vyřazení odlehlých hodnot, redukce šumu (clustering, binning), vyhlazení,
2. integrace dat: z více databází, rámců, záznamů,
3. transformace dat: normalizace (maximum ... minimum, z-score, softmax scaling),
4. redukce dat: snížení objemu dat, tak aby výběr produkoval stejné výsledky při menší výpočetní složitosti.

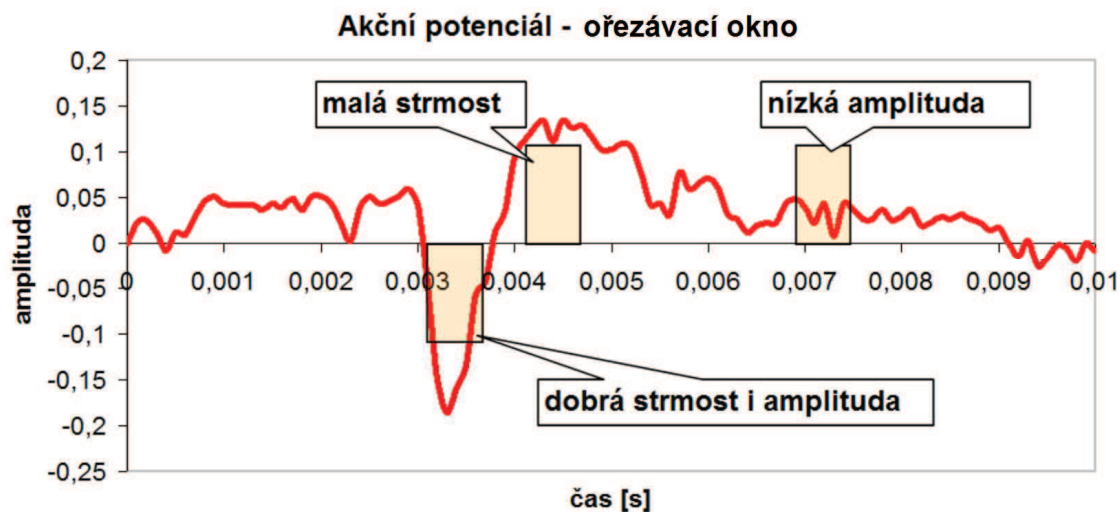
V obecném případě vstupují do hry jak náhodné šumy (bílý šum pozadí), tak i pravidelné signály jako např. pulzace cév či okolní síťové rušení (i při snaze o jeho minimalizaci použitím uzemnění a Faradayovy klece).

Vyhledávání hrotů na základě minimální amplitudy je jednoduchá a snadno implementovatelná metoda s lineární výpočetní složitostí  $\mathcal{O}(n)$  a snadnou obvodovou realizací [89]. Pokud zvolíme práh příliš vysoko, ztratíme část hrotů (falešná negativita), pokud ho zvolíme příliš nízko, získáme zase množství falešně pozitivních hrotů. Existuje i možnost automatického nastavení prahu, například jako násobek standardní odchylky [90]. To funguje dobře u neuronů, které mají malou aktivitu. V případě rychle po sobě následujících výbojů a salv nastává problém se zvýšením standardní odchylky, která již nereflektuje skutečný odstup šumu od signálu. Řešení tohoto problému bylo nalezeno v neparametrické veličině s odhadem okolního šumu podle:

$$\sigma_n = \text{median} \left\{ \frac{|x|}{0.6745} \right\}$$

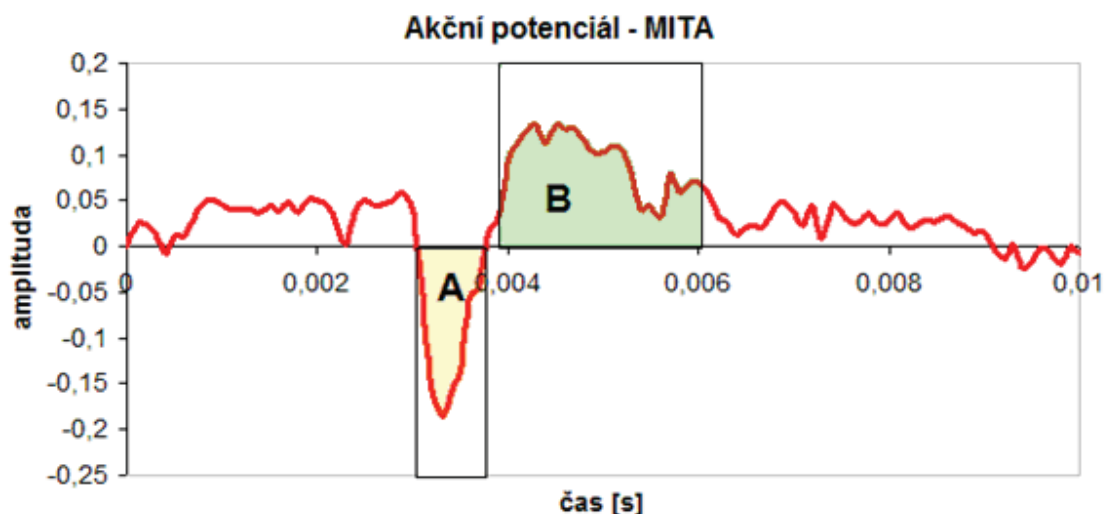
kteřá je méně náchylná na vyšší frekvenci výbojů [91]. Jako hranice pro detekci hrotu byl používán pětinašobek této hodnoty. Vyhledávání hrotů na základě prahu amplitudy, který je posazen níže, než by odpovídalo skutečnosti, se používá k předvybrání vhodných kandidátů na výboje, jež jsou dále zpracovány.

Známe je i využití tvarově definovaných omezení (např. strmost či ostrost), nebo metoda ořezávacího okna (tzv. „window discriminators“) zaručující jak minimální amplitudu, tak i dostatečnou strmost [92,93] (Obr. 8). Window discriminators mají nevýhodu v tom, že vyžadují manuální nastavení parametrů okna a je velmi obtížné tyto parametry nastavit tak, abychom odlišili dva různé tvary. Pro svou jednoduchost jsou implementovány v řadě komerčních programů - např. MicroCal Origin. Kromě základní verze se objevily i varianty a řada vylepšení [94]. Hlavní výhodou window discriminators je malá výpočetní složitost, která v minulosti umožnila implementaci pomocí elektronických obvodů v reálném čase.



**Obr. 8:** Ořezávací okno - akční potenciál musí mít dostatečnou strmost i amplitudu, aby byl přijat. Amplituda je v arbitrárních jednotkách. Obrázek vytvořen autorem s využitím vlastních laboratorních dat.

Další metodou je „*Maximum Integral Transform Alignment*“, neboli *MITA*. Metoda je založená na integraci negativní a pozitivní části akčního potenciálu (Obr. 9). Oba integrály lze následně využít pro detekci a dokonce i třídění jednotkových potenciálů. Algoritmus probíhá ve dvou krocích takto: v první fázi (fáze extrakce) se provede výpočet integrálů (v diskrétním případě samozřejmě sum) v definovaném časovém okně v celém průběhu záznamu. V druhé fázi (fáze zarovnání) se v předem stanoveném časovém odstavu od nalezených maxim z první fáze vypočte další integrál. Tyto dvě hodnoty lze následně použít k třídění jednotek. Výhodou *MITA* je i poměrně nízká výpočetní složitost s rozumným počtem špatně klasifikovaných hrotů kolem 1,2%, což je dobré pro obvodovou realizaci pomocí VLSI (integrovaných obvodů). Grafoelementy, které vykazují malé změny po dobu snímání, mohou být nalezeny podle svých charakteristických vlastností [95,96].

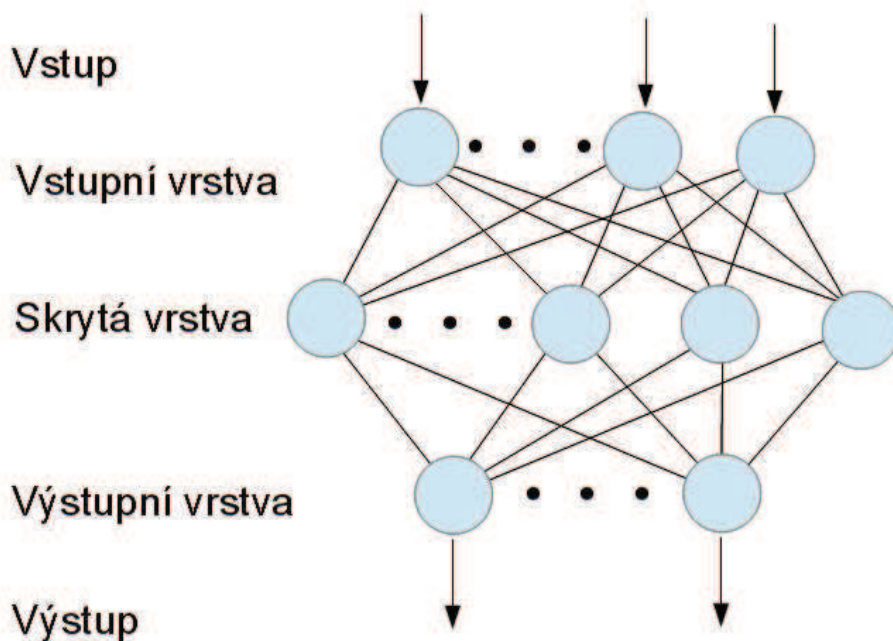


Obr. 9: Maximum Intergral Tranform Alignment (MITA): druhý integrál (B) je počítán ve fixní, předem stanovené vzdálenosti od prvního integrálu (A). Amplituda je v arbitrárních jednotkách. Obrázek vytvořen autorem s využitím vlastních laboratorních dat.

Další technikou, která umožňuje identifikaci akčních potenciálů, je filtrace s pásmovou propustí (*band-pass filter*). Filtrace signálu by mimo jiné měla být prvním krokem všech ostatních algoritmů. Sofistikovanější metody zahrnují transformaci signálu cestou např. vlnkové (*wavelet*) [91,97] nebo Fourierovy transformace [98], metody, které jsou jinak hojně používané v multimediální kompresi: vlnková transformace např. u komprese obrazu a Fourierova transformace např. u komprese zvuku. Výhodou vlnkové transformace je optimální dekompozice signálu v časovém a frekvenčním prostoru, charakteristika vlny je pak zachycena ve více koeficientech, což je vhodné pro další třídění grafoelementů.

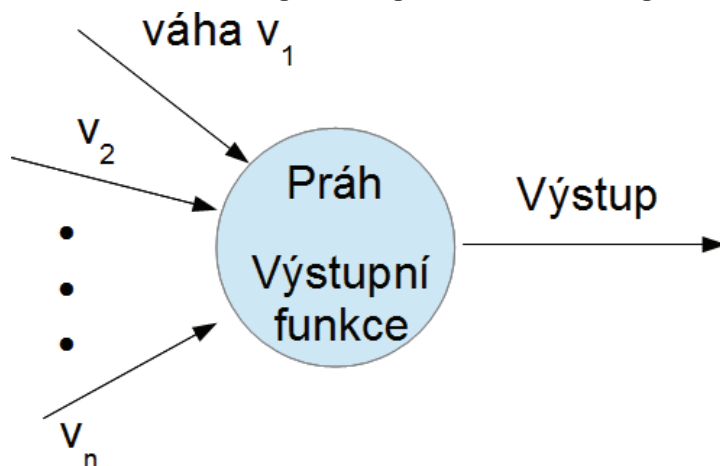
Pro třídění grafoelementů se kromě již uvedené vlnkové transformace [99–102] užilo a užívá dalších metod, z nichž jmenujme ještě analýzu hlavních komponent (*pricipal component analysis*, PCA) [103,104]. V neposlední řadě jsou to neuronové sítě [102,104,105].





Obr. 10: Schéma klasické neuronové sítě Backpropagation. Síť má tři vrstvy: vstupní, skrytou a výstupní. Mezi sousedními vrstvami je úplné propojení. Jednotlivé neurony představují váhy, ze kterých se vypočítává výstupní vektor k vektoru přiloženému na vstup. Obrázek vytvořen autorem.

Obecně řečeno, neuronové sítě se snaží v některých aspektech napodobit funkci živých vzájemně spojených neuronů za účelem řešení nějakých problémů. Jejich základním znakem je, že se skládají z většího množství vzájemně propojených výkonných prvků. Každý prvek transformuje data na vstupu na výstupní data podle dané přenosové funkce a může při tom uplatnit svou lokální paměť.

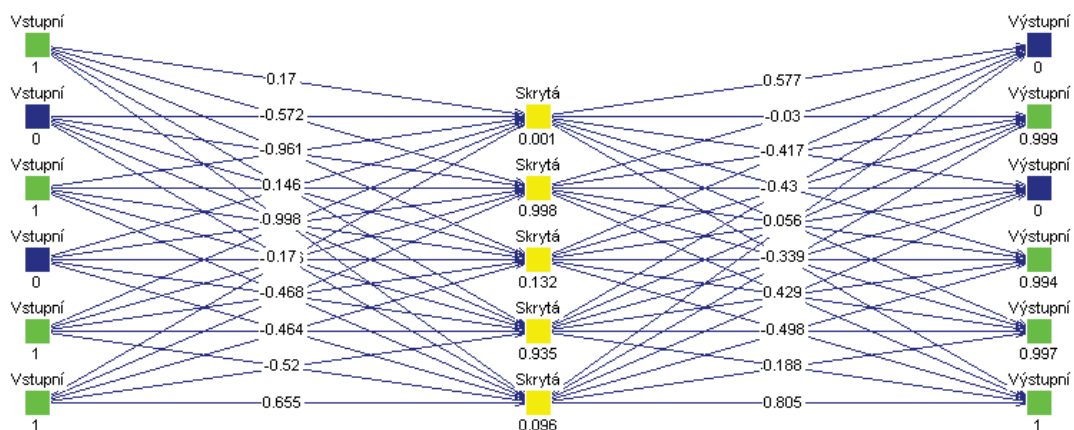


Obr. 11: McCulloch-Pittsův Perceptron jako základní stavební jednotka neuronové sítě. Perceptron provádí vážený součet vstupních hodnot podle nastavených vah. Výstup může být binární v případě prahové funkce (klasický perceptron) nebo obecně jakákoliv jiná výstupní funkce. Vlastní ilustrace.

Neuronové sítě obecně pracují ve dvou krocích: učení a vybavování. Rozlišujeme dva typy učení: učení s učitelem a bez učitele. Při učení s učitelem se neuronové sítě předloží na vstup problém se známým řešením. Síť si nastavuje váhy na základě rozdílu

svého výstupu, tak aby se lišil od správného řešení co nejméně, a tím se „učí“. Typickým představitelem tohoto typu učení je vícevrstvá neuronová síť *Backpropagation* (Obr. 10, Obr. 12) složená z perceptronů (Obr. 11) – jednoduchých výkonných prvků provádějících vážený součet s prahovou (nebo obecně jakoukoliv jinou) funkcí [104,106–108] uspořádaných ve vstupní (input), skryté (hidden) a výstupní (output layer) vrstvě a její varianty [101,102,109,110]. Naopak, učení bez učitele probíhá samoorganizací sítě tak, že síť hledá ve vstupních datech společné znaky. Vzory jsou předkládány bez znalosti požadovaného výstupu a váhy jsou nastavovány v průběhu celé aktivní fáze.

Při rozhodování, zda použijeme neuronovou síť s učitelem nebo bez něho vycházíme z faktu, že záznam (např. jednotkových potenciálů) se může v čase výrazně měnit. Vyhodnocované záznamy mají délku až půl hodiny a dochází k experimentálnímu zásahu. Není možné procházet záznam za účelem vyhledání vhodných kandidátů na „správné“ a „špatné“ vzory. Navíc i nalezená aktivita se může měnit tak, že již nebude sítí rozpoznávána jako „správný“ vzor. Z podobného důvodu rovněž nelze užít rozříděný výběr vzorů z jiného již vyhodnoceného záznamu. Řešením je síť bez učitele s následným interaktivním výběrem vzorů.

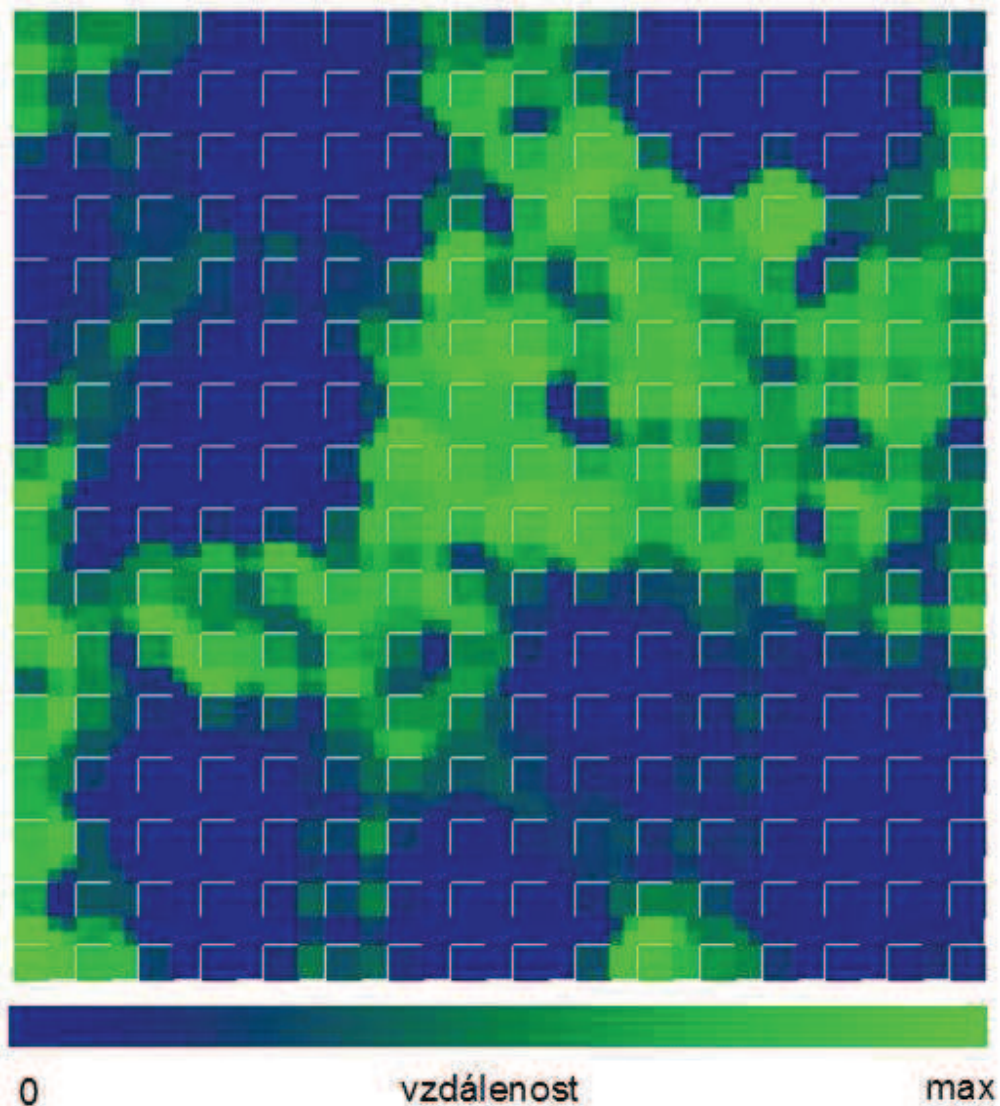


**Obr. 12: Ukázka síť Backpropagation (učení s učitelem) s nastavenými váhami. Obrazový výstup a data z programu JavaNNS. Vstupní vrstva vlevo, skrytá vrstva uprostřed, výstupní vrstva vpravo. Čísla na spojnicích ukazují váhy, čísla pod jednotlivými výkonnými prvky (čtverce) jejich aktuální hodnotu.**

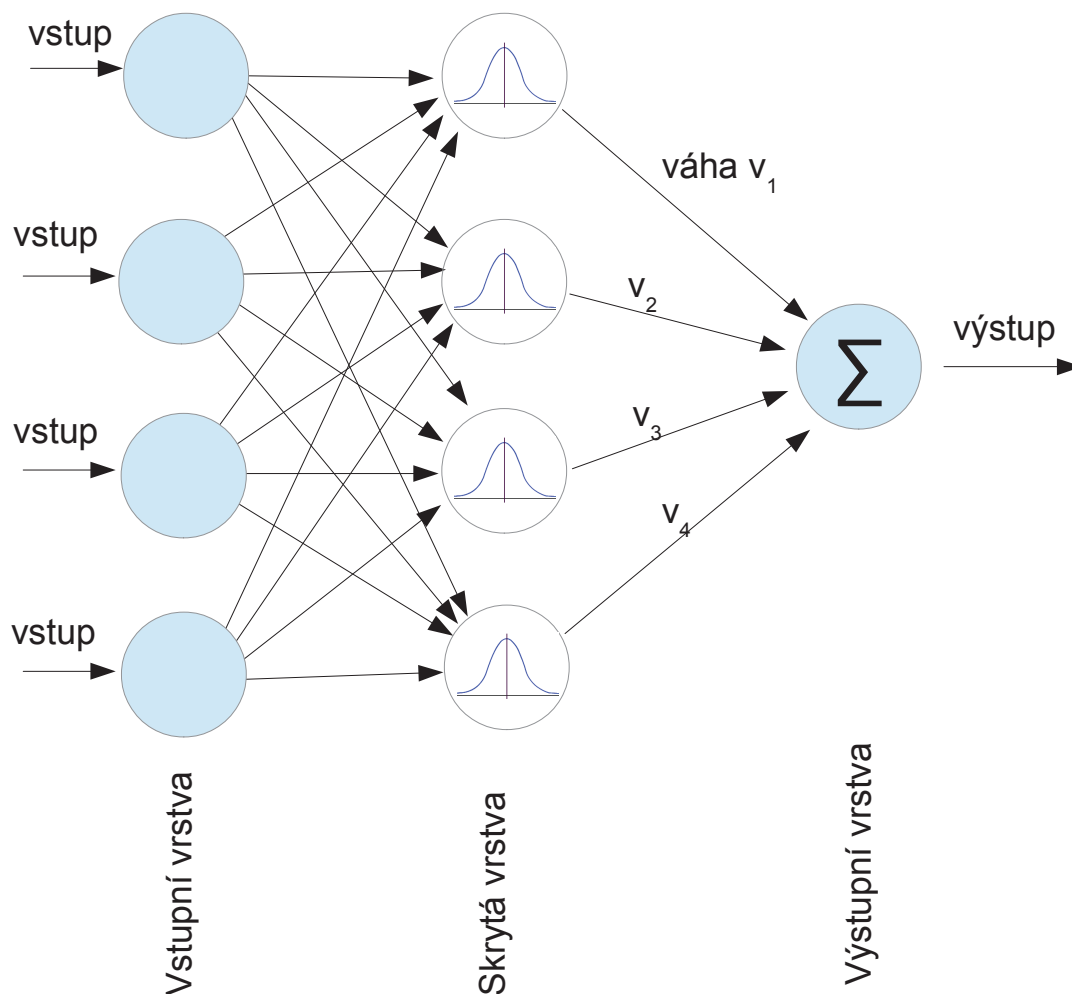
Pokud předpokládáme, že se v záznamu bude vyskytovat více odlišných vzorů, je nutné užít samoorganizující síť s vlastností shlukové analýzy umožňující na základě celočíselných vstupů rozlišit (nebo lépe shlukovat grafoelementy do) více vzorů. Ze známějších sítí připadajících v úvahu máme na výběr:

1. SOM (*Self-Organising Map*) – shluková analýza, princip organizace a sousednosti [111,112] (Obr. 13).
2. ART (*Adaptive Resonance Theory*) – paralela mechanismu dlouhodobé potenciace (LTP) typické pro neurony hipokampu. Není stanovena horní hranice počtu neuronů, obtížně je odhadnutelná vzdálenost dvou vzorů, který by vedl na „rozumný“ počet neuronů.

3. Analýza hlavních komponent (*PCA – principal component analysis*), distribuce vzorů podle dimenzí s největším rozptylem. Tato metoda je v naší práci užita jenom jako doplněk k následující síti.
4. RBF (*Radial Basis Function*) - shluková analýza pomocí algoritmu „k-means“ – zřejmě nejlepší řešení [110]. Síť RBF s algoritmem k-means je vhodná jak ke zpracování EEG signálu tak ke třídění grafoelementů. Jedná se o síť s třemi vrstvami neuronů a dopředným šířením signálu (Obr. 14).



Obr. 13: Ukázka sítě SOM (učení s učitelem). Obrazový výstup a data z programu JavaNNS (Kohonenova mapa) ukazuje síť po učení. Čím více zelené, tím větší vzdálenost od hledaného řešení.



Obr. 14: Schéma neuronové sítě RBF. Síť má tři vrstvy. Mezi vstupní a skrytou vrstvou (vrstvou RBF neuronů) je úplné propojení. RBF neurony v tomto případě vypočítávají vzdálenost na základě funkce normálního rozložení s daným středem. Výstupní vrstva obsahuje jediný výkonný prvek provádějící sumaci. Vlastní ilustrace.

Komě vstupní (rozvětovací) vrstvy má síť skrytou vrstvou, kterou tvoří RBF neurony a výstupní vrstvou tvořenou perceptrony. Mezi vstupní vrstvou a skrytou vrstvou je úplné propojení. RBF neurony používají funkce s euklidovskou metrikou, nejčastěji Gaussovu funkci normálního rozložení, kde rozptyl udává strmost. Pokud se vstupní vektor vyskytuje ve sféře vlivu daného neuronu, dochází k jeho aktivaci. Neurony výstupní vrstvy jsou klasické perceptrony, které zpravidla provádějí výpočet sumy příspěvku jednotlivých RBF neuronů.

Pro učení sítě RBF se klasicky využívá algoritmus k-means. V zásadě existují dvě varianty: standardní nebo adaptivní k-means algoritmus.

Standardní k-means algoritmus je inicializován náhodným uspořádáním středů RBF neuronů. Pro všechny vzory z trénovací množiny je vypočítána příslušnost k nejbližšímu vzoru. Podle vzorů, které se přiřadily k danému RBF neuronu je vypočítána hodnota jeho

středu jako průměr přiřazených vzorů. Toto se opakuje až do té doby, kdy se příslušnost vzorů z testovací množiny k RBF neuronům již dále nemění.

Naopak pro zpracování biosignálu, který je v čase nekonstantní, je zajímavější adaptivní verze k-means algoritmu. Stejně jako u standardní verze začíná náhodným rozmístěním středů RBF neuronů. Ke vzoru přiloženému na vstup vyhledá nejbližší shluk (resp. RBF neuron), jehož střed se „poposune“ směrem k tomuto vzoru, přičemž míra posunutí se v průběhu učení snižuje dle klesající proměnné, která opět může být nějakou asymptotickou funkcí

$$f(x), \text{ kde } \lim_{x \rightarrow \infty} f(x) = 0.$$

Zde existuje jedna varianta, kdy pokud není ve stanovené vzdálenosti od vzoru střed RBF neuronu, vytvoří se nový. I zde je potřeba generaci nových RBF neuronů postupně omezovat klesající proměnnou či absolutním počtem RBF neuronů. Zásadní význam má správné nastavení celého procesu. Příliš malé okolí RBF neuronu by vedlo ke generaci zbytečně velkého množství dalších neuronů, naopak příliš velké okolí by nevedlo ke generaci žádného. Pro úplnost uveďme, že algoritmus k-means patří do třídy NP-těžkých problémů (NPH) [113], v praxi algoritmus probíhá v polynomiálně ohraničeném čase.

Fuzzy třídění (fuzzy clustering) resp. fuzzy k-means je volnější variantou tohoto algoritmu [114]. Každý vzor patří do každého ze shluků (resp. ke každému z RBF neuronů u sítě RBF), k některému však více, k jinému velmi málo. Centrum shluku je pak dáno váženým průměrem vzorů. Průběh učení je obdobný algoritmu k-means.

Další modifikací je použití histogramu intervalů mezi hroty k určení, zda jeden shluk reprezentuje aktivitu jednoho neuronu či více [115]. Další možností je Bayesovská (pravděpodobnostní) implementace třídění akčních potenciálů [116].

Neuronová síť RBF se obecně používá ve dvou aplikacích – jako aproximátor a jako klasifikátor. Z pohledu analýzy biosignálu je druhé použití důležitější. Úplné propojení vstupní (rozvětvací) vrstvy umožňuje každému z RBF neuronů posoudit vzdálenost svého středu. Spojení RBF neuronů s výstupní vrstvou je realizováno tak, že tyto neurony provádějí logický součet (funkce OR) v případě nespojitě sféry vlivu RBF neuronů [např. Heavisideova funkce [117]], či prostý součet s nastavenou prahovou hodnotou v případě spojitě sféry vlivu (např. funkce normálního rozložení).

Shlukování (clustering) podobných grafoelementů a analýza hlavních komponent usnadňují odlišení odlehlých hodnot a signálů z více buněk zaznamenaných simultánně v jednom záznamu (multi-unit activity) s přítomností nezanedbatelného množství elektronického šumu. Významné pokroky ve výpočetní technice v posledním desetiletí nám umožňují implementaci stále složitějších a přesnějších algoritmů pro automatickou hodnocení záznamů na cenově dostupných strojích a často i v reálném čase.

## **1.6. Účinek světla na mozkovou kůru**

Světlo je elektromagnetické záření o vlnových délkách, které zachytí lidské oko, tj. mezi 390 a 750nm. Kromě vnímání části spektra elektromagnetického záření za účelem

prostorové orientace vnímají biologické systémy světlo i z pohledu příjmu energie s vazbou na buněčný metabolismus a genovou expresi. Známe je otáčení rostlin za světlem (fototropismus) nebo diurnální otáčení podle Slunce (heliotropismus) [118], které mají jak biologické (genová exprese, dělení buněk), tak i fyzikální příčiny (turgor).

Vnímání světla u živočichů se děje na značně odlišných úrovních složitosti. Světločivnou skvrnu (*stigma*) lze najít již u jednobuněčných organismů např. rodu *Euglena* – Krásnoočko, což jsou jednobuněčné bičíkaté organismy. Slouží k synchronizaci biologických pochodů s rytmem denního světla a vytváření cirkadiálních rytmů. Pochopitelně tyto organismy neumí rozlišit tvar zdroje světla. Světločivná skvrna se však nachází v blízkosti bičíku. Organismus tak i zjišťuje, odkud přichází světlo, aby se k němu mohl přiblížit pomocí bičíku (*fototaxe*) za účelem fotosyntézy [119]. Tzv. nevizuální fotorecepci (čítí světla, které nevytváří obraz) vykazují zhruba dvě třetiny živočichů [120].

Ovlivnění světločivných buněk světlem a složkami spektra blízkými světlu (infračervené, ultrafialové záření) na všech úrovních fylogeneze je dobře prozkoumané. Existují práce zabývající se přítomností fotosenzitivních neuronů u dalších bezobratlých a jejich ovlivnění [121]. Méně se však ví o ovlivnění buněk, které nejsou k fotorecepci určeny u vyšších živočichů (obratlovců), zejména samotných korových neuronů.

V roce 1988 byl publikován článek, ve kterém se autoři zabývali účinkem světla na korové neurony u potkanů [122]. Experiment byl proveden na 0,5mm tenkých povrchových řezech různých oblastí kůry dospělých potkanů. Řezy byly ponořeny do inkubačního roztoku, který obsahoval radioaktivně označenou kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou ( $[^3\text{H}]\text{GABA}$ ) a aminooctovou kyselinu k zabránění metabolismu  $[^3\text{H}]\text{GABA}$ . Poté byly ponořeny do Ringerova roztoku s vyšším poměrem draselných iontů za různých světelných podmínek. Autoři opakovaně měřili uvolňování radioaktivně značené  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  do roztoku v časových intervalech a zbytkovou aktivitu v mozkových řezech. Experimentem zjistili, že bílé světlo o nízké intenzitě kolem  $1,3 \text{ mW/cm}^2$  vedlo ke zvýšenému uvolňování  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  o 31%. Naproti tomu, když byla intenzita světla vyšší, kolem  $1,9 \text{ mW/cm}^2$ , uvolňování  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  se snižovalo, resp. bylo nižší oproti kontrole ve tmě. Zajímavé je to, že u jednoho experimentu se ani při optimálních podmínkách neprokázala odpověď uvolňování  $[^3\text{H}]\text{GABA}$  na bílé světlo o nízké intenzitě. V práci bohužel nebylo rozlišeno, z jakého typu buněk (neurony, glie) GABA pocházela.

Jaká je paralela experimentu v běžném životě? Na Zemi je solární konstanta (výkon slunečního záření dopadajícího kolmo na plochu)  $136 \text{ mW/cm}^2$  [123]. V mírném pásmu je energie dopadajícího viditelného záření odhadována na  $55 \text{ mW/cm}^2$  za slunečního poledne v létě a zhruba desetinná v případě zatažené oblohy. U potkana bylo změřeno, že frakce světla, která proniká neoholenou hlavou, se pohybuje mezi 4,7 až 11,9%, při ozáření světlem  $9 \text{ mW/cm}^2$ , to činí 0,42 až  $1,07 \text{ mW/cm}^2$ . Zde se ale již dostáváme do hodnot, které v popsaném experimentu měly vliv na uvolňování GABA. Vzhledem k tomu, že denní světlo může u malých obratlovců přímo ovlivňovat hypothalamus, který je uložen hluboko v kranii, lze předpokládat jeho účinek i na povrch mozkové kůry u

člověka a to zejména v nižších vlnových délkách viditelného spektra a ultrafialového záření [124].

### **1.7. Postiktální inhibice**

Po epileptickém záchvatu obvykle následuje období postiktální inhibice, kdy je obtížné vyvolat další epileptický záchvat. To platí i v případě epileptického záchvatu vyvolaného elektrickou stimulací [125,126]. Během postiktální inhibice lze sledovat řadu jevů jako například změny chování [127,128], změny v EEG [128] a v evokovaných potenciálech [129], změny na molekulární úrovni [130,131]. Mechanismy, které vedou k postiktální inhibici, jsou aktivovány již během epileptického záchvatu a mají vliv na jeho ukončení zejména prostřednictvím výrazné aktivní inhibice [132,133]. Při hodnocení excitability neuronů k dalšímu záchvatu během postiktální inhibice se obvykle používá stimulace o vyšší intenzitě [125] s cílem překonat sníženou excitabilitu v tomto období.

### **1.8. Hypotézy a cíle**

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 [51,54], který je dobře popsanou a reprodukovatelnou metodou, která je navíc málo invazivní. Zásadní výhodou je to, že lze již během rozvoje ischemické léze provádět kontinuální záznam evokovaných či jednotkových potenciálů.

Zavedení nového modelu do laboratorní praxe vyžaduje jeho morfologické a funkční ověření k vyloučení systematických chyb jako je termická nekróza mozkové kůry, fyzikálně-chemického ovlivnění elektrod laserovým světlem a dalších změn, které by nesouvisely s ischemickou lézí. Kromě morfologického ověření léze bylo podstatné sledovat funkční změny. Zajímaly nás akutní změny excitability nejen během samotného vzniku léze ale i časně po jejím vzniku. Zaměřili jsme se nejprve na kontinuální sledování akutních změn somatosenzorických evokovaných potenciálů, které jsou v klinické praxi důležitým testem např. správného průběhu operací krčních tepen. Toto jsme v další fázi doplnili o sledování akutních změn jednotkových potenciálů. Důvodem byla naše praktická zkušenost s těmito metodami a to, že odrážejí celkové změny aktivity v relativně malé oblasti – např. na okraji ischemického ložiska. 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 somatosenzorické 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).

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. Program bude inherentně semi-automatický, s uživatelským vstupem, který definuje parametry vyhledávané komponenty evokovaného potenciálu, tj. kterou z komponent vlastně vyhledáváme. Motivací k této části práce byla potřeba komplexnějšího pohledu na data získaná v experimentu, který ověřoval vliv ischemické léze vyvolané fototrombózou [51,52] na somatosensorické evokované potenciály.

Tuto víceméně metodickou část práce ponecháváme bez hypotézy, neboť zde postrádá význam, protože kvalitu výstupu nelze objektivně hodnotit jinak než výpočetní složitostí.

Dále vznikla potřeba nástroje pro hodnocení změn jednotkových potenciálů. Hned na úvod je důležité uvědomit si motivaci implementace algoritmu pro vyhledávání grafoelementů. Představme si záznam jednotkové aktivity délky 30 minut při vzorkovací frekvenci 10kHz, kde každý dvoutisícový bod představuje grafoelement, který má být označen. Celkem zde nalezneme 9000 grafoelementů. Jejich označení (resp. vypsání latence) vyžaduje kolem 50 hodin práce, která se ale nedá vykonávat cyklicky a bezchybně po delší dobu. Pokud budeme mít tři skupiny zvířat po osmi jedincích, dostaneme 50 dní čisté práce, tj. kolem sedmi měsíců při osmihodinové pracovní době.

Zaměříme se tedy nyní na problém, který jsme museli řešit na našem pracovišti: vyhledávání jednotkových potenciálů v nestacionárním záznamu. Vzhledem k tomu, že jsme nenašli vhodný nástroj pro izolaci jednotkových potenciálů (z našich dostupných programů se jednalo o Origin 6.0 firmy Microcal, Signal 1.8 firmy Cambridge Electronic Design), stalo se naším dalším cílem vytvoření nástroje pro detekci jednotkových potenciálů. 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 logaritmicke-normální [134].

Poissonovo rozdělení definujeme jako:



$$f(k; \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

kde  $\lambda$  je rovna očekávané (střední) hodnotě  $E(X)$  a varianci  $\text{var}(X)$

$$\lambda = E(X) = \text{var}(X)$$

$k = 0, 1, 2, \dots$  a  $e$  je základ přirozeného logaritmu. Logaritmicko-normální rozdělení definujeme jako:

$$f_X(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\ln(x-\mu))^2}{2\sigma^2}}$$

kde  $\mu$  je střední hodnota a  $\sigma$  je standardní odchylka přirozeného logaritmu proměnné.

V našich 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 ozáření mozkové kůry laserovým světlem. Kromě samotné pulsní stimulace prováděné různými stimulačními vzory (jednotlivé pulsy různé délky a salvy pulsů) jsme se rozhodli pokusit se vyvolat epileptiformní aktivitu rytmickou stimulací kůry laserovým světlem (srovnání s elektrickou rytmickou korovou stimulací v další části práce) a ovlivnit kontinuálním svícením laserovým světlem odpověď na korovou elektrickou stimulaci. K průkazu funkčních změn jsme se rozhodli zaznamenávat evokované potenciály, resp. sumace případných odpovědí na stimulaci laserovým světlem. Stanovili jsme si následující hypotézy:

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

**Hypotéza H<sub>0b</sub>:** Rytmická stimulace mozkové kůry laserovým světlem není schopna vyvolat epileptiformní aktivitu ani změny výkonového 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 iradiace mozkové kůry laserovým světlem nemá vliv na jednotkovou aktivitu.

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

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 pulsů o frekvenci 8Hz o nižší intenzitě, než která byla použita pro vyvolání epileptického záchvatu.

**Hypotéza  $H_{0a}$ :** salva čtyř pulsů o nižší intenzitě než která byla použita pro vyvolání epileptického záchvatu rytmickou korovou elektrickou stimulací není schopna demaskovat reziduální hyperexcitabilitu mozkové tkáně a vyvolat následný výboj v interiktálním období.

## 2. METODIKA

### 2.1. Metodika použitá ve více experimentech

#### 2.1.1. Zvířata

K provedení experimentů in vivo jsme zvolili samce laboratorního potkana kmene Wistar. Jedná se o outbrední kmen albínů druhu *Rattus norvegicus*, který byl založen v roce 1996 ve Wistar Institute v Philadelphii, Pensylvánie, USA. Potkani kmene Wistar jsou t.č. nejpoužívanějšími laboratorními zvířaty na Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie 3. LF UK, z čehož vyplývají i naše hlubší zkušenosti s tímto kmenem. Zvířata byla chována při pokojové teplotě  $21 \pm 1$  °C. Denní rytmus byl rozdělen na 12 hodin světla a 12 hodin tmy, kdy rozsvícení bylo načasováno na 6. hodinu ranní. Zvířata měla po celou dobu volný přístup k vodě a k potravě. Všechny činnosti se zvířaty byly prováděny v souladu s etickými doporučeními 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a rovněž v souladu s doporučeními Zákona na ochranu zvířat České Republiky, který odráží příslušné směrnice Evropské unie. Protokol a provedení experimentu bylo schváleno etickou komisí 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Zvláštní péče byla věnována zamezení či minimalizaci případné bolesti či utrpení zvířat, které by mohly při experimentu vzniknout. Zvířata byla obecně 6-9 týdnů stará, o hmotnosti 200 – 400 gramů (v jednotlivých experimentech pochopitelně v menším rozmezí). Používali jsme výhradně samce, abychom tak vyloučili vliv estrálního cyklu. Dodavatelem byl ANLAB s.r.o., Česká republika.

#### 2.1.2. Anestézie

V našich experimentech jsme používali dva druhy celkové injekční (resp. intraperitoneální) anestézie. Dostatečnou hloubku anestézie jsme testovali jako odpověď na stisk planty jedné z dolních končetin anatomickou pinzetou.

Ketamin + Xylazin: Ketamin 100mg/kg intraperitoneálně (Narkamon, Spofa, Česká republika), Xylazin 7mg/kg intraperitoneálně (Rometar, Spofa, Česká republika). V případě nedostatečné hloubky anestézie byla přidána 1/4 - 1/2 kalkulované dávky dle hloubky anestézie.

Pentobarbital: v množství 70mg/kg intraperitoneálně, v případě nedostatečné hloubky anestézie přidána 1/4 až 1/3 kalkulované dávky (Thiopental, VUAB, Česká republika).

#### 2.1.3. Operační protokol

V celkové injekční anestézii jsme pomocí nůžek zbavili operační pole srsti. Incizi měkkých tkání jsme provedli v sagittálním směru v délce cca 1cm a dále pokračovali

tupou preparací až na periost kalvy. V kalvě jsme vytvořili trepanační otvory nejprve mělkým návrtem zevní laminy vrtákem o průměru 0,5 mm a poté opatrně trepanem o průměru 3mm. Při trepanaci jsme kladli zvláštní důraz na šetrnou techniku k vyloučení traumatizace mozkové kůry. Případný zbytek vnitřní laminy byl odstraněn ostrým háčkem. Otvory byly vytvářeny v primární somatosenzorické oblasti se středem 2mm laterálně a 2mm dorzálně od bregmatu. Povrch kůry byl udržován vlhký, avšak pouze tak, aby nebyl tekutinou zalit. Toto samozřejmě bylo prováděno pouze mimo záznam a mimo stimulace, tak abychom do záznamu nevnašeli artefakty.

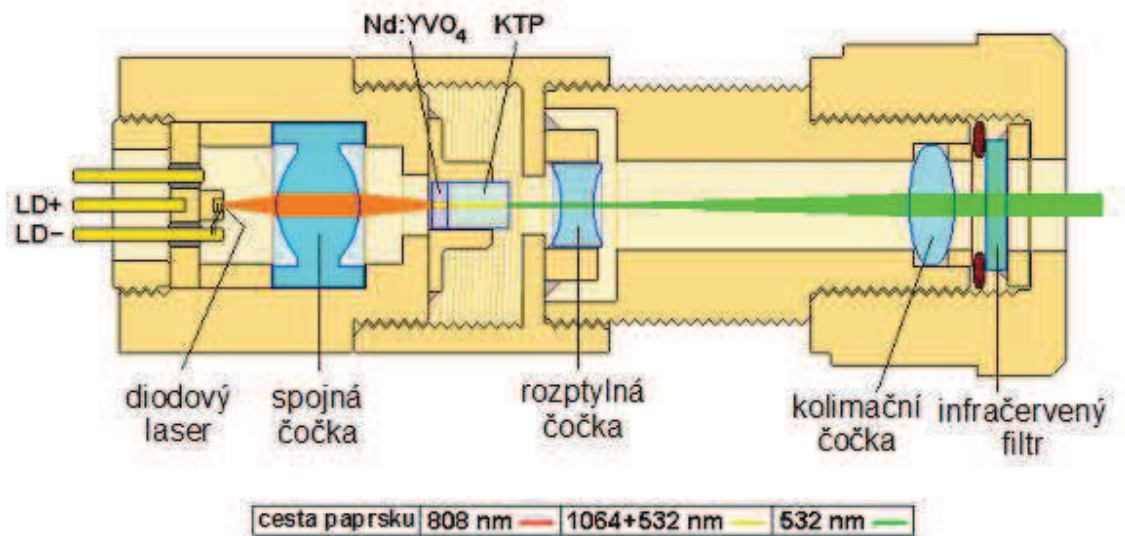
#### **2.1.4. Elektrody**

Kuličkové elektrody pro snímání ECoG jsme vytvořili zahřátím konce stříbrného drátku (průměr 0,25mm), na jehož konci se vytvořila drobná kulička od 0,6 do 1,0mm průměru. Konce elektrod pak byly pochloridovány buď ponořením do taveniny chloridu sodného (teplota tání 801°C) nebo ponořením do lázně SAVO (SAVO Original, Biochemie Group, Česká republika), které obsahuje Chlornan sodný a Hydroxid sodný, na 24 hodin. Poté byly elektrody opakovaně opláchnuty destilovanou vodou, připájeny na konec snímacího kabelu a nevodivě uchyceny do stereotaktického přístroje. Referenční elektroda byla umístována rostrálně mezi nosní kůstky a měkké tkáně hlavy do prostoru vytvořeného tupou preparací.

Tenké skleněné elektrody pro zaznamenávání jednotkových potenciálů byly vytvořeny zahřátím a tažením tenké skleněné trubičky o průměru 1mm na tahači. Elektrody byly poté naplněny 3 molárním roztokem chloridu sodného a do dutiny byl zaveden tenký stříbrný drátek. Elektrody, jejichž impedance ležela mimo stanovené hodnoty (impedance  $6 \pm 1.5 \text{ M}\Omega$ ) nebyly pro účel tohoto pokusu použity. Elektrody byly zaváděny pomocí elektrického posuvu do kůry v oblasti primární somatosenzorické oblasti do hloubky maximálně 1,5mm pod povrch kůry.

#### **2.1.5. Fototrombóza, laser**

Pro vyvolání fokální ischemie v primární somatosenzorické oblasti jsme zvolili techniku fototrombózy. Cestou periferní kanyly zavedené do ocasní žíly potkana bylo podáno fotosenzitivní barvivo bengálská červeň (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetrajodofluorescein) v dávce 20mg/2ml/kg rozpuštěné v 0,9 % roztoku chloridu sodného (fyziologický roztok). U zvířat v kontrolní skupině jsme podávali pouze fyziologický roztok ve stejném množství. Cílové místo pak bylo ozářeno diodovým laserem (*DPSS - diode-pumped solid-state laser*, Obr. 15). Doba ozáření pro vyvolání fototrombózy byla stanovena na 9 minut. Laserové světlo mělo vlnovou délku 532nm, udávaný výkon  $50\text{mW/mm}^2$  a ozářená plocha byla ve tvaru kruhu o ploše menší než  $1\text{mm}^2$ . V dalších experimentech bylo laserové světlo spínáno pomocí hradlového obvodu.



Obr. 15: Technické podrobnosti funkce diodového laseru s výstupní vlnovou délkou paprsku 532nm: diodový laser s vlnovou délkou 808nm excituje krystal Nd:YVO<sub>4</sub> (yttriumvanad dotovaný neodymem), ze kterého vychází světlo o vlnové délce 1064nm. To je následně převedeno KTP krystalem (kaliumtitanylfosfát) na poloviční vlnovou délku 532nm. Upraveno z Wikipedie.

### 2.1.6. Sběr dat

Sběr dat byl při experimentech s laserem prováděn při uchycení zvířete ve stereotaktickém přístroji a na vyhřívané podložce. Celý experiment byl umístěn do Faradayovy klece a všechny vodivé části konstrukce a stereotaktického přístroje byly uzemněny. Snímací kabel se třemi žilami (2 x registrační elektroda, 1 x referenční elektroda) byl veden do předzesilovače konstruovaného pomocí dvou operačních zesilovačů napájených 9V baterií s proměnným zesílením. Předzesilovač byl rovněž umístěn ve Faradayově kleci. Zesílený signál byl veden do 16-bitového A/D převodníku Micro 1401 interface (Cambridge Electronic Design Limited, UK, rozsah vstupního napětí  $\pm 5V$ ) a byl zaznamenáván pomocí softwarového produktu Signal for Windows 1.80 utility (Cambridge Electronic Design Limited, UK). Data byla ukládána v proprietárním formátu CFS (CED Filling System). Vzorkovací frekvence byla volena podle typu záznamu s ohledem na Nyquistův-Shannonův vzorkovací teorém [135] od 1kHz do 10kHz v různých experimentech.

### 2.1.7. Elektrická stimulace

V experimentech používáme dva druhy elektrické stimulace: kortikální stimulaci a stimulaci periferního nervu. V případě periferního nervu jsme použili šetrně vypreparovaný n. ischiadicus, na který jsme přiložili dvě stříbrné stimulační elektrody spojené měkkým plastovým polštářkem. Stimulovali jsme bipolárním obdélníkovým pulzem délky 1 ms. Intenzita stimulace byla zvolena jako 2,5 násobek prahu, při kterém začala být detekovatelná odpověď. V případě kůry jsme použili pár stříbrných kuličkových elektrod o průměru  $0,8 \pm 0,2$  mm ve vzdálenosti 1 mm od sebe, uložených v

trepanačních otvorech v oblasti primární somatosensorické kůry. Intenzita stimulace byla stanovena obdobným způsobem. Použili jsme izolovaný lineární stimulátor A365 a A395, World Precision Instruments, Inc., USA.

### **2.1.8. Morfologické zpracování mozku**

Po samotném experimentu byly operační rány chirurgicky ošetřeny suturou. Tři dny nato jsme zvířata uvedli do hluboké anestézie (Pentobarbital) a provedli dekapitaci a šetrné vyjmutí mozku, který byl následně ochlazen v lázni fyziologického roztoku o teplotě 2 - 6 °C. Pomocí ocelové matice na vytváření řezů mozku potkana v koronární rovině (World Precision Instruments, Inc., USA) jsme vytvořili 1mm široké koronární řezy v oblasti trepanačních otvorů. Řezy byly následně inkubovány pomocí redukčního testu TTC (2,3,5-triphenyltetrazoliumchlorid). Ten se skládá z 2 krát 15 minut inkubace řezů v 2% TTC (řezy se musí po 15 min. obrátit) v temnu při teplotě 37°C s jejich následným opláchnutím a ponořením do 10% roztoku formaldehydu [81,136–139]. V přítomnosti zachovalého mitochondriálního respiračního řetězce se bezbarvý TTC redukuje na triphenylformazan, který má červenou barvu [140,141]. Řezy byly následně vyfotografovány digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C4040 (4 Mpix rozlišení) s makro objektivem. Snímky byly uloženy v nekomprimovaném formátu TIFF (tagged image file format). Hodnocen byl součet neobarvené plochy v místě, kam dopadalo laserové světlo, a to na čtyřech řezech.

### **2.1.9. Statistické hodnocení**

Statistické hodnocení výsledků experimentů jsme prováděli v programech Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp., USA) a GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., USA). 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.

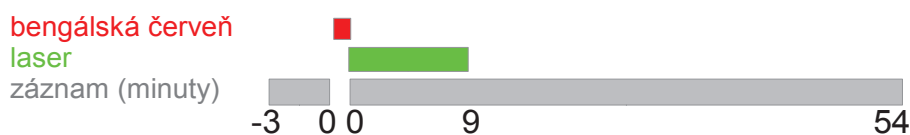
## **2.2. Speciální metodiky**

### **2.2.1. Experimentální model ischemie**

V této části práce jsme zavedli model fototrombotické ischemické léze v naší laboratoři, který jsme zvolili pro jeho dobrou reprodukovatelnost a pro předpokládanou velikost ischemického ložiska přiměřenou pro naše potřeby. Model jsme se rozhodli ověřit morfologicky a prozkoumat akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů během rozvoje ischemické léze. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – experimentální (12 zvířat) a kontrolní skupina (9 zvířat). V celkové anestézii (pentobarbital) po chirurgické přípravě (viz společné metodiky) byla naložena bipolární stimulační elektroda na levý n. ischiadicus, záznamové elektrody na obě primární

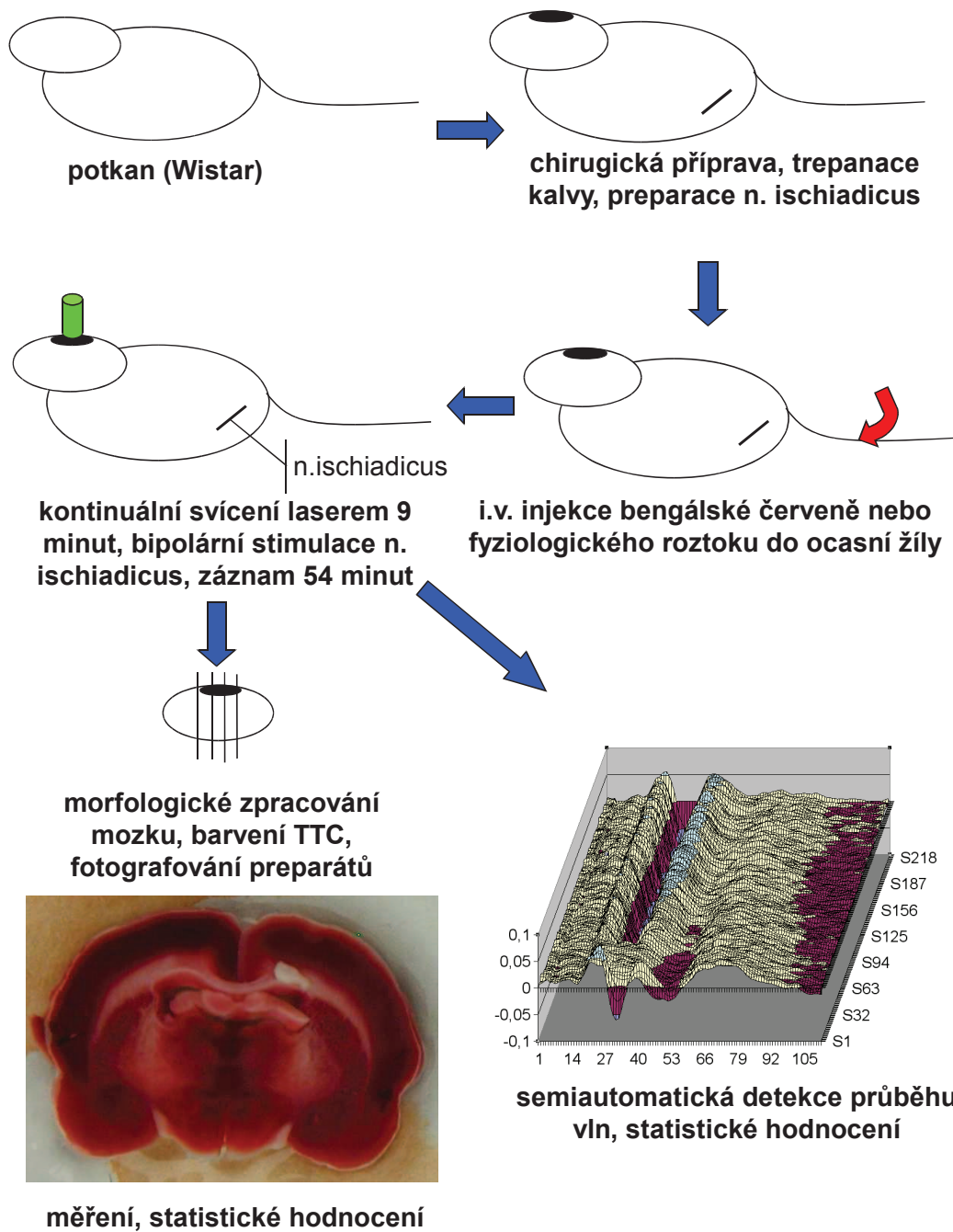
somatosensorické oblasti a referenční elektroda nad nosní kůstky a zvíře fixováno ve stereotaktickém přístroji.

U obou skupin bylo započato záznamem 3 minut evokovaných potenciálů. Stimulátor byl nastaven na 2,5 násobek hodnoty, při které začala být korová odpověď poprvé patrná. Stimulovali jsme obdélníkovým 1ms pulzem jednou za vteřinu. U experimentální skupiny byla systémově podána bengálská červeň, u kontrolní skupiny fyziologický roztok v odpovídajícím množství. Poté následovalo 9 minut ozařování primární projekční oblasti, celkový záznam trval 54 minut při vzorkovací frekvenci 1 kHz (Obr. 16, obr. 17). Po ukončení pokusu byla zvířata chirurgicky ošetřena suturou, abychom po 72 hodinách provedli morfologické zpracování mozku, jak uvedeno výše.



**Obr. 16:** Schéma záznamu somatosenzorických evokovaných potenciálů (šedivá) a časový vztah k injekci bengálské červeně (červená) a ozařování kůry laserem (světle zelená).

Rozsah léze na řezu byl měřen jako maximální plocha, kde bylo patrné nepochybné, byť sebemenší snížení sytosti barvení v místě, kde byl vytvořen trepanační otvor. Celkovou plochu léze jsme získali součtem plochy na čtyřech nejbližších řezech. Měření bylo provedeno manuálně pomocí grafického programu ImageJ 1.45 (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Hodnotitel neměl informaci o tom, ze které skupiny preparát pocházel. Pro statistické zpracování výsledků byl užit neparametrický test (Mann-Whitney U-test), protože jsme nepředpokládali normální rozložení hodnot. To navíc nelze na takto malém vzorku reálně testovat, resp. samotný test lze provést již se dvěma hodnotami, nicméně je to chybný postup [142].



**Obr. 17: Zjednodušené schéma průběhu experimentu: experimentální model ischemie a vliv ischemie na somatosenzorické evokované potenciály. Obrázek vytvořen autorem s použitím vlastních experimentální dat.**

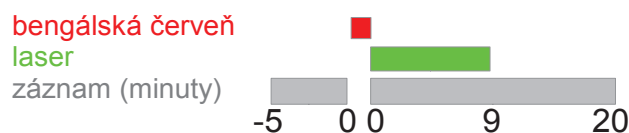
Elektrická odpověď v obou primárních somatosenzorických oblastech byla vyhodnocena pomocí programu, který byl za tímto účelem vytvořen a jehož bližší popis je v samostatné kapitole. Záznamy byly porovnány mezi experimentální a kontrolní skupinou, mezi levou a pravou hemisférou pomocí neparametrického testu (Mann-



Whitney U-test). Porovnání se záznamem před vyvoláním ischémie bylo porovnáno rovněž pomocí neparametrického testu (Wilcoxonův párový test).

V dalším experimentu, kde jsme hodnotili akutní změny jednotkových potenciálů v čase, jsme použili celkem 32 potkanů. Vzorkovací frekvence byla 10 kHz. Zaznamenávali jsme celkem dva kanály – jednotkové potenciály tenkou skleněnou elektrodou z hloubky 950 až 1500 mikrometrů pod povrchem kůry a ECoG z kontralaterální strany kuličkovou elektrodou v referenčním zapojení. Celkem bylo zaznamenáváno 5 minut spontánního záznamu, poté 9 minut během svícení laserovým světlem následováno dalšími 11 minutami, celkem 25 minut záznamu (Obr. 18). Zvířata byla rozdělena do tří skupin:

- 1) **SS**: svícení a záznam mikroelektrodou na stejné (ipsilaterální) straně (10 zvířat), kde bylo svíceno laserem,
- 2) **OS**: svícení a záznam mikroelektrodou na opačné (kontralaterální) straně (10 zvířat),
- 3) **SSKO**: svícení a záznam mikroelektrodou na stejné (ipsilaterální) straně, kde bylo svíceno, s aplikací fyziologického roztoku místo bengálské červeně (12 zvířat).



**Obr. 18:** Schéma záznamu jednotkových potenciálů (šedivá) a časový vztah k injekci bengálské červeně (červená) a iradiaci kůry laserem (světle zelená).

Změny v jednotkových potenciálech byly vyhodnoceny pomocí programu, který byl za tímto účelem vytvořen a jehož bližší popis je opět v samostatné kapitole.

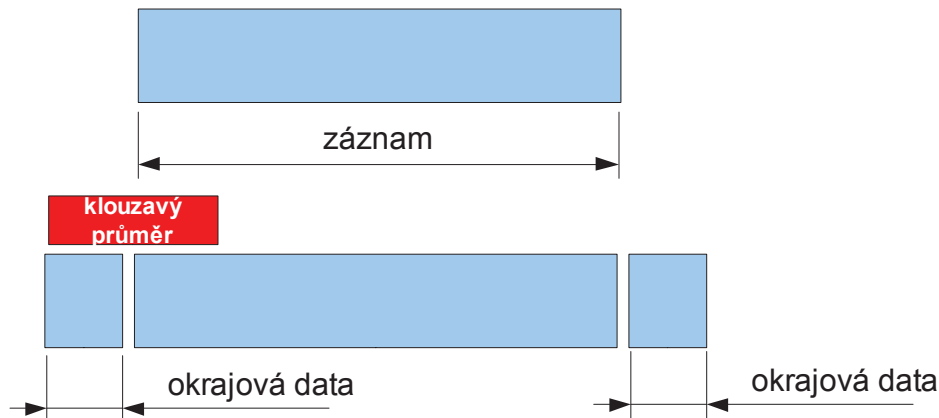
### 2.2.2. Analýza evokovaných potenciálů v čase

Abychom mohli analyzovat záznam evokovaných potenciálů v čase (t.j. kontinuálně v rozsahu celého 54-minutového záznamu), museli jsme navrhnout a vytvořit vlastní program. Ten byl implementován v programovacím jazyce C++. Výpočty probíhaly na PC s procesorem AMD Sempron 3000+ a 512MB RAM.

Pro hodnocení záznamů evokovaných potenciálů zpravidla zprůměrováváme více odpovědí na daný stimulus – vizuální, zvukovou, elektrickou či magnetickou stimulaci atp. Základním parametrem, který musíme stanovit při vytváření evokovaného potenciálu z více odpovědí, je jejich počet, ze kterého zprůměrováním vytvoříme jeden evokovaný potenciál. Jedná se o kompromis mezi kvalitou evokovaného potenciálu ve smyslu potlačení okolního šumu, zachycením okamžitých změn jeho tvaru (časového rozlišení) a délkou záznamu. Při zkracování zprůměrovávaného úseku postihneme změny latence a amplitudy komponent evokovaného potenciálu v kratším časovém okně, naopak při prodlužování tohoto úseku snížíme podíl šumu.

Dalším problémem jsou okrajové datové body ve vzdálenosti poloviny šíře okna od začátku a konce, které lze řešit redundancí dat (Obr. 19). Před působením sledované

proměnné začneme záznamem délky poloviny šíře okna. Totéž přidáme na konec záznamu.



Obr. 19: Schéma řešení okrajových bodů při výpočtu klouzavého průměru přidáním redundantních okrajových dat v délce poloviny šíře klouzavého průměru. Vlastní ilustrace.

Výpočetní složitost klouzavého průměru roste lineárně s počtem datových bodů  $O(n)$ . V praxi, kde předpokládáme kontinuální změny parametrů evokovaného potenciálu (latence a amplitudy vln), není nezbytně nutné počítat klouzavý průměr v každém datovém bodě (např. po jedné vteřině), ale v rozmezí zlomku délky, ze které se klouzavý průměr vypočítává. Tím snížíme i počet bodů vstupujících do dalšího stupně postprocessingu a zároveň zamezíme, aby rozdíly mezi sousedními záznamy byly příliš velké.

#### Vyjádření „kvality“ nalezeného průběhu vlny:

Pro výpočet „kvality“ (tzv. „ceny“) dosaženého řešení je nutno stanovit algoritmus, abychom mohli mezi sebou jednotlivá řešení porovnat. Pro zjednodušení uvádíme námi navržený výpočet „ceny“ následujícím pseudokódem:

```
yy = y * import_factor + import_shift [nastavení měřítka osy y]
xx = weighted_average (current_frame - zone_to_current_frame + zone, peak_time *
normal_dist (current_peak, sigma(time)), peak_time) [vážený průměr v ose x]
yyy = (normal_dist(xx, sigma(peak), time)) [vážený průměr v ose y]
peak_value= (yyy + frame_time) * yy [přepočet hodnoty bodu]
```

kde *import\_factor*, *import\_shift*, *sigma(time)*, *sigma(peak)*, *zone* jsou zvolené konstanty, *current\_frame*, *frame\_time*, *y*, *peak\_time*, *time* jsou proměnné z datového pole, *weighted\_average()*, *normal\_dist()* jsou příslušné funkce.

Kromě toho jsou bonifikovány (násobeny zadanou konstantou: *peak\_bonus*, *selected\_bonus*) vlastnosti lokálních extrémů následujícím způsobem:

- Oboustranné ustupování lokálního extrému: \* *peak\_bonus* za každý krok oběma směry od zkoumaného bodu
- Cesta prochází vybraným lokálním extrémem: \* *selected\_bonus*.

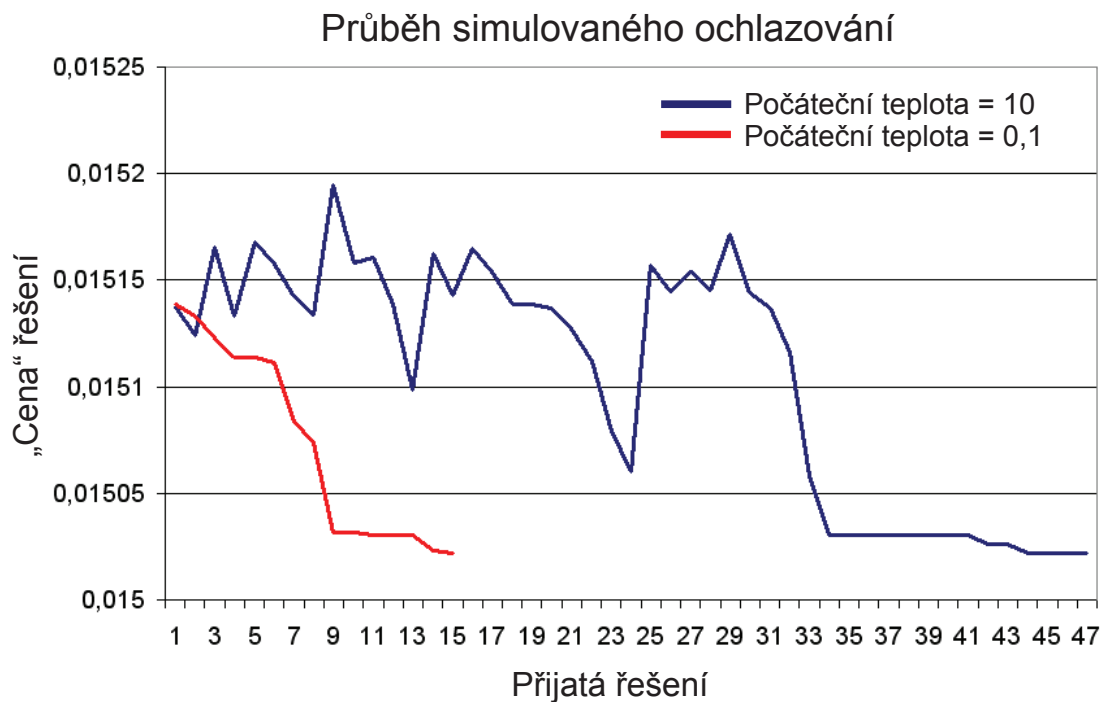
A některé naopak penalizovány (děleny zadanou konstantou: *border\_penalty*):

c) Penalizace za překročení stanovené hranice latence: / *border\_penalty*.

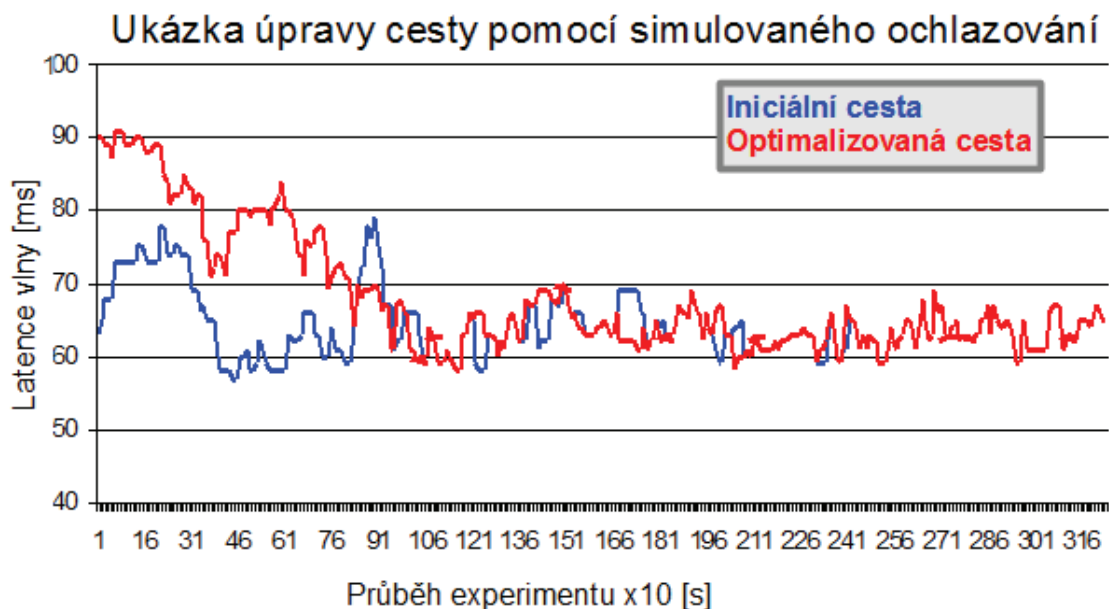
Konstrukce iniciálního řešení probíhá “greedy” algoritmem, rovněž známým pod pojmem nejbližší soused (nearest neighbour). Od zvoleného bodu, který byl manuálně nalezen v kterémkoliv ze sestavených evokovaných potenciálů, hledáme na obě strany postupně nejbližšího souseda ve smyslu optimalizačního kritéria [143].

K optimalizaci iniciálního řešení byla zvolena metaheuristika simulované ochlazování [87], která nejvíce vyhovovala zvolenému zadání. Její název je odvozen od podobnosti s žíháním oceli. Základní myšlenkou je to, že pravděpodobnost přijetí stavu s vyšší cenou řešení (horší kvalita řešení) se postupně (exponenciálně) snižuje. Jednoduše řečeno to znamená, že na začátku má algoritmus větší volnost procházet i horší řešení, aby přes ně našel cestu k ještě lepším řešením (Obr. 20, obr. 21). Jedná se o mechanismus, který zabraňuje uváznutí algoritmu v lokálním minimu. Jeho myšlenku lze vyjádřit následujícím pseudokódem:

```
t = POČÁTEČNÍ_TEPLOTA;
nejlepší_stav = počáteční_řešení;
do {
    iterace = 0;
    do {
        najdi nový_stav;
        delta = cena (nový_stav) - cena (poslední_stav);
        if delta < 0 or random() < exp(-delta/t) then poslední_stav = nový_stav;
        if cena(nejlepší_stav) < price(poslední_stav) then nejlepší_stav =
            poslední_stav;
        iter++;
    } while (iterace < MAXIMÁLNÍ_POČET_ITERACÍ);
    t = koeficient_ochlazování * t;
} while (T > TEPLOTA_TUHNUTÍ);
```



Obr. 20: Ukázka průběhu simulovaného ochlazování. Červeně: průběh algoritmu při počáteční teplotě 0,1. Modře: průběh algoritmu při počáteční teplotě 10. Na ose x jsou jednotlivé kroky. Na ose y je výpočet optimalizačního kritéria („cena“) daného řešení. Vlastní ilustrace s použitím vlastních experimentálních dat.



Obr. 21: Ukázka úpravy cesty pomocí algoritmu simulovaného ochlazování. Na ose y je latence od stimulačního podnětu, na ose x je pořadové číslo akčního potenciálu (po deseti vteřinách). Počáteční cesta je modře. Optimalizovaná cesta je červeně. Vlastní ilustrace s použitím vlastních experimentálních dat.

Vstupní data jsou ve formátu CFS (CED Filling System), což je binární formát, ve kterém jsou primárně zaznamenávána v akvizčním programu Signal. Pro čtení souborů toho typu byla využita knihovna, která je volně ke stažení ze stránek Cambridge Electronic Design, Ltd. Výstupní data z programu jsou v tabulce s hodnotami oddělenými tabulátorem, aby šla přímo importovat do tabulkových kalkulačků pro další (statistické) zpracování.

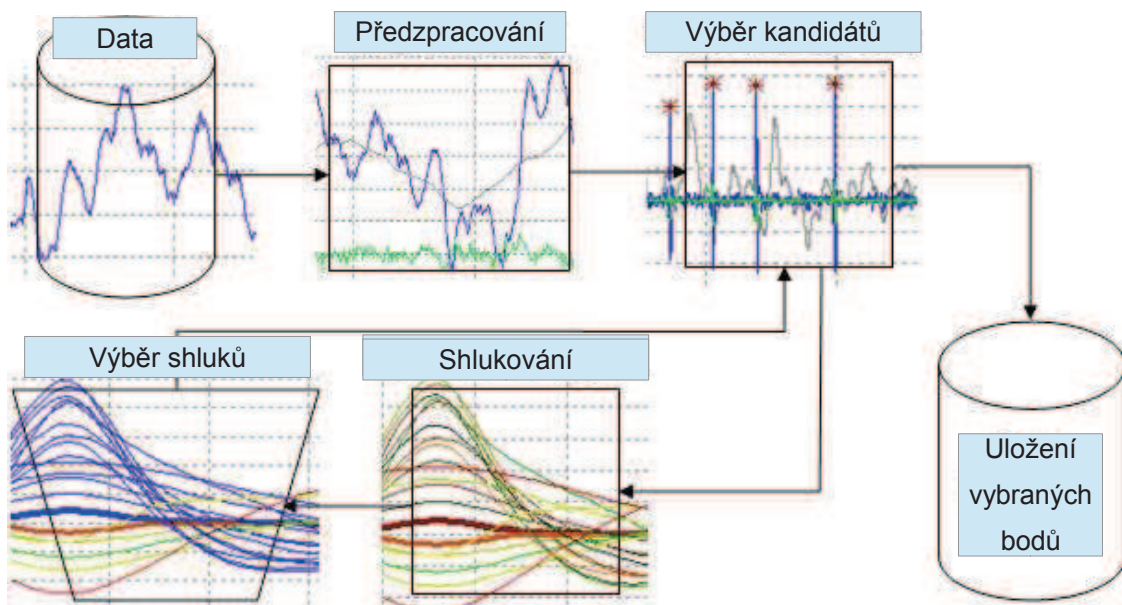
Velký důraz byl kladen na přehledné grafické uživatelské rozhraní programu („usability“) oddělením skupin souvisejících prvků, zvolenou velikostí a tvarem jednotlivých ovládacích a zobrazovacích prvků. Vývoj a ladění programu jsme provedli s použitím experimentálních dat z naší laboratoře.

Kontrolu správnosti implementace algoritmu jsme ověřovali graficky porovnáním s předpokládaným průběhem komponenty akčního potenciálu v trojrozměrném grafu.

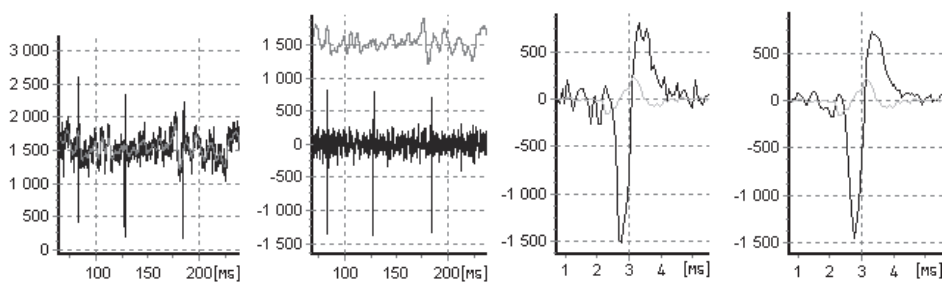
### **2.2.3. Analýza jednotkových potenciálů v čase**

Pro hodnocení nestacionárního záznamu jednotkových potenciálů (aktivity jednotlivých nervových buněk) v délce 20 minut jsme byli nuceni navrhnout a vytvořit program pro jejich vyhledávání a třídění. Ten byl rovněž implementován v jazyce C++. Výpočty probíhaly na stejném stroji, jak je uvedeno výše. Algoritmus byl implementován ve třech krocích [144].

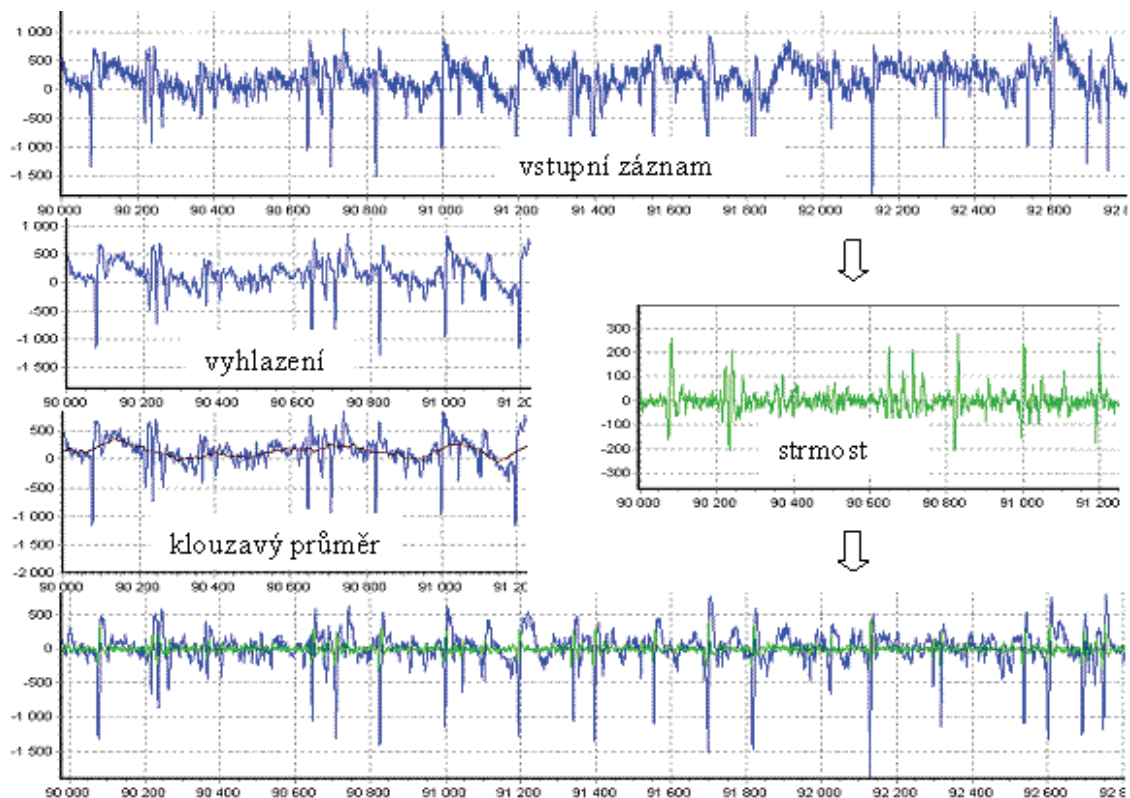
V prvním kroku probíhá předzpracování (preprocessing) dat (Obr. 22, obr. 23, obr. 24). Nízké frekvence jsou potlačeny odečtením klouzavého průměru (t.j. plovoucí nuly, „baseline“) od záznamu. Šíři okna pro výpočet klouzavého průměru jsme stanovili minimálně jako trojnásobek hledaného jednotkového potenciálu, který v našem případě typicky trval 1,2 ms, resp. 12 datových bodů. Průměrovaný interval 36 datových bodů nám dává „cut-off“ frekvenci kolem 100 Hz. Vyhlazení záznamu probíhá nahrazením datového bodu průměrem tohoto bodu, předcházejícího a následujícího bodu, tj. v okolí  $\pm 0,1$  ms.



**Obr. 22:** Postup vyhledávání a třídění jednotlivých potenciálů v implementovaném programu. Vlastní experimentální data.

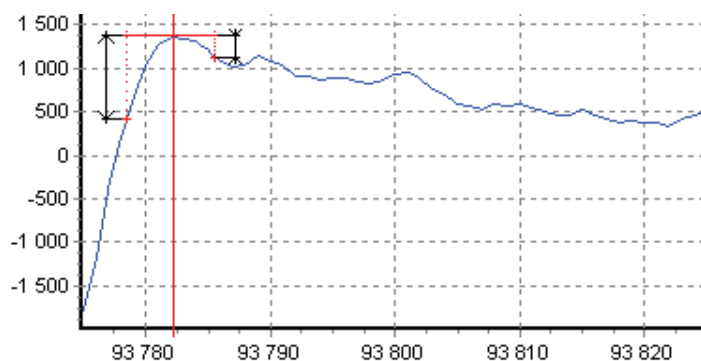


**Obr. 23:** Předzpracování záznamu: odečtení základní čáry (baseline, klouzavý průměr) a vyhlazení záznamu. Výchylka je uvedena v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů). Vlastní experimentální data.



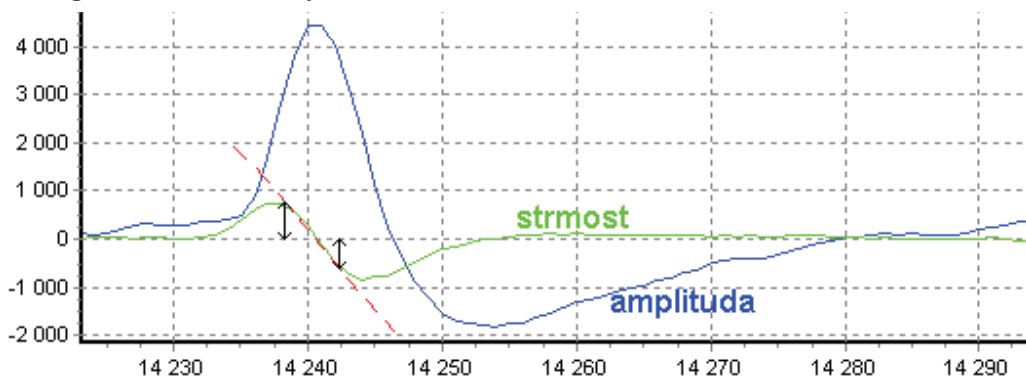
**Obr. 24:** Schéma postupu předzpracování záznamu, jak se zobrazuje na ovládacím panelu programu. Po načtení záznamu program provede vyhlazení záznamu, odečtení základní čáry a vypočítá a zobrazí strmost. Výchylka osy y je v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů). Pomocné úsečky na ose x jsou po 20ms (osa x udává pořadové číslo datového bodu při vzorkovací frekvenci 10kHz). Signál je modře, strmost zeleně, základní čára šedivě. Vlastní experimentální data.

Cílem druhého kroku je snížit na minimum počet datových bodů vstupujících do kroku třetího, který je výpočetně nejsložitější. Algoritmus vyhledává body, které se dle svých charakteristik a charakteristik svého okolí nejvíce blíží jednotkovému potenciálu. Body, které daná kritéria splňují, jsou s největší pravděpodobností hroty, které hledáme. Z charakteristik jsme vybrali ty, které nejlépe pomáhají odlišit jednotkový potenciál od šumu na pozadí. Jedná se o amplitudu, strmost a symetrii stanovené v místech lokálních extrémů.



Obr. 25: Symetrie hrotu. Pod pojmem symetrie rozumíme poměr rozdílu amplitudy lokálního extrému a amplitudy v definované vzdálenosti před a za tímto extrémem. V tomto případě je hodnota okolo 3. Signál je modře. Výchylka je uvedena v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů). Pomocné úsečky na ose x jsou po 1ms (osa x udává pořadové číslo datového bodu při vzorkovací frekvenci 10kHz). Vlastní experimentální data.

**Kritérium strmosti a symetrie** (Obr. 25, obr. 26): Strmost je definována jako první derivace křivky v bodě ( $dx/dy$ ), v našem nespojitém signálu lépe  $\partial x/\partial y$  či  $x_{k+i/2} - x_{k-i/2} / y_{k+i/2} - y_{k-i/2}$ , kde  $i$  odpovídá šířce okolí bodu. Vzhledem k ekvidistančnímu vzorkování a konstantní (definované) délce okolí  $i$  bodu lze výpočet zjednodušit na  $x_{k+i/2} - x_{k-i/2}$ . Rozhodovacím kritériem ale není jen absolutní hodnota strmosti, důležitá je také symetrie strmosti. Výrazně asymetrické hodnoty svědčí spíše pro artefakt. Jako kritérium symetrie volíme poměr strmosti před a po vyšetřovaném bodu a naopak, který by neměl přesáhnout zvolenou hodnotu. V našich záznamech se jeví vhodné hodnoty multiplikativní konstanty v oboru  $\langle 6; 10 \rangle$ .



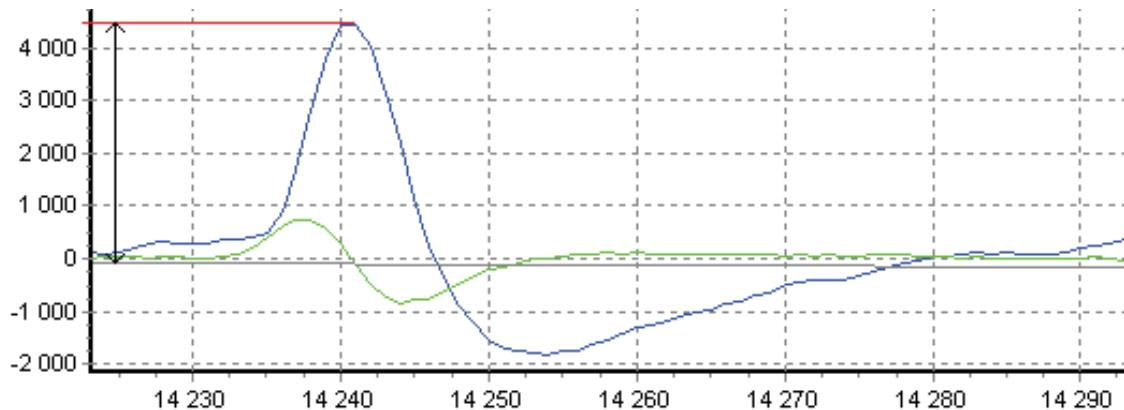
Obr. 26: Strmost hrotu. Signál je modře, strmost zeleně. Křivka strmosti zobrazuje rozdíl amplitudy dvou sousedních bodů, strmost je měřena v definované vzdálenosti před a za extrémem amplitudy signálu. Výchylka je uvedena v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů). Pomocné úsečky na ose x jsou po 1ms (osa x udává pořadové číslo datového bodu při vzorkovací frekvenci 10kHz). Vlastní experimentální data.

**Kritérium amplitudy** (Obr. 27): Amplituda je y-ová výchylka od základní čáry (baseline). Představuje další základní kritérium pro výběr bodu. V našem případě je definovaná jako průměrná amplituda bodu a jeho okolí o poloměru  $i$ ,

$$\left( \sum_{j=-i}^i y_j \right) / (2i+1)$$



které samozřejmě může mít i nulovou vzdálenost. Vzhledem k tomu, že se při výpočtu velikost okolí bodu nemění, je možné při vzájemném porovnávání amplitud vypustit dělení.



Obr. 27: Amplituda hrotu. Amplituda je definovaná jako y-ová výchylka ve vyhlazeném záznamu po odečtení základní čáry (baseline). Signál je modře, strmost zeleně, základní čára šedě. Výchylka je uvedena v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů). Pomocné úsečky na ose x jsou po 1ms (osa x udává pořadové číslo datového bodu při vzorkovací frekvenci 10kHz). Vlastní experimentální data.

**Kritérium lokálního extrému (hrotu):** Extrém funkce je definován jako bod, ve kterém nabývá první derivace nulové hodnoty. Tak tomu je i u ekvidistantně vzorkovaného signálu. Derivaci nahradíme strmostí (viz „Kritérium strmosti“) a můžeme konstatovat, že lokální extrém nalezneme mezi dvěma body, pro které platí, že strmost jejich okolí nabývá opačného znaménka. Vzhledem k odlišné definici okolí u kritéria strmosti a amplitudy nemusí být maximum záznamu ani v jednom ze zúčastněných bodů. Může být umístěno v jeho bezprostřední blízkosti. Přesné vystředění extrému nebo maximální hodnoty je nezbytné v další fázi při porovnávání a shlukování jednotlivých úseků záznamu.

Jak amplituda, tak strmost jsou reprezentovány rozmezím hodnot a jsou vypočítávány ve vztahu k okolí s nastavitelnou šíří, typicky  $\pm 5$  datových bodů, tj.  $\pm 0,5$  ms v našem případě. Na konci druhého kroku je počet potenciálních kandidátů na jednotkové potenciály zmenšen na zlomek původní hodnoty. Vyhledávání bodů nemusí vždy napoprvé dopadnout nejlépe. Záznamy se mezi sebou liší, proto je nutné u každého záznamu nastavit „rozlišovací úroveň“ podle aktuálního tvaru, charakteru šumu, amplitudy hrotů atd. K tomu nám mohou pomoci předpočítané statistiky, jako je průměrná amplituda a průměrná strmost, které jsou počítány při prvním načtení záznamu. Obecně vzato, kritéria výběru by měla mít raději větší senzitivitu než specificitu. Falešně pozitivní body je možné následně odhalit v dalším kroku při shlukování grafoelementů. Nicméně, pokud si zvolíme zbytečně velký počet bodů, bude výpočet další části trvat déle.

Poslední třetí krok zahrnuje shlukování a je závislý na vnějším (interaktivním) vstupu. Cílem je přiřadit hroty vybrané ve druhém kroku k určitému množství nejbližších vzorů. Toto umožňuje postihnout variabilitu akčních potenciálů v čase a rozlišit odlišné

typy, resp. aktivitu několika různých buněk. Shlukování se provádí na síti RBF dle algoritmu k-means. Ten přiřazuje dané vektory  $x_1, x_2 \dots x_m$ , obsahující  $n$  komponent (datové body jednotlivých hrotů) nejbližšímu shluku. Shluk, který má nejmenší vzdálenost od daného vektoru, je upraven proporcionalně ke své síle, tj. počtu již přiřazených vektorů. To rovněž zaručuje konvergenci algoritmu. Lineární vzdálenost mezi vektory je definována jako

$$\|x_1, x_2\| = \sum_{i=1}^m |x_{1,i} - x_{2,i}|$$

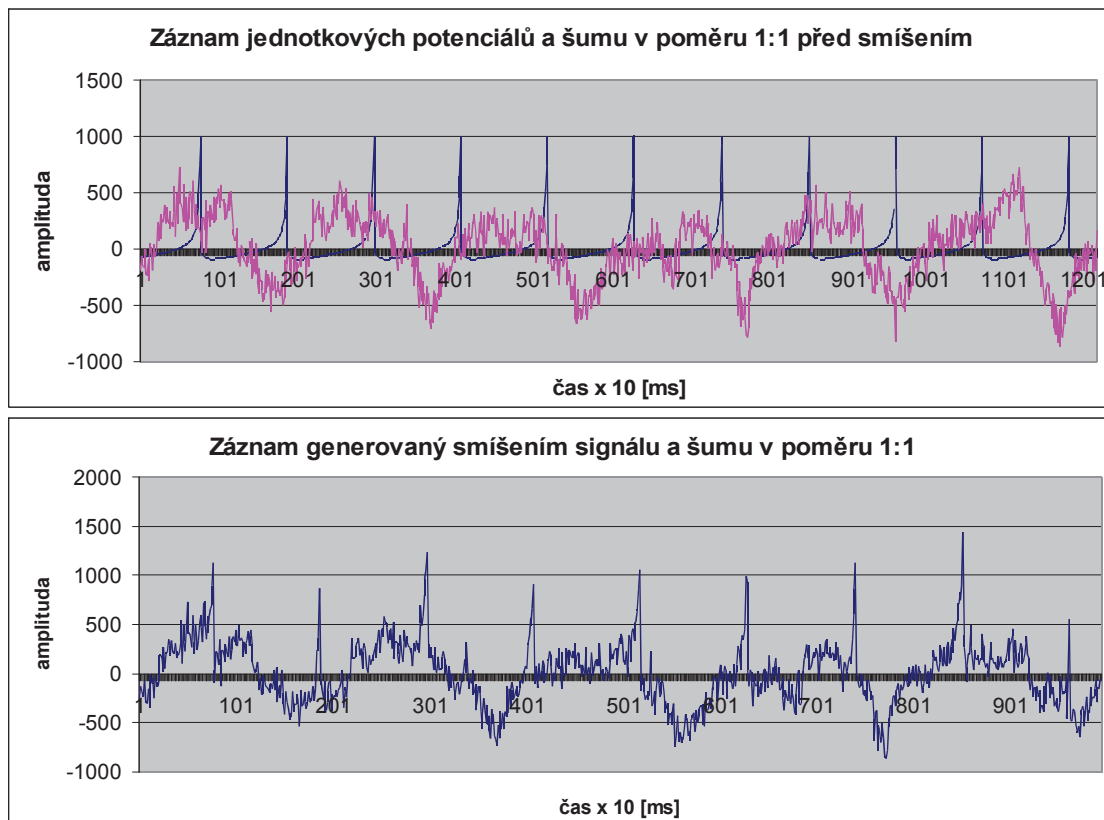
a nejbližší vektor je ten, který má nejmenší vzdálenost od daného shluku.

Vzhledem k tomu, že nelze dopředu zhodnotit rozmanitost typů akčních potenciálů, není počet shluků implicitně závislý na jejich rozdílnosti, ale je nastavený předem. Pokud je vzdálenost mezi dvěma nejbližšími vzory menší než vzdálenost zařazovaného vektoru a jeho nejbližšího vzoru, vytvoří se z daného zařazovaného vektoru vzor nový. Pokud počet vzorů překročí limit, který je explicitně zadán, dva nejbližší se spojí do jednoho a nový vzor vznikne proporcionalně k síle každého z původních (tj. proporcionalně k počtu již přiřazených vektorů). Další osud shluků je interaktivně určen v programu podle jejich tvaru a počtu přiřazených hrotů, jak je v grafickém uživatelském rozhraní přehledně zobrazeno (Obr. 43). Shluky, které nemají tvar typický pro jednotkový potenciál, mohou být jednoduše vypuštěny. Shlukování pak může být opakováno s tím, že každé další následující roztřídění shluků je vždy jemnější.

Vývoj a ladění programu jsme opět provedli s použitím experimentálních dat z naší laboratoře.

Testování schopnosti algoritmu vyhledávat akční potenciály bylo prováděno na uměle vytvořeném záznamu délky 2 minut. Ten 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. 28). Výstup našeho programu jsme dále porovnali s deseti minutovými záznamy hodnocenými manuálně.

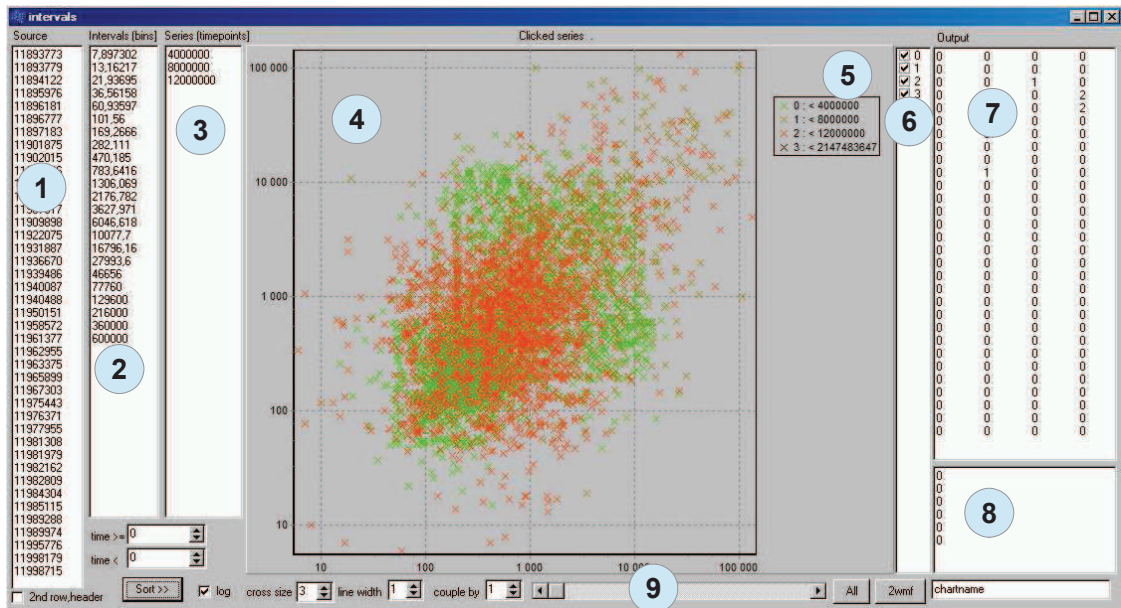
V rámci této části práce jsme rovněž testovali schopnost odlišit šum od jednotkového evokovaného potenciálu u sítě SOM (Self-Organizing Map, samoorganizující mapa) v aplikaci NeuralZOOM (Obr. 40), dále hybridní samoorganizující síť GAME (Group of Adaptive Models of Evolution) v programu vytvořeném na FEL ČVUT (Obr. 41) a síť Backpropagation se dvěma skrytými vrstvami v programu JavaNNS (Obr. 42).



**Obr. 28:** Záznam jednotkových potenciálů a šumu v poměru 1:1 před smíšením (nahore) a po smísení (dole). Na obrázku nahore jsou čisté jednotkové potenciály vyobrazeny modrou barvou a záznam bez jednotkových potenciálů (šum) barvou růžovou. Měřítko osy y je v arbitrárních jednotkách.

Distribuce jednotkových potenciálů byla porovnána s Poissonovým a logaritmicko-normálním rozložením kalkulovaných parametrů pomocí testu  $\chi^2$ .

Pro usnadnění hodnocení jednotkových potenciálů jsme vytvořili pomocný program, který zobrazuje intervaly mezi hroty (*inter-spike intervals*, ISI) vynesené do dvou os (ISI před hrotem a po hrotu) do tzv. poincaré grafu [145]. Program zobrazuje poincaré grafy v různých časových okamžicích po sobě, současně s barevným odlišením nebo tažením myši jako měnící se sekvenci (Obr. 29).



Obr. 29: Program pro zobrazení inter-spike intervals (ISI) do poincaré grafu v různých částech záznamu. Vstupní data se zadávají do sloupce 1: latence hrotů, 2: dělení intervalů do skupin histogramu a 3: dělení časové osy (průběhu experimentu). Dvourozměrný poincaré graf uprostřed ukazuje rozložení ISI (osa x: interval před hrotem, osa y: interval po hrotu). Bodům jsou přiřazeny barvy podle umístění na časové ose, jejíž části lze selektivně vybrat ve sloupci 6, nebo vybrat celou délku experimentu tlačítkem “All”, nebo postupně zobrazovat od začátku do konce tažením lišty 9. Grafy lze ukládat do grafického souboru tlačítkem “2wmf”. Sloupec 7 slouží pro export dat pro histogram rozložení ISI. Okno 8 zobrazuje statistiky z intervalů na časové ose (počet bodů, průměr a medián ISI). V ukázce byla použita vlastní data.

## 2.2.4. Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG

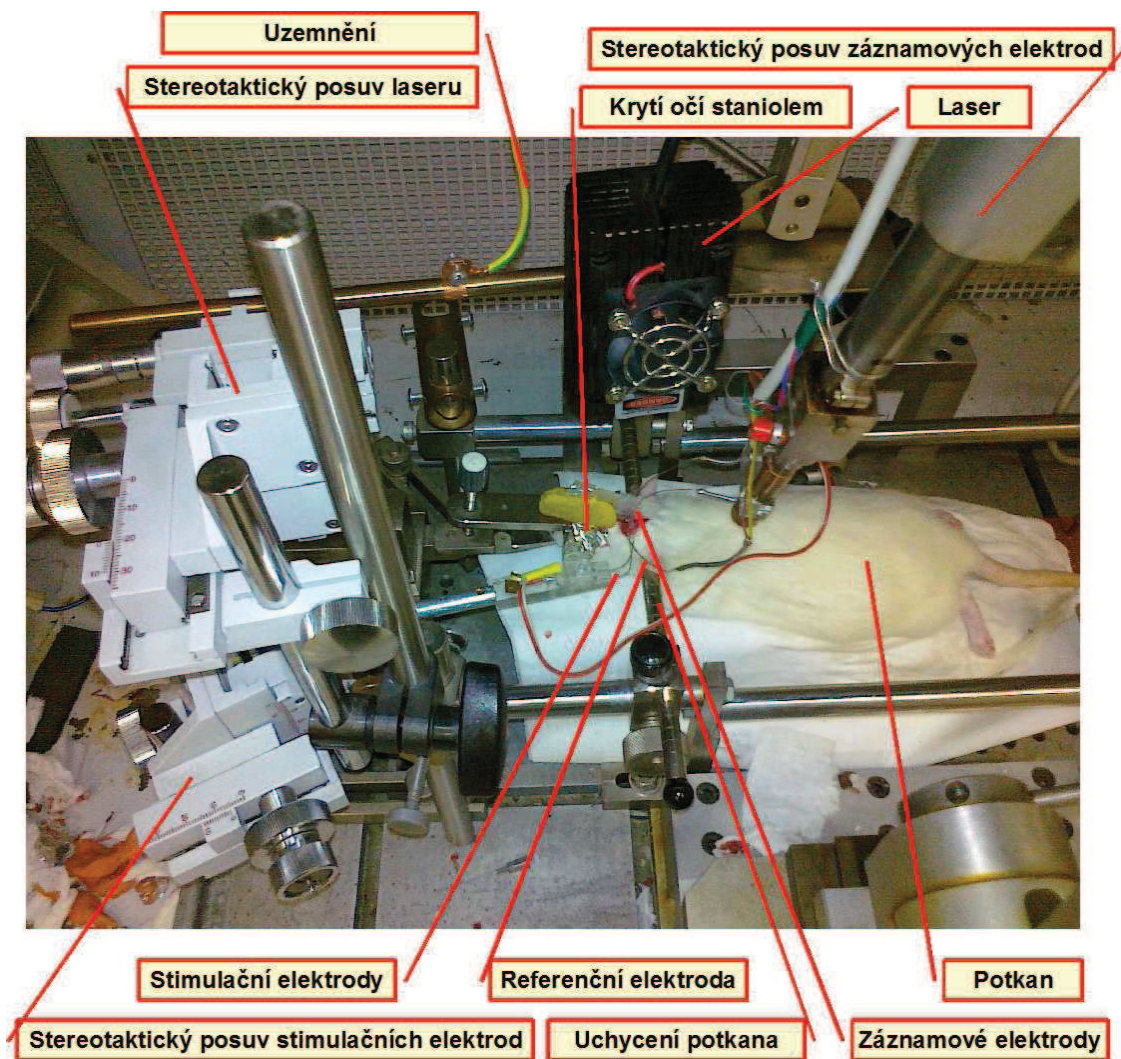
Pro studium vlivu přímého ozáření mozkové kůry laserem jsme provedli řadu in vivo experimentů. Ve všech byla použita anestezie xylazin + ketamin a chirurgická technika popsaná v obecné části. Během svícení laserovým světlem mělo zvíře zakryté oči a levou polovinu hlavy aluminiovou fólií tak, aby na ně nemohl nedopadat ani případný odraz laserového světla.

V první části experimentu probíhal první spontánní záznam, svícení laserem přes allobal a kalvu ještě před provedením trepanace na pravé straně (Obr. 30). Laserové světlo dopadalo na pravou primární somatosenzorickou oblast. V rámci experimentu bylo použito celkem 14 jedinců, z nichž tři během experimentu uhynuli, a jeden záznam byl nehodnotitelný pro artefakty. Vzorkovací frekvence byla 10kHz. Pro experiment byl navržen následující rozvrh:

- 1) spontánní záznam 2 minuty
- 2) stimulace laserovým pulsem přes allobal délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 3) stimulace laserovým pulsem přes kalvu délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 4) po provedení trepanace i na pravé straně pokračujeme spontánním záznamem délky 2 minuty z obou hemisfér

- 5) stimulace laserovým pulsem přímo na kůru délky 10ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 6) stimulace laserovým pulsem přímo na kůru délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 7) stimulace laserovým pulsem přímo na kůru délky 100ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 8) stimulace laserovým pulsem přímo na kůru délky 200ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 9) stimulace salvou laserových pulsů přímo na kůru délky 8 pulsů krát 10ms se zpožděním 10ms a rozestupy 10ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 10) stimulace salvou laserových pulsů přímo na kůru délky 16 pulsů krát 5ms se zpožděním 10ms a rozestupy 5ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 11) spontánní záznam 2 minuty
- 12) kontinuální stimulace laserovými pulsy přímo na kůru délky 70ms s rozestupy 130ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 13) kontinuální stimulace laserovými pulsy přímo na kůru délky 10ms s rozestupy 130ms, délka frame 400ms, celkem 250 frame
- 14) spontánní záznam 2 minuty
- 15) dvakrát kontinuální 8Hz stimulace laserovými pulsy přímo na kůry délky 50ms s rozestupy 75ms, po dobu 20s, délka záznamu celkem dvě minuty
- 16) po naložení bipolárních stimulačních elektrod do trepanačního otvoru na levé straně elektrická stimulace obdélníkovým pulsem délky 1ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 150 frame
- 17) elektrická stimulace obdélníkovým pulsem délky 1ms se zpožděním 10ms za konstantního svícení laserem, délka frame 400ms, celkem 750 frame
- 18) elektrická stimulace obdélníkovým pulsem délky 1ms se zpožděním 10ms, délka frame 400ms, celkem 150 frame
- 19) spontánní záznam 2 minuty

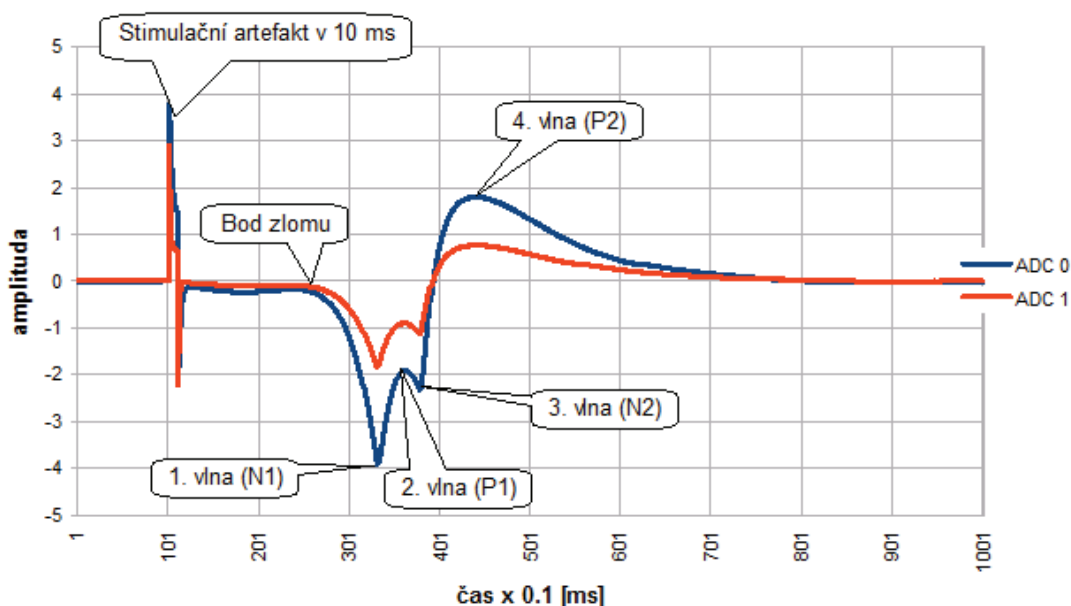
Na konci experimentu bylo zvíře chirurgicky ošetřeno a za 72 hodin provedeno morfologické zpracování mozku s barvením TTC.



Obr. 30: Vliv přímého ozáření kůry laserem na ECoG: uspořádání experimentálního prostoru. Obrázek vytvořen autorem.

Ze záznamů bylo provedeno ruční hodnocení vln jednotlivých komponent odpovědi na korovou elektrickou stimulaci s označením podle schématu na obr. 31:

### Odpověď na elektrickou stimulaci - označení komponent



Obr. 31: Označení komponent odpovědi na elektrickou korovou stimulaci. Barva záznamu znázorňuje stranové odlišení: červená vpravo (kam dopadalo laserové světlo), modrá vlevo (kde bylo stimulováno). Amplituda je v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů). Obrázek vytvořen autorem s použitím vlastních experimentálních dat.

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit t-test.

V druhé části experimentu (kontrolní skupina) bylo použito 8 zvířat. Vzorkovací frekvence byla 2kHz. V této části experimentu byly oba trepanační otvory vytvořeny již před záznamem dat. Rozvrh experimentu jsme stanovili takto:

- 1) spontánní záznam 2 minuty
- 2) stimulace laserovým pulsem přes alobal délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 2500ms, celkem 150 frame
- 3) stimulace laserovým pulsem přes papír délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 2500ms, celkem 150 frame
- 4) stimulace laserovým pulsem na kůru délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 2500ms, celkem 150 frame
- 5) čtyřikrát kontinuální 8Hz stimulace laserovými pulsy přímo na kůru délky 50ms s rozestupy 75ms, po dobu 20s, délka každého záznamu celkem dvě minuty
- 6) čtyřikrát kontinuální 8Hz korová stimulace elektrickými pulsy (bipolární elektroda, obdélníkový puls) 1ms, s rozestupy 124ms po dobu 20s, za kontinuálního svícení laserem, délka každého záznamu celkem dvě minuty [146].
- 7) spontánní záznam 2 minuty
- 8) kontinuální 8Hz stimulace laserovými pulsy přímo na kůru délky 50ms s rozestupy 75ms, po dobu celou dobu záznamu, délka frame 30s, celkem 20 frame.

Po ukončení vyšetření byla zvířata usmrcena prohloubením anestezie. K vyloučení nenáhodných jevů jsme u několika zvířat doplnili ruční spouštění pulsů.

**Ve třetí části experimentu** (druhá kontrolní skupina) jsme použili celkem 9 zvířat. Vzorkovací frekvence byla rovněž 2kHz. V této části experimentu byly rovněž oba trepanační otvory vytvořeny již před snímáním záznamu. Rozvrh experimentu jsme stanovili následovně:

- 1) spontánní záznam 2 minuty
- 2) stimulace laserovým pulsem přes neprůhledný plast délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 2500ms, celkem 150 frame
- 3) stimulace laserovým pulsem přes průhledný plast rozostřující laserové světlo délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 2500ms, celkem 150 frame
- 4) stimulace laserovým pulsem přímo na kůru délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 2500ms, celkem 150 frame
- 5) stimulace laserovým pulsem na kůru ze vzdálenosti 1 metr délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 2500ms, celkem 150 frame
- 6) spontánní záznam 2 minuty
- 7) kontinuální 8Hz stimulace laserovými pulsy přímo na kůru délky 50ms s rozestupy 75ms, po dobu celou dobu záznamu, délka frame 30s, celkem 20 frame.

Po ukončení vyšetření byla zvířata usmrcena prohloubením anestezie.

**Ve čtvrté části experimentu** jsme provedli podobný pokus jako ve třetí části, nicméně na rozkrojeném jablku. Účelem bylo zjistit, jaké má laserové světlo vliv na buňky, které nejsou považovány za excitabilní. Rozvrh experimentu jsme stanovili takto:

- 1) spontánní záznam 2 minuty
- 2) stimulace laserovým pulsem délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 500ms, celkem 100 frame
  - a) svícení z blízka k pravé registrační elektrodě
  - b) svícení z blízka k levé registrační elektrodě
  - c) svícení z blízka 3mm od levé registrační elektrody
  - d) svícení z blízka mezi levou a pravou registrační elektrodu
  - e) svícení z blízka na pravou registrační elektrodu přes neprůhledný plast
  - f) svícení z blízka na pravou registrační elektrodu tangenciálně
  - g) svícení z dálky k pravé registrační elektrodě
  - h) svícení z dálky mezi levou a pravou registrační elektrodu

**V páté části experimentu** jsme provedli podobný pokus jako ve čtvrté části, tentokrát byly elektrody zanořeny do umělé houby navlhčené fyziologickým roztokem. Rozvrh experimentu jsme stanovili takto:

- 1) spontánní záznam 2 minuty
- 2) stimulace laserovým pulsem délky 50ms se zpožděním 10ms, délka frame 500ms, celkem 100 frame
  - a) svícení z blízka k pravé registrační elektrodě
  - b) svícení z blízka mezi levou a pravou registrační elektrodu



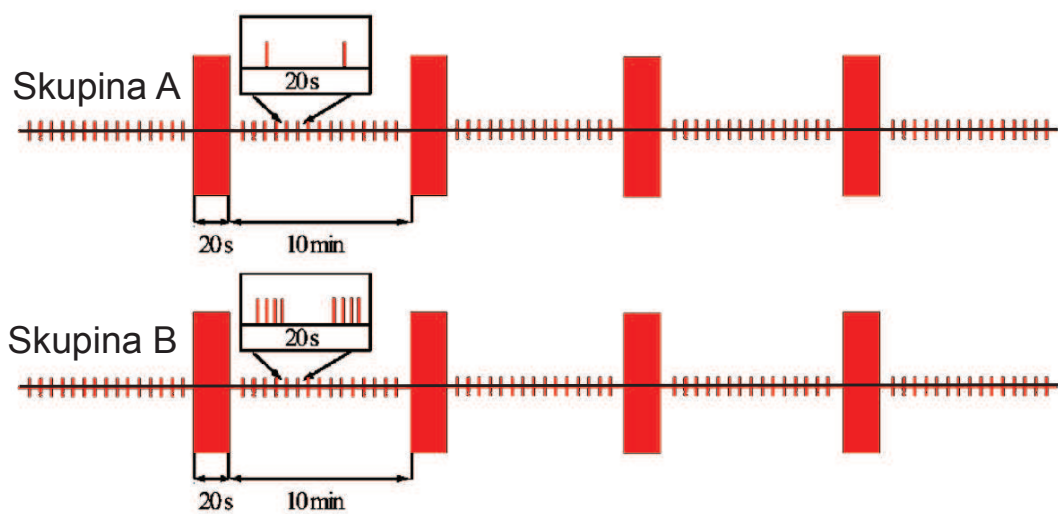
- c) svícení z blízka na pravou registrační elektrodu přes neprůhledný plast
- d) svícení z blízka na pravou registrační elektrodu tangenciálně
- e) svícení z dálky k pravé registrační elektrodě

V šesté části experimentu jsme na 4 potkanech provedli stejný experiment jako v první části, avšak se vzorkovací frekvencí 2kHz a bez ozařování přes kalvu či alobal. Na rozdíl od prvního experimentu byly oba trepanační otvory zhotoveny již před snímáním záznamu. Primárním cílem této části bylo morfologické zpracování mozkových řezů za použití fluorescenčního mikroskopu (Olympus<sup>Tm</sup>) v laboratoři prof. MUDr. Jaroslava Pokorného, DrSc., ve Fyziologickém ústavu 1. lékařské fakulty University Karlovy v Praze [61].

### 2.2.5. Průlom postiktální inhibice salvou pulsů o nižší intenzitě

V této části práce jsme testovali hypotézu, že krátká salva čtyř pulsů o nižší intenzitě než je intenzita pro vyvolání samotného epileptického záchvatu je schopna demaskovat přetrvávající hyperexcitabilitu mozkové tkáně na pozadí masivní inhibice, která je hlavním rysem postiktální inhibice. Celkem 18 zvířat bylo rozděleno do dvou skupin po devíti jedincích. Zvířata byla uvedena do injekční anestézie pentobarbitalem. Po chirurgické přípravě byly implantovány bipolární stimulační elektrody na povrch pravé somatosenzorické kůry, registrační elektrody na povrch somatosenzorické a zrakové kůry oboustranně. Elektrody byly vodivě spojeny s konektorem, který byl upevněn ke kalvě akrylátovou pryskyřicí.

Týden nato jsme provedli samotný experiment. Po záznamu 5 minut spontánního ECoG záznamu jsme určili práh pro evokované potenciály zvyšováním intenzity elektrické stimulace, než se objevila interhemisferická odpověď. Epileptický záchvat jsme v obou skupinách vyvolávali 8Hz stimulačními obdélníkovými pulsy o 5-násobné intenzitě než byl stanovený práh po dobu 20s. Na začátku a mezi těmito stimulačními pulsy jsme prováděli po dobu 10 minut stimulaci 2,5 násobkem stanoveného práhu u skupiny A jedním obdélníkovým pulsem a u skupiny B salvou čtyř obdélníkových pulsů o frekvenci 8Hz (Obr. 32). U obou skupin jsme měřili délku následného výboje po 20s stimulaci a vyhledávali následný výboj po interiktálních stimulačních pulsech. Během stimulačních pulsů jsme zaznamenávali změny chování zvířat (zejména ztrátu rovnováhy s pádem). Délku následného výboje po 20s stimulaci jsme porovnali mezi skupinami pomocí t-testu. Počet interiktálních následných výbojů jsme mezi skupinami porovnali pomocí U testu. Pro porovnání změn chování zvířat (ztráta rovnováhy) jsme použili  $\chi^2$  test.



Obr. 32: Schéma stimulačního protokolu. Zvířata ve skupině A byla mezi 20s stimulacemi (interiktálně) stimulována pouze jedním pulsem s odstupem 20s, zatímco zvířata ve skupině B salvou čtyř 8Hz pulsů. Vlastní ilustrace.

## 3. VÝSLEDKY

### 3.1. Morfologické ověření experimentálního modelu ischemie

Měření plochy postižené tkáně (Obr. 33) je přehledně shrnuto v tabulce (Tab. 2). Plocha výpadku barvení TTC byla u experimentální skupiny  $7,7 \pm 4,4 \text{ mm}^2$  a u kontrolní skupiny  $1,2 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ .

Tab. 2: Celková plocha postižené tkáně na jednomilimetrových řezech barvených TTC v  $\text{mm}^2$  v experimentální a kontrolní skupině.

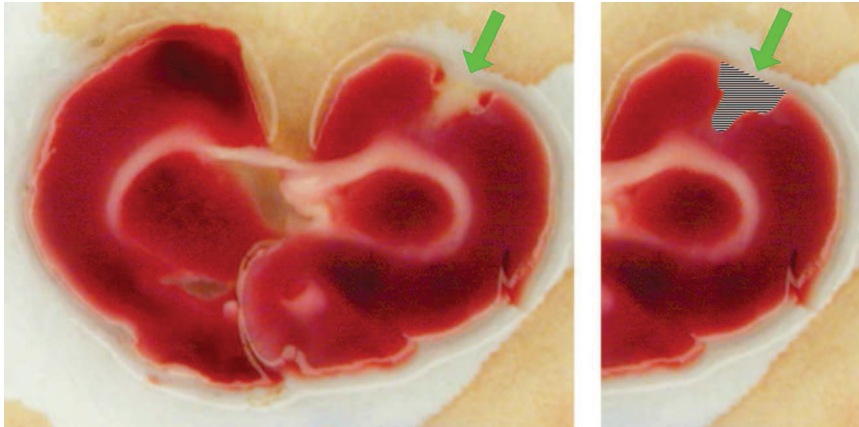
Celková plocha postižené tkáně při barvení TTC [ $\text{mm}^2$ ]												
Zvíře číslo	1	2	3	4	5	6	9	10	11	SUMA	Průměr	Medián
Experimentální skupina	14,75	3,76	15,16	5,58	8,02	5,16	7,92	4,76	4,18	69,29	7,7	5,58
Kontrolní skupina	0,81	1,41	0,72	2,46	1,58	0,61	2,29	1,07	0,27	11,22	1,2	1,07

Pro porovnání se studii jiných autorů je nutno provést přepočítání na objem jako plocha násobená šíří řezu, v našem případě 1mm. Formálně k testování normality rozložení naměřených hodnot dle D'Agostino & Pearson omnibus normality test jsou výsledky shrnuty v tabulce (Tab. 3). Nicméně, jak již bylo uvedeno, testování normálního rozložení na takto malém vzorku je zavádějící.

Tab. 3: Výsledky testování normality rozložení plochy postižené tkáně na 1 mm řezech barvených TTC v experimentální a kontrolní skupině.

Test normality rozložení		
Parametr	p hodnota	výsledek
Experimentální skupina	0,26 (n.s.)	normální rozložení
Kontrolní skupina	0,63 (n.s.)	normální rozložení

Pro testování statistické významnosti rozdílu (Mann Whitney U test) dostáváme p-hodnotu menší než 0,0001. Prokážeme tak, že model fototrombotické kortikální léze v naší laboratoři vytváří morfologicky patrnou lézi.

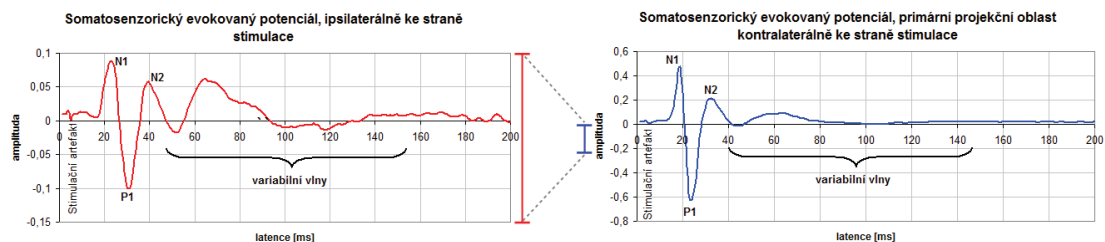


**Obr. 33:** Výpadek barvení TTC jako zn. fokální ischemie indukované fototrombózou. Zelená šipka označuje místo ozáření laserovým paprskem. Šrafovaná plocha vpravo zobrazuje rozsah ischemického ložiska.

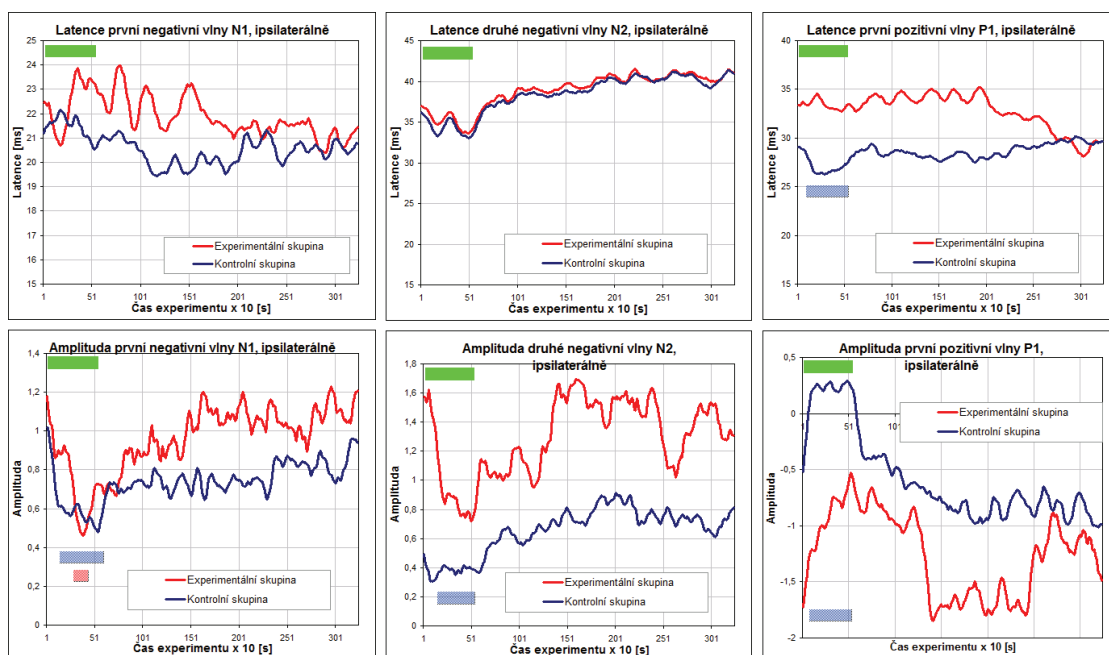
**Souhrn výsledků:** prokázali jsme, že model fototrombotické kortikální ischemické léze zavedený v naší laboratoři vytváří morfologicky detekovatelnou lézi. Morfologické ověření modelu ischemické léze ukázalo jeho účinnost a bylo základním předpokladem k dalším částem práce.

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

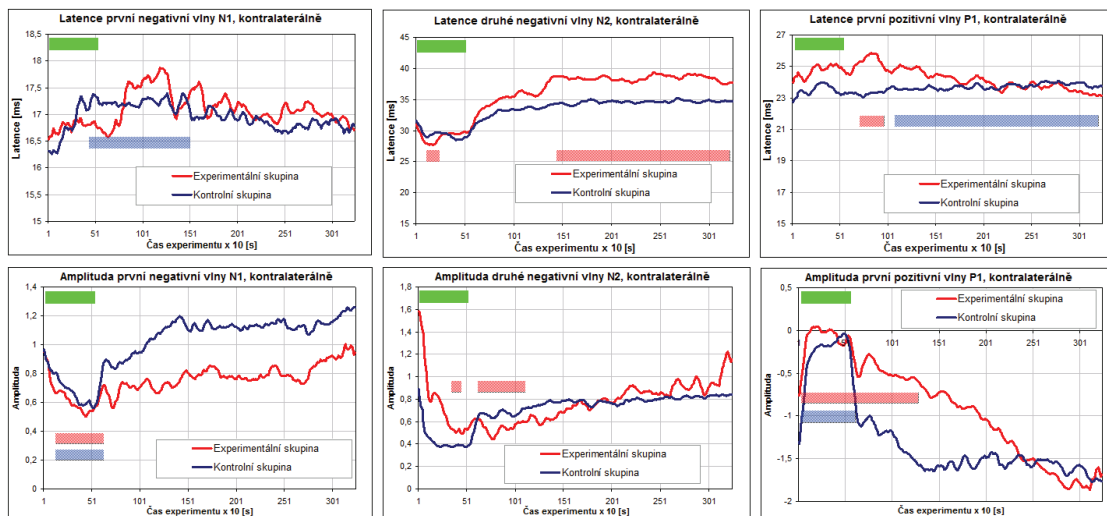
Výsledky tohoto experimentu jsou přehledně shrnuty na Obr. 35 a Obr. 36, které ukazují průběh latence a amplitudy první (N1) a druhé (N2) negativní vlny a první pozitivní vlny (P1) v čase (Obr. 34). Ukázalo se, že během iradiace dochází ke snížení amplitudy N1, N2 a P2 u kontrolní skupiny a N1 u experimentální skupiny na ipsilaterální straně vzhledem ke stimulaci n. ischiadicus. Na kontralaterální straně dochází ke snížení amplitudy během svícení u N1 a během a přechodně po svícení u N2 a P1 u experimentální skupiny. U kontrolní skupiny docházelo ke snížení amplitudy N1 a N2 pouze během svícení. Zkrácení latence na kontralaterální straně jsme pozorovali u experimentální skupiny u N2 na začátku svícení, prodloužení latence u N2 v druhé polovině záznamu a u P1 krátce po svícení. U kontrolní skupiny došlo k prodloužení latence u N1 přechodně po skončení iradiace a u P1 v druhé polovině záznamu. Uváděny jsou pouze statisticky významné změny ( $p < 0,05$ ) dle t-testu.



**Obr. 34: Somatosenzorický evokovaný potenciál – označení komponent: první a druhá negativní vlna N1 a N2, první pozitivní vlna P1. Vlevo záznam ipsilaterálně ke stimulaci n. ischiadicus, vpravo záznam kontralaterálně (primární projekční oblast). Amplituda je uváděna v arbitrárních jednotkách. Záznam ipsilaterálně (vlevo) má menší amplitudu a je oproti záznamu z primární projekční oblasti (vpravo) zvětšen 5x, aby byly vlny patrné. Vlastní ilustrace.**



**Obr. 35: Latence a amplituda komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu na straně ipsilaterální ke straně stimulace n. ischiadicus, tj. neozařované straně. Zelený proužek ukazuje dobu svícení laseru, modrý a červený proužek zase statistickou významnost změn amplitudy nebo latence jednotlivých vln oproti baseline. Amplituda je uváděna v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů).**



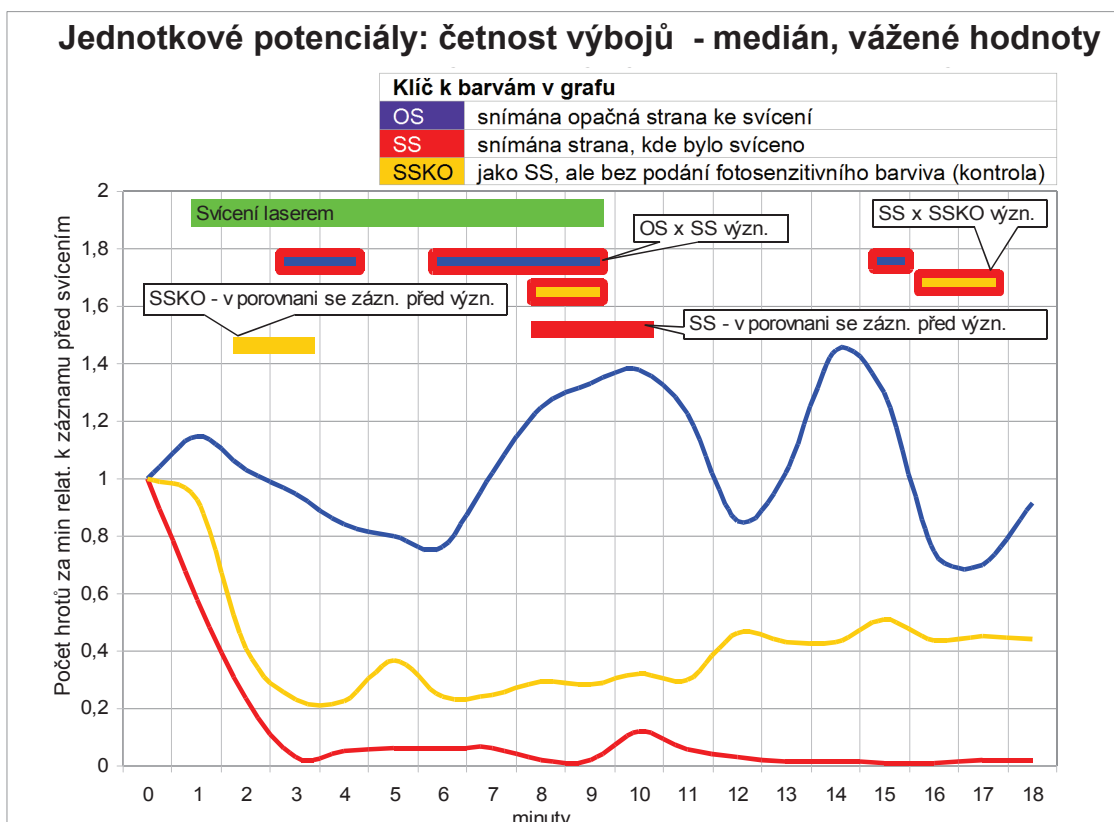
**Obr. 36: Latence a amplituda komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu na straně kontralaterální ke straně stimulace n. ischiadicus (primární projekční oblast), tj. ozařované straně. Zelený proužek ukazuje dobu svícení laseru, modrý a červený proužek zase statistickou významnost změn amplitudy nebo latence jednotlivých vln oproti baseline. Amplituda je uváděna v arbitrárních jednotkách (normalizace záznamů).**

Celkově shrnuto jsme v této části experimentu zjistili, že během osvětlení 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.

**Souhrn výsledků:** během rozvoje fototrombotické ischemické kortikální léze jsme prokázali změny latence a amplitudy komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu, které byly komplexního charakteru. Hlavním zjištěním bylo snížení amplitudy během rozvoje ischemické léze v experimentální ale i v kontrolní skupině, které dočasně přetrvávalo pouze v experimentální skupině.

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

Výsledky experimentu jsou přehledně shrnuty na Obr. 37. Na straně, kam dopadalo laserové světlo, došlo k poklesu četnosti jednotkových potenciálů, který byl významný u experimentální skupiny (SS) při konci svícení a u kontrolní skupiny (SSKO) na začátku svícení. Významně snížená byla jednotková aktivita u experimentální skupiny (SS) oproti kontrolní skupině (SSKO) ke konci svícení a na konci záznamu a oproti záznamu opačné strany (OS) během svícení a krátce i po svícení. Jak je vidět z grafu (Obr. 37), tak snížení aktivity na straně, kam dopadalo laserové světlo, nastává krátce po začátku svícení a u experimentální skupiny přetrvává, na rozdíl od kontrolní skupiny, kde je patrná tendence k návratu k výchozím hodnotám.



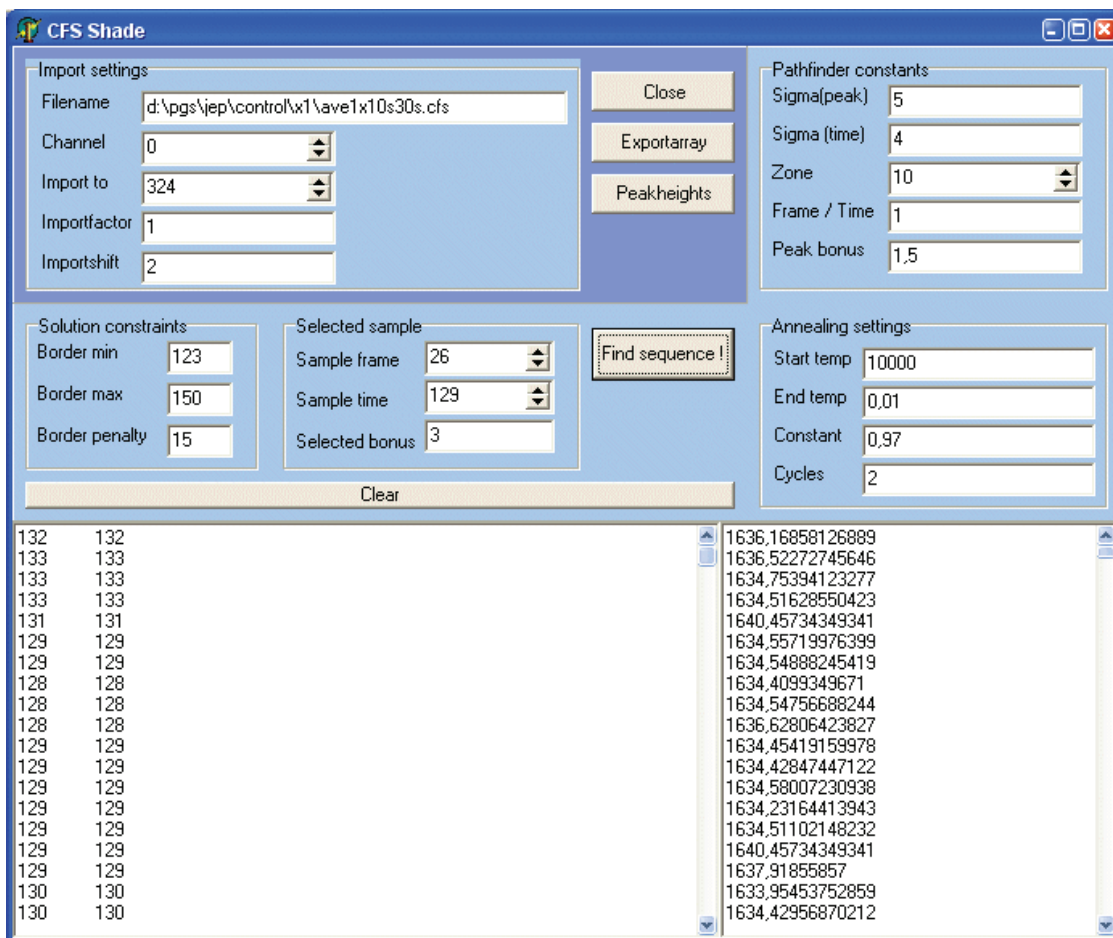
**Obr. 37:** Průběh aktivity jednotkových potenciálů během a po vzniku kortikální fototrombotické léze. Zeleně je vyznačena doba osvětlení kůry laserem. Další proužky označují statistickou významnost rozdílů mezi skupinami (dvě barvy) nebo v porovnání se záznamem před experimentálním zásahem (jedna barva). Klíč k barvám je umístěn pod nadpisem.

Obecně vzato, pouhým pohledem na Obr. 37 je patrné snížení aktivity na ozařované straně (SS, SSKO), které má u kontrolní skupiny (SSKO) tendenci po ukončení svícení k postupnému návratu k původním hodnotám, zatímco u experimentální skupiny přetrvává.

**Souhrn výsledků:** prokázali jsme změny aktivity jednotkových potenciálů během rozvoje ischemické kortikální léze vyvolané fototrombózou. Hlavním zjištěním bylo snížení jednotkové aktivity v průběhu svícení na ozařované straně u experimentální i kontrolní skupiny. U kontrolní skupiny byla po ukončení svícení patrna tendence k opětovnému návratu jednotkové aktivity.

### 3.4. Analýza somatosenzorických evokovaných potenciálů v čase

Výsledkem této části práce je program implementovaný v jazyce C++, jehož grafické uživatelské rozhraní je na Obr. 38.



Obr. 38: Grafické uživatelské rozhraní programu na vyhledávání komponent evokovaného potenciálu.

Program obsahuje tlačítka na spuštění následujících funkcí:

„**Export array**“: otevře soubor se zdrojovými daty v akvizičním formátu CFS, importuje data ze zadaného kanálu v počtu zadaných framů. Zobrazí data v levém okně a zkopíruje je do schránky Windows.

„**Peak heights**“: importuje amplitudy k časovým bodům z levého okna, zobrazí je v pravém okně.

„**Find sequence**“: hlavní funkce, přečte data (jako funkce „Export array“), nalezne počáteční řešení, které optimalizuje pomocí algoritmu simulovaného ochlazování. Výsledky zobrazí v levém okně a průběh simulovaného ochlazování v okně pravém.

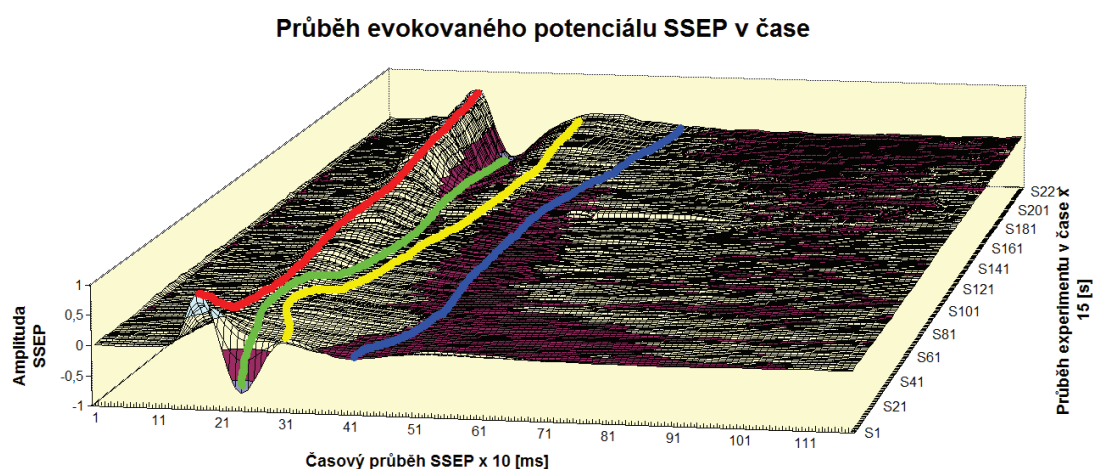
Kvalitu výstupu našeho programu lze stěží objektivně zhodnotit, jak již bylo naznačeno výše. Výsledek jsme proto hodnotili pouze porovnáním trojrozměrné rekonstrukce dat a vypočítaného řešení. Celkově jsme vyhodnotili průběh 108 negativních (N1 a N2) a 72 pozitivních (P1) vln (Obr. 34).

Konzistenci nalezeného řešení jsme ověřili porovnáním s grafickou trojrozměrnou interpretací (Obr. 39). V několika případech, kde jsme nebyli s řešením zcela spokojeni, jsme upravili parametry vyhledávání. Ve všech případech byla finálně nalezena správná



cesta v celém rozsahu. U 97% záznamů vedlo simulované ochlazování ke zlepšení iniciálního řešení. Nejvýraznější optimalizace iniciální cesty bylo dosaženo v místech, kde nebyl průběh vlny zcela jednoznačný, tj. zejména u poslední sledované komponenty (N2). To navíc zaručuje konzistenci provedeného hodnocení průběhu vlny.

Výsledkem a smyslem programu je nalezení průběhu komponenty evokovaného potenciálu v celé délce záznamu. Díky tomuto programu jsme mohli sestrojít grafy vývoje jejich latence a amplitudy v čase a tyto dále v celém rozsahu statisticky vyhodnotit (viz Obr. 35 a Obr. 36) a tak prokázat změny, které by nám při manuálním hodnocení pouze několika vybraných bodů zcela jistě unikly.

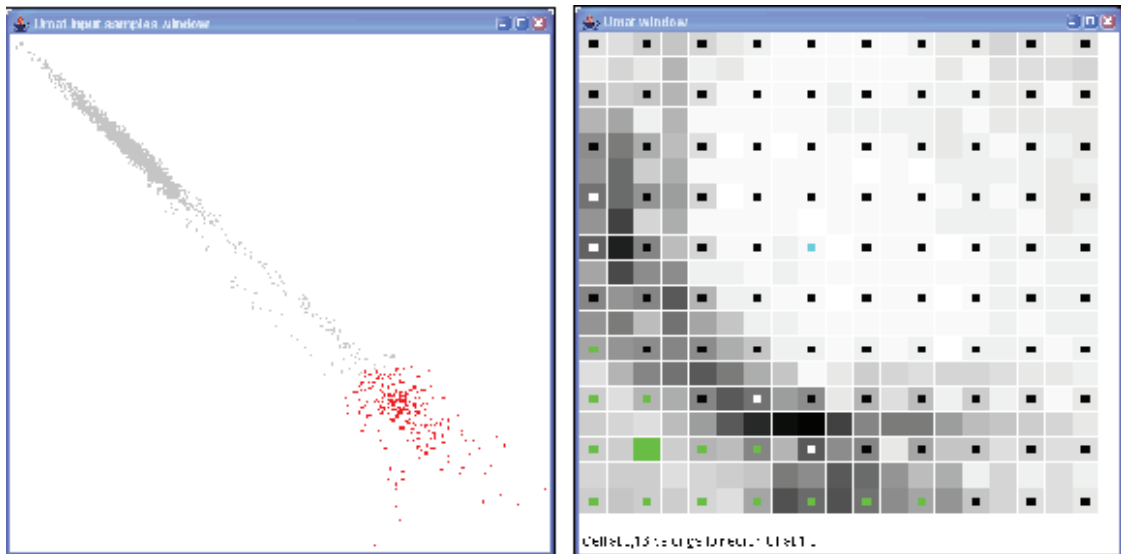


**Obr. 39:** Časový průběh jednotlivých komponent evokovaného potenciálu v průběhu celého experimentu a jejich porovnání s trojrozměrným grafem. Ze znalosti okolí lze nalézt komponentu evokovaného potenciálu v okamžiku, kdy je tato špatně vyjádřena např. v důsledku experimentálního zásahu. Červená a žlutá jsou první a druhá negativní vlna (N1, N2). Zelená a modrá jsou první a druhá pozitivní vlna (P1, P2).

**Souhrn výsledků:** podařilo se nám navrhnout a implementovat vlastní algoritmus využívající různých programovacích technik pro vyhodnocování průběhu vln evokovaného potenciálu v čase. Jedině díky němu jsme tak mohli vyhodnotit změny somatosenzorických potenciálů během vzniku fototrombotické ischemické korové léze ve všech zaznamenaných bodech, což by ručním hodnocením jinak nebylo možné.

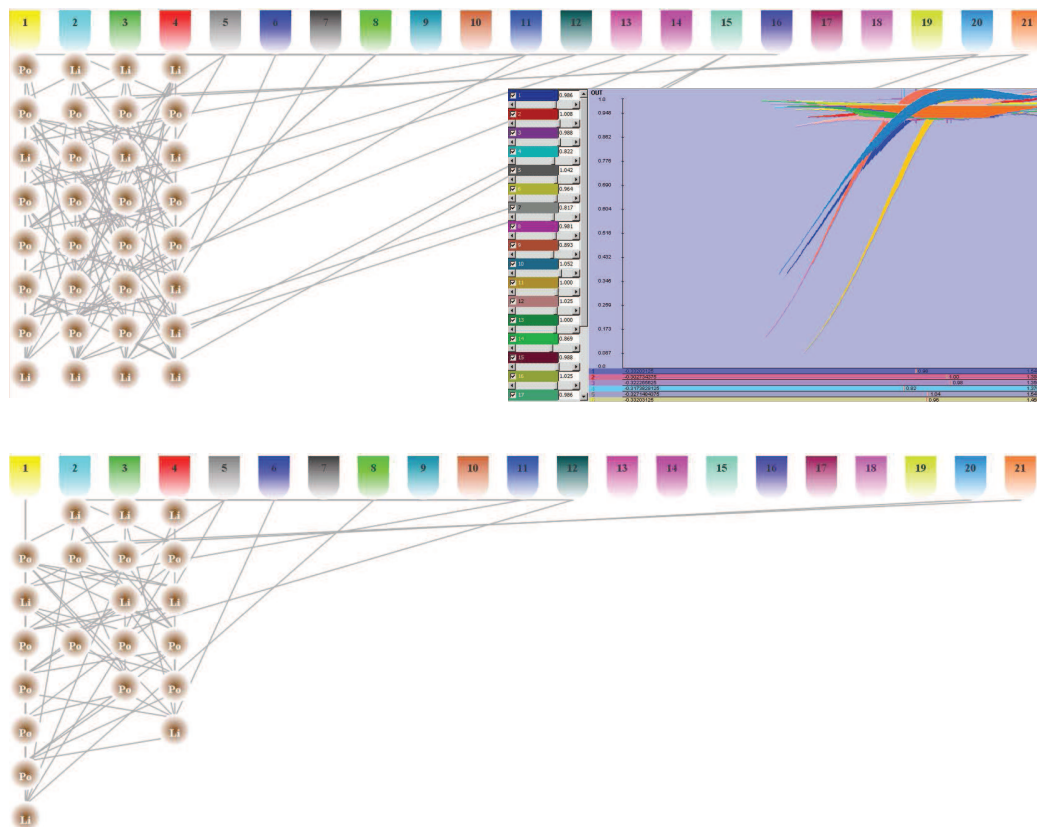
### 3.5. Analýza jednotkových potenciálů v čase

Výsledkem této části práce je program implementovaný v programovacím jazyce C++, který umožňuje semiautomatickou detekci jednotkových potenciálů v čase a jejich třídění. Shlukování je prováděno na síti RBF dle algoritmu *k-means*, který se ukázal jako nevhodnější pro tuto aplikaci. Testovali jsme i síť SOM (aplikace NeuralZOOM), kde byl počet chybně zařazených vzorů 4% (Obr. 40).



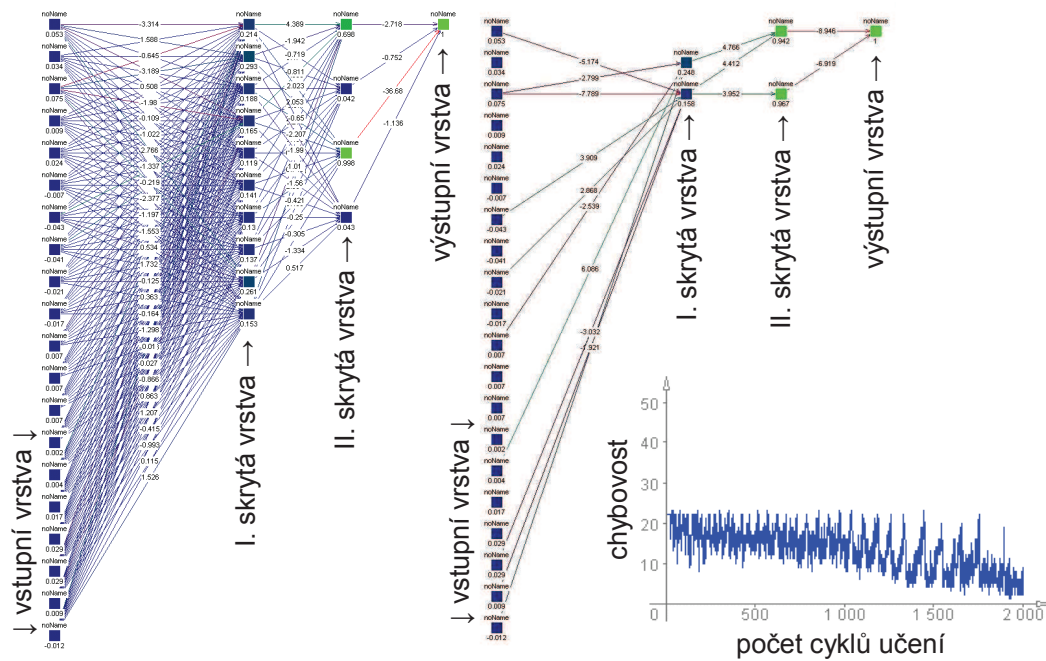
**Obr. 40:** Třídění grafoelementů na neuronové síti SOM v aplikaci NeuralZoom (učení s učitelem) – obrázky z aplikace: vlevo transformace vstupních vektorů do dvoudimenzionálního prostoru (červeně jsou označeny hledané grafoelementy). Vpravo neurony a jejich rozdělení (zeleně jsou obarveny neurony, které odpovídají hledaným grafoelementům). Tato síť zařadila chybně 4% vzorů. Použita vlastní data.

Další testovanou sítí byla hybridní samoorganizující síť (GAME, *Group of Adaptive Models of Evolution*) založená na síti GMDH (*Group Method of Data Handling*) [147]. Ta dosahovala chybovosti 1,5% (Obr. 41). Tato síť má v našem případě jednu podstatnou nevýhodu a to, že učení probíhá s učitelem a nikoliv samoorganizací. My však předpokládáme, že tvar a zejména amplituda jednotkových potenciálů se budou během experimentu měnit.



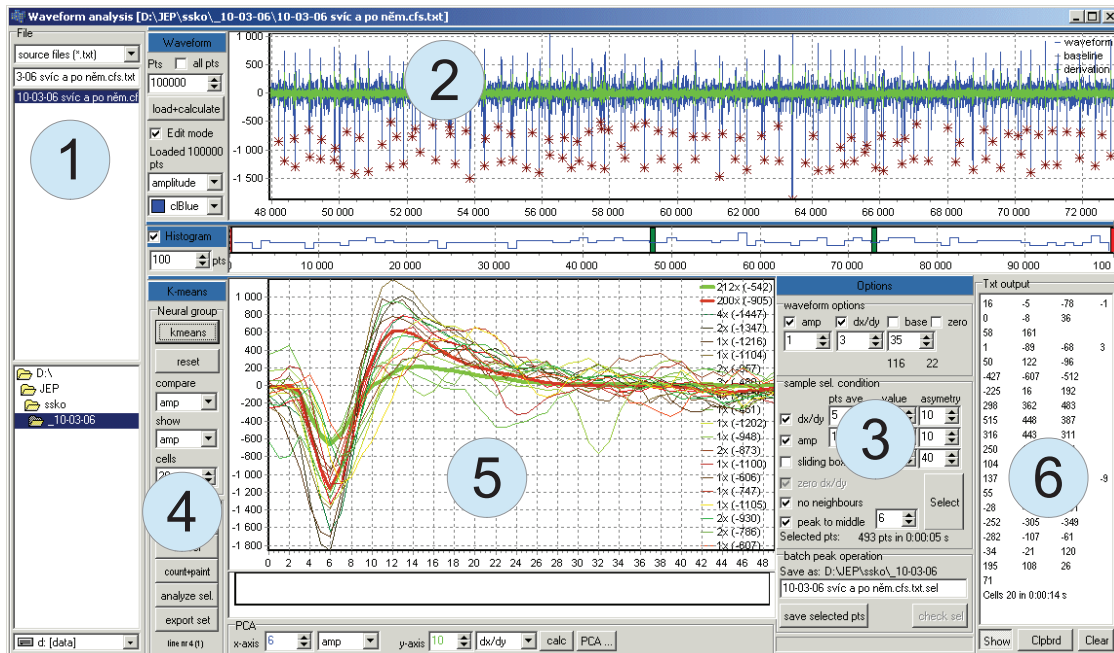
Obr. 41: Struktura sítě GAME. Horní obrázek ukazuje síť po fázi učení, dolní obrázek stejnou síť po zjednodušení - prořezání (pruning). Řada barevných štítků nahoře znázorňuje vstupní vrstvu, šikmé čáry znázorňují propojení jednotlivých neuronů. Neurony typu “Li” mají lineární převodní funkci, typu “Po” naopak polynomiální. Vpravo nahoře jsou zobrazeny tyto funkce s konkrétními hodnotami dle vektoru aktuálně přiřazenému na vstup. Výstup z programu FEL ČVUT s použitím vlastních experimentálních dat.

Třetí testovanou sítí byla klasická neuronová síť Backpropagation (Obr. 42) s chybovostí 2%. Ta však má rovněž v našem případě omezené použití, protože učení probíhá s učitelem.



**Obr. 42: Ukázka sítě Backpropagation (učení s učitelem) se dvěma skrytými vrstvami a s nastavenými váhami. Vlevo je síť s úplným propojením, vpravo po zjednodušení - prořezání (pruning). Graf vlevo dole ukazuje průběh učení s postupně klesající. Obrazový výstup z programu JavaNNS, pro učení byla použita vlastní experimentální data.**

Část programu, kde probíhá shlukování je výpočetně nejnáročnější. Výpočetní složitost roste přibližně lineárně s počtem bodů vybraných v prvním kroku a maximálně exponenciálně s počtem shluků. Vzhledem k tomuto může být doba výpočtu zkrácena nejlépe omezením počtu shluků.



Obr. 43: 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.

Pro usnadnění orientace v množství vzorů jsme do programu přidali možnost vynesení dvou komponent (amplitudy a strmosti s volitelným bodem v porovnávaném úseku) do dvojrozměrného grafu – zjednodušená obdoba PCA (analýza hlavních komponent, angl. Principal Component Analysis). V okně pod grafem zobrazujícím vzory se nalézá přehledový graf součtu vzdáleností všech vzorů v každém bodě porovnávaných úseků jak pro amplitudu, tak i pro strmost. Výběr bodu v porovnávaném úseku, který bude vnesen do grafu PCA, závisí na charakteru záznamu. Uživatel může vycházet jak z přehledového grafu, tak i z grafu záznamů: vybírá tak místa, která jsou z hlediska odlišnosti jednotlivých vzorů nejpopsnější. V grafu analýzy hlavních komponent je možno provádět výběr jak vzorů, tak i samotných porovnávaných úseků ze záznamu (resp. kandidátů na jednotkové potenciály). Výsledek výběru vzorů je možno zobrazit v základním grafu vzorů na hlavním panelu. Jednotlivé porovnávané úseky je možno označit a vypustit. To má další výhodu: pokud dva blízké shluky pokrývá jeden vzor, můžeme z něho vybrat jen část přiřazených úseků.

Grafické uživatelské rozhraní je řešeno ve stylu ovládacího panelu, na kterém jsou všechny potřebné ovládací i zobrazovací prvky viditelné bez dalších zbytečných kliků na záložky nebo podformuláře (Obr. 43). V levém sloupci je umístěn výběr souboru ke zpracování včetně listování systémem souborů. Iničiální adresář je kořenový adresář programu. Dvojitým klikem na soubor dojde k jeho načtení a vypočítání základních statistik.

V pravém horním okně se nachází graf se záznamem. Elektivně se zobrazuje vyhlazená křivka, průběžná strmost a plovoucí nula (základní čára, baseline), jejichž barvy jsou zvoleny tak, aby umožňovaly co největší přehlednost. Barvy křivek je rovněž možno změnit. V grafu se rovněž zobrazují nalezené body včetně jejich barevného přiřazení vzorům. V okně grafu je sice možný výběr a mazání nalezených bodů, i když tato funkce v praxi nenabývá většího významu; bodů k označení je mnoho a úkolem programu je, aby se postaral o usnadnění jejich výběru. Křivku je možno přibližovat, oddalovat a posouvat.

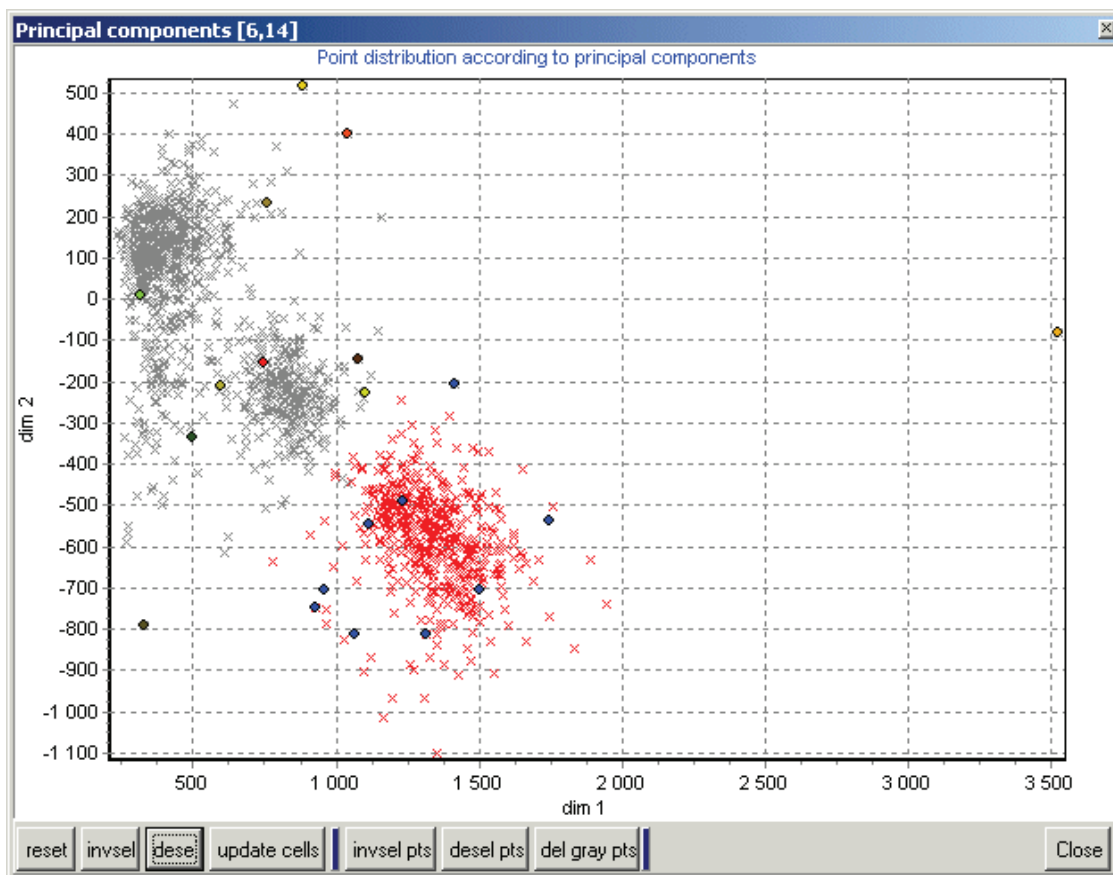
Podlouhlé okno grafu uprostřed panelu slouží k náhledu záznamu. Zobrazuje polohu horního grafu vzhledem k celé délce záznamu. Ukazuje i histogram počtu vybraných bodů, velikost jednoho okna histogramu je možné zvolit.

Největší část panelu je vyhrazena pro porovnávání okolí vybraných bodů (předvybraných úseků) na neuronové síti. Základem je okno s grafy vzorů. Jednotlivé parametry se nastavují na nejbližším panelu (nalevo od grafu), kde se i spouštějí jednotlivé operace nad polem vzorů. Přímou v okně grafu je možno tahem myši vybírat skupinu vzorů či zaklikáním jednotlivé exempláře. Podle vzorů jsou barevně odlišeny vybrané body v záznamu v horním grafu (Obr. 44). Vybrané záznamy lze opakovaně třídít (nevybrané vzory jsou smazány) do čím dál větších podrobností. Tloušťka čar v grafu vypovídá o relativní síle vzorů (počtu přiřazených jednotkových potenciálů).



**Obr. 44:** Grafické uživatelské rozhraní programu na vyhledávání a třídění hrotů (jednotkových potenciálů): druhý krok shlukování, kde byly vybrány dva nejhojněji zastoupené vzory. Graf nahoře zobrazuje označené hroty s barevným rozlišením přiřazeného vzoru. Vzory jsou zobrazeny v dolním grafu v odpovídající barvě. Vlastní experimentální data.

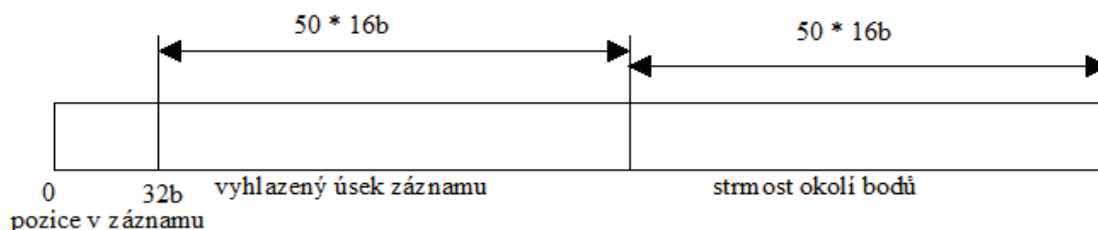
Kliknutím na tlačítko PCA se zobrazí rozložení bodů a vzorů dle dvou vybraných komponent (Obr. 45). I v tomto grafu je možný manuální výběr vzorů určených k další analýze.



**Obr. 45: Grafické uživatelské rozhraní programu na vyhledávání a třídění hrotů (jednotkových potenciálů): pomocný graf určený k analýze shluků vzorů („o“) a úseků záznamu („x“) pomocí analýzy dvou komponent. Vybrané úseky záznamu mají červenou barvu, vybrané vzory mají modrou barvu. Hodnoty na osách jsou v arbitrárních jednotkách. Vlastní experimentální data.**

Textový výstup umístěný při pravém okraji umožňuje zobrazení vypočítaných dat: vybraných bodů, bodů přiřazených vybraným vzorům, křivky vzorů (Obr. 44). Obsah textového pole lze jedním kliknutím zkopírovat do schránky a přímo přenést od jiného programu, např. tabulkového kalkulátoru k dalšímu vyhodnocení.

Konečným výstupem programu je sekvence vybraných bodů s jejich okolím (přilehlým úsekem záznamu). Pořadí v původní posloupnosti, předzpracovaný záznam a vypočtená strmost okolí bodů jsou charakteristiky, které jsou buď ukládány do binárního souboru (pořadí jako 32-bitové celé číslo následované datovými body jako 16-bitová celá čísla), nebo mohou být exportovány do textového pole jako celá čísla oddělená tabulátorem. Odtud jsou pak přístupná dalšímu výpočtu ve statistických programech a tabulkových kalkulátorech.



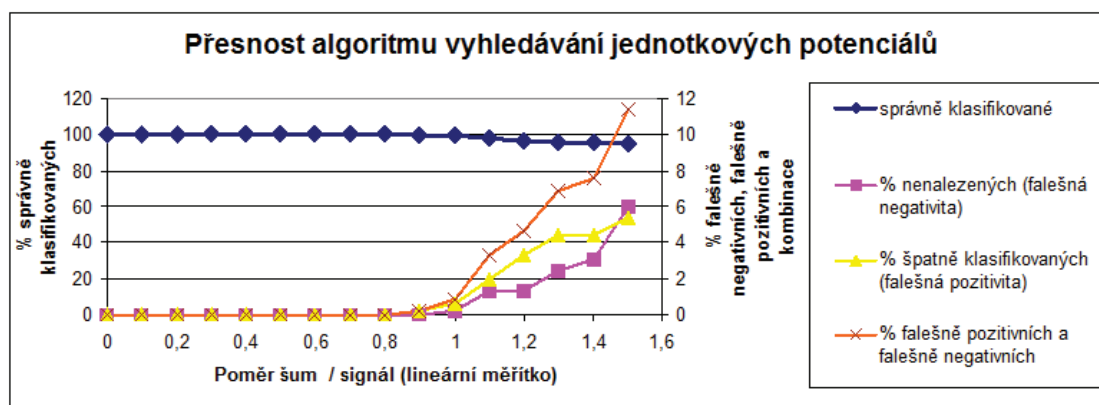
Obr. 46: Struktura věty ukládané sekvence vybraných bodů a jejich okolí. Záznam začíná celým číslem, které označuje pozici v záznamu, následuje 50 bodů křivky a 50 bodů strmosti v okolí vybraného bodu. Malé “b” označuje bit. Vlastní ilustrace.

Program jsme použili k vyhodnocení našich experimentů pro detekci jednotkových potenciálů v záznamech o 12 milionech datových bodů (20 minut při vzorkovací frekvenci 10 kHz). Program správně rozpozná 100% jednotkových potenciálů (0% falešně negativních či falešně pozitivních) v záznamech s mírnou úrovní šumu. V záznamech s vysokou úrovní šumu pak o něco méně - porovnání hodnocení záznamů o různých poměrech smíšeného šumu a signálu je zobrazeno v tabulce (Tab. 4) a v grafu (Obr. 47).

Tab. 4: Porovnání hodnocení záznamů jednotkových potenciálů s různou úrovní poměru signál:šum v našem programu.

Poměr signál:šum	1:0,0	1:0,1	1:0,2	1:0,3	1:0,4	1:0,5	1:0,6	1:0,7	1:0,8	1:0,9	1:1,0	1:1,1	1:1,2	1:1,3	1:1,4	1:1,5
% chybně označených	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,89	3,33	4,67	6,89	7,56	11,33

Jako v jiných aplikacích i zde lze volit nastavením parametrů programu mezi lepší senzitivitou či specifitou.

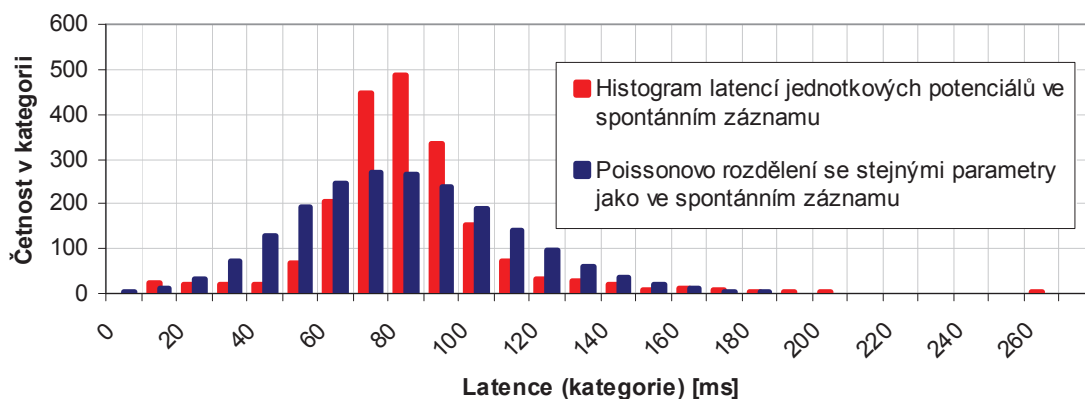


Obr. 47: Přesnost algoritmu vyhledávání jednotkových potenciálů je vynesena v procentech pro různé poměry signálu a šumu.

Pro další otestování programu jsme porovnali histogram latencí spontánního záznamu s Poissonovým rozdělením s vypočítanými momenty (Obr. 48) a jejich odlišnost zamítli pomocí  $\chi^2$  testu.



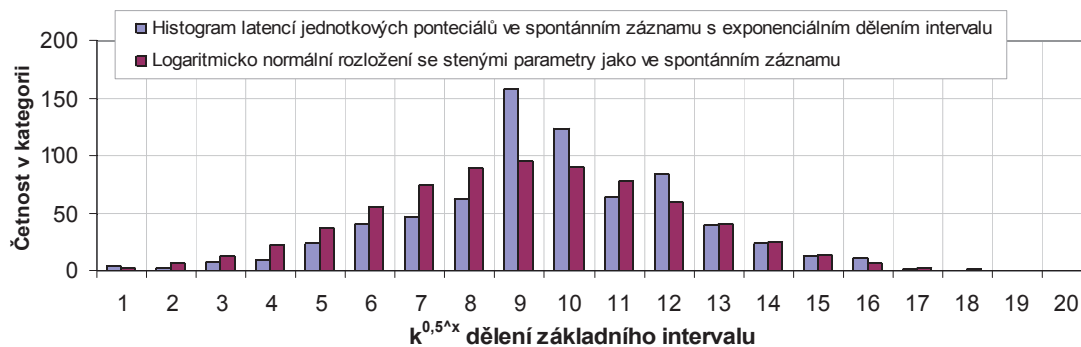
### Porovnání histogramu latencí jednotkových potenciálů spontánního záznamu a Poissonova rozložení se stejnými parametry ( $\lambda$ )



Obr. 48: Porovnání histogramu latencí jednotkových potenciálů ze spontánního záznamu a Poissonova rozložení se stejnými parametry ( $\lambda$ ). Vlastní data.

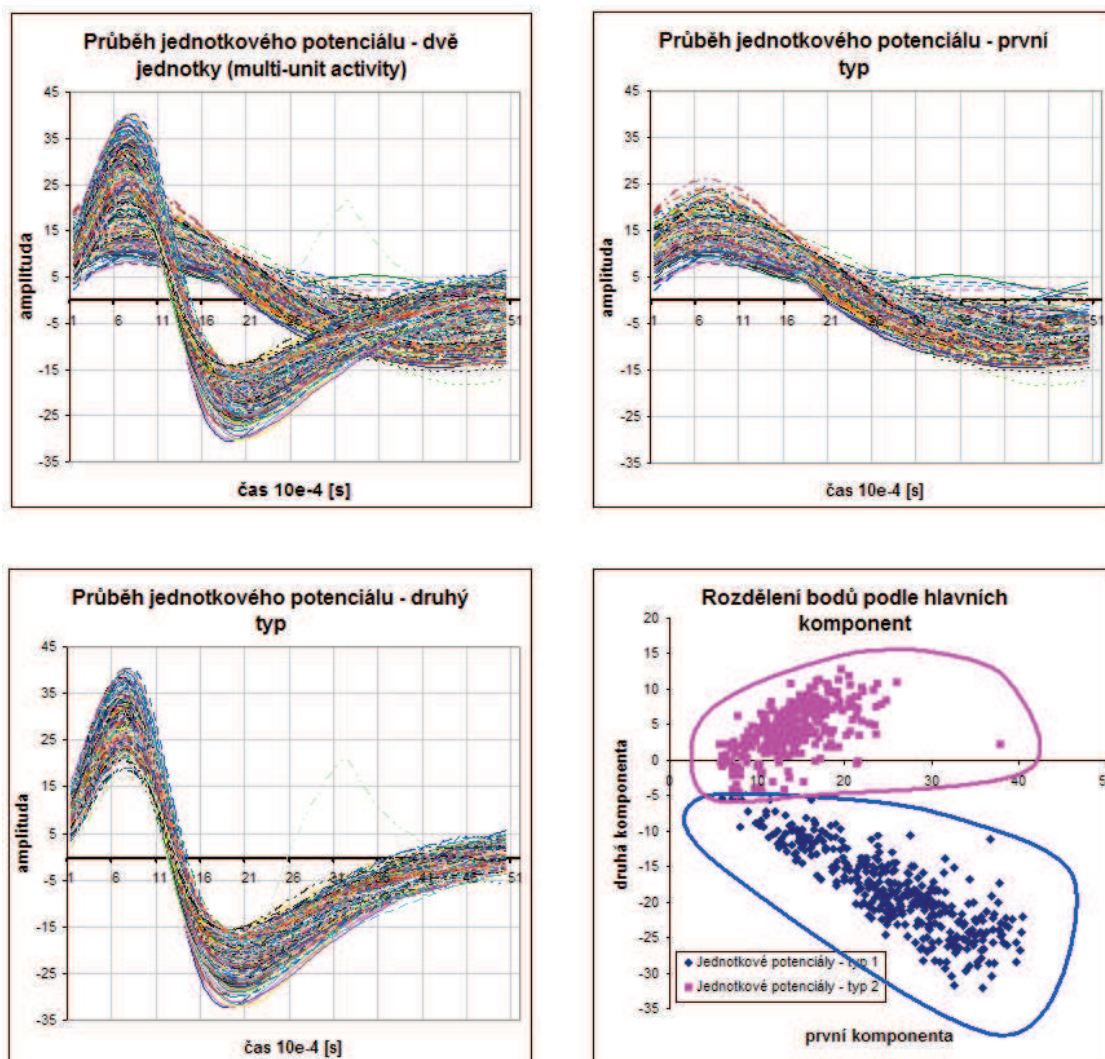
Pro porovnání s logaritmicko-normálním rozložením jsme zvolili exponenciální dělení základního intervalu (Obr. 49). Pomocí  $\chi^2$  testu se neprokázal statisticky významný rozdíl v porovnání s normálním rozložením stejných parametrů  $N(x, \sigma)$ .

### Porovnání histogramu latencí jednotkových potenciálů spontánního záznamu s logaritmicko-normálním rozložením se stejnými parametry $N(x, \sigma)$



Obr. 49: Porovnání histogramu latencí jednotkových potenciálů spontánního záznamu s logaritmicko-normálním rozložením se stejnými parametry  $N(x, \sigma)$ . Patrná jsou dvě lokální maxima v 9. a menší v 12. intervalu, které odpovídají dvěma různým neuronům. Druhé maximum je nevýrazné, protože tento neuron měl nižší aktivitu.

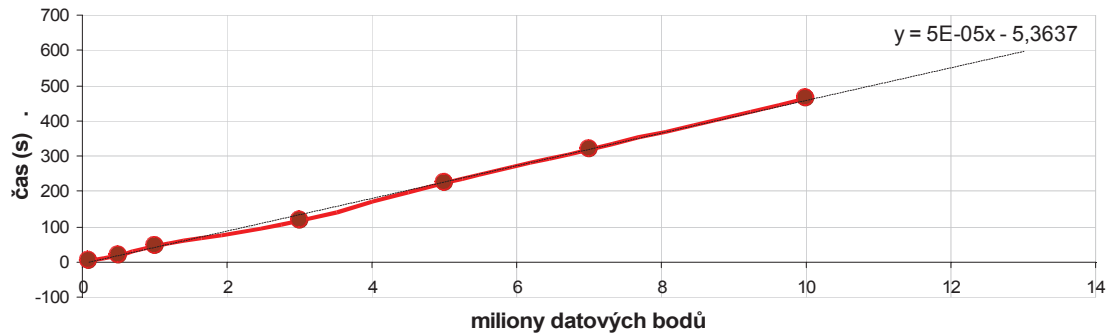
V případě relativně stacionárního záznamu aktivity více neuronů (tzv. multi-unit activity) je program schopen tyto rozlišit buď pomocí přiřazených vzorů, nebo zjednodušené analýzy hlavních komponent (PCA) (Obr. 50).



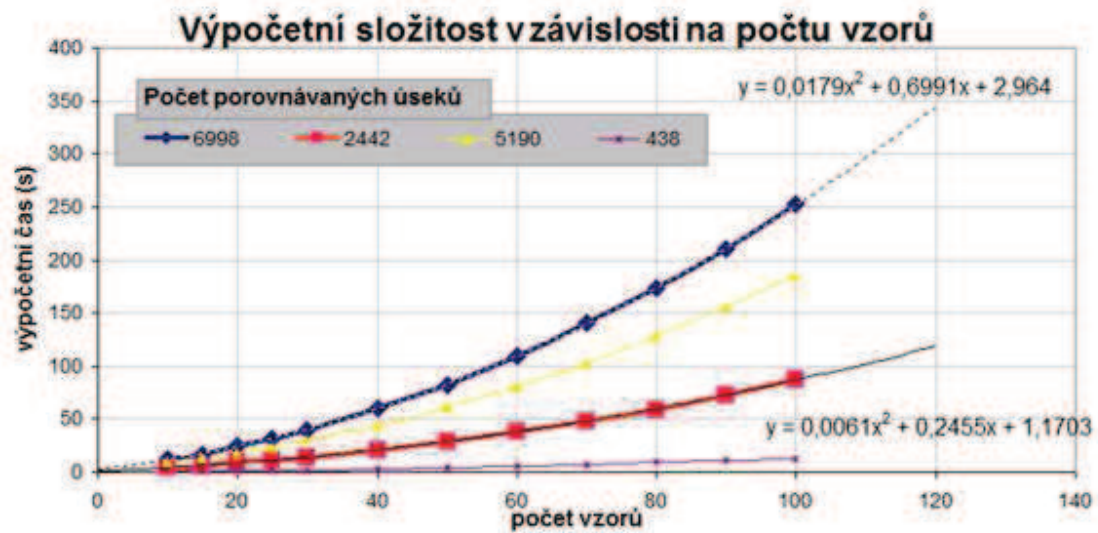
Obr. 50: Analýza záznamu jednotkových potenciálů se dvěma typy jednotkových potenciálů (graf vlevo nahoře), které lze dobře separovat na základě tvaru (graf vpravo nahoře a vlevo dole) nebo analýzy hlavních komponent jejich vzorů. Vlastní data.

Časová složitost první (předzpracování) a druhé části výpočtu (předvýběr bodů) je  $\Theta(n)$ , u třetí části (shlukování) je  $O(nv^2)$ , kde  $v$  je nastavený počet vzorů (shluků) (Obr. 51, Obr. 52 a Obr. 53). Výstupem programu je binární soubor obsahující vektory vybraných jednotkových potenciálů včetně jejich časové lokalizace nebo obdobná tabulka pro použití v tabulkovém kalkulátoru.

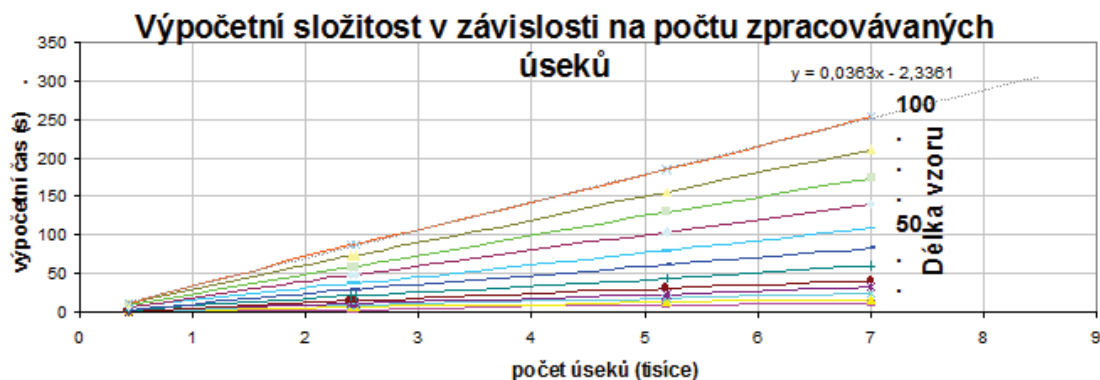
### Výpočetní složitost předzpracování záznamu v závislosti na délce zpracovávaného záznamu



Obr. 51: Výpočetní složitost předzpracování záznamu v závislosti na délce zpracovávaného záznamu. Z grafu je zřejmé, že výpočetní složitost předzpracování záznamu je lineární, což je v souladu s teoretickým odhadem. Vlastní data.



Obr. 52: Výpočetní složitost shlukování (třetí fáze) v závislosti na počtu vzorů. Z křivek je zřejmé, že algoritmus pracuje v polynomiálně ohraničeném čase, což je v souladu s teoretickým odhadem výpočetní složitosti. Vlastní data.



Obr. 53: Výpočetní složitost v závislosti na počtu zpracovávaných úseků roste podle teoretického předpokladu lineárně s počtem zpracovávaných úseků i jejich délkou (délka vzoru je uvedena v počtech datových bodů). Vlastní data.

Výsledkem této části práce je program, který nám umožnil kontinuální hodnocení vývoje aktivity jednotkových potenciálů v čase, které bychom jinak hodnotili manuálně v námi arbitrárně stanovených časových okamžicích. Díky tomuto programu jsme mohli sestavit časový průběh aktivity zaznamenávané buňky a najít statisticky významné rozdíly mezi skupinami v celém rozsahu záznamu (Obr. 37).

**Souhrn výsledků:** v této části práce byl navržen a implementován semi-interaktivní algoritmus vyhodnocení časového průběhu jednotkových potenciálů, který dosáhl požadované přesnosti. Rozložení hrotů ve fyziologickém záznamu vyhodnoceném pomocí tohoto programu má předpokládanou distribuci. Vytvořený program nám umožnil hodnocení našich experimentálních záznamů jednotkových potenciálů během rozvoje fototrombotické ischemické kortikální léze v celém jejich průběhu, nikoliv pouze v předem zvolených okamžicích, a tak prokázat změny, které by při ručním hodnocení unikly.

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

V první části experimentu, kde jsme porovnávali vliv kontinuálního ozáření kůry laserovým světlem na odpověď na elektrickou korovou stimulaci (Obr. 55), jsme ručním hodnocením jednotlivých komponent odpovědi před začátkem osvětlení, v každé minutě svícení a po svícení změřili hodnoty (celkem 896 ručně naměřených hodnot) uvedené v tabulce (Tab. 5) a grafu (Obr. 54).

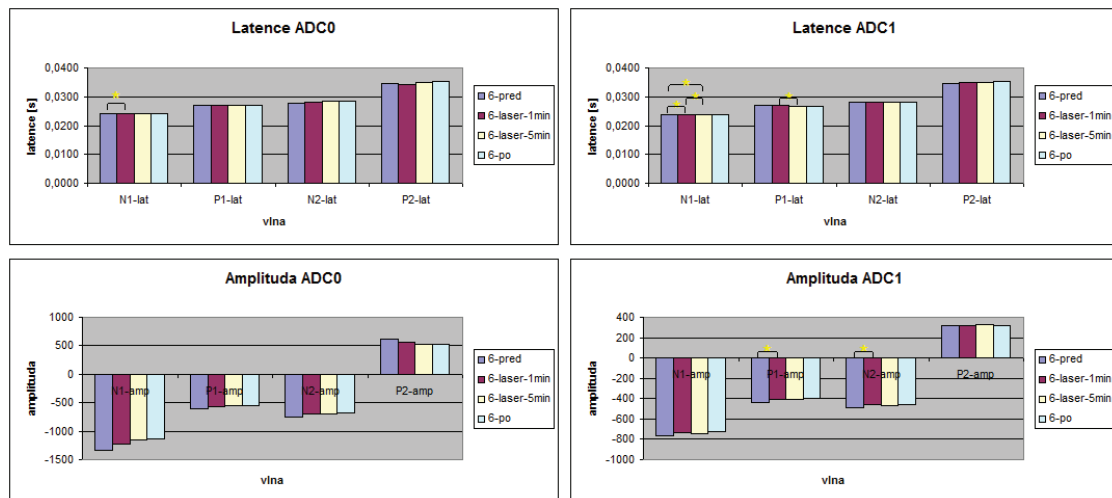
Tab. 5: Tabulka ukazuje latence a amplitudy jednotlivých komponent odpovědi na elektrickou korovou stimulaci na straně, kde bylo stimulováno (šedivý nadpis) a kam dopadalo laserové světlo (červený nadpis).

ADC0 – latence komponent vln na levé straně (kde probíhala elektrická stimulace) v [ms]				
komponenta odpovědi	před svícením	první minuta svícení	pátá minuta svícení	po svícení
N1-latence	0,0243	0,0241	0,0241	0,0242
P1-latence	0,0270	0,0269	0,0271	0,0270
N2-latence	0,0279	0,0282	0,0284	0,0283
P2-latence	0,0345	0,0341	0,0349	0,0354

ADC0 – normovaná amplituda komponent vln na levé straně (kde probíhala elektrická stimulace)				
komponenta odpovědi	před svícením	první minuta svícení	pátá minuta svícení	po svícení
N1-amp	-1330,3	-1218,1	-1161,8	-1134,3
P1-amp	-614,1	-566,6	-554,5	-552,6
N2-amp	-751,8	-701,5	-691,8	-677,6
P2-amp	619,1	562,1	530,8	521,8

ADC1 – latence komponent vln na pravé straně (kde svítilo laserové světlo) v [ms]				
komponenta odpovědi	před svícením	první minuta svícení	pátá minuta svícení	po svícení
N1-latence	0,0239	0,02385	0,02372	0,02375
P1-latence	0,0269	0,02693	0,02678	0,02676
N2-latence	0,0280	0,02805	0,02813	0,02805
P2-latence	0,0347	0,0349625	0,034975	0,0352

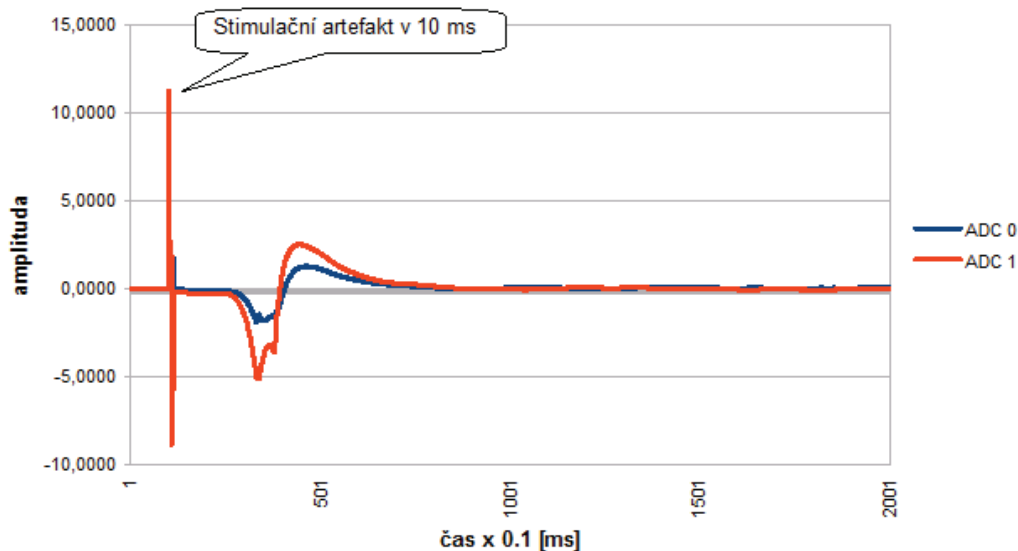
ADC1 – normovaná amplituda komponent vln na pravé straně (kde svítilo laserové světlo)				
komponenta odpovědi	před svícením	první minuta svícení	pátá minuta svícení	po svícení
N1-amplituda	-761,3750	-731,75	-746,75	-725,125
P1-amplituda	-434,6250	-408,125	-406,625	-397,125
N2-amplituda	-490,7500	-463	-469,375	-459,375
P2-amplituda	322,1250	321,625	323,5	317,25



**Obr. 54:** 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 dopadalo laserové světlo. Modrý sloupec: záznam před iradiací, fialový sloupec: záznam na začátku iradiace, žlutý sloupec: záznam na konci iradiace, tyrkysový sloupec: záznam po ukončení iradiace.

Z výsledků této části vyplývá, že na pravé straně (kam dopadalo laserové světlo) se při svícení a po svícení mírně zkracuje latence první vlny. Navíc se na pravé straně přechodně při svícení snižuje amplituda druhé vlny.

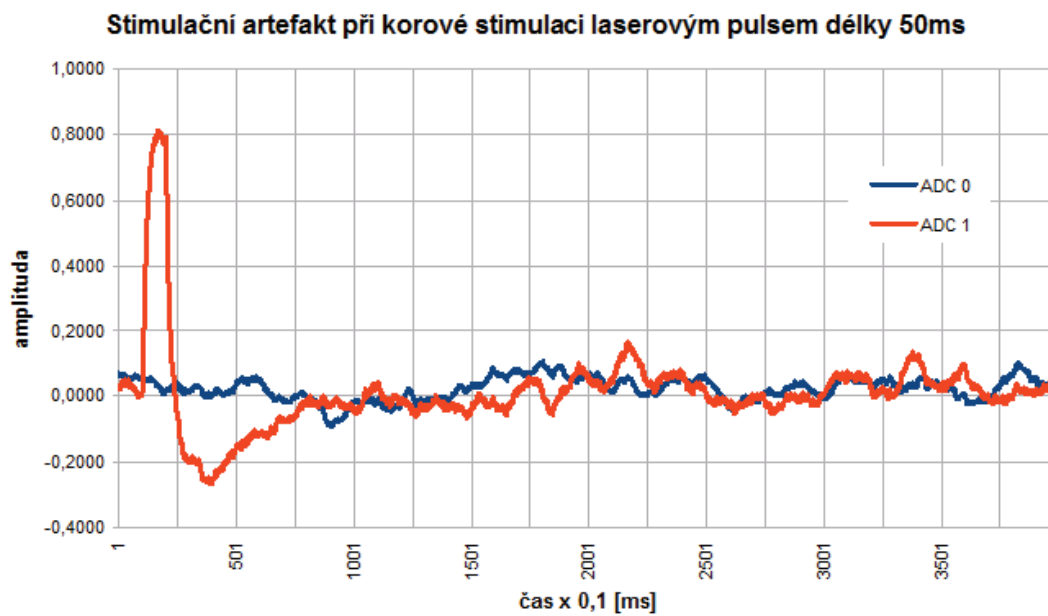
### Odpověď na elektrickou stimulaci - ukázka



**Obr. 55:** Ukázka odpovědi na korovou elektrickou stimulaci. ADC0: levá, stimulovaná strana, ADC1: pravá strana, kam svítil laser. Vlastní data.

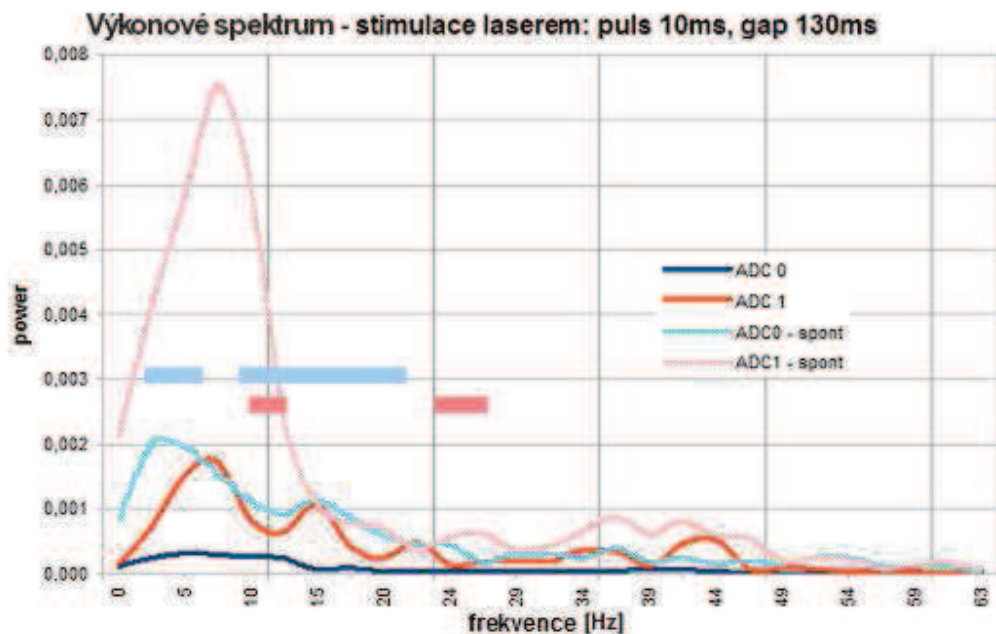
U přímé stimulace kůry pouze laserovým světlem v uspořádání salvy 8 pulsů délky 0,01s a 16 pulsů délky 0,005s a stimulace jedním pulsem délky 0,01s, 0,05s, 0,1s, 0,2s se

u některých zvířat objevoval stimulační artefakt na pravé straně (ADC1, strana, kam svítil laser, Obr. 56), v žádném případě jsme nepozorovali hodnotitelnou odpověď na stimulaci, která by převyšovala okolní šum. Zprůměrovaný záznam jsme vytvářeli z celé délky jednoho typu odpovědi. Na zkoušku jsme nasníмали záznamy i o délce 4000 průběhů, nicméně ani zde žádná hodnotitelná odpověď patrná nebyla.



**Obr. 56: Ukázka stimulačního artefaktu při stimulaci pravé hemisféry laserem. ADC0 - modrá: levá hemisféra, ADC1 - červená: pravá hemisféra, kam dopadalo laserové světlo. Vlastní data.**

V části experimentu, kde byla použita stimulace laserovým pulsem délky 10 nebo 70ms s rozestupem 130ms, jsme vytvořili spektrální výkonovou křivku pomocí rychlé Fourierovy transformace (FFT). Porovnali jsme spektra obou stimulačních rozvrhů se spontánním záznamem. Výsledky jsou přehledně uvedeny v grafu (Obr. 57 a Obr. 58).

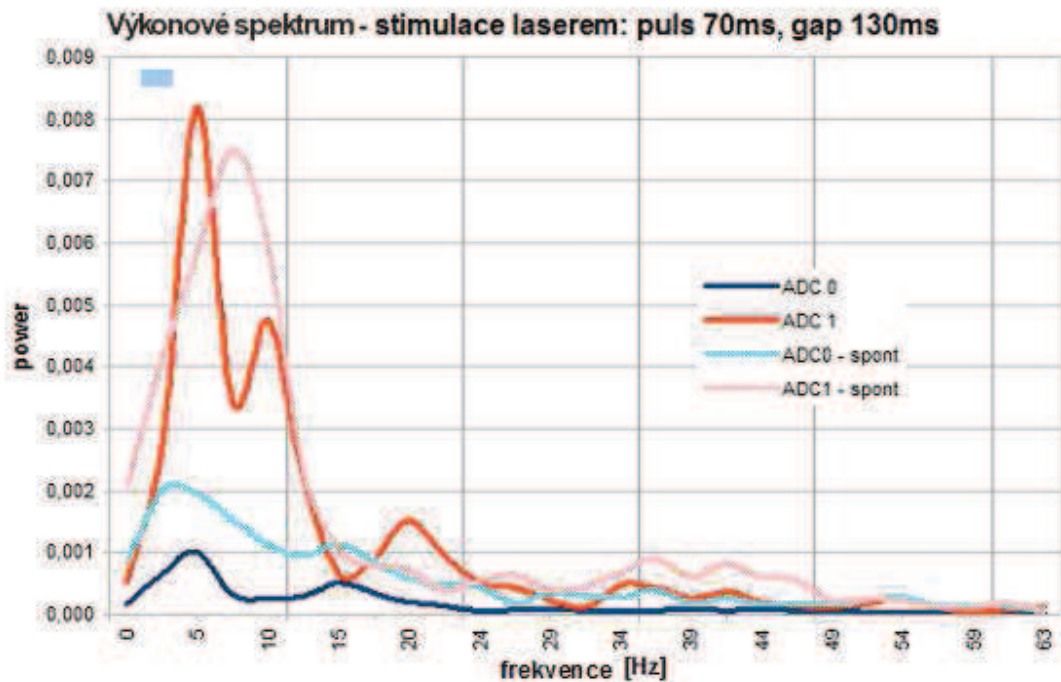


**Obr. 57: Výkonové spektrum - stimulace laserem: puls 10ms, gap 130ms. ADC 0 (modrá): levá hemisféra, ADC 1 (červená): pravá hemisféra, kam dopadalo laserové světlo. ADC0 - spont a ADC1 - spont jsou ze spontánního záznamu. Bledě modrá a bledě červená horizontální čára označují oblasti statistické významnosti rozdílu v ADC0 a ADC1 mezi spontánním a stimulovaným záznamem.**

Statisticky významný rozdíl lze prokázat u stimulace 10ms pulsem ve frekvencích 2,4 – 4,9Hz a 9,8 – 22,0Hz v nestimulovaném kanále (ADC0) a ve frekvencích do 12,2Hz a 24,4 – 26,9Hz ve stimulovaném kanále (ADC1).

U stimulace 70ms pulsem lze statisticky významný rozdíl prokázat v nestimulovaném kanále (ADC0) ve frekvenci kolem 2,4Hz; ve stimulovaném kanále (ADC1) statisticky významný rozdíl prokázat nelze (Obr. 58).

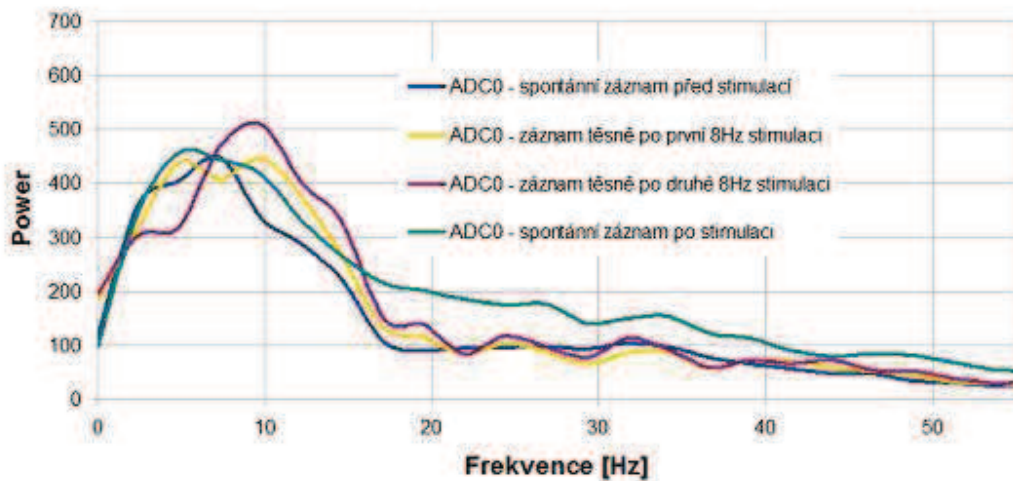




**Obr. 58: Výkonové spektrum - stimulace laserem: puls 70ms, gap 130ms. ADC 0 (modrá): levá hemisféra, ADC 1 (červená): pravá hemisféra, kam svítil laser. ADC0 - spont a ADC1 - spont jsou ze spontánního záznamu. Bledě modrá horizontální čára označuje oblast statistické významnosti rozdílu v ADC0 mezi spontánním a stimulovaným záznamem.**

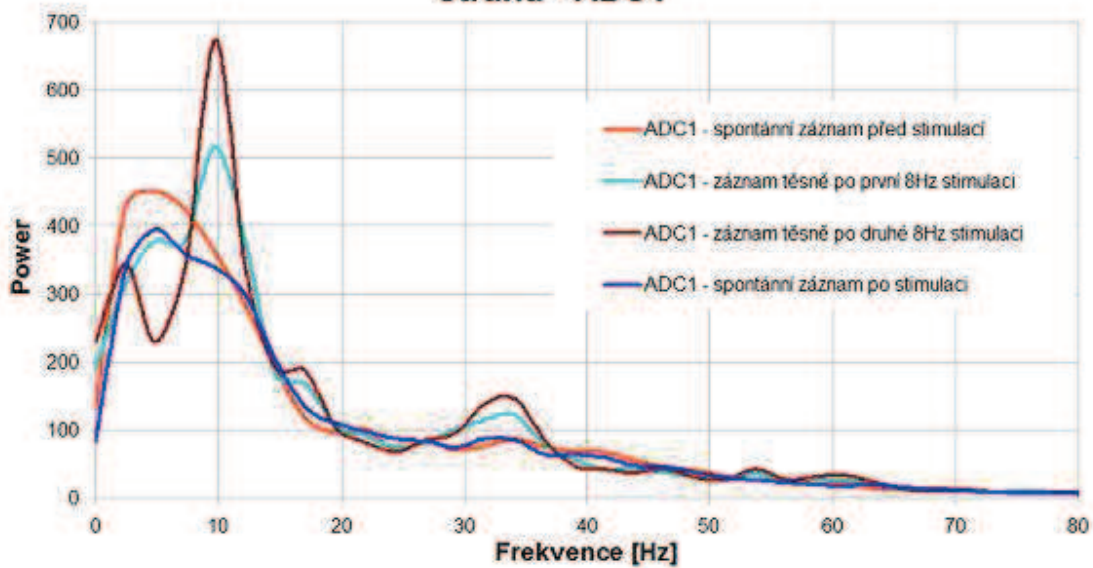
U 8Hz stimulace laserem délky 20s jsme vytvořili frekvenční spektra po ukončení stimulace a spočítali celkový výkon v tomto časovém okně. Výsledky jsou uvedeny přehledně v grafu (Obr. 59, Obr. 60).

**Výkonové spektrum - srovnání spontánního záznamu a záznamů po stimulaci laserem. Levá (nestimulovaná) strana - ADC0**



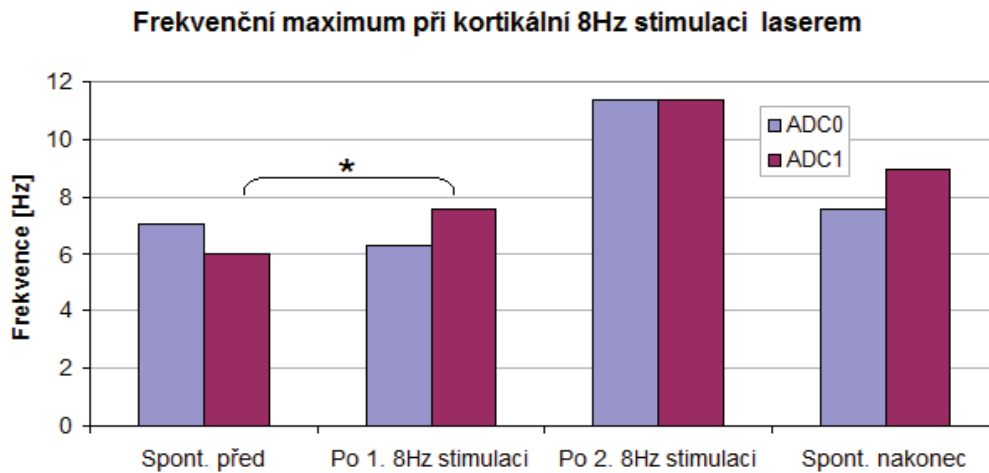
Obr. 59: Výkonové spektrum před stimulací, po ukončení první a druhé 20s korové stimulace laserem a po stimulaci. Levá hemisféra (ADC0), kontralaterálně ke stimulaci laserem.

**Výkonové spektrum - srovnání spontánního záznamu a záznamů po stimulaci laserem. Pravá (stimulovaná) strana - ADC1**



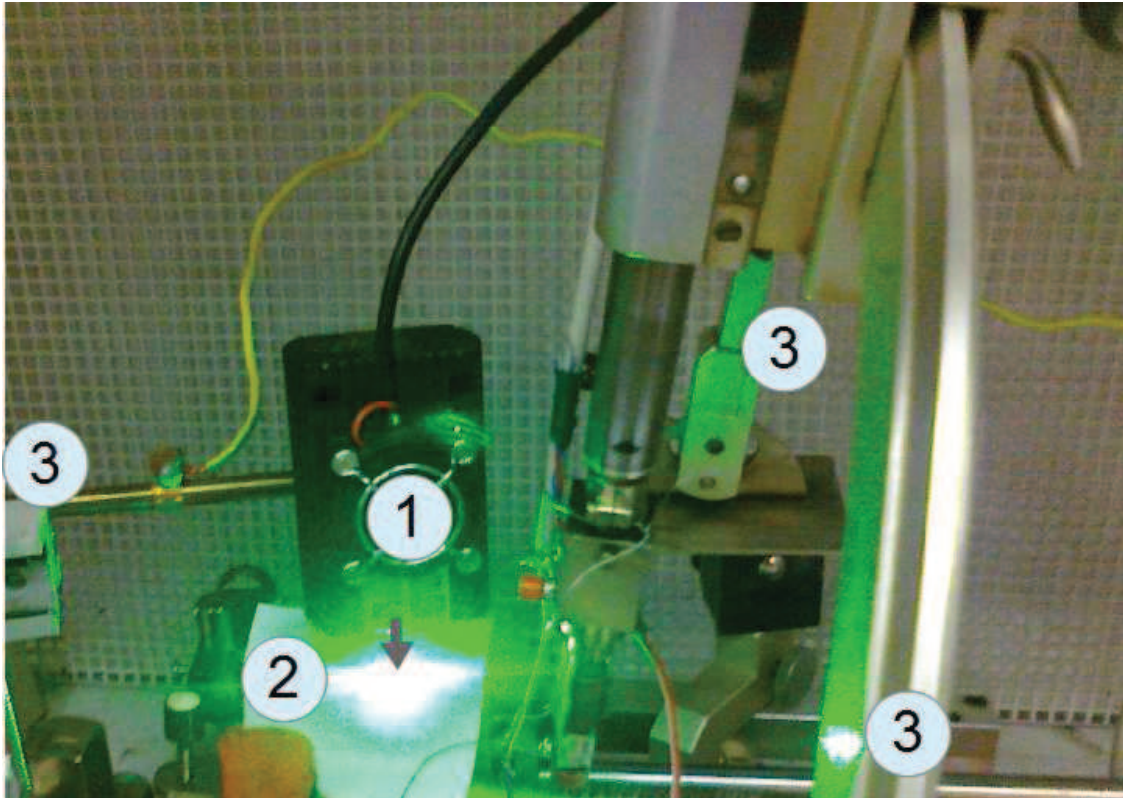
Obr. 60: Výkonové spektrum před stimulací, po ukončení první a druhé 20s korové stimulace laserem a po stimulaci. Pravá hemisféra (ADC1), kde bylo stimulováno laserem.

Ačkoliv je z grafů (Obr. 59, Obr. 60, Obr. 61) patrné, že při stimulaci laserovým světlem dochází na obou stranách 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 ( $p = 0,0497$ ). Rovněž výkon celého spektra se mezi spontánním záznamem a záznamy po 8Hz stimulaci statisticky významně nemění. Neprokázali jsme ani přítomnost epileptických fenoménů po ukončení 8Hz stimulace laserem během vizuální interpretace záznamu ECoG.



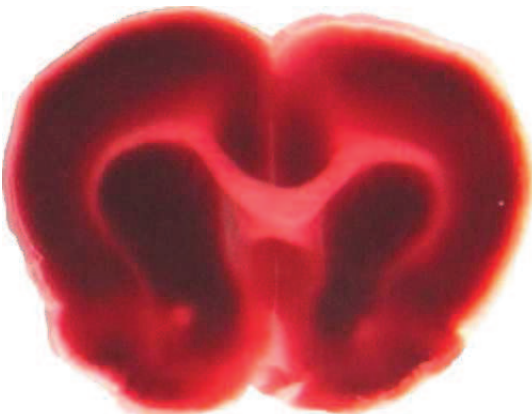
**Obr. 61: Frekvenční maximum před stimulací, po ukončení první a druhé 20s korové stimulace laserem a po stimulaci. ADC0 je levá strana, ADC1 je pravá strana, kde bylo stimulováno (svíceno). \* označuje statisticky významný rozdíl.**

Vzhledem k tomu, že velmi krátké pulsy laserového světla nejsou přes ochranné brýle patrné, rozhodli jsme se k ověření toho, že skutečně probíhají, použít videozáznamu. Ukázka 10ms pulsu je na obrázku (Obr. 62) .



**Obr. 62:** Obrázek z laboratoře exportovaný z videa, které jsme pořizovali pro dokumentaci existence velmi krátkých pulsů laserového světla zelené barvy. Označen je generátor (1) laserového světla, papír (2), na který laserový paprsek (šipka) dopadá, a odrazy (3) na konstrukci.

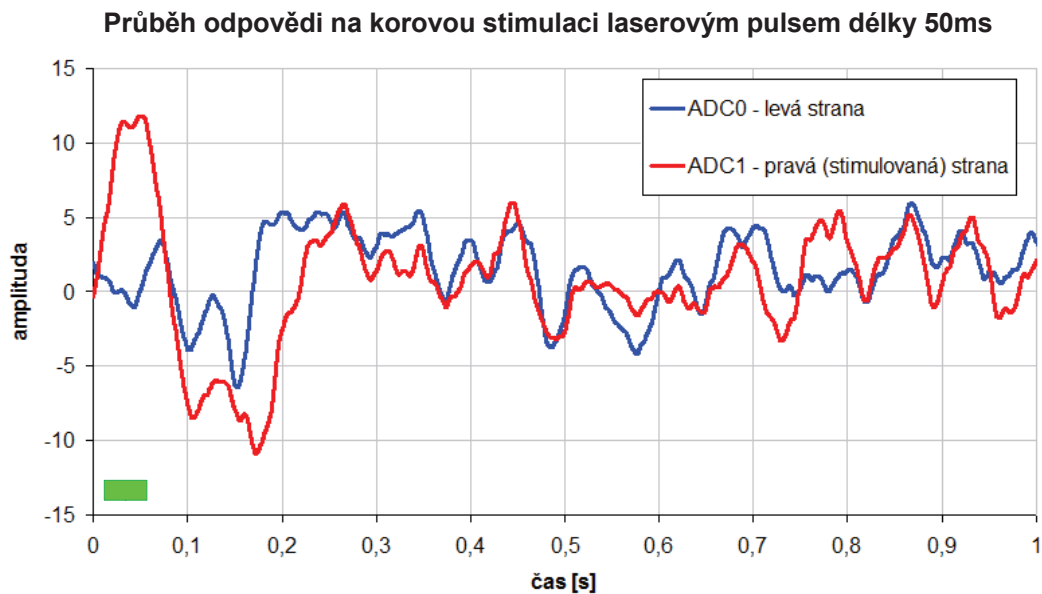
U zvířat v této části experimentu, kde jsme provedli morfologické zpracování mozku do tlustých řezů barvených TTC, jsme výpadek barvení neprokázali (Obr. 63).



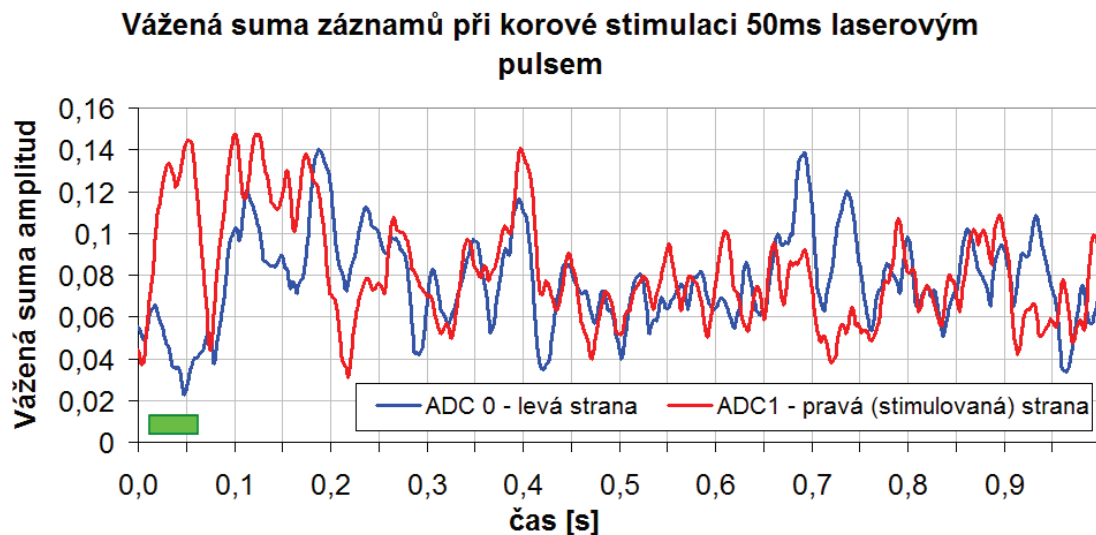
**Obr. 63:** Na obrázku je fotografie tlustého řezu (1mm) mozku potkana v úrovni trepanačních otvorů v primární somatosensorické oblasti barvený TTC. Na řezu není patrný výpadek barvení, který by svědčil pro přítomnost avitální tkáně.

V druhé části experimentu, ve které jsme vytvořili kontrolní skupinu, se při svícení laserem přes alobal a papír neprokázaly žádné změny v záznamu. V případě přímé stimulace kůry laserovým pulsem délky 50ms byla patrná kromě velmi drobného stimulačního artefaktu i odpověď mezi 100 až 200ms (tj. s latencí 40 až 140ms po

ukončení stimulu). Tyto změny jsou diskrétní, ale nepochybné, a vyskytují se v obou kanálech, tj. na stimulované i nestimulované straně (Obr. 64, Obr. 65).

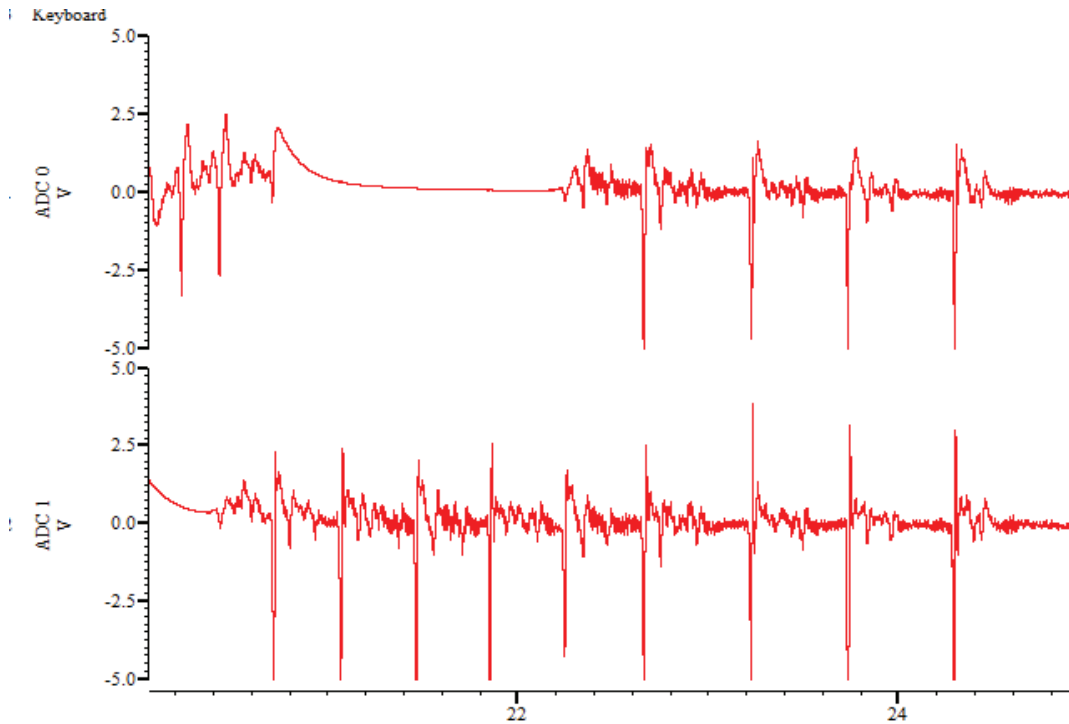


Obr. 64: Ukázka průběhu odpovědi na korovou stimulaci laserovým pulsem délky 50ms s latencí 10ms od začátku rámce (frame) u jednoho zvířete. Délka osvětlení vyznačena zeleným obdélníkem. ADC0 (modrá): levá strana, ADC1 (červená): pravá strana, kam dopadalo laserové světlo. Záznam vyhlazen zprůměrováním okolí o poloměru 25 bodů. Amplituda je uvedena v arbitrárních jednotkách.



Obr. 65: Vážená suma amplitud záznamů v průběhu odpovědi na korovou stimulaci laserovým pulsem délky 50ms s latencí 10ms od začátku rámce (frame) u jednoho zvířete. Délka osvětlení vyznačena zeleným obdélníkem. ADC0 (modrá): levá strana, ADC1 (červená): pravá strana, kam dopadalo laserové světlo. Záznam vyhlazen zprůměrováním okolí o poloměru 25 bodů. Amplituda je uvedena v arbitrárních jednotkách.

U 8Hz stimulace laserovým světlem délky 20s jsme na ECoG záznamech neprokázali žádné změny, které by měly charakter epileptických fenoménů. Při 8Hz stimulaci elektrickými obdélníkovými impulsy bylo u třech zvířat patrné několik epileptických fenoménů (hroty) a u jednoho zvířete se podařilo vyvolat krátký záchvat délky 4s (Obr. 66).

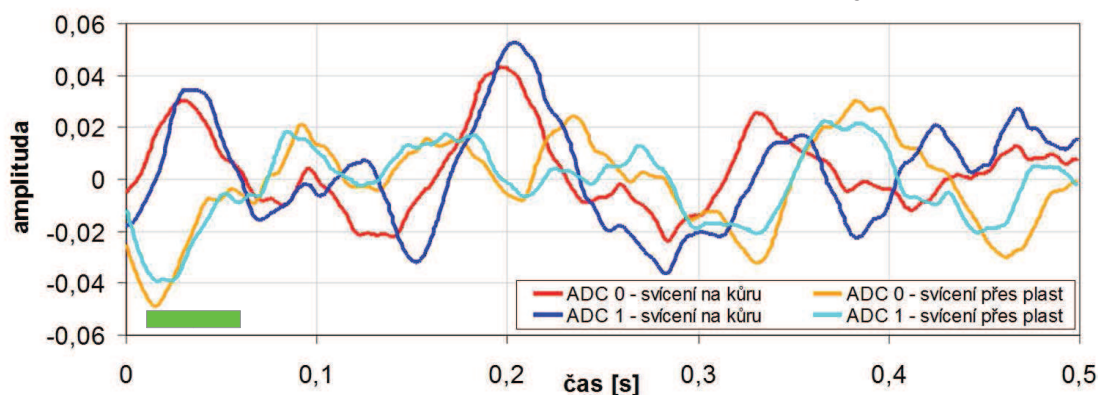


**Obr. 66:** ECoG záznam krátce po ukončení elektrické korové stimulace. U jednoho zvířete se podařilo vyvolat krátký epileptický záchvat délky 4s. Kanál ADC 0 je snímán z levé strany, kde probíhala elektrická stimulace – zde je patrný 1,5s artefakt vzniklý přebuzením zesilovače. Kanál ADC 1 ze strany pravé. Amplituda je uvedena v arbitrárních jednotkách. Zobrazení záznamu v programu Signal.

Při kontinuální dlouhé 8Hz stimulaci kůry laserem se u žádného zvířete nevyklytly epileptické fenomény.

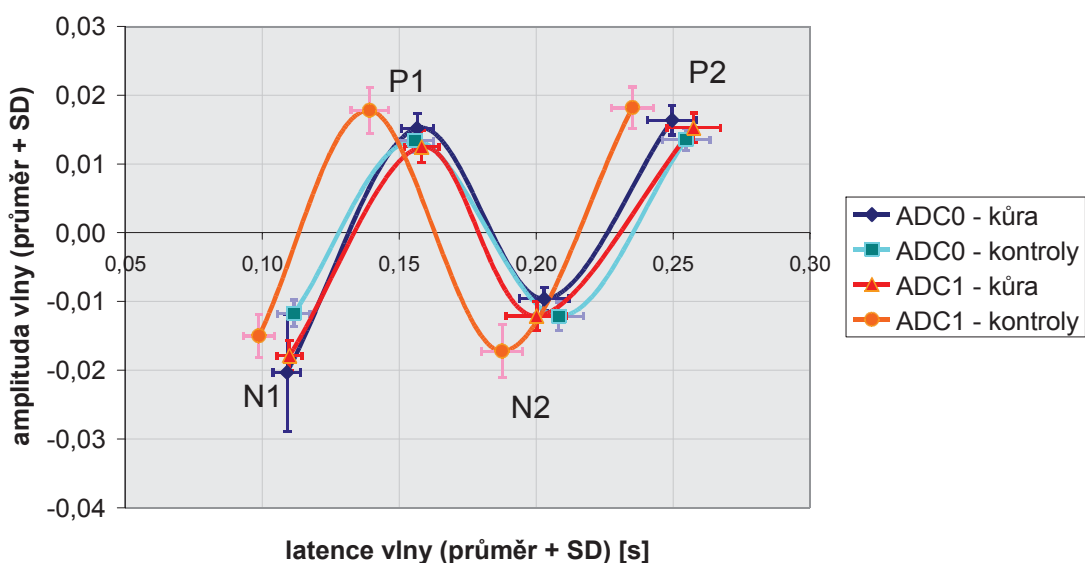
**Ve třetí části experimentu u druhé kontrolní skupiny** jsme při stimulaci jedním pulsem neprokázali detekovatelnou odpověď ani při svícení přímo na kůru. Nebyly patrné ani stimulační artefakty. Spojením předchozích skupin vznikla větší skupina, ve které jsme se pokusili najít vlny, které by mohly potenciálně odpovídat odpovědi na osvit laserovým pulsem. Vznikly tak dvě skupiny: experimentální skupina, kde se svítilo přímo na kůru, a kontrolní skupina, kde byl mezi svazek laserového světla a kůru přidán neprůsvitný plast. Manuálně jsme vyhodnotili experimenty s jednotlivým pulsem délky 50ms, který začínal v 10ms (Obr. 68). Průběhy jednotlivých skupin jsou uvedeny přehledně v grafu (Obr. 67). Statisticky významný rozdíl mezi skupinami jsme neprokázali.

Vážená suma záznamů odpovědí na 50ms puls laserového světla na obou stranách u experimentální a kontrolní skupiny



Obr. 67: Vážená suma odpovědí na 50ms puls laserového světla u experimentální a kontrolní skupiny v obou kanálech. ADC0 je levá strana, ADC1 je pravá strana, kam se svítilo laserem (doba osvětlení vyznačena světle zeleným pruhem). Červená a modrá křivka jsou experimentální záznamy, kde se svítilo přímo na kůru. Oranžová a tyrkysová jsou kontrolní záznamy, kde byl laserovému paprsku do cesty postaven neprůhledný plast. Amplituda je vyjádřena v arbitrárních jednotkách.

Porovnání amplitud a latencí odpovědí na stimulaci laserem

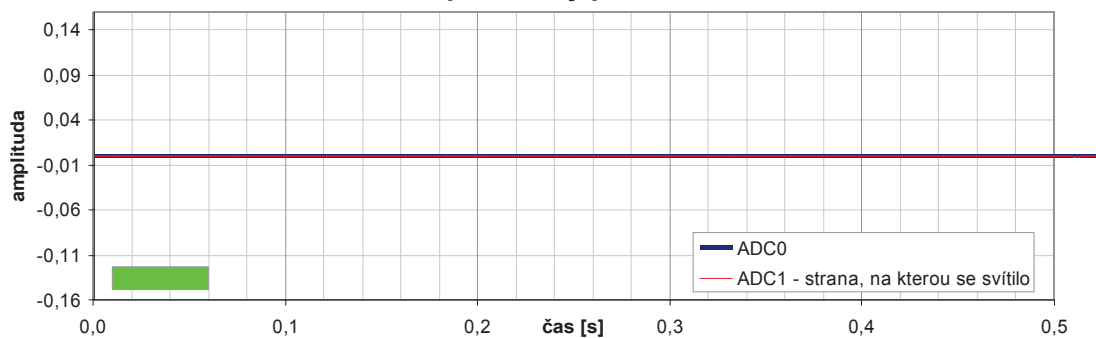


Obr. 68: Porovnání amplitud a latencí jednotlivých vln odpovědí na korovou stimulaci laserovým pulsem délky 50ms. Kanál ADC0 je snímán nad levou hemisférou, ADC1 nad pravou hemisférou, kam dopadalo laserové světlo. U kontrol byl do laserového paprsku vložen neprůhledný plast. Amplituda je vyjádřena v arbitrárních jednotkách.

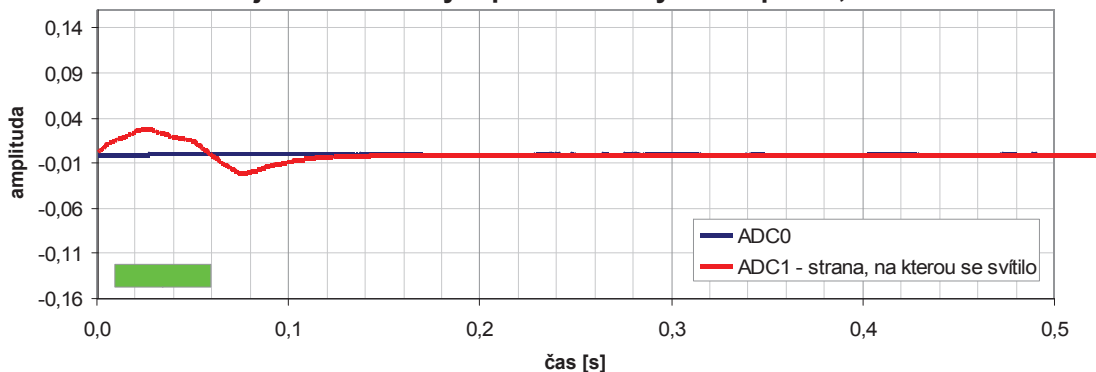
Ve čtvrté části experimentu jsme se pokusili ověřit charakter a původ stimulačních artefaktů. Elektrody byly položeny na rozkrojené jablko. Při stimulaci přes plast se zobrazila izoelektrická linie. Při pulzech laserového světla směřovaných na jablko z blízka i z dálky se zobrazil stimulační artefakt (Obr. 69). Při dalších pokusech o polohování paprsku laserového světla jsme zjistili, že stimulační artefakt je tím

výraznější, čím blíže dopadá k dané snímací elektrodě. Artefakt se navíc vytvořil i při tangenciálním dopadu paprsku na elektrodu tak, že prakticky nedopadal na povrch jablka.

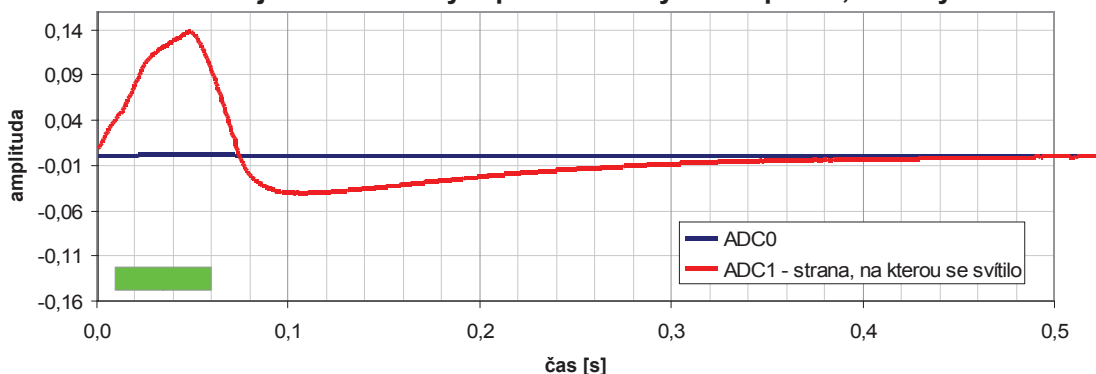
### Stimulace jablka laserovým pulsem délky 50ms přes neprůhledný plast



### Stimulace jablka laserovým pulsem délky 50ms přímo, z blízka



### Stimulace jablka laserovým pulsem délky 50ms přímo, z dálky



**Obr. 69:** Stimulace jablka laserovým pulsem délky 50ms (začátek v 10ms) přes neprůhledný plast, přímo z blízka a z dálky k průkazu charakteru stimulačního artefaktu. ADC0 (modrá): nestimulovaná strana. ADC1 (červená): stimulovaná strana (kam dopadalo laserové světlo - doba osvětlení vyznačena světle zeleným pruhem). Amplituda je uvedena v arbitrárních jednotkách.

V **páté části** experimentu jsme stejný pokus zopakovali na neživém předmětu – umělé houbě navlhčené fyziologickým roztokem. Výsledky byly obdobné jako ve čtvrté části.



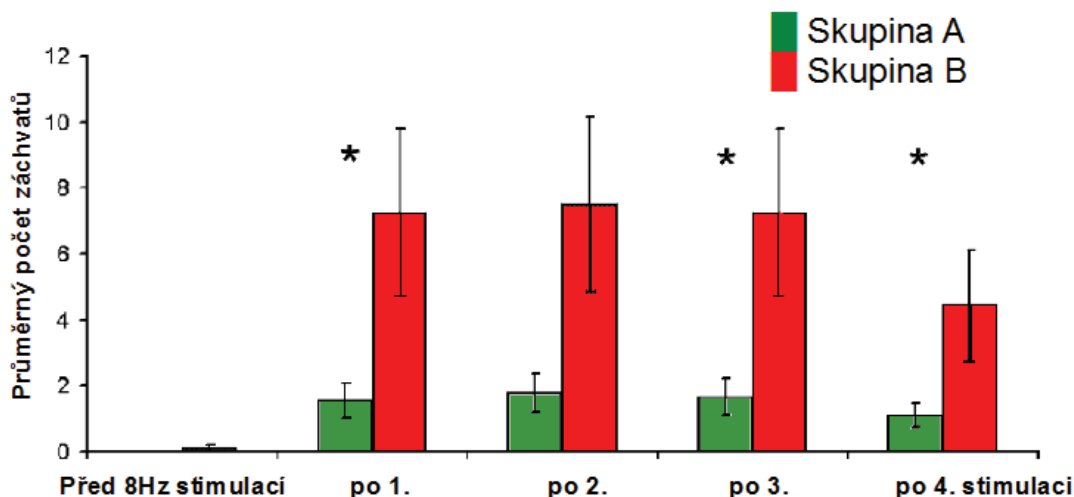
V této sérii experimentů jsme prováděli různá schémata stimulace kůry laserovým světlem a kontinuální svícení s elektrickou kortikální stimulací. Prokázali jsme změny excitability mozkové kůry podobné jako u kontrolních skupin v předchozích experimentech, kde během samotného ozáření docházelo ke snížení amplitudy SSEP oboustranně a snížení jednotkové aktivity na osvětlené straně. Zde bylo patrné mírné snížení amplitudy komponent odpovědi na kortikální stimulaci a změny latence první negativní vlny oboustranně. Po rytmické 8Hz kortikální stimulaci délky 20s laserovým světlem docházelo ke změnám výkonového spektra na stimulované a méně i na kontralaterální straně. Jednalo se o posun frekvenčního maxima doprava o cca 5Hz. Náznak těchto změn jsme pozorovali i při méně intenzivní repetitivní stimulaci pulsem délky 10 a 70ms s rozestupem 130ms. Při kortikální stimulaci laserovým pulsem délky 50ms jsme identifikovali diskrétní odpověď s latencí 40 až 140ms. Nepodařilo se nám vyvolat epileptiformní fenomény žádným uspořádáním stimulace mozkové kůry laserovým světlem. Dále jsme se pokusili ověřit charakter stimulačního artefaktu, který vznikal při korové stimulaci laserem, opakováním pokusu na jablku a neživém předmětu. Zjistili jsme, že artefakt je výraznější, když paprsek dopadá blíže k elektrodě.

**Souhrn výsledků:** prokázali jsme, že samotná iradiace mozkové kůry potkana laserovým světlem vyvolává komplexní změny v ECoG záznamu. Pozorovatelné byly změny ve frekvenčním spektru záznamu na ozářené a dokonce i kontralaterální straně při opakované stimulaci laserovým pulsem. Změny frekvenčního spektra po ukončení 20s rytmické kortikální stimulace laserovým světlem jsou patrné na stimulované straně, hraniční statistické významnosti dosahuje pouze posun frekvenčního maxima po první stimulaci. Samotnou stimulací mozkové kůry laserovými pulsy se nám nepodařilo vyvolat epileptické fenomény – samotná rytmická stimulace kůry laserovým paprskem není dostatečným podnětem pro vyvolání epileptického záchvatu (srovnání s následující kapitolou). Neprokázali jsme ani odpověď na stimulaci kůry jednotlivými pulsy laserového paprsku. V interhemisferické odpovědi na korovou elektrickou stimulaci jsou během ozařování mozkové kůry laserem prokazatelné komplexní změny amplitudy a latence jednotlivých komponent odpovědi, zejména zkrácení latence první vlny a snížení amplitudy druhé vlny. Pro úplnost zde uvádíme i nálezy u kontrolních skupin v experimentech uvedených v předchozích kapitolách, kde jsme prokázali snížení amplitudy somatosenzorického evokovaného potenciálu a útlum jednotkové aktivity během iradiace mozkové kůry.

### **3.7. Průlom postiktální inhibice salvou pulsů o nižší intenzitě**

Před započítáním první 20s kortikální 8Hz stimulace jsme u jednotlivých pulsů (skupina A) neprokázali žádnou epileptiformní aktivitu, zatímco u salvy čtyř pulsů (skupina B) u jednoho zvířete byla patrna odpověď na stimulaci. Po 20s stimulacích jsme v interiktálním období prokázali u skupiny A pouze několik krátkých epileptiformních fenoménů, zatímco u skupiny B 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. 70).

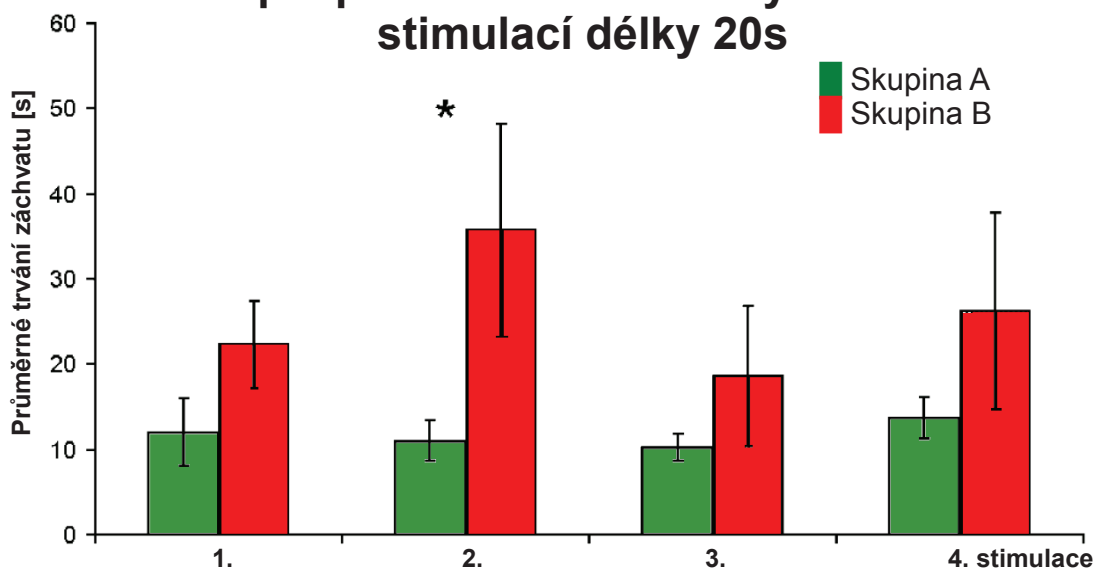
## Krátké záchvaty po jednotlivých pulsech nebo salvě čtyř pulsů



Obr. 70: Průměrný počet krátkých záchvatů po stimulaci jedním pulsem (skupina A) nebo salvou čtyř pulsů (skupina B). Chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku. Hvězdičky označují statistickou významnost ( $p < 0,05$ ).

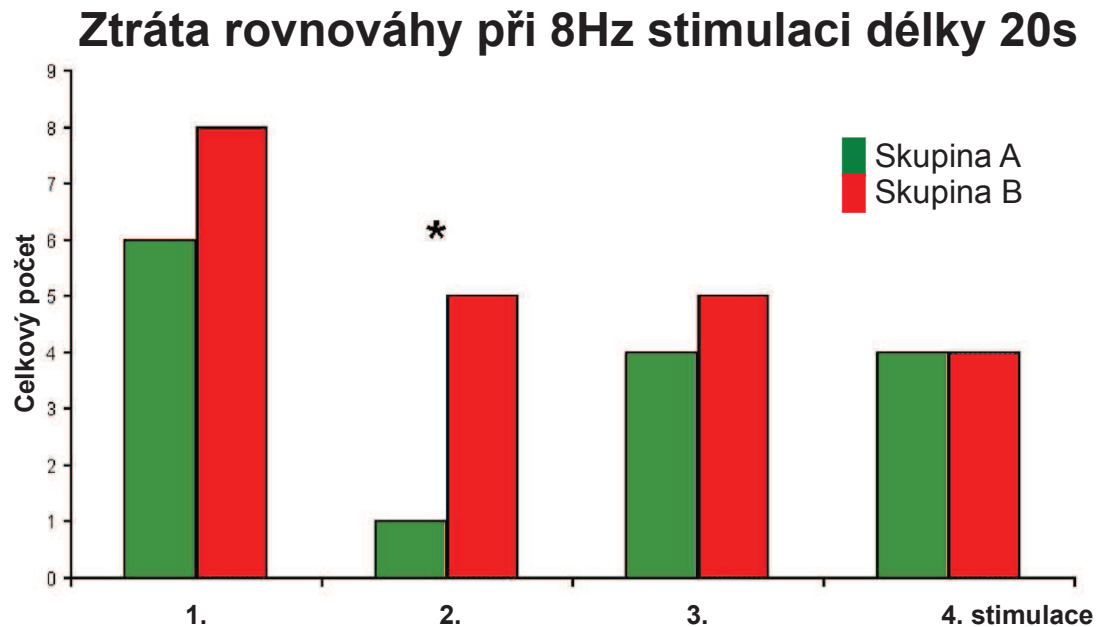
Průměrná doba trvání záchvatu po 8Hz stimulaci délky 20s byla vyšší u skupiny B, ale pouze po druhé stimulaci byl rozdíl statisticky významný ( $p < 0,05$ ) (Obr. 71).

## Trvání epileptického záchvatu vyvolaného 8Hz stimulací délky 20s



Obr. 71: Trvání epileptického záchvatu po 8Hz stimulaci délky 20s bylo delší u skupiny B (červená barva) než u skupiny A (zelená barva), avšak pouze po druhé stimulaci byl rozdíl statisticky významný ( $p < 0,05$ , označeno hvězdičkou).

U skupiny B jsme prokázali významně vyšší počet zvířat, u kterých došlo ke ztrátě rovnováhy v souvislosti s 8Hz stimulací délky 20ms ( $p < 0,05$ ) (Obr. 72).



Obr. 72: Porovnání počtu zvířat, u kterých došlo při 8Hz stimulaci délky 20s ke ztrátě rovnováhy, mezi skupinami. Zeleně skupina A, červeně skupina B. Statisticky významný rozdíl jsme prokázali pouze během druhé stimulace (označeno hvězdičkou).

**Souhrn výsledků:** v tomto experimentu jsme prokázali, že v interiktálním období lze pomocí kortikální elektrické stimulace salvou čtyř slabých pulsů o nižší intenzitě vyvolat krátké záchvaty častěji než při použití jednoho pulzu. Zároveň u skupiny, kde bylo v interiktálním období stimulováno salvami čtyř pulsů, došlo k významnému prodloužení epileptického záchvatu po ukončení druhé 8Hz kortikální stimulace délky 20s a častějšímu výskytu pádu zvířete během indukovaného epileptického záchvatu. 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.

## 4. DISKUSE

### 4.1. Experimentální model ischemie – fototrombotická ischemická kortikální léze

Pro srovnání naší implementace modelu fototrombotické léze jsme provedli porovnání s jinými autory:

Choi et al. použili potkany o hmotnosti 300 až 350 gramů pro srovnání rozsahu ischemické léze a neurobehaviorálního deficitu mezi modelem fototrombózy a uzávěrem a. cerebri media tenkým nylonovým vláknem. Bengálskou červeň podávali systémově v množství 30mg/kg. Paprsek o průměru 6 mm z halogenové lampy o svítivosti 10000lux vedli pomocí fibrooptického kanálu na chirurgicky odhalenou kalvu po dobu 5, 10 nebo 20 minut. Za 24 hodin pak následovalo neurobehaviorální testování a morfologické zpracování mozku. Celkový objem postižené části mozku byl morfologicky ověřen barvením TTC na koronárních řezech šíře 2 mm. Objem léze dosahoval u osvětlení 5 minut  $69,95 \pm 11,73 \text{ mm}^3$ , u 10 minut svícení  $134,53 \pm 12,15 \text{ mm}^3$  a  $153,94 \pm 13,88 \text{ mm}^3$  u 20 minut svícení. Prodloužení osvětlení z 10 na 20 minut nevedlo k významnému zvýšení objemu ischemické léze [148].

Van Reempts et al. podávali potkanům bengálskou červeň systémově v koncentraci 7,5mg/ml a celkovém množství 10mg/kg po dobu 2 minut. Zdrojem světla byla xenonová žárovka a světlo bylo přiváděno fibrooptickým vodičem. Svícení probíhalo po dobu 20 minut. Rozsah ischemie hodnotili 4 hodiny po osvětlení na 0,1mm tenkých koronárních řezech barvených A-eosinem B. Velikost léze byla  $3,74 \text{ mm}^3$  ( $3,38 - 5,27 \text{ mm}^3$ ), po výměně žárovky, která svítila více, se však zvýšila zhruba třikrát na  $13,06 \text{ mm}^3$  ( $9,26 - 15,04 \text{ mm}^3$ ) [69].

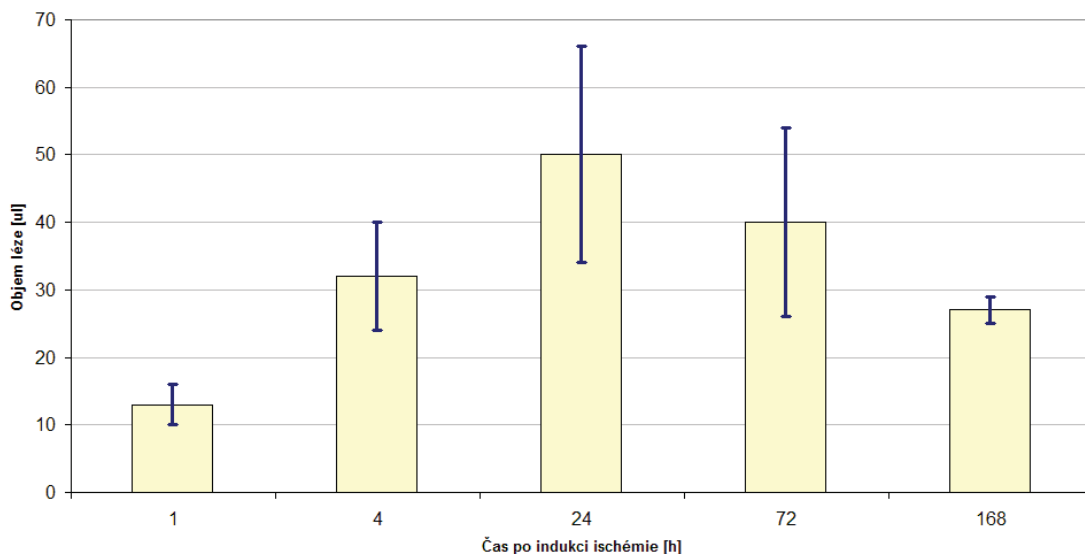
Model fototrombózy u potkana byl použit i při studiu diaschízy u potkanů kmene Wistar o váze 290 až 310 gramů. Autoři použili fibrooptické vlákno šíře 1,5mm napojené na zdroj bílého světla, svítili na kalvu po dobu 20 minut. Bengálskou červeň podali nitrožilně v množství 13mg/kg. Za 6-7 dní pak zhotovili koronární řezy šíře 0,4mm a průměr zóny infarktu změřili na  $2,3 \pm 0,3$  mm [149].

To, že stačí fotosenzitivní barvivo aplikovat nikoli pouze nitrožilně ale i intraperitoneálně, ukázali Schroeter et al. na myším modelu [150] a zopakovali další [151]. Laboratorním myším o váze 20 – 25 gramů podávali bengálskou červeň v koncentraci 10mg/ml 5 minut před iradiací v množství 0,1ml, tj. 1 mg účinné látky. Pro svícení byl užit zdroj bílého světla. Použitý paprsek měl šíři 1,5mm a dopadal na kalvu zbavenou periostu po dobu 3 minut. Délka osvitu činila 15 minut. Po třech dnech byla provedena morfologická studie a rozsah léze byl měřen na 0,2mm širokých koronárních řezech. Celkový objem infarzované mozkové tkáně činil  $4,39 \pm 0,87 \text{ mm}^3$ .

Kim et al. s úspěchem použili na rozdíl od většiny autorů fotosenzitizující látku erythrosin B podaný intravenózně. V experimentu použili tříměsíční myši o váze 35 – 40g. Paprsek helium-neonového laserového světla (vlnová délka 543,5nm) o výkonu 1mW s primární clonou o průměru 2mm nechali dopadat na kalvu zbarvenou měkkých pokrývek. Erythrosin podávali v dávce 30mg/kg. Morfologické zpracování provedli za 24 hodin po osvětlení, mozek zpracovali do 2mm koronárních řezů s barvením TTC. Objem ischemické léze byl  $1,22 \pm 0,14 \text{mm}^3$  za 6 hodin a  $3,49 \pm 0,49 \text{mm}^3$  za 24 hodin po indukci ischemie [152].

Grome et. al hodnotili velikost ischemické léze způsobené fototrombózou na potkanech o váze 300 až 350 gramů [153]. Intravenózně podali bengálskou červen v objemu 1 ml při koncentraci 5mg/ml. Ke svícení použili xenonovou lampu emitující zelené světlo dopadající přes chromatický a tepelný filtr na kalvu. Průměr paprsku byl 3mm (šíře fiberoptického vodiče). Morfologické hodnocení prováděli na velmi tenkých (7-8 $\mu\text{m}$ ) koronárních histologických řezech v různých časových intervalech po indukci léze. Jejich výsledky jsou shrnuty v grafu (Obr. 73).

**Objem ischemické léze vytvořené fototrombózou v různých časových intervalech po insultu**



**Obr. 73: Objem ischemické léze vyvolané fototrombózou v časových intervalech po insultu: graf vytvořen na podkladě dat z [153]. Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku.**

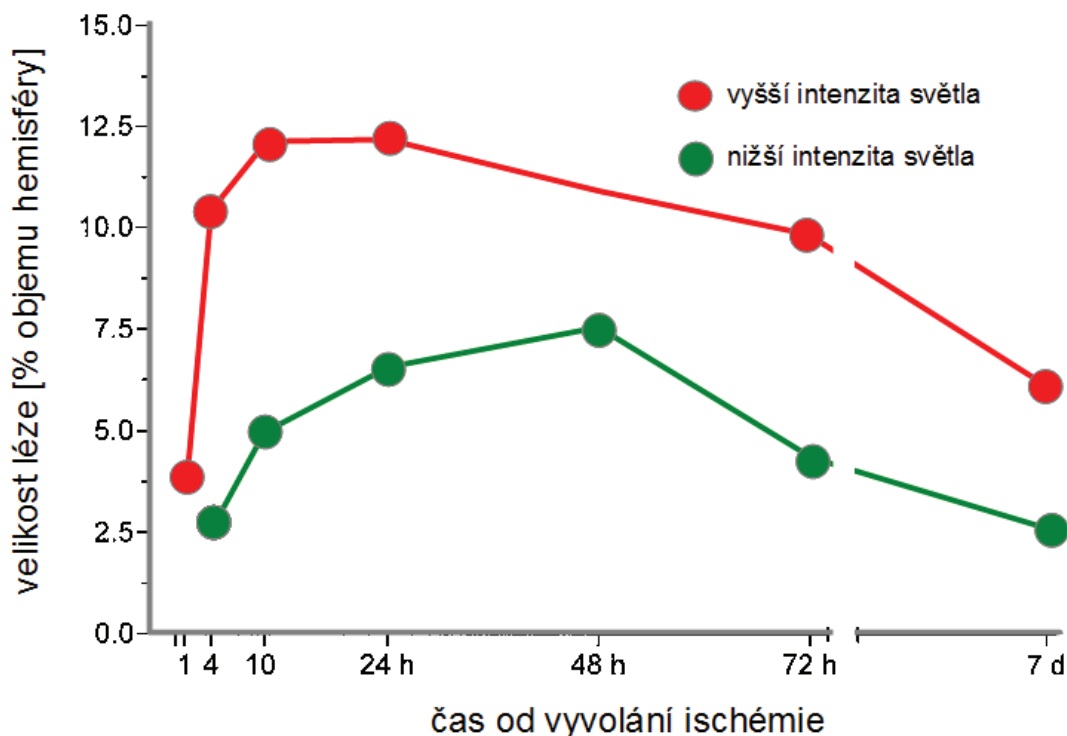
Kromě velikosti primárního paprsku, délky osvětlení a doby, která uplynula od insultu, má na celkovou velikost ischemické léze vliv i intenzita světla [69,154]. Boquillon et al. použili jako zdroj k aktivaci bengálské červeně laserové světlo o vlnové délce 570nm o výkonu 2, 5, 10 a 20mW dopadající na kalvu myši. Ukázali, že léze vytvořené s výkonem laseru 2 a 5 mW zasahovaly pouze kůru, kdežto u 10 nebo 20mW zasahovaly i podkorové struktury [154].

Pro vytvoření ischemické léze v bazálních gangliích potkanů o váze 270–320g použili Kuroiwa et al. stereotakticky zavedené tenké optické vlákno z polymethylmetakrylátu (PMMA) šíře 0,5 – 0,75mm zavedené stereotakticky do cílové struktury (bazálních ganglií). Nitrožilně bylo podáno 20mg/kg bengálské červeně. Osvícení bílým světlem trvalo 5 - 10 minut. Morfologické zpracování provedli 4 hodiny, 1 den, nebo 6 týdnů po ischemickém inzultu pomocí 1mm koronárních řezů barvených TTC a Evansovou modří. Velikost léze byla úměrná průměru světelného vodiče a době iradiace. Při použití tenkého vlákna a 10 minutách iradiace dosahovala  $2,1 \pm 0,9 \text{ mm}^3$  [65].

Pevsner et al. modifikovali model fototrombózy tím, že použili delší dobu expozice s nižší intenzitou. Bílé xenonové světlo o intenzitě  $1 \text{ mW/mm}^2$  vedli optickým vodičem o průměru 5mm na chirurgicky odhalenou kalvu z drobné incize, systémově podávali bengálskou červeně v dávce 20mg/kg. V experimentu použili potkany o hmotnosti 200 - 300 gramů. Délku svícení stanovili na 30 minut. Hloubka ischemické léze měřeno kolmo od povrchu mozku dosahovala na histologických koronárních řezech šíře  $6 \mu\text{m}$  zhotovených 7 hodin po vyvolání ischemie 4,2mm, z čehož zóna nekrózy tvořila 2,5mm [155].

S originálním konceptem přišli Hu et al., kteří svítili laserovým světlem prstenčitého tvaru o vnějším průměru 5mm. Použili model fototrombózy s aktivací erythrosinu B, který aplikovali systémově. Délka svícení byla 120s a byly použity celkem dvě intenzity záření (Obr. 74). Morfologická studie byla provedena na tenkých řezech šíře  $5 \mu\text{m}$  s rozstupem  $400 \mu\text{m}$ . Velikost infarktu byla největší mezi 10. a 24. hodinou po inzultu a dosahovala 12,2% objemu hemisféry [156,157].

## Objem ischemické léze při svícení světlem prstenčitého tvaru



Obr. 74: Objem ischemické léze při iradiaci laserovým světlem prstenčitého tvaru o dvou intenzitách. Upraveno z [156].

### 4.1.1. Morfologické ověření ischemické léze

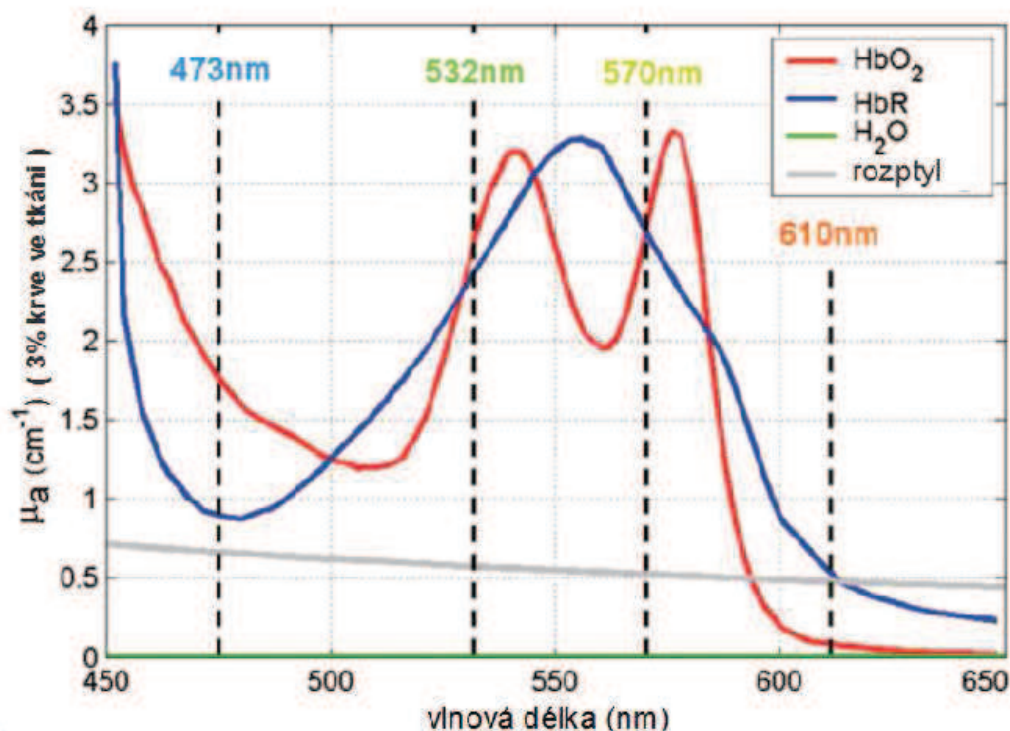
V našem experimentu jsme použili morfologické ověření léze barvením TTC. V porovnání s uvedenými pracemi je to jeden z oblíbenějších průkazů ložiska ischemie v mozku. Hlavní výhodou je to, že oblast ischemie, tj. oblast, která se TTC nebarví, je dobře patrná i bez mikroskopu a řezy tak lze jednoduše vyfotit digitální kamerou v makro režimu. Pro hodnocení nemusí být řezy tenké, Kim et al. s úspěchem použili barvení TTC na řezy šíře 2mm [152]. V našem experimentu jsme vytvářeli řezy šíře 1mm. Tato hodnota však již vyžaduje zcela delikátní a jemnou práci, protože řezy již této šíře jsou značně fragilní. Použití tenčích řezů pak vede k nutnosti vynechávat mezery, protože jinak by řezů bylo příliš mnoho. Hodnocení na úrovni histopatologie je zcela nepřesnější ale i nenáročnější. V našem experimentu, kde jsme potřebovali prokázat pouze přítomnost ischemické léze, nebylo nezbytné. Rovněž nebylo naším cílem hodnotit rozsah ischemického ložiska v časových intervalech, kde v současné době nachází využití magnetická rezonance a výpočetní tomografie [63,64].

#### 4.1.2. Teplota v ozařované oblasti

V původním modelu fototrombózy, jak ho poprvé popsal B. D. Watson [51], byla použita oblouková lampa s ventilátorem s obtížně odhadnutelným termickým efektem na kalvu. Postupně docházelo k vylepšování modelu. Nejdříve přidáním tepelného filtru. Dalším vylepšením bylo použití optického vodiče, který omezuje přenos tepla a díky kterému lze světelný paprsek snadno stereotakticky umístit nejen na kalvu [153], ale i do hlubších struktur [65]. V posledně zmíněné práci rovněž nebylo prokázáno případné zvýšení teploty při svícení optickým vodičem do 1ml vody [65]. Nicméně toto nelze považovat za průkaz, protože ve vodě se světlo absorbuje oproti mozkové kůře málo (Obr. 75). Při stimulaci korových neuronů infračerveným laserem bylo změřeno lokální zvýšení teploty o circa jeden stupeň [158].

Buchkremer-Ratzman et al. pozorovali zvýšení teploty v oblasti, která byla osvětlena, a v jejím okolí o 1-2 °C. Toto zvýšení však považovali za větší než by reálně odpovídalo zvýšení teploty na intaktní kalvě pohlcením světla [149].

Absorpční koeficient viditelného světla v mozkové kůře



Obr. 75: Absorpční koeficient viditelného světla v kůře mozku menších obratlovců s předpokladem 3% obsahu oxygenované (HbO<sub>2</sub>, červená křivka) nebo deoxygenované (HbR, modrá křivka) krve. Zeleně pro srovnání absorpční koeficient vody (H<sub>2</sub>O). Upraveno z [159].

V našem experimentu jsme vytvořili lézi o průměrné velikosti 7,7mm<sup>2</sup> (plocha léze) x 1mm (šíře řezu) = objem 7,7mm<sup>3</sup>. Udávaný výkon laserového světla byl 50mW/mm<sup>2</sup>. Za 9 minut svícení to činí 27 Joule. Při měrné tepelné kapacitě vody 4180 Jkg<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup> a uvedeném ozářeném objemu a stoprocentním přenosu tepelné energie by se teplota



zvýšila o  $27 / (4180 \times 0,0077) = 0,8$  K. K tomu v praxi pochopitelně nedochází, protože významná část laserového světla se odráží. Navíc se povrch mozku, který absorbuje největší podíl záření, sám ochlazuje od okolního vzduchu. Dále lze předpokládat, že u experimentů, kde jsme zaznamenávali jednotkové potenciály v hloubce 950 až 1500 $\mu$ m, je intenzita paprsku podstatně nižší, protože klesá exponenciálně, jak tento jev popisuje Lambert-Beerův zákon:  $H_z = H_0 e^{-\mu z}$ , kde  $H_0$  je výkon záření ve vzdálenosti  $z = 0$ ,  $\mu$  je absorpční koeficient. Lokální nahromadění tepelné energie v čase popisuje konstanta termální relaxace  $t_{\text{therm}}$ , která vyjadřuje, za jaký čas dojde k dissipaci lokálně nahromaděného tepla, numericky kolem 112 ms. Teplo se dissipuje za desetinasobek tohoto času, tj. 1,2s a při kratším čase se ho část hromadí [160,161]. Další otázka, kterou jsme řešili a která je diskutována dále, byla, zda samotné osvětlení kalvy či mozkové kůry nemůže vést jiným mechanismem ovlivnění excitability neuronů a event. i glie.

#### 4.1.3. Měření velikosti léze

V literatuře lze vyhledat různé metody kvantifikace rozsahu ischemické léze na řezech různé šíře při různých metodách jejich barvení. Jedná se například o měření maximálního rozměru nebo plochy ložiska [162], poměr k celkovému objemu hemisféry [156,163], hloubku léze měřenou kolmo k povrchu mozku [155]. Nejpřesnější se zdá být absolutní hodnota celkového objemu [153], buď jako součet plochy na každém z řezů násobený šířkou řezu [164], či jako extrapolace na trapézoid [153].

Goldlust et al. vytvořili software pro automatické hodnocení léze na řezech barvených TTC na základě dekompozice na komponenty RGB modelu (červená-zelená-modrá). Červené a zelené barvě přiřadili prahovou hodnotu a minimální plochu léze v pixelech. Tímto způsobem odstranili variabilitu v hodnocení jednotlivými pozorovateli [136]. Je však zřejmé, že u použitého modelu okluze a. cerebri media je rozlišení obarvené a neobarvené tkáně jednodušší než u menších lézí, které vytváříme v naší laboratoři. Navíc je otazné, zda symetrické použití těchto dvou komponent RBG modelu je optimální. Vizuální hodnocení totiž preferuje barvu červenou, v literatuře se objevuje i hodnocení pouze podle zelené komponenty, nicméně jsme nenalezli zmínku o použití jiného barevného modelu (CMYK, YUV, HSL) či optimalizaci detekce pomocí nějaké funkce více modelů nebo kanálů.

V našem experimentu jsme použili manuální hodnocení pomocí volně dostupného grafického programu ImageJ (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health), který umožňuje změřit obkreslenou plochu. Přepočtení na plochu jsme prováděli pomocí měřítka, které bylo přiloženo ke každému z řezů při fotodokumentaci. Objem léze se dále spočítal jako:

$$\text{objem léze} = \text{plocha léze} * \text{šíře řezu}$$

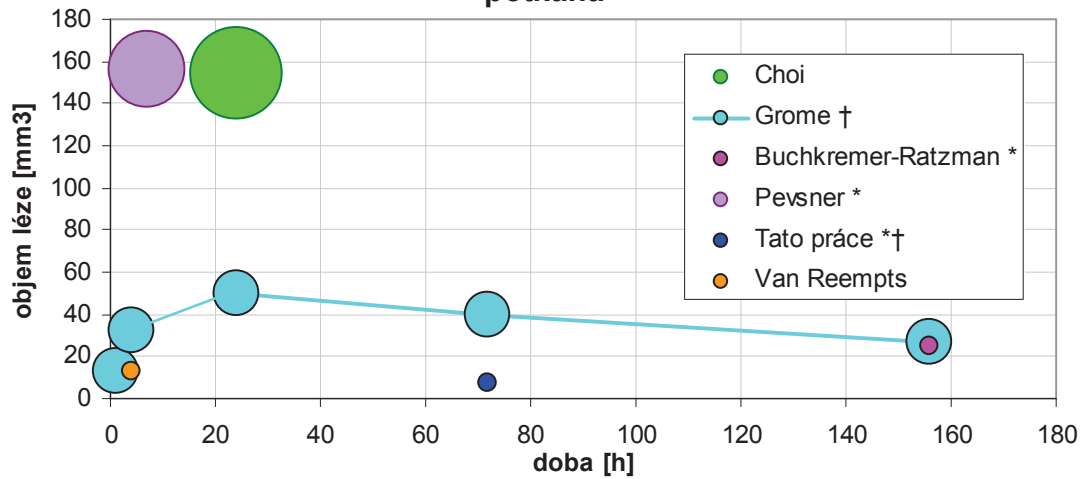
kde šíře řezu je 1mm a celková plocha léze je uvedena ve výsledcích. V experimentální skupině takto vychází objem léze na 7,7mm<sup>3</sup>.

#### 4.1.4. Srovnání velikostí lézí mezi články

Celkový objem léze se mezi jednotlivými experimenty různých autorů liší. Závisí zejména na velikosti ozařované oblasti (průměr paprsku), výkonu světelného zdroje, době svícení a zvířecím modelu. Dokonce existuje i variabilita mezi kmeny: u kmene Wistar na rozdíl od kmene Sprague-Dawley jsou ischemické léze menší, nestejněměrné a vykazují větší zónu nekompletní ischemie [60]. Další proměnnou je doba, která uplyne mezi vytvořením ischemické léze a usmrcením zvířat. Hu et al. ukázali, že objem ischemické léze roste v prvních 12 hodinách, poté stagnuje a po 24 hodinách od jejího vyvolání postupně klesá [156] (Obr. 74). Závislost velikosti léze na světelném výkonu neplánovaně ověřili Van Reempts et al. z důvodu, že jejich xenonová žárovka musela být vyměněna a nová žárovka byla silnější. Velikost léze pak byla 3,4 krát větší [69]. Choi et al. zjistili, že u potkana při fototrombóze vyvolané aktivací bengálskou červení je významně vyšší objem ischemické léze při 10 minutách svícení, než při 5 minutách, dále však už její objem významně neroste [148]. Teoreticky vzato, další proměnnou, která by mohla vést k ovlivnění velikosti ischemické léze, je stáří potkana, respektive tloušťka kalvy. Zmínku o tom, že by u starších zvířat byly ischemické léze menší, jsme nenašli.

V naší práci jsme změřili objem ischemické léze na  $7,7\text{mm}^3$  za 3 dny po vyvolání ischemického infarktu. To je v porovnání s ostatními pracemi, kde bylo svíceno přes kalvu, relativně málo (Obr. 76, tab. 6). Hlavním důvodem bude pravděpodobně menší plocha světelného paprsku. Dále to, že jsme svítili na kůru a nikoliv na kalvu, jak tomu bylo u většiny ostatních prací. Svícení na kalvu má za následek částečné rozostření laserového paprsku a osvětlení o něco větší plochy, a tím pádem zřejmě i vznik větší léze. Relativně menší objem léze je ale srovnatelný s prací Kuroiwa et al., kteří přiváděli světlo tenkým fiberoptickým vodičem přímo do bazálních ganglií [65]. Dalším důvodem menšího objemu je vlnová délka použitého laseru, při které je extinkce bengálské červeně 3,6 krát menší než v jejím maximu. Rovněž potkani kmene Wistar vykazují menší velikost ložiska kompletní ischemie v porovnání s kmenem Sprague-Dawley [60]. Drobnou lézi jsme změřili i na kontralaterální straně, kde byl rovněž vytvořen trepanační otvor. Její přítomnost vysvětlujeme zaprvé citlivou metodikou měření, kde jsme brali v úvahu sebemenší snížení sytosti barvení v místě, kde byl vytvořen trepanační otvor. Další možnou příčinou může být drobná traumatizace během chirurgické přípravy, event. dopad okolního (ambientního) světla na kůru. Je ale nejisté zda ambientní světlo samo stačí k aktivaci fotosenzitivního barviva. Pravděpodobnost, že se jedná o efekt diaschízy [61,165] je minimální, popsáno bylo pouze funkční postižení kontralaterální kůry [149,166] a porucha hematoencefalické bariéry [61]. Rozmezí velikostí lézí lze vysvětlit měnlivým prostředím na povrchu odhalené mozkové kůry, kterou bylo u některých zvířat nutno jednotlivými částmi experimentu osušovat.

**Velikost ischemické léze v závislosti na odstupu  
morfológického zpracování od ischemického infarktu u  
potkana**



**Obr. 76:** Velikost ischemické léze v závislosti na odstupu morfológického zpracování od ischemického infarktu. 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).

Tab. 6: Srovnání prací používajících model fototrombotické ischemické léze. \* u práce Choi et al. označují minuty dobu iradiace. B.Č. = bengálská červeň, E.B = erythrosin B, i.v. = intravenózní, i.p. = intraperitoneální, BG = bazální ganglia.

Srovnání prací používajících model fototrombotické ischemické léze											
Práce (první autor)		Weise	Choi	Reempts	Buchkremer-Ratzman	Schroeter	Kim	Grome	Kuroiwa	Pevsner	Tato práce
zvíře	druh	myš	potkan	potkan	potkan	myš	myš	potkan	potkan	potkan	potkan
	hmotnost [g]	20-30	300-350	250-270	290-310	20-25	35-40	300-350	270-320	200-300	300-350
fototrombóza	látka	B.Č.	B.Č.	B.Č.	B.Č.	B.Č.	E.B	B.Č.	B.Č.	B.Č.	B.Č.
	koncentrace [mg/ml]			7,5mg/mL		10mg/mL		5mg/mL			10mg/mL
	množství [mg/kg]		30	10	13	1mg celkem	30	5mg celkem	20	20	20
	cesta	i.p.	i.v.	i.v.	i.v.	i.p.	i.v.	i.v.	i.v.	i.v.	i.v.
světlo	typ	bílé	bílé (halogen)	bílé (xenon)	bílé	bílé	laser 345,5nm (He-Ne)	zelené světlo (xenon + filtr 570nm)	bílé	bílé	laser 532nm
	výkon [mW/mm <sup>2</sup> ]						0,31			1	1
	šíře paprsku [mm]		6	1	1,5	1,5	2	3	0,5-0,75	5	<1
	doba iradiace [min]	20	5,10, 20	20	20	15	3	15	5 až 10	30	9
	lokalita	kalva	kalva	kalva	kalva	kalva	kalva	kalva	kalva	BG	kalva
morfologie	šíře řezu [mm]	5	2	0,1	0,4	0,2	2	0,008	1	0,006	1
	objem léze [μL]*		5 min.: 69,9 10 min.: 34,5 20 min.: 153,9	3,7 až 13,1	6,4 (průměr zóny 2,3mm)	4,39	6 hod: 1,2 24 hod: 3,5	1 hod: 13 4 hod: 32 24 hod: 50 72 hod: 40 168 hod: 27	4 hod: 2,1 24 hod: 4,2	38,7 (4,2 mm od kůry do hloubky)	7,7
	doba od vyvolání léze	1-6 dnů	24 hod	4 hod	6 až 7 dní	3 dny	6, 24 hod	1, 4, 24, 72, 168 hod	4, 24 hod	7 hodin	3 dny

#### 4.1.5. Množství fotosenzitivního barviva, rychlost a cesta podání

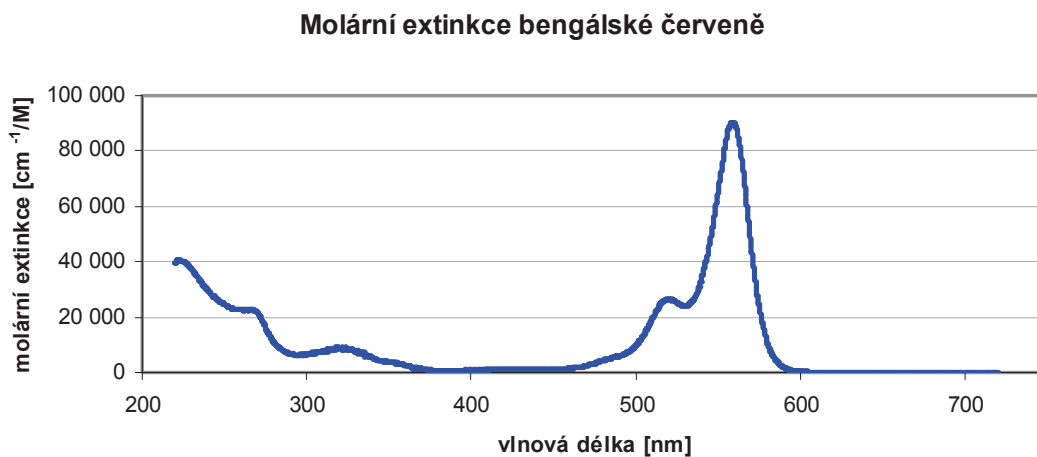
V zásadě se používají dvě fotosenzitizující látky, bengálská červeň a erythrosin B, z nichž první zmíněná je používána více co do počtu dostupných publikací. Hlavní nevýhodou bengálské červeně je to, že pokud je infúze prováděná manuálně místo automatickou pumpou, může dojít k přechodné hypotenzi, která může být pro zkoumané zvíře i fatální. Naproti tomu, u erythrosinu B není takový efekt popisován a lze ho bezpečně dávkovat i bez infúzní pumpy. Dále je účinek obou podobný. V našich experimentech, kde jsme používali bengálskou červeň, jsme zaznamenali několik případů, u kterých po intravenózním podání bengálské červeně došlo k zástavě životních funkcí s nutností resuscitace, která byla ve většině případů neúspěšná. Bengálskou červeň jsme podávali pomalu, po dobu zhruba půl minuty. Nicméně, i kdyby resuscitace úspěšná byla, nelze tyto jedince kvůli prodělané hypotenzní epizodě dále do studie zařadit. Infúze fyziologického roztoku nebyla pochopitelně u žádného ze zvířat v kontrolní skupině doprovázena žádnou nežádoucí reakcí.

Bengálská červeň byla ve jmenovaných studiích podávána v koncentraci 5 až 10mg/kg, v množství 10 – 30mg na kilogram hmotnosti zvířete. Ve většině případů byla

látka podávána intravenózně. Byla-li podána intraperitoneálně, tak v obdobném množství [150]. Intraperitoneální podání má výhodu v tom, že je jednodušší, obejde se bez kanylace žíly a látka se vstřebává postupně. Tím se zamezí i hypotenzní epizodě, kterou může intravenózní injekce bengálské červeně způsobit.

#### 4.1.6. Vlnová délka paprsku

Maximum extinkce bengálské červeně je při vlnové délce světla 562 nm, kterou lze získat použitím např. kryptonového laseru, jež vyzařuje světlo o vlnové délce 568nm [67,68]. V našich experimentech jsme použili diodový laser o vlnové délce 532nm. Při této vlnové délce má bengálská červeně extinkci 3,6x menší než ve svém maximu (Obr. 77). Z toho vyplývá i nutnost použití vyšší intenzity světelného paprsku k dosažení stejného efektu.



Obr. 77: Graf molární extinkce bengálské červeně. Upraveno z [167].

Extinkční maximum erythrosinu B leží na 537nm. Helium-neonový laser o vlnové délce 543,5nm [152] nebo námi používaný diodový laser o vlnové délce 532nm (Obr. 15) jsou dostatečně blízko k jeho maximální aktivaci. Vzhledem k pozvolnějšímu maximum extinkce erythrosinu B by tento měl teoreticky být vhodnější i pro aktivaci bílým světlem [168].

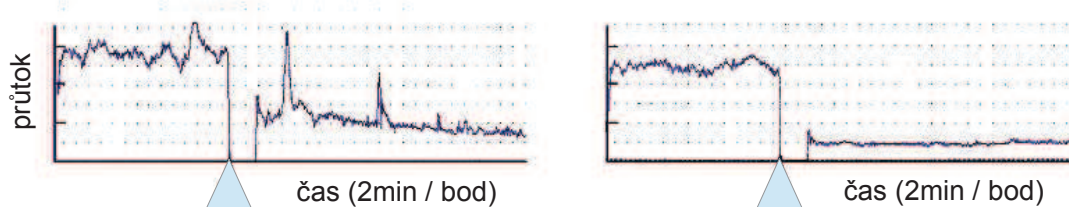
#### 4.1.7. Intenzita paprsku

Mezi články, které udávají i intenzitu či výkon použitého světla, jsou značné rozdíly jak v uváděných jednotkách (mW, mW/mm<sup>2</sup>, lux), tak i v číslech. Zhruba lze říci, že používaný výkon světla je od desetin do desítek mW/mm<sup>2</sup>. Rozdílnost údajů pravděpodobně vychází z různé metodiky měření a použití různých světelných zdrojů a nelze je tedy mezi sebou porovnávat. Rovněž je rozdíl mezi iradiací světlem o definované vlnové délce (příp. jeho užším pásmu) nebo spektrem (např. bílé světlo), jak vyplývá i z grafů extinkce obou fotosenzitizujících barviv (Obr. 77, ).

#### 4.1.8. Rychlost nástupu účinku

Časový vztah nástupu ischemie a začátku iradiace lze studovat měřením průtoku kůrou (cCBF – cortical cerebral blood flow) pomocí laserového doppleru (Obr. 78). Hu et al. ukázali na příkladech, že nástup účinku resp. vytvoření fototrombózy je prakticky okamžité po ozáření cílového objemu [157]. Doba trvání ischemie rovněž závisí na intenzitě laserového paprsku. V případě intenzity  $9 \text{ mW/mm}^2$  byla pozorována reperfúze. Naproti tomu, při zvýšení intenzity na dvojnásobek k reperfúzi nedocházelo [157]. Délka svícení se rovněž odvíjí od použitého barviva. Poločas erythrosinu B v plazmě se pohybuje pod 2 minuty [152]. Naproti tomu u bengálské červeně je řádově delší [169]. U erythrosinu B tedy nemá cenu svítit déle než 10 minut, není-li podáván kontinuálně, počítáme-li eliminační čas jako 4,5krát poločas eliminace. Hu et al. svítili pouze 120s při infúzi erythrosinu B, která trvala 30s [157]. Naproti tomu u bengálské červeně lze barvivo aktivovat déle nebo i opakovaně.

#### Průtok kůrou mozku během rozvoje kortikální fototrombotické ischemické léze



Obr. 78: Průtok kůrou v oblasti ischemické léze (vpravo) a v jejím okolí (vlevo) měřený pomocí laserového doppleru ukazuje, že nástup účinku fototrombotické léze je prakticky okamžitý. Šipka označuje začátek svícení. Upraveno podle [157].

#### 4.1.9. Celkové zhodnocení modelu fototrombotické ischemické kortikální léze

V naší laboratoři se nám podařilo úspěšně zavést model ischemické fototrombotické léze, provést jeho morfologické ověření a s tímto modelem provádět další experimentální práce. Na rozdíl od většiny jiných prací jsme svítili paprskem přímo na kůru. Důvod byl ten, že jsme potřebovali zaznamenávat signál z těsného okolí léze. Menší velikost lézí v porovnání s ostatními jsme dosahovali z důvodu velmi malého průměru laserového paprsku s o něco nižší vlnovou délkou než je maximum extinkce bengálské červeně a relativně nižší intenzity. Menší léze jsou rovněž popisovány u kmene Wistar, který jsme v experimentech použili [60].

Hlavní nevýhody modelu fototrombotické léze vyplývají z mikrovaskulárního poškození: během ischemie vzniká relativně malá penumbra nebo oblast se sníženým tokem a reperfúzí, na rozdíl od postupně přibývajících změn od periferie do centra u jiných modelů [170]. Toto však platí pouze pro přímé ozáření kůry (resp. kalvy). Hu et al. upravili model fototrombotické ischemické léze tak, že provedli ozáření paprskem ve tvaru prstence s vnějším průměrem 5mm [157]. Tím vytvořili inverzní model ischemického ložiska s penumbrou lokalizovanou centrálně. Pokud bychom prováděli

uzávěr tepny aktivací fotosenzitivního barviva přímým svícením na tuto tepnu, tak by výsledek byl podobný jako např. u mechanické okluze [66,170].

Další otázkou je možnost přímé interakce laserového světla s neurony mozkové kůry či s elektrodou, jak je diskutováno dále. Tato interakce by mohla celý model fototrombotické léze učinit neschůdným pro elektrofyziologická měření během svícení laserovým světlem. Problémem může být i penetrace ambientního světla přes odhalenou kalvu a vyvolání fototrombózy v jiných lokalitách, i když v podstatně menším měřítku než na svícené straně.

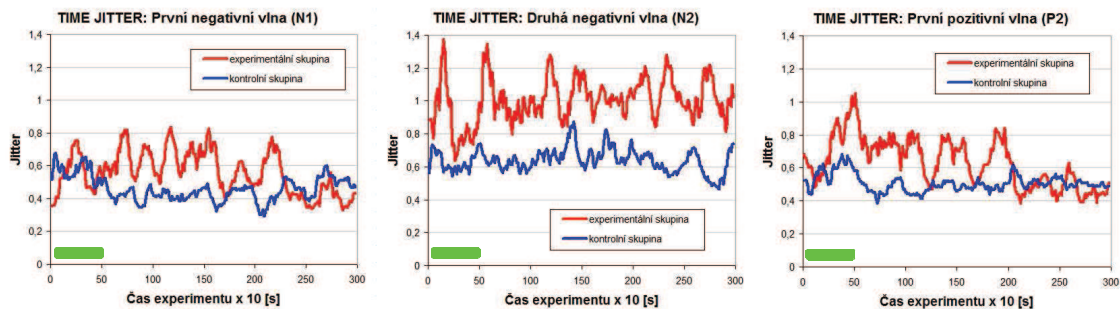
Obecně je hlavní výhodou tohoto modelu dobrá reprodukovatelnost ischemické léze. Dále je to relativní jednoduchost modelu. Zejména minimální chirurgická invazivita, kdy postačí svítit na odhalenou kalvu. Svítit lze dokonce i obyčejným bílým světlem, nejlépe přes světlovodné vlákno pro přesnější zacílení paprsku. Fotosenzitivní barvivo lze údajně podat i intraperitoneálně bez nutnosti kanylace žíly a rizika akutních nežádoucích účinků jako je systémová hypotenze a srdeční zástava.

V této části práce jsme dokumentovali úspěšné zavedení experimentálního modelu kortikální fototrombotické ischemické léze v naší laboratoři. Ischemické léze jsou v porovnání s dostupnou literaturou menší, což je dáno menším průřezem světelného paprsku, vlnovou délkou použitého laserového světla a použitým kmenem laboratorního potkana. Rešerší jsme zjistili, že vliv přenosu tepelné energie je u modelu fototrombózy zanedbatelný. 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. Otázkou zůstává možnost přímé interakce světla s kortikálními neurony či s materiálem elektrod, která by učinila tento model neschůdným pro elektrofyziologická měření během vzniku fototrombotické léze. Model fototrombotické léze je možno dále zjednodušit intraperitoneálním podáním fotosenzitivní látky, použitím polychromatického světla a světelného vodiče.

#### **4.2. 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 [77–79]. Shao ve své práci popisuje postupné prodlužování latence první vlny evokovaného potenciálu s odstupem od ischemie vyvolané uzávěrem a. cerebri media u potkana [81,82]. V literatuře se uvádí i vymizení evokovaných potenciálů během rozvoje ischemie [80] s jejich návratem po ukončení ischemického infarktu [77]. Amplituda somatosenzorických evokovaných potenciálů klesá zhruba od průtoku 18ml/100g/min a ztrácí se pod 12ml/100g/min. 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 [171]. Kromě času a amplitudy lze pozorovat změny variability latence jednotlivých komponent zvané time jitter [172] (Obr. 79). Snížení

amplitudy evokovaného potenciálu může prohlubovat fakt, že ischemická tkáň má vyšší impedanci [173].



**Obr. 79:** Time jitter: všechny tři grafy ukazují time jitter somatosenzorického evokovaného potenciálu v primární projekční oblasti (kontralaterálně ke stimulaci n. ischiadicus). Červená křivka značí experimentální skupinu, modrá kontrolní skupinu, u které nebyla podána bengálská červen. Zelený proužek označuje dobu svícení laserovým světlem. Graf vlevo je sestaven pro první negativní vlnu (N1), uprostřed pro druhou negativní vlnu (N2), vpravo pro první pozitivní vlnu (P1). Křivky jsou klouzavým průměrem vypočtených hodnot o šíři 60s. Z grafu je patrný vyšší time jitter u experimentální skupiny, který je i v hrubším pohledu více rozkolísaný, ke konci záznamu se v experimentální skupině ve vlně N1 a P1 opět přibližuje skupině kontrolní. Vlastní experimentální data.

Práce autorů Sakatani et al. ukazuje, že po jedné a třech hodinách od vyvolání ischemie uzávěrem a. cerebri media dochází k opětovnému obnovení amplitudy somatosenzorických evokovaných potenciálů, ba co více, amplituda vln přesahuje amplitudu v záznamu před vyvoláním ischemie [174]. Snížení amplitudy evokovaného potenciálu negativně koreluje s průtokem krve mozkovou kůrou (nižší amplituda při nižším průtoku a naopak) [175]. Na EEG vede snížení průtoku krve mozkem ke snížení amplitudy [176] a frekvence ve prospěch theta (5 – 7 Hz) a delta (0,5 – 4 Hz) rytmu [177]. Evokované potenciály se na nepostižené straně prakticky nemění. V případě korově se šířící deprese (cortical spreading depression, CSD) způsobené infúzí kalie se jejich amplituda zvyšuje [78]. Snížení amplitudy během rozvoje fototrombotické ischemické kortikální léze, které jsme prokázali v primární somatosenzorické oblasti u experimentální skupiny, je v souladu s pozorováním jiných autorů. Překvapivé jsou ale podobné změny u kontrolní skupiny a i na opačné straně, než bylo svíceno. Tyto změny jsou diskutovány dále společně s vlivem laserového světla na mozkovou kůru. Pozorované změny latence zahrnovaly její přechodné zkrácení během dopadu laserového světla u vlny N2 u obou skupin na obou stranách a u vlny P1 na neozářované straně. Vzhledem k tomu, že nastávalo i u kontrolní skupiny, si ho lze vysvětlit pouze samotným účinkem laserového světla na mozkovou kůru, které je diskutováno v samostatné kapitole. Po ukončení iradiace jsme pak prokázali pouze mírné prodlužování některých vln, což je v souladu s dosavadními znalostmi.

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 iradiace přičítáme vlivu ozáření laserového světla na mozkovou kůru stejně jako zkrácení latence vlny N2 u obou skupin na obou stranách.



Podrobné hodnocení vývoje somatosenzorického evokovaného potenciálu jsme mohli provést díky programu, který je součástí této práce a je diskutován v samostatné kapitole.

### **4.3. 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 infarktu rychle klesá a tak zůstává do konce experimentu. Tyto změny volně kopírují předpokládané změny průtoku v této oblasti zobrazené na Obr. 78 [157]. Podobné změny popsali i Heiss et al. u koček, u kterých v závislosti na průtoku krve mozkovou kůrou (CBF) došlo až k vymizení aktivity. U zvířete, kde došlo k opětovnému zvýšení CBF, se aktivita opět objevila. Ojediněle bylo pozorováno i přechodné zvýšení aktivity neuronu, které lze vysvětlit vyšší vulnerabilitou inhibičních systémů ke sníženému CBF [178].

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

Obecně lze konstatovat, že aktivita jednotkových potenciálů zaznamenávaných v blízkosti ischemického ložiska volně kopíruje předpokládané změny perfúze této oblasti (Obr. 78). To svědčí pro účinnost modelu fototrombotické ischemické kortikální léze, jak jsme ho zavedli v naší laboratoři. Neočekávané však byly méně výrazné přechodné změny podobného charakteru u kontrolní skupiny, kde bylo svíceno laserovým světlem bez podání fotosenzitivního barviva, které je diskutováno dále společně s vlivem světla na mozkovou kůru. Hodnotit vývoj aktivity jednotek v čase v průběhu celého experimentu nám umožnil program, který byl pro tento účel navržen a implementován a který je diskutován v samostatné kapitole.

### **4.4. 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 [179]. Hlavní komponenty pak byly použity k odlišení a kvantifikaci změn evokovaného potenciálu. Výpočet byl prováděn ve výpočetním centru, což bylo zjevnou absolutní překážkou analýzy v reálném čase. Užití minipočítače ve smyslu počítače, který nevyžaduje samostatnou místnost, pro hodnocení evokovaných potenciálů v reálném čase bylo popsáno v roce 1976 [180]. Program již tehdy počítal Fourierovu transformaci za účelem implementace Wienerova filtru k potlačení šumu.

Část dostupných prací řešila problém rozpoznání, zda je evokovaný potenciál patologický s případným dalším zatříděním patologie. Jedním z přístupů je hledání (resp. identifikace) jednotlivých vln v záznamu evokovaného potenciálu. Abolhasani et al. implementovali algoritmus k automatické detekci vln kmenových sluchových evokovaných potenciálů (brainstem auditory evoked potentials, BAEP). Po filtraci signálu označili všechny vrcholy v předem stanovených intervalech. V každém intervalu pak vybrali ten, který byl nejbližší vzorovému obrazu počítáno jako průměr kvadrátů odchylek [82]. Pro klasifikaci odchylek od normy hodnocených jako změny latence určité vlny použili jednoduché fuzzy logiky [181]. V 95% případů výstup latence nalezených vrcholů korespondoval s klinickým hodnocením záznamu. Není však známo, kolik záznamů bylo patologických. Třídění záznamů pomocí fuzzy logiky dosahovalo přesnosti (accuracy) pouhých 65% pro pět stanovovaných případů. Pro rozlišení záznamu normálních pacientů a pacientů s kochleárním implantátem je udávaná přesnost 83%. Pro automatické rozlišení patologických evokovaných potenciálů bylo využito i neuronových sítí po předchozí transformaci dat [182,183].

V naší práci měl problém vyhledávání vrcholů další parametr, časový průběh. Přesněji řečeno, hledali jsme algoritmus, který by postihl jak lokální vlastnosti evokovaného potenciálu v daném časovém bodě, tak i globální charakteristiky, zejména vývoj v okolí [184]. V literatuře jsme nenašli článek, který by tuto problematiku řešil. Není problém nalézt a identifikovat na dobrém záznamu komponenty evokovaného potenciálu. Naopak, je to velmi složité, když se mění tvar evokovaného potenciálu (např. vlivem experimentálního zásahu) tak, že nelze z jediného záznamu s jistotou říci, která komponenta je která, a zda určité vrcholy (lokální extrémy) nějaké komponentě vůbec odpovídají. Pro stanovení průběhu vlny jsme potřebovali najít kompromis mezi tím aby:

1. lokální extrém měl určitou amplitudu vůči svému okolí,
2. se lokální extrém pohyboval v určité latenci od stimulu, abychom nevyhledávali pouze první negativní a pozitivní komponentu evokovaného potenciálu, které mají největší amplitudy,
3. v časovém průběhu experimentu nebyly výrazné výkyvy, t.j. aby komponenty v sousedních evokovaných potenciálech neměly příliš odlišné latence – změna latence a amplitudy by měla v experimentu probíhat téměř spojitě (s přihlédnutím k prakticky nevýznamným diskrétním časovým intervalům ve kterých sestrojujeme sousední jednotkové potenciály).

Tyto podmínky obecně definují optimalizační kritérium. Třetí podmínka je zásadní, odlišuje účel této části práce od jiných autorů. Vede i k nutnosti použití heuristiky (optimalizačního algoritmu). Vždyť použití výpočtu hrubou silou by si vynutilo spočítání všech permutací daného stavového prostoru – v našem případě by to bylo

$$O(s^n),$$

kde  $s$  je počet prohledávaných datových bodů v jednom evokovaném potenciálu a  $n$  je počet sestrojených evokovaných potenciálů!

Z metaheuristik k optimalizaci počátečního řešení jsme zvolili simulované ochlazování [87], protože s ním máme zkušenosti i z jiných prací. Další výhodou je jednodušší definice a nastavení konstant a funkcí v tomto algoritmu. Naproti tomu u tabu vyhledávání spatřujeme hlavní nevýhodu při řešení našeho problému v obtížné definici pravidel prohledávání stavového prostoru a tím i složitější implementaci a ladění. Nevýhodou evolučních algoritmů je potřeba více počátečních řešení a výpočetní náročnost z důvodu počítání optimalizačního kritéria pro každého jedince v populaci.

Kontrolu správnosti implementace algoritmu jsme ověřovali graficky porovnáním s předpokládaným průběhem komponenty akčního potenciálu v trojrozměrném grafu. Objektivně toto nelze dobře ověřit, protože by to vyžadovalo nezávislého arbitra, který by manuálně vyhodnotil latence všech komponent všech sestavených evokovaných potenciálů, a to nelze. Navíc, jak již ale bylo uvedeno, pokud by toto hodnotil člověk, tak by byly v hodnocení nejasnosti, protože v určitých částech záznamu by nešlo vlnu spolehlivě identifikovat.

V experimentu jsme hodnotili první tři vlny somatosenzorického evokovaného potenciálu. Čtvrtá a pátá vlna jsou poměrně variabilní a v mnoha případech těžko odlišitelné (i vizuálně) od okolního šumu. Proto jsme se jejich hodnocením, které by nebylo konzistentní, stejně jako jiní autoři [81], nezabývali. Rovněž by nebylo možno zhodnotit kvalitu výstupu. V některých pracích byla hodnocena latence a amplituda dokonce pouze jedné nejvýraznější vlny [78].

Komplexní hodnocení záznamu průběhu evokovaných potenciálů v čase má nesporný význam. V první řadě se jedná o to, že v klasickém případě manuálního hodnocení vybereme podle našeho přesvědčení reprezentativní body v průběhu experimentu, ve kterých manuálně stanovíme parametry jednotlivých vln – latenci a amplitudu a ty porovnáme statistickým testem. Větší šanci najít rozdíl v záznamech máme, když určíme všechny body z celého záznamu, o kterých jsme zjistili, že statisticky významný rozdíl vykazují (Obr. 35, Obr. 36). Další výhodou je časová kontinuita sledované komponenty, kdy v některých případech bychom manuálně vlnu chybně vyhodnotili, případně vůbec nenašli, nicméně pomocí tohoto algoritmu ji můžeme na základě vztahu k okolí vždy stanovit (Obr. 6).

V této části práce jsme navrhli a implementovali algoritmus semiautomatického hodnocení průběhu komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu v čase, protože jsme nenalezli jiný vhodný nástroj, který by toto uměl. Vybrali jsme a upravili pro naše speciální potřeby některé obecné programovací postupy (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 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. Změny, které jsme pomocí tohoto programu prokázali, jsou diskutovány v samostatné kapitole.

#### **4.5. Analýza časového vývoje jednotkových potenciálů**

Automatizované hodnocení jednotkových potenciálů je v současné době prerekvizitou analýzy neustálených stavů vyvolaných experimentálním zásahem. V moci člověka je nalézt a vypsát body jednotkových potenciálů v kvalitním záznamu v délce několika minut. Hodnocení méně kvalitních záznamů o delším trvání ale jeho možnosti přesahuje. Wood et al. ve své práci dokumentovali značnou variabilitu hodnocení záznamů jednotkových potenciálů člověkem, kdy falešná negativita či pozitivita dokázala přesáhnout hranici 50% [185].

V našich experimentech jsme hodnotili vývoj jednotkových potenciálů při vzniku ischemické léze vyvolané fototrombózou [18,51,155]. Protože jsme zaznamenávali signál v těsné blízkosti rozvíjejícího se ischemického ložiska, museli jsme nutně předpokládat změny tvaru a amplitudy extracelulárního záznamu. Tyto změny pravděpodobně vznikají v důsledku edému [156] s následnou dislokací neuronu [186], rozdílnou impedancí ischemické tkáně [173], odpovědí neuronu na ischemický inzult, případně jeho lýzou. V důsledku vzájemného geometrického posunu snímaného neuronu a registrační elektrody během záznamu lze předpokládat tvarové změny jednotkového potenciálu. Z tohoto důvodu jsme slevili z nároku na odlišení záznamu jednotlivých neuronů, což je ale v relativně ustáleném stavu v programu možné provést.

V úvodu jsou diskutovány jednotlivé principy detekce akčních potenciálů [116,144,187]. Prezentovaná implementace využívá shlukové analýzy sítě RBF metodou k-means. Porovnáváme jednotlivé úseky se vzory, které představují jednotlivé neurony umělé sítě. V případě, že se nový úsek liší od nejbližšího vzoru méně než se liší jednotlivé vzory mezi sebou, přiřadíme úsek k onomu vzoru. Nalezený vzor je upraven směrem k nově přiřazenému úseku. Váha pro úpravu bodů nalezeného vzoru odpovídá počtu úseků, které daný vzor „pohltil“. Tím rovněž dosahujeme konvergence v čase: čím později úsek vzoru přiřazujeme, tím více již má daný vzor „nasbíráno“ podobných úseků a má tudíž i větší „váhu“ a menší „ochotu“ měnit tvar své křivky.

Úseky, jejichž vzdálenost od nejbližšího vzoru je větší než nejmenší aktuální známá vzdálenost mezi vzory, založí nový neuron. Vzhledem k tomu, že takto by nám počet neuronů rostl nade všechny meze, což by vedlo k výraznému zpomalení výpočtu a nepřehlednosti, je nutné nadbytečné vzory slučovat. Slučujeme opět zase vždy dva nejbližší vzory do jednoho. Váhy pro slučování bodů opět nastavujeme podle počtu úseků, které se k tomu kterému vzoru přiřadily.

Klasifikace vzorů na neuronové síti je výpočetně složitá. Bez předzpracovaných dat by nebyla v tomto rozsahu na osobním počítači časově možná. Složitost třídění na neuronové síti můžeme jen přibližně odhadnout – konečný výsledek pak závisí na tvaru porovnávaných úseků.

Zavedme počet buněk  $b$ , počet úseků  $k$  porovnání  $u$ . Každý úsek je nejprve porovnáván se všemi buňkami tj.  $bn$  operací. Pouze pro část úseků je nutno vytvořit vlastní vzor. Při tom se zvýší počet neuronů o 1 a je tudíž třeba dva neurony spojit. Při vyhledávání nejbližších dvou neuronů provedeme porovnání každý s každým, čili všechny kombinace po dvou:

$$n(n-1) + (n-1)(n-2) + \dots + 2*1 = \binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!} = \binom{b}{2} = \frac{b!}{2(b-2)!} = \frac{b*(b-1)}{2}$$

Počet těchto porovnání roste, jak se dalo předpokládat, přibližně kvadraticky s počtem buněk. Celková složitost výpočtu tedy bude

$$k_1 * b_n + k_2 * \frac{b*(b-1)}{2} + k_3$$

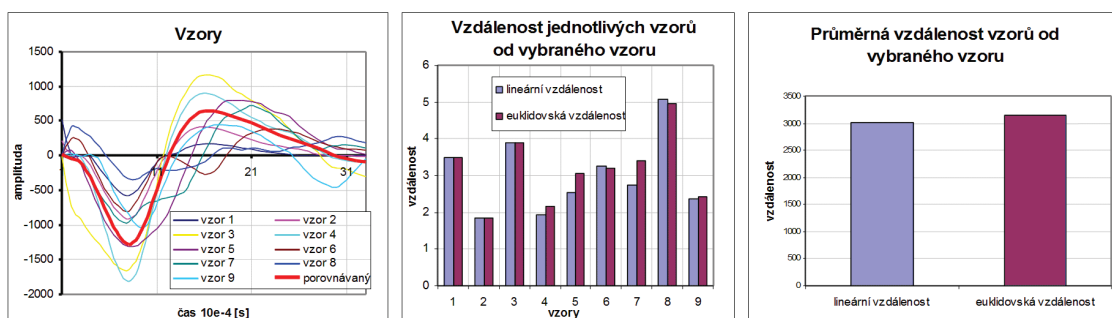
kde  $k_1$ ,  $k_2$  a  $k_3$  jsou konstanty. Tuto operaci je (zhruba vyjádřeno) potřeba aplikovat na každý zkoumaný úsek, t.j.  $u$  krát.

$$u * \left\{ k_1 * b_n + k_2 * \frac{b*(b-1)}{2} + k_3 \right\} + k_4$$

Z výše uvedeného je zřejmé, že třídění úseků má polynomiální složitost, a řádově roste přibližně kvadratickou rychlostí v závislosti na počtu buněk a lineární rychlostí v závislosti na počtu zkoumaných úseků. Empiricky se jeví jako dobrý odhad konstant (závislost času potřebného k výpočtu na počtu vzorů):

$$\text{čas} = (b^2 + 3,9b + 16,6) * k_n, \text{ kde } k_n \text{ je konstanta odpovídající počtu úseků.}$$

Ačkoliv neuronová síť radial basis flow využívá přednostně euklidovskou metriku, porovnáním výsledků lineární a euklidovské metriky jsme došli k závěru, že výpočet vzdálenosti pomocí euklidovské metriky negeneruje dostatečný rozdíl oproti lineární metrice aby ospravedlňoval vyšší výpočetní složitost (Obr. 80). Existují i složitější výpočty vzdálenosti dvou vektorů, například Mahalanobisova zobecněná vzdálenost [188,189] nebo normal information radius (NIR), které jsme netestovali [190].



**Obr. 80:** Porovnání lineární a euklidovské metriky u podobných jednotkových potenciálů. Levý obrázek ukazuje jednotkové potenciály, červenou křivkou je jednotkový potenciál, od něhož je vzdálenost ostatních vzorů (1 – 9) vyčíslena. Uprostřed je porovnání mezi lineární (modře) a euklidovskou (fialově) metrikou u zobrazených vzorů. Vpravo je vyjádřena průměrná lineární (modře) a euklidovská (fialově) vzdálenost vzorů od vybraného vzoru. Osa y je v arbitrárních jednotkách. Vlastní experimentální data.

Pokud provedeme lineární korelaci výpočetní složitosti třídění s konstantním počtem vzorů v závislosti na počtu porovnávaných hrotů, potvrdíme již výše uvedený odhad lineární závislosti ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney U-test):

$$\text{čas} = k_1 * u + k_2,$$

kde konstanta  $k_2$  je tak malá, že ji můžeme zanedbat, konstanta  $k_1$  je závislá na počtu vzorů (neuronů).

V porovnání s jinými sítěmi dosahuje tato implementace algoritmu k-means dobrých výsledků. V případě smíšení šumu a signálu v poměru 1:1 je podíl chybně hodnocených (falešně pozitivních a falešně negativních) jednotkových potenciálů menší než jedno procento. V praxi jsou naše záznamy o poznání lepší. Při porovnání třídění grafoelementů ze standardního záznamu na síti SOM jsme dosáhli kolem čtyř procent špatně hodnocených jednotkových potenciálů, u sítě GAME to bylo 1,5 procenta.

V experimentu jsme zamítli odlišnost rozložení spontánního záznamu jednotkových potenciálů od Poissonova a logaritmicke-normálního rozložení, což svědčí pro (ale rozhodně není zárukou) správnou funkci programu [191,192].

V roce 2010 byla popsána implementace algoritmu, který detekuje jednotkové potenciály z několika simultánně zaznamenávaných kanálů v těsné blízkosti a umí do značné míry odlišit několik vzorů, které se vyskytují simultánně. Senzitivita pro hroty, které se nepřekrývaly, dosahovala 96 až 98%. Pro dva až tři překrývající se hroty byla o poznání horší - 87 až 94% [186]. Tito autoři rovněž popsali a kvantifikovali vliv posunu tkáně na amplitudu jednotkového potenciálu, který jsme rovněž pozorovali.

Hulata et al. ve své práci porovnali vlnkovou (wavelet) transformaci a analýzu hlavních komponent [97]. Zjistili, že analýza hlavních komponent efektivně používá k rozlišení jednotlivých vzorů pouze první dvě komponenty oproti vlnkové transformaci, která ve svých komponentách navíc obsahuje méně šumu. Navíc poukazují na to, že tato metodika je schopna postihnout fluktuaci různých jednotkových potenciálů v čase. Jejich metoda správně detekuje 91% jednotkových potenciálů s falešnou pozitivitou 7%. Pokud se vyskytují akční potenciály dvou buněk současně, je tyto zmíněná metoda schopna detekovat jen v 50%.

Analýza nezávislých komponent (independent component analysis, ICA) je nadstavba nad známou analýzou hlavních komponent (PCA). Mamlouk et al. tuto metodu, která oproti PCA navíc hledá statisticky nezávislé komponenty mezi daty, použili pro vyhledávání a třídění jednotkových potenciálů. Pro detekci signálu nejbližších 3 buněk v simulovaném záznamu z hippocampu dosahovali chybovosti 12%. Analýza nezávislých komponent se shlukováním byla použita i v analýze vícekanálového záznamu jednotkových potenciálů z tetrody [193].

To, že lze detekovat a třídít hroty i ve frekvenční doméně ukázali Rinberg et al. Algoritmus vytváří skupiny shluků a statistický model ( $\chi^2$ ) pro jejich rozpoznání ve frekvenční doméně po vypočtení Fourierovy transformace. Detekce pak probíhá podle statistického vzoru vytvořeného v prvním kroku. Tento algoritmus upravili i pro vícekanálové záznamy. Uvádějí, že z typického experimentu s cca 400000

jednotkovými potenciály algoritmus nalezne 90% jednotlivých hrotů, 8% překrývajících se hrotů a pouze ve dvou procentech nelze grafoelementy správně zařadit. Hlavním přínosem jejich algoritmu je to, že začíná samostatným krokem, ve kterém se vytvoří model jednotlivých hrotů, a detekce následuje poté. To je i výhodné pro detekci koincidujících grafoelementů [98]. Fourierova transformace může být použita i k upsamplingu záznamu filtrovaného frekvenčním filtrem typu propust' [194].

Pro výběr kandidátů na jednotkové potenciály lze použít i např. směrodatnou odchylku záznamu v okolí [194]. To je vhodné zejména tam, kde úroveň okolního šumu kolísá nebo pokud chceme nastavovat hranici automaticky. Stejní autoři, podobně jako tato práce, provádějí rozdělování a spojování shluků avšak ne na základě jejich počtu, ale arbitrárně stanovené hranice. Navíc používají statistické metody ke zhodnocení euklidovské vzdálenosti mezi shluky s předpokládaným  $\chi^2$  rozložením s počtem stupňů volnosti rovným počtu datových bodů daného vzoru. Tím lze automaticky vyjádřit konstanty pro spojení či rozdělení shluků jako směrodatnou odchylku. Autoři udávají, že při signal-to-noise ratio (SNR) 1,2 detekují 79% hrotů správně, u SNR 2,3 pak 98% [194].

Pro třídění hrotů ale není shlukování podmínkou. Kromě jednoduchých algoritmů jako kritérium amplitudy, MITA ad. lze použít i spektrální reprezentaci jednotlivých typů hrotů, jejichž vzory jsou vytvořeny v prvním kroku [195].

Mtewa a Smith porovnali šest metod pro detekci hrotů: amplitudu, konvoluci, euklidovskou vzdálenost (suma kvadrátů), Gaussovo rozložení, součet amplitud ve vyhlazeném záznamu s prahem, rozdíl normalizované kumulativní energie. Ukázali, že poslední z jmenovaných poskytuje nejlepší výsledky. Navíc je výpočetně jednoduchá a tudíž implementovatelná na úrovni VLSI obvodů, protože zahrnuje výpočet poměru dvou integrálů (resp. sum), který zaručuje i adaptabilitu v případě změny úrovně šumu. Z jejich grafu lze odečíst, že úroveň detekce jednotkových potenciálů je nejlepší u této metody a součtu amplitud a nejhorší u jednoduchého kritéria amplitudy [196]. Autoři však neuvádějí, jaký měl záznam, na kterém metody testovali, charakter (střední doba mezi hroty, úroveň šumu, záznam jednoho či více neuronů).

Obecně vzato lze říci, že existuje na téma vyhledávání a třídění neuronů dostatečná množina prací a souhrnných článků, které ukazují vývoj od jednodušších implementací po složitější s vývojem počítačů. Na druhou stranu jsou vývojové skupiny, které usilují o real-time zpracování signálů na VLSI obvodech s dostatečnou přesností a co nejmenší výpočetní složitostí. Vyhledávání a třídění jednotkových potenciálů je stále aktuální téma, jak ukazuje množství publikací v databázi Pubmed. V poslední době lze sledovat posun k algoritmům, které detekují i koincidenci dvou a eventuálně i více jednotkových potenciálů, nicméně s omezeným úspěchem, protože v jednom kanále je jejich obraz značně zkreslený. Lepších výsledků dosahuje vícekanálové hodnocení v experimentech, kde jsou v blízkosti snímány záznamy více elektrod najednou.

V této práci jsme se soustředili na navržení a implementaci algoritmu s cílem hodnocení záznamů našich experimentů, kde jsme zaznamenávali signál pouze jednou

tenkou elektrodou. Program v této podobě vyhovuje 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 jednotkové aktivity. Vytvořili jsme grafy vývoje aktivity jednotek v čase a jejich závislosti na experimentálním zásahu.

Při navrhování postupu výpočtu jsme použili a upravili některé obecné programovací postupy a metody vytěžování dat (filtrace dat, neuronové sítě, algoritmus k-means, analýza hlavních komponent). V porovnání s ostatními popsány 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.

Pochopitelně by v programu šla provést řada dalších vylepšení – zejména statistický model shlukování, průběžná definice minimální amplitudy hrotu, zrychlení paralelním výpočtem (v době vytváření programu se používaly procesory s jedním jádrem). Program v této podobě vyhovuje našim potřebám, a proto není třeba alokovat prostředky k jeho dalšímu vývoji minimálně do té doby, než se změní metodika záznamu jednotkových potenciálů (např. simultánní záznam více kanálů).

Dostupné komerční programy, které nabízejí detekci hrotů, jsou často limitované množstvím zpracovávaných dat a velmi obecnou definicí hrotu s rizikem ztráty části výsledků nebo přidáním arteficiálních dat. Z našeho pohledu se jeví v experimentální praxi daleko vhodnější propojení programovacích technik a algoritmů, které jsou zmíněny v diskusi, za účelem vytvoření funkce ušité na míru. Toho lze docílit nejen psaním samotného programovacího kódu, ale i použitím k tomu určených nástrojů (např. Neural Network Toolbox v MATLABu).

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

Vliv laseru na fyziologické pochody a případný léčebný vliv na tkáň byly popsány v mnoha pracích, rovněž poskytují nemalý zdroj příjmu výrobcům těchto laserů a centrum poskytujícím s tím spojené služby - zejména se jedná o uplatnění v dermatologii. To, že laserové světlo má na celulární úrovni vliv na samotné korové neurony, však není příliš známé. Sharma et al. ukázali na kultuře neuronů z embryonálních mozků potkana, že tomu tak je, a změny vztáhli k energii laseru o vlnové délce 810nm a výkonu 2,5W/mm<sup>2</sup>. Zjistili, že světlo významně zvyšuje intracelulární koncentrace kalcia, adenosintrifosfátu (ATP) a mitochondriálního membránového potenciálu při nízkých energiích laseru a naopak zvyšuje při vyšších energiích v krátkém odstupu od stimulace [197,198]. Mechanismus tohoto účinku laseru na kůru není přesně znám. Předpokládá se, že mírné zvýšení teploty o 3 – 5 Kelvinů, které je samo o sobě nedestruktivní, je přeměněno na signál receptory, které reagují na teplotu, nebo teplotními změnami iontových kanálů. Přímé fyzikální působení tepelné energie světla je nepravděpodobné, protože pozorované změny nastávaly velmi rychle.



Popsán byl i účinek stimulace somatosensorické kůry potkana infračerveným světlem. Pomocí laserového světla o vlnové délce  $1,9\mu\text{m}$  s udávanou penetrací  $300 - 600\mu\text{m}$  s frekvencí pulsů  $50$  až  $200\text{Hz}$  o délce pulsu  $250\mu\text{s}$  a při celkové délce stimulace  $500\text{ms}$  prokázali Cayce et al. aktivaci somatosensorické oblasti s maximem  $1\text{s}$  po stimulaci a celkovou dobou trvání  $3\text{s}$  jako zvýšení průtoku touto oblastí měřené změnou odrazivosti světla [160]. Aktivace této oblasti byla vyšší u vyšších frekvencí stimulace, které však celkově vedly na větší celkovou energii emitovaného světla v daném časovém rozmezí. Aktivace rovněž klesala se vzdáleností od světelného vodiče zhruba exponenciálně. Při záznamu jednotkových potenciálů vedlo ozáření ke statisticky významnému snížení aktivity, které trvalo kolem  $1,5$  až  $2$  vteřin. Z tohoto důvodu je krajně nepravděpodobné, že by bylo způsobeno pouze transformovaným teplem, které má časové konstanty podstatně delší. Rovněž je nepravděpodobné, že by se jednalo o fotochemický proces, protože absorbovaná energie je příliš malá [161].

Feng et al. studovali účinek infračerveného laseru na  $\text{GABA}_A$ -ergní transmisi neuronů v kultuře a zjistili, že optická stimulace zvyšovala amplitudu a intenzitu inhibičního postsynaptického potenciálu a zkracovala repolarizaci [158]. Zajímavé je, že nebyla nalezena přímá vazba mezi pulsy laserového světla a odpovědi neuronů, jak tomu je například u obdobné stimulace periferních nervů [199]. Biochemický průkaz účinku laserového světla na mozek potkana podali Ahmend et al., kteří ukázali, že při ozáření hlavy potkana laserovým světlem dochází ke změnám hladin neurotransmiterů ve tkáni [200].

V poslední dekádě se rozvíjí použití fotostimulace neuronů transgenních jedinců, jejichž neurony exprimují kanál channelrhodopsin-2 [201–204]. Touto metodou lze dosáhnout vysokého prostorového rozlišení na úrovni buněčných kompartmentů, dendritů a vysokého časového rozlišení na úrovni  $1\text{ms}$  v případě upraveného tvaru světelného paprsku [205] nebo i bez něj [206]. Zhang et al. tento model doplnili o chloridovou pumpu řízenou světlem (NpHR), kterou lze ovlivnit světlem jiné vlnové délky, a tak selektivně řídit inhibici či aktivaci jednotlivých neuronů [207].

Změny v odpovědi na korovou elektrickou stimulaci během iradiace laserovým světlem, které jsme v experimentu prokázali, jsou malé, avšak dosahují statistické významnosti. Statisticky významné bylo zkrácení latence N1 jak na svícené tak i na kontralaterální straně. Zkrácení latence komponent somatosenzorického evokovaného potenciálu během iradiace laserovým světlem jsme prokázali rovněž v předchozích experimentech u kontrolní skupiny, kde byl místo bengálské červeně podán pouze fyziologický roztok, neboli která byla pouze ozářena laserovým světlem. 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 [198]. 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 somatosenzorického potenciálu (N2) při odpovědi na stimulaci n. ischiadicus, které lze vysvětlit kromě působení ambientního světla i mechanismem

diaschízy, neboli ovlivněním vzdálených oblastí při lokálním inzultu [61,149,166]. Existuje zde ovšem určitá diskrepance s jinými studiemi, kde je obvykle při téměř jakémkoliv inzultu prokazováno prodloužení latencí komponent evokovaného potenciálu. Snížení amplitudy somatosenzorického evokovaného potenciálu (odpovědi na stimulaci n. ischiadicus) jak v místě svícení, tak i na opačné straně nebo útlum jednotkové aktivity v oblasti dopadu laserového paprsku 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.

Nález odpovědi na stimulaci mozkové kůry krátkým laserovým pulsem v sumačním záznamu, jak na stimulované, tak na nestimulované straně budí dojem fyzikální interakce záření ve viditelném spektru a materiálu elektrody. Pro to nepřímo svědčí poslední část experimentu, kde se nám podařilo stimulační artefakt vyvolat i na neživém předmětu. Přímá závislost laserového pulsu a kortikální odpovědi nebyla ještě u geneticky nemodifikovaných laboratorních hlodavců popsána. Známo je to, že změny, které je laserové světlo schopno u neuronů (nikoliv fotoreceptorů) vyvolat, jsou typicky časově nezávislé na jednotlivých pulsech [199].

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 [206]. Neuvádějí však jeho původ. V experimentu jsme prokázali, že tento artefakt není způsoben ani interakcí světla a živé hmoty, ani elektromagneticky při spínání laserového světla. Amplituda artefaktu se měnila pouze se vzdáleností dopadajícího paprsku od elektrody, nikoliv však se vzdáleností laserového generátoru, který byl nakonec umístěn i mimo Faradayovu klec. Jediné vysvětlení je tedy interakce laserového světla a elektrody nejspíše na podkladě fotoelektrického jevu. Ten byl ostatně dávno popsán u podobných materiálů [208–210], ale při vyšších intenzitách laserového světla.

Význam této studie spatřujeme i v tom, že přináší výhrady k in-vitro záznamům jednotkových potenciálů na tenkých řezech za kontroly konfokálního mikroskopu [211]. Konfokální mikroskopie používá laserového světla ke skenování cílové struktury. Laserový paprsek prochází úzkou aperturou a je postupně fokusován a nasměrován do všech míst skenovaného rozsahu. Právě osvětlení neuronu může mít vliv na jeho excitabilitu. To pak může ovlivnit výsledek studií, kde se pomocí konfokální mikroskopie měří změny hladiny kalcia [212–214].

V této části práce jsme se zabývali vlivem ozáření mozkové kůry laserovým světlem ve viditelném spektru na její excitabilitu a spolu s tím diskutujeme i nálezy u kontrolních skupin z předchozích experimentů (akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů a jednotkových potenciálů během rozvoje fototrombotické kortikální ischemické léze). 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 somatosensorické oblasti a k přechodnému snížení jednotkové aktivity. Předpokládáme, že tyto změny excitability jsou vzhledem k časovým konstantám způsobeny změnami hladin intracelulárních molekul při osvětlení 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 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. Nakonec jsme se pokusili ověřit původ stimulačního artefaktu, který byl patrný u některých experimentů při stimulaci mozkové kůry krátkými laserovými pulsy. Domníváme se, že se zčásti uplatňuje interakce hmoty (kov elektrody) a záření (jistě avšak ne elektromagnetický artefakt, spíše fotoelektrický jev) a zčásti přímý účinek světla na mozkovou kůru.

#### **4.7. Průlom postiktální inhibice salvou pulsů 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 [125,215]. V této části práce se nám podařilo v interiktálním období vyvolat epileptické fenomény salvou čtyř elektrických pulsů o slabší intenzitě a ojedinele i jednotlivými pulsy. Ve skupině, kde bylo stimulováno salvami, jsme rovněž pozorovali častější ztrátu rovnováhy zvířete při druhé 20s stimulaci. Nepozorovali jsme prodloužení epileptických záchvatů, které by svědčilo pro akutní kindling. Vzhledem k tomu, že po první 20s stimulaci jsme neprokázali rozdíl mezi skupinou A a B v délce vyvolaného záchvatu ani v behaviorálních projevech s ním spojených, lze předpokládat, že následné iteriktální období probíhalo u obou skupin stejně. Z tohoto důvodu usuzujeme, že vyšší počet epileptických fenoménů po salvách čtyřech pulsů zde byl způsoben jejich přímým akutním vlivem na neuronální excitabilitu. Nelze však vyloučit ani přetrvávající změny excitability způsobené stimulací jednotlivými pulsy nebo salvou čtyř pulsů u naivních zvířat před první 20s stimulací.

V této práci jsme použili stejné parametry 20s stimulace, jako v práci předchozí [125]. Tehdy bylo prokázáno, že při použití intenzivní stimulace se v několika prvních minutách projevuje fenomén postiktální inhibice [125,215]. Vyvolání epileptických fenoménů v tomto experimentu pomocí salvy čtyř pulsů o nižší intenzitě lze vysvětlit přítomností přetrvávající zvýšené excitability na pozadí masivní aktivní inhibice a deplece presynaptických váček [133,216].

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.

## 5. 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. Vliv přenosu tepelné energie paprsku lze s jistotou zanedbat. 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. Vlivu ozáření mozkové kůry laserovým světlem se pak věnujeme v samostatné části práce. 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. Změny, které jsme pomocí tohoto programu prokázali, jsou rozvedeny v samostatné kapitole.

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. Vytvořili jsme grafy vývoje aktivity jednotek v závislosti na experimentálním zásahu. V programu jsme použili a upravili některé obecné programovací postupy a metody vytěžování dat (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. Tyto změny srovnáváme i s nálezy u kontrolních skupin z předchozích experimentů (akutní změny somatosenzorických evokovaných potenciálů a jednotkových potenciálů během rozvoje fototrombotické kortikální ischemické léze). 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 rytmičnou 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 rytmičnou 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.

## 6. LITERATURA

1. Bruthans J. Epidemiologie a prognóza cévních mozkových příhod. *Remedia*. 2009;2/2009).
2. 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.
3. Hakim AM. Ischemic penumbra The therapeutic window. *Neurology*. 1998 Sep 1;51(3 Suppl 3):S44–S46.
4. Stapf C, Mohr JP. Ischemic Stroke Therapy. *Annu Rev Med*. 2002;53(1):453–75.
5. Huang Y, McNamara JO. Ischemic stroke: “acidotoxicity” is a perpetrator. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):665–6.
6. Siesjö BK, Memezawa H, Smith ML. Neurocytotoxicity: pharmacological implications. *Fundam Clin Pharmacol*. 1991;5(9):755–67.
7. Lassen NA, Vorstrup S. Ischemic penumbra results in incomplete infarction: is the sleeping beauty dead? *Stroke J Cereb Circ*. 1984 Aug;15(4):755–8.
8. Siesjö BK, Rehncrona S, Smith D. Neuronal cell damage in the brain: possible involvement of oxidative mechanisms. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1980;492:121–8.
9. Lipton P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol Rev*. 1999 Jan 10;79(4):1431–568.
10. Cruz-Flores S. Ischemic Stroke in Emergency Medicine. 2013; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1916852-overview>
11. Hara A, Iwai T, Niwa M, Uematsu T, Yoshimi N, Tanaka T, et al. Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 1996 Mar;711(1-2):249–53.
12. Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, Sikorska M, Mossakowski MJ, Reed JC. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1995 Oct 1;15(10):6364–76.
13. Bednar MM, Raymond S, McAuliffe T, Lodge PA, Gross CE. The role of neutrophils and platelets in a rabbit model of thromboembolic stroke. *Stroke*. 1991 Jan 1;22(1):44–50.
14. Möller K, Stahl T, Boltze J, Wagner D-C. Isolation of inflammatory cells from rat brain tissue after stroke. *Exp Transl Stroke Med*. 2012 Oct 2;4(1):20.
15. Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, Davalos A, Davis SM, Diener H-C, et al. NXY-059 for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2006;354(6):588–600.
16. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, et al. NXY-059 for the Treatment of Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2007;357(6):562–71.
17. Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y, Strauss KI, Glass T, et al. Hypoxic Preconditioning Protects against Ischemic Brain Injury. *NeuroRx*. 2004 Jan;1(1):26–35.
18. Matejovská I, Bernásková K, Krýsl D, Mares 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.
19. An JJ, Lee YP, Kim SY, Lee SH, Lee MJ, Jeong MS, et al. Transduced human PEP-1–heat shock protein 27 efficiently protects against brain ischemic insult. *FEBS J*. 2008;275(6):1296–308.
20. Kaur P, Liu F, Tan J, Lim K, Sepramaniam S, Karolina D, et al. Non-Coding RNAs as Potential Neuroprotectants against Ischemic Brain Injury. *Brain Sci*. 2013 Mar 20;3(1):360–95.
21. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors — Similar but not identical. *Mol Cells*. 2010 Apr 12;29(5):435–42.

22. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem*. 2012 Nov;123 Suppl 2:29–38.
23. Dunn JF, Wu Y, Zhao Z, Srinivasan S, Natah SS. Training the Brain to Survive Stroke. *PLoS One*. 2012 Sep 13;7(9).
24. Molinari GF, Laurent JP. A Classification of Experimental Models of Brain Ischemia. *Stroke*. 1976 Jan 1;7(1):14–7.
25. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989 Dec 1;20(12):1627–42.
26. 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.
27. 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.
28. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J Natl Res Council Inst Lab Anim Resour*. 2003;44(2):85–95.
29. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*. 1979 May 1;10(3):267–72.
30. Kameyama M, Suzuki J, Shirane R, Ogawa A. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat--three vessel occlusion model. *Stroke*. 1985 May 1;16(3):489–93.
31. Du XY, Zhu XD, Dong G, Lu J, Wang Y, Zeng L, et al. Characteristics of circle of Willis variations in the mongolian gerbil and a newly established ischemia-prone gerbil group. *ILAR J Natl Res Council Inst Lab Anim Resour*. 2011 Feb 8;52(1):E1–7.
32. Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: development of a new experimental model. *Stroke*. 1985 Jan 1;16(1):76–84.
33. Kaufman HH, Anderson JH, Huchton JD, Woo J. A new canine model of proximal internal carotid embolism. *Stroke*. 1979 Jul 1;10(4):415–8.
34. Rumbaugh CL, Davis DO, Gilson JM. Experimental cerebral emboli angiographic evaluation of autologous emboli in the dog. *Invest Radiol*. 1968 Oct;3(5):330–6.
35. Rink C, Christoforidis G, Abduljalil A, Kontzialis M, Bergdall V, Roy S, et al. Minimally invasive neuroradiologic model of preclinical transient middle cerebral artery occlusion in canines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 16;105(37):14100–5.
36. Molinari GF, Moseley JI, Laurent JP. Segmented Middle Cerebral Artery Occlusion in Primates: An Experimental Method Requiring Minimal Surgery and Anesthesia. *Stroke*. 1974 May 1;5(3):334–9.
37. Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Müller C, Rottger C, Kluge A, et al. Complications and Pitfalls in Rat Stroke Models for Middle Cerebral Artery Occlusion A Comparison Between the Suture and the Macrosphere Model Using Magnetic Resonance Angiography. *Stroke*. 2004 Oct 1;35(10):2372–7.
38. Harvey J, Rasmussen T. Occlusion of the middle cerebral artery; an experimental study. *AMA Arch Neurol Psychiatry*. 1951 Jul;66(1):20–9.
39. O'brien MD, Waltz AG. Transorbital Approach for Occluding the Middle Cerebral Artery Without Craniectomy. *Stroke*. 1973 Mar 1;4(2):201–6.
40. Hayakawa T, Waltz AG. Immediate Effects of Cerebral Ischemia: Evolution and Resolution of Neurological Deficits After Experimental Occlusion of One Middle Cerebral Artery in Conscious Cats. *Stroke*. 1975 May 1;6(3):321–7.
41. Garcia JH, Wagner S, Liu K-F, Hu X. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Statistical Validation. *Stroke*. 1995 Apr 1;26(4):627–35.
42. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989 Jan 1;20(1):84–91.



43. Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Iii G, G D, Fisher M. Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci*. 1997 Dec 9;153(1):8–11.
44. Goto S, Sampei K, Alkayed NJ, Doré S, Koehler RC. Characterization of a new double-filament model of focal cerebral ischemia in heme oxygenase-2-deficient mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Jul 1;285(1):R222–R230.
45. Freret T, Bouet V, Toutain J, Saulnier R, Pro-Sistiaga P, Bihel E, et al. Intraluminal thread model of focal stroke in the non-human primate. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(4):786–96.
46. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat by Intraluminal Suture Neurological and Pathological Evaluation of an Improved Model. *Stroke*. 1996 Sep 1;27(9):1616–23.
47. Crowell RM, Olsson Y, Klatzo I, Ommaya A. Temporary Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Monkey: Clinical and Pathological Observations. *Stroke*. 1970 Nov 1;1(6):439–48.
48. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal Cerebral Ischaemia in the Rat: 1. Description of Technique and Early Neuropathological Consequences Following Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981;1(1):53–60.
49. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal Cerebral Ischaemia in the Rat: 2. Regional Cerebral Blood Flow Determined by [<sup>14</sup>C]Iodoantipyrine Autoradiography Following Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981;1(1):61–9.
50. Sicard K, Fisher M. Animal models of focal brain ischemia. *Exp Transl Stroke Med*. 2009 Nov 13;1(1):7.
51. 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.
52. Dietrich WD, Feng Z-C, Leistra H, Watson BD, Rosenthal M. Photothrombotic Infarction Triggers Multiple Episodes of Cortical Spreading Depression in Distant Brain Regions. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14(1):20–8.
53. Watson BD, Dietrich WD, Prado R, Ginsberg MD. Argon laser-induced arterial photothrombosis. Characterization and possible application to therapy of arteriovenous malformations. *J Neurosurg*. 1987 May;66(5):748–54.
54. 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.
55. Bureš J, Koroleva V, Korolev O, Mareš V. Slow-potential concomitants of forebrain focal ischemia and systemic hypoxia in rat brain. *Zhurnal Vysshei Nervn Deyatelnosti*. 1998;48:640–53.
56. Dietrich WD, Ginsberg MD, Busto R, Watson BD. Photochemically Induced Cortical Infarction in the Rat. 1. Time Course of Hemodynamic Consequences. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1986;6(2):184–94.
57. Dietrich WD, Ginsberg MD, Busto R, Watson BD. Photochemically Induced Cortical Infarction in the Rat. 2. Acute and Subacute Alterations in Local Glucose Utilization. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1986;6(2):195–202.
58. Rogers DC, Hunter AJ. Photothrombotic lesions of the rat cortex impair acquisition of the water maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997 Apr;56(4):747–54.
59. Rogers DC, Wright PW, Roberts JC, Reavill C, Rothaul AL, Hunter AJ. Photothrombotic lesions of the frontal cortex impair the performance of the delayed non-matching to position task by rats. *Behav Brain Res*. 1992 Aug 10;49(2):231–5.
60. Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, Watson BD, Dietrich WD, Ginsberg MD. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Stroke*. 1993 Feb 1;24(2):286–92.
61. 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.

62. Kleinschnitz C, Schütz A, Nölte I, Horn T, Frank M, Solymosi L, et al. In vivo detection of developing vessel occlusion in photothrombotic ischemic brain lesions in the rat by iron particle enhanced MRI. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(11):1548–55.
63. Weise G, Basse-Lüsebrink TC, Kleinschnitz C, Kampf T, Jakob PM, Stoll G. In Vivo Imaging of Stepwise Vessel Occlusion in Cerebral Photothrombosis of Mice by 19F MRI. *PLoS ONE.* 2011 Dec 15;6(12):e28143.
64. Hayasaka N, Nagai N, Kawao N, Niwa A, Yoshioka Y, Mori Y, et al. In Vivo Diagnostic Imaging Using Micro-CT: Sequential and Comparative Evaluation of Rodent Models for Hepatic/Brain Ischemia and Stroke. *PLoS ONE.* 2012 Feb 23;7(2):e32342.
65. Kuroiwa T, Xi G, Hua Y, Nagaraja TN, Fenstermacher JD, Keep RF. Development of a Rat Model of Photothrombotic Ischemia and Infarction Within the Caudoputamen. *Stroke.* 2009 Jan 1;40(1):248–53.
66. Nakayama H, Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD. Photothrombotic Occlusion of Rat Middle Cerebral Artery: Histopathological and Hemodynamic Sequelae of Acute Recanalization. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8(3):357–66.
67. Yao H, Sugimori H, Fukuda K, Takada J, Ooboshi H, Kitazono T, et al. Photothrombotic Middle Cerebral Artery Occlusion and Reperfusion Laser System in Spontaneously Hypertensive Rats. *Stroke.* 2003 Nov 1;34(11):2716–21.
68. Sugimori H, Yao H, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M. Krypton laser-induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004 Aug;13(3):189–96.
69. Reempts JV, Deuren BV, Ven MV de, Cornelissen F, Borgers M. Flunarizine reduces cerebral infarct size after photochemically induced thrombosis in spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* 1987 Nov 1;18(6):1113–9.
70. Domann R, Hagemann G, Kraemer M, Freund HJ, Witte OW. Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci Lett.* 1993 May 28;155(1):69–72.
71. Yano Y, Yao H, Aoyagi K, Kawakubo K, Nakamura S, Doi K, et al. Photochemically induced colonic ischaemic lesions: a new model of ischaemic colitis in rats. *Gut.* 1997 Sep;41(3):354–7.
72. Huang AJ, Watson BD, Hernandez E, Tseng SC. Photothrombosis of corneal neovascularization by intravenous rose bengal and argon laser irradiation. *Arch Ophthalmol.* 1988 May;106(5):680–5.
73. Farah ME, Cardillo JA, Luzardo AC, Calucci D, Williams GA, Costa RA. Indocyanine green mediated photothrombosis for the management of predominantly classic choroidal neovascularisation caused by age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2004 Aug;88(8):1055–9.
74. Jelen J. Fyzika II. Vydavatelství ČVUT; 2000.
75. Mattia M, Ferraina S, Del Giudice P. Dissociated multi-unit activity and local field potentials: A theory inspired analysis of a motor decision task. *NeuroImage.* 2010 Sep;52(3):812–23.
76. Huxley A. From overshoot to voltage clamp. *Trends Neurosci.* 2002 Nov 1;25(11):553–8.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.

81. 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.
82. 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.
83. Schmidt J. Problémy a algoritmy - přednášky z předmětu D36PAA ČVUT FEL ČVUT Praha; 2004.
84. Fogel LJ, Owens AJ, Walsh MJ. Artificial intelligence through simulated evolution. Wiley; 1966.
85. Glover F. Tabu Search—Part I. *ORSA J Comput.* 1989 Jun 20;1(3):190–206.
86. Glover F, Laguna M. Tabu search. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1997.
87. Kirkpatrick S, Gelatt CD, Vecchi MP. Optimization by simulated annealing. *Science.* 1983;220:671–80.
88. Fayyad U, Piatetsky-Shapiro G, Smyth P. From Data Mining to Knowledge Discovery in Databases. *AI Mag.* 1996 Mar 15;17(3):37.
89. Ohl W, Fallert M. A window amplitude discriminator with adjustable upper and lower thresholds. *Pflugers Arch.* 1976;364(2):199–202.
90. Pouzat C, Mazor O, Laurent G. Using noise signature to optimize spike-sorting and to assess neuronal classification quality. *J Neurosci Methods.* 2002 Dec 31;122(1):43–57.
91. Quiroga RQ, Nadasdy Z, Ben-Shaul Y. Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering. *Neural Comput.* 2004 Aug 1;16(8):1661–87.
92. Matthews B, Searle BN. An amplitude discriminator and an “instantaneous” frequency display. *J Physiol.* 1972 Jul;224(1):3P–6P.
93. Eskelinen P. A Highly Selective Amplitude Discriminator. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1973 Jul;BME-20(4):300–301.
94. Sabah NH, Sarhan A. Peak-detecting window discriminator. *Med Biol Eng Comput.* 1977 Mar;15(2):205–6.
95. 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.
96. 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. p. 317–320.
97. 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.
98. Rinberg D, Bialek W, Davidowitz H, Tishby N. Spike sorting in the frequency domain with overlap detection. *Arxiv Prepr Physics.* 2003;0306056.
99. Zouridakis G, Tam DC. Multi-unit spike discrimination using wavelet transforms. *Comput Biol Med.* 1997 Jan;27(1):9–18.
100. Letelier JC, Weber PP. Spike sorting based on discrete wavelet transform coefficients. *J Neurosci Methods.* 2000 Sep 15;101(2):93–106.
101. Subasi A, Alkan A, Koklukaya E, Kiymik MK. Wavelet neural network classification of EEG signals by using AR model with MLE preprocessing. *Neural Networks.* 2005 Sep;18(7):985–97.
102. Subasi A, Erçelebi E. Classification of EEG signals using neural network and logistic regression. *Comput Methods Programs Biomed.* 2005 May;78(2):87–99.
103. Zouridakis G, Tam DC. Identification of reliable spike templates in multi-unit extracellular recordings using fuzzy clustering. *Comput Methods Programs Biomed.* 2000 Feb;61(2):91–8.
104. Šnorek M. Neuronové sítě a neuropočítače. Praha: Vydavatelství ČVUT; 2004.
105. 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).

106. McCulloch WS, Pitts W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull Math Biophys.* 1943 Dec;5(4):115–33.
107. Hebb DO. *The Organization of Behavior.* John Wiley & Sons; 1949.
108. Zell A. *JavaNNS.* University of Tübingen, Germany; 2012.
109. Khorasani K, Weng W. An Adaptive Structure Neural Networks with Application to EEG Automatic Seizure Detection. *Neural Networks.* 1996 Oct;9(7):1223–40.
110. Dai J, Liu X, Yi Y, Zhang H, Wang J, Zhang S, et al. Experimental Study on Neuronal Spike Sorting Methods. *Second Int Conf Future Gener Commun Netw.* 2008:230 –233.
111. Hermle T, Schwarz C, Bogdan M. Employing ICA and SOM for spike sorting of multielectrode recordings from CNS. *J Physiol-Paris.* 2004 Jul;98(4–6):349–56.
112. Yang Y, Mason AJ. On-chip spike clustering and classification using self organizing map for neural recording implants. *2011 IEEE Biomed Circuits Syst Conf.* 2011:145 –148.
113. Aloise D, Deshpande A, Hansen P, Popat P. NP-hardness of Euclidean sum-of-squares clustering. *Mach Learn.* 2009 Jan 24;75(2):245–8.
114. Nock R, Nielsen F. On weighting clustering. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell.* 2006 Aug;28(8):1223–35.
115. Fee MS, Mitra PP, Kleinfeld D. Automatic sorting of multiple unit neuronal signals in the presence of anisotropic and non-Gaussian variability. *J Neurosci Methods.* 1996 Nov;69(2):175–88.
116. Lewicki MS. Bayesian Modeling and Classification of Neural Signals. *Neural Comput.* 1994 Sep 1;6(5):1005–30.
117. Weisstein EW. Heaviside Step Function - from Wolfram MathWorld [Internet]. 2013. Available from: <http://mathworld.wolfram.com/HeavisideStepFunction.html>
118. Häder D-P, Lebert M. *Photomovement.* Elsevier; 2001.
119. Diehn B. Phototaxis and sensory transduction in *Euglena*. *Science.* 1973 Sep 14;181(4104):1009–15.
120. Musio C, Santillo S. Non visual photoreception in invertebrates. 2009.
121. Kartelija G, Nedeljkovic M, Radenovic L. Photosensitive neurons in mollusks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2003 Mar;134(3):483–95.
122. 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.
123. Laue EG, Drummond AJ. Solar Constant: First Direct Measurements. *Science.* 1968 Aug 30;161(3844):888–91.
124. Wan S, Parrish JA, Anderson RR, Madden M. Transmittance of Nonionizing Radiation in Human Tissues. *Photochem Photobiol.* 1981;34(6):679–81.
125. Mares J, Mares P, Kadlecova-Jursikova D. Changes in the excitability of rat cerebral cortex after a self-sustained after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1982 Mar;53(3):283–8.
126. Swartzwelder HS, Wegener ST, Johnson CT, Dyer RS. Depressed excitability and integrated EEGs following hippocampal afterdischarges. *Brain Res Bull.* 1980 Oct;5(5):509–507.
127. Aldenkamp AP. Effect of Seizures and Epileptiform Discharges on Cognitive Function. *Epilepsia.* 1997;38:S52–S55.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. 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.

132. 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.
133. Young D, Dragunow M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience.* 1994 Jan;58(2):245–61.
134. 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 7;23(2):293-304.
135. Shannon CE. Communication in the Presence of Noise. *Proc IRE.* 1949 Jan;37(1):10 – 21.
136. Goldlust EJ, Paczynski RP, He YY, Hsu CY, Goldberg MP. Automated Measurement of Infarct Size With Scanned Images of Triphenyltetrazolium Chloride–Stained Rat Brains. *Stroke.* 1996 Sep 1;27(9):1657–62.
137. Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure.* 2001 Jun;10(4):287–93.
138. Khan S-NH, Baziany A, Banigesh A, J. Hemmings S, Shuaib A. Evaluation of an optimal temperature for brain storage in delayed 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. *J Neurosci Methods.* 2000 May 15;98(1):43–7.
139. Yang Y, Shuaib A, Li Q. Quantification of infarct size on focal cerebral ischemia model of rats using a simple and economical method. *J Neurosci Methods.* 1998 Oct 1;84(1-2):9–16.
140. Bodine JH, Lu K-H, West WL. Reduction of Triphenyltetrazolium Chloride by Mitotically Active and Blocked Embryonic Cells. *Biol Bull.* 1952 Feb 1;102(1-1):16–21.
141. Ruf M, Brunner I. Vitality of tree fine roots: reevaluation of the tetrazolium test. *Tree Physiol.* 2003 Mar 1;23(4):257–63.
142. Rogalewicz V. *Pravděpodobnost a statistika pro inženýry. dotisk 1. vydání.* Praha: Vydavatelství ČVUT; 2000.
143. Johnson DS, McGeoch LA. The traveling salesman problem: A case study in local optimization. *Local Search Comb Optim.* John Wiley & Sons; 1997. p. 215–310.
144. 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.
145. Bergfeldt L, Haga Y. Power spectral and Poincaré plot characteristics in sinus node dysfunction. *J Appl Physiol.* 2003 Jun 1;94(6):2217–24.
146. 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.
147. Onwubolu GC. *Hybrid Self-Organizing Modeling Systems.* Springer; 2009.
148. Choi B, Park D, Lee SH, Bae D-K, Yang G, Yang Y-H, et al. Neurobehavioural deficits correlate with the cerebral infarction volume of stroke animals: a comparative study on ischaemia-reperfusion and photothrombosis models. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012 Jan;33(1):60–9.
149. 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.
150. Schroeter M, Jander S, Stoll G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods.* 2002 May 30;117(1):43–9.
151. Lee J-K, Park M-S, Kim Y-S, Moon K-S, Joo S-P, Kim T-S, et al. Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model. *Surg Neurol.* 2007 Jun;67(6):620–625.
152. Kim GW, Lewén A, Copin J, Watson BD, Chan PH. The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice. *Neuroscience.* 2001;105(4):1007–18.
153. Grome JJ, Gojowczyk G, Hofmann W, Graham DI. Quantitation of Photochemically Induced Focal Cerebral Ischemia in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1988;8(1):89–95.

154. Boquillon M, Boquillon JP, Bralet J. Photochemically induced, graded cerebral infarction in the mouse by laser irradiation evolution of brain edema. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1992 Mar;27(1):1–6.
155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. Hillman EMC. Optical brain imaging in vivo: techniques and applications from animal to man. *J Biomed Opt*. 2007;12(5):051402.
160. 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.
161. 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.
162. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*. 1986 Jul 1;17(4):738–43.
163. Weinstein PR, Anderson GG, Telles DA. Neurological deficit and cerebral infarction after temporary middle cerebral artery occlusion in unanesthetized cats. *Stroke*. 1986 Mar 1;17(2):318–24.
164. Ding S, Wang T, Cui W, Haydon PG. Photothrombosis ischemia stimulates a sustained astrocytic Ca<sup>2+</sup> signaling in vivo. *Glia*. 2009 May;57(7):767–76.
165. Von Monakow C. Die Lokalisation im Großhirn un der Abbau der Funktion durch Kortikale Herde. Germany: Bergman JF; 1914.
166. 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.
167. Scott Prah. Rose bengal [Internet]. Oregon medical laser center. Available from: <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/html/084.html>
168. Long J. Determining the molar extinction coefficient of erythrosin B. IO Rodeo Inc. Available from: <http://www.iiorodeo.com/content/determining-molar-extinction-coefficient-erythrosin-b>
169. Agarwala SS. PV-10, aka Rose Bengal: Intralesional Therapy For Metastatic Melanoma. *Melanoma Lett*. 2012;30(1).
170. Carmichael ST. Rodent Models of Focal Stroke: Size, Mechanism, and Purpose. *NeuroRx*. 2005 Jul;2(3):396–409.
171. 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 Exp Hirnforsch Expérimentation Cérébrale*. 1995;106(2):233–8.
172. Ma Y, Hu Y, Valentin N, Geocadin RG, Thakor NV, Jia X. Time Jitter of Somatosensory Evoked Potentials in Recovery from Hypoxic-ischemic Brain Injury. *J Neurosci Methods*. 2011 Oct 15;201(2):355–60.
173. Ropper AH. Evoked potentials in cerebral ischemia. *Stroke*. 1986 Jan 1;17(1):3–5.
174. Sakatani K, Iizuka H, Young W. Somatosensory evoked potentials in rat cerebral cortex before and after middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 1990 Jan 1;21(1):124–32.

175. Branston NM, Symon L, Crockard HA, Pasztor E. Relationship between the cortical evoked potential and local cortical blood flow following acute middle cerebral artery occlusion in the baboon. *Exp Neurol*. 1974 Nov;45(2):195–208.
176. Hossmann KA, Schuier FJ. Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke*. 1980 Nov 1;11(6):583–92.
177. Florence G, Guerit J-M, Gueguen B. Electroencephalography (EEG) and somatosensory evoked potentials (SEP) to prevent cerebral ischaemia in the operating room. *Neurophysiol Clin Clin Neurophysiol*. 2004 Feb;34(1):17–32.
178. 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.
179. Suter CM. Principal component analysis of average evoked potentials. *Exp Neurol*. 1970 Nov;29(2):317–27.
180. Hartwell J., Erwin C. Evoked potential analysis: On-line signal optimization using a mini-computer. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1976 Oct;41(4):416–21.
181. Navara M, Olšák P. *Základy fuzzy množin*. 1st ed. Vydavatelství ČVUT; 2007.
182. 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).
183. 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.
184. Kittler J, Roli F. *Multiple Classifier Systems: Second International Workshop, MCS 2001 Cambridge, UK, July 2-4, 2001 Proceedings*. Springer; 2001.
185. 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.
186. 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.
187. Wheeler B. *Automatic Discrimination of Single Units*. In: Nicolelis M, editor. *Methods Neural Ensemble Rec*. CRC Press; 1998.
188. Bankman IN, Johnson KO, Schneider W. Optimal detection, classification, and superposition resolution in neural waveform recordings. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1993 Aug;40(8):836–841.
189. Mahalanobis P. On the generalised distance in statistics. *Proc. Nat. Inst. Sci., India*. 1936;2:49–55.
190. Everitt BS, Landau S, Leese M, Stahl D. *Cluster Analysis*. 5th Edition. Wiley-Blackwell; 2011.
191. Nawrot MP, Boucsein C, Rodriguez-Molina V, Aertsen A, Grün S, Rotter S. Serial interval statistics of spontaneous activity in cortical neurons in vivo and in vitro. *Neurocomputing*. 2007 Jun;70(10-12):1717–22.
192. Tsubo Y, Isomura Y, Fukai T. Power-Law Inter-Spike Interval Distributions Infer a Conditional Maximization of Entropy in Cortical Neurons. *PLoS Comput Biol*. 2012 Apr 12;8(4):e1002461.
193. 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.
194. 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.
195. Luczak A, Narayanan NS. Spectral representation--analyzing single-unit activity in extracellularly recorded neuronal data without spike sorting. *J Neurosci Methods*. 2005 May 15;144(1):53–61.
196. Mtetwa N, Smith LS. Smoothing and thresholding in neuronal spike detection. *Neurocomput*. 2006 Jun;69(10-12):1366–70.
197. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y-Y, De Taboada L, McCarthy T, Hamblin MR. Effects of 810 nm laser on mouse primary cortical neurons. 2011 Feb 10;788707–788707.

198. 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.
199. 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.
200. 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.
201. Ayling OGS, Harrison TC, Boyd JD, Goroshkov A, Murphy TH. Automated light-based mapping of motor cortex by photoactivation of channelrhodopsin-2 transgenic mice. *Nat Methods.* 2009;6(3):219–24.
202. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci.* 2005;8(9):1263–8.
203. Kramer RH, Fortin DL, Trauner D. New photochemical tools for controlling neuronal activity. *Curr Opin Neurobiol.* 2009 Oct;19(5):544–52.
204. Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, et al. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Nov 25;100(24):13940–5.
205. Andrasfalvy BK, Zemelman BV, Tang J, Vaziri A. Two-photon single-cell optogenetic control of neuronal activity by sculpted light. *Proc Natl Acad Sci.* 2010 Jun 11; 107(26):11981–6.
206. 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.
207. Zhang F, Wang L-P, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, et al. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature.* 2007 Apr 5;446(7136):633–9.
208. Farkas G, Kertész I, Náray Z, Varga P. On the laser-induced non-linear photoelectric effect in metals. *Phys Lett.* 1967 Oct;25(8):572–3.
209. Logothetis EM, Hartman PL. Laser-Induced Electron Emission from Solids: Many-Photon Photoelectric Effects and Thermionic Emission. *Phys Rev.* 1969 Nov 10;187(2):460–74.
210. Moustazis SD, Tatarakis M, Kalpouzou C, Fotakis C. High current and directional electron beams produced from gold photocathodes by ultrashort excimer laser pulses. *Appl Phys Lett.* 1992 Apr 20;60(16):1939–41.
211. 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.
212. 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.
213. 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.
214. 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.
215. 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.
216. 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.



## Nebibliografické zdroje

- Kordík P.: GAME – Group of Adaptive Models Evolution. FEL ČVUT. 2005.
- Lambert L.: Elektrofyziologické změny během rozvoje kortikální fototrombotické ischemické léze a epilepsie. Souhrn poznatků k tématu doktorské práce zpracovaný ke státní doktorské zkoušce Postgraduální studium biomedicíny, fyziologie a patofyziologie člověka. 2013.
- Lambert L.: Neuroelektrofyziologické změny během rozvoje kortikální fototrombotické ischemické léze a u epilepsie. Souhrn poznatků k tématu doktorské práce zpracovaný ke státní doktorské zkoušce Postgraduální studium biomedicíny, fyziologie a patofyziologie člověka. 2007.
- Tůma L.: Analýza signálů biologických neuronů. Diplomová práce FEL ČVUT. 2007.
- Tůma L., Mareš J., Krýsl D.: Changes in somatosensory evoked cortical potentials during development of cortical photothrombotic ischemic lesion. 5. konference České společnosti pro neurovědy. 2005.
- Tůma L., Kordík P.: Evaluation of Cortex Single-Units on Neuronal Network. Semestrální práce k předmětu Neuronové sítě a neuropočítače, FEL ČVUT. 2006.
- Tůma L.: Does activated bengal rose induce brain ischemia in the rat? Final semester work for M6F. Semestrální práce k předmětu Matematika 6F, FEL ČVUT. 2005.
- Tůma L.: CFS Data Mining Utility – a Methodic Study. Semestrální práce k předmětu Problémy a algoritmy, FEL ČVUT. 2005.
- Tůma L., Krýsl D., Mareš J.: Ovlivnění postiktální inhibice v neokortexu potkanů kmene Wistar krátkými salvami slabých podnětů. Studentská vědecká konference 3.LF UK. 2002.
- Tůma L., Krýsl D., Mareš J.: Experimentální ovlivnění prahu pro epileptické záchvaty. Studentská vědecká konference 3.LF UK. 2001.
- Tůma L., Krýsl D., Mareš J.: Cortical Epileptic Afterdischarge and Changes in Brain Excitability in the Rat. 4. konference České společnosti pro neurovědy. 2001.
- Valenta T.: Neural Zoom, FEL ČVUT. 2005.

## 7. VĚDECKÁ ČINNOST AUTORA

### **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 kardiovaskulární chirurgie. Brno. Grus T, Rohn V, Grusová G, Lambert L., Janák D, Brlicová L, Linder J. Výskyt gastrointestinálních komplikací po kardiochirurgické 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, Hruby J, Novotny R, Rohn V, Krajicek M, Lambert L., Grusova G, Lindner J. POSTER: Surgical treatment of diabetic foot syndrome complete / full revascularization.

---

## 8. PRÁCE AUTORA IN EXTENSO

## Short Bursts of Weak Pulses Break Postictal Inhibition in the Neocortex of Wistar Rats

Lukáš Tůma, David Krýsl, and Jan Mareš

*Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, Charles University, Third Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic*

**Summary:** *Purpose:* Postictal inhibition (PI) is a decrease in excitability that follows an epileptic seizure and decreases probability of new seizure occurrence. PI may involve both increased inhibition and persisting elevated excitation. Our experiments tested whether shorter trains of weak stimuli are able to unmask this residual increase of excitability during the PI.

*Methods:* Four epileptic afterdischarges (ADs) were evoked by intense electrical stimulation (20 s, 8 Hz, current intensity at 5× threshold) of the neocortex in two groups (A, B) of Wistar rats. Before the first AD and during the 10-min interictal period, 8-Hz trains of four weak pulses (half of the intensity used for the AD triggering; 4P) were applied every 20 s in group B and a single pulse with similar parameters in group A.

*Results:* The number of interictal epileptiform events evoked by 4P in the group B was significantly higher than that in the group A (evoked by single pulses) except after the second AD. Epileptic events were triggered by 4P also immediately after the AD termination.

*Conclusions:* It is apparent that weak stimulation can trigger epileptic phenomena during PI. Our results indicate that it is no longer possible to perceive PI only as persisting extreme and active inhibition. An appropriate stimulation can reveal more subtle (but important) excitatory events contributing to the functional status during the postictal period. **Key Words:** Epilepsy—Postictal inhibition—Electrical stimulation—Rat—Kindling—Seizure.

Epileptic seizures are usually followed by a period when it is difficult or impossible to evoke any seizure. This postictal inhibition (PI) occurs also after seizures elicited by electrical stimulation. If the same stimulation parameters are used in an attempt to evoke an epileptic afterdischarge (AD) during the PI, the AD cannot be elicited (1,2). A broad spectrum of changes in CNS function such as altered behavior, modification of EEG (3,4), evoked potentials (5), and also molecular changes (6–8) were documented during the PI. Among the mechanisms involved in seizure termination, a massive active inhibition is widely believed to play the main role (9,10). However, some experimental evidence points to a more complex view of events during the PI [for example, changes in energetic metabolism (8) or decreased number of synaptic vesicles (11)].

Mechanisms leading to the PI are apparently activated during the seizure, and they can be involved in seizure termination. However, in some experiments, spontaneous acute recurrent ADs were observed when PI nor-

mally occurs. This phenomenon was observed in adult as well as in young rats (12). The mechanisms involved in seizure termination also are obviously insufficient during status epilepticus (SE) (10). These may indicate persisting increase in excitability during the development of the PI. For the testing of seizure susceptibility during the PI, an intense stimulation is commonly used (1,7). It is based on the concept that such stimulation should overrun the PI.

Our hypothesis anticipates the coexistence of increased excitability with persisting activation of inhibitory factors during the postictal period. In this study, we tested whether certain stimulation paradigms could unmask residual excitability during the PI. We determined whether a burst (8 Hz) of four pulses (4P) weaker than those used to elicit ADs, applied during the interictal period, may evoke ictal phenomena. We also tested whether the administration of 4P affects the induction of the next AD.

### METHODS

Adult male Wistar rats ( $N = 18$ ) were randomly assigned to two groups (A, B) of nine. All experiments were carried out on freely moving animals.

Accepted November 17, 2002.

Address correspondence and reprint requests to Dr. J. Mareš at Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, 3rd Fac Med, Charles University, Ke Karlovu 4, 120 00 Praha 2, Czech Republic. E-mail: jan.mares@lf3.cuni.cz

## Surgery

Under pentobarbital (PTB) anesthesia (70 mg/kg, intraperitoneally) bipolar stimulation electrodes were placed on the right sensorimotor (SM) area and registration electrodes on both SM areas and on the visual cortex. An indifferent electrode was positioned on the nasal bone. All electrodes were fixed in their places with a cap composed of acrylic.

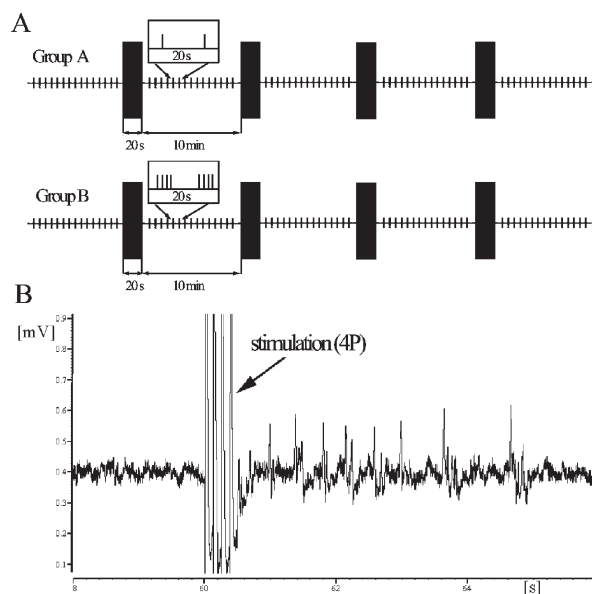
## Experiment

One week after surgery, the rats were connected to the computer-based EEG recorder, and 5 min of spontaneous electrocorticography (ECoG) was recorded in each animal. Threshold for an evoked potential (interhemispheric response) was estimated by increasing the intensity of individual pulses stepwise (10  $\mu$ A). When five subsequent evoked potentials were detected with a given intensity, then the previous level of intensity was accepted as a threshold and used as a reference value (RI) for stimulation intensity. Two types of interictal stimulation were used: single bipolar rectangular pulses (intensity at 2.5 $\times$  RI; duration, 1 ms; and interstimulation interval, 20 s); and 4P (train of four pulses with the frequency of 8 Hz, intensity at 2.5 $\times$  RI). After the end of the reference intensity estimation, 20 single pulses were administered in group A, and 20 4P, in group B.

This was followed by triggering of four ADs in each animal (stimulation, 8 Hz; intensity, 5 $\times$  RI; duration of the stimulation train, 20 s; pulse duration, 1 ms). This stimulation paradigm was much more intense than either of the previously mentioned types of interictal stimulations. Intervals between ADs evoked by intense stimulations lasted 10 min. During these intervals, single pulses (in group A) and 4Ps (in group B) with the same parameters as for the pre-AD stimulation were administered 4P (See the sequence of stimulations for both groups in Fig. 1A.) During the ADs, behavior of the animals was observed and recorded with special attention to the occurrence of loss of balance (LB; falling). The presence or absence of LB was used to estimate the behavioral severity of the ADs. The duration of individual ADs was measured.

## Statistical evaluation

To compare the number of interictal epileptic phenomena in group A with the number of interictal epileptic phenomena in group B, the Mann–Whitney *U* test was used. The differences between the groups in the mean AD duration after the first, second, third, and fourth intense stimulations were tested by using Student's *t* test. The total number of ADs with LB after the first, second, third, and fourth intense stimulations was compared between the groups by using the  $\chi^2$  test. Level of significance was always preset to  $p < 0.05$ .



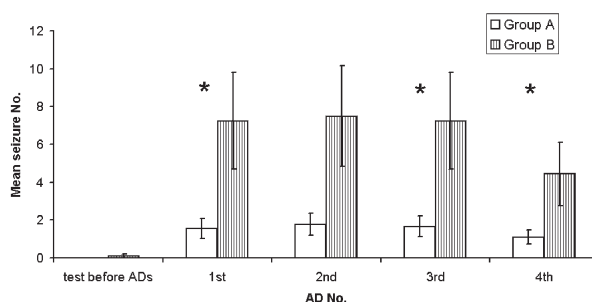
**FIG. 1.** **A:** Scheme of the stimulation protocol. **B:** Short seizure elicited by four weak pulses (8 Hz) after the end of the afterdischarge

## RESULTS

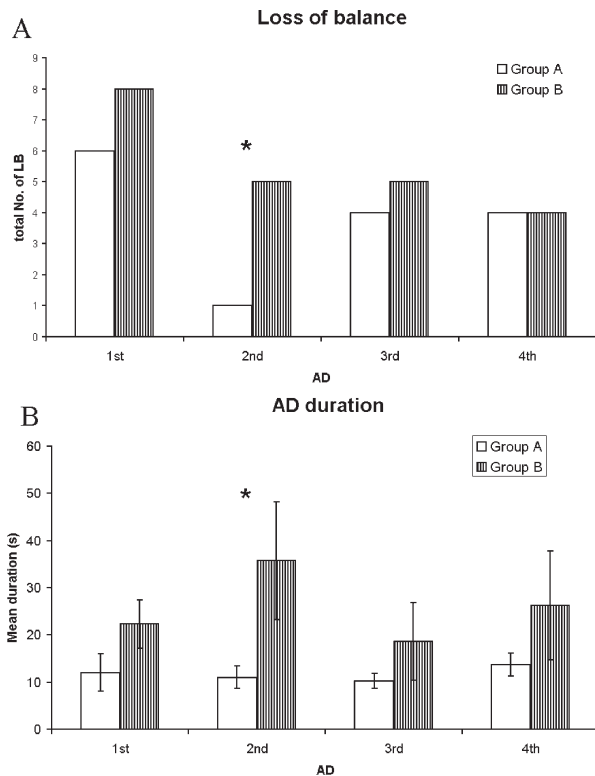
In group A, single pulses did not evoke any epileptiform activity before the induction of the first AD (i.e., in the animal without a history of seizures). In group B, the 4P evoked atypical EEG response in one of nine animals before the induction of the first AD.

In group A ( $n = 9$ ) after any of the four ADs, single pulses evoked only a few short seizures. However, the number of short seizures (Figs. 1B and 2) associated with 4P (group B;  $n = 9$ ), when compared with single pulses in group A, was significantly higher after the first ( $p < 0.05$ ), third ( $p < 0.05$ ), and fourth (Student's *t* test;  $p < 0.05$ ), but not after the second AD (Fig. 3). The total number of evoked short seizures was significantly higher in group B (Mann–Whitney *U* test,  $p < 0.01$ ).

### Short seizures following AD



**FIG. 2.** Mean number of short seizures elicited by stimulations before (control) and after afterdischarges ( $\pm$ SEM). In group A, single pulses at 20-s intervals were used, and in group B, trains of four pulses at 8 Hz were applied (\* $p < 0.05$ ).



**FIG. 3.** Comparison of subsequent epileptic afterdischarges (ADs) between the groups. **A:** Number with loss of balance. **B:** Mean duration of ADs ( $\pm$ SEM) (\* $p < 0.05$ ).

Mean duration of the second AD in group B was significantly longer compared with the mean duration of the second AD in group A ( $p < 0.05$ ). ADs after the first, third, and fourth intense stimulations did not differ significantly between the groups when comparing mean durations. No difference in the duration of the four consecutive ADs was found within each group (Fig. 3).

Significantly more ADs were associated with falling of the animal (LB, Fig. 3) after the second AD in group B compared with the second AD of group A ( $\chi^2$  test,  $p < 0.05$ ). However, comparison of absolute numbers with falling between both groups yielded no significant differences.

## DISCUSSION

From our previous experiments (1) and other reports (13), it is known that the strong stimulation (used to elicit ADs) is not able to trigger a new AD during the initial phases of the PI. In the present experiment, the trains of only four weak pulses (4P) were able to trigger more short seizures immediately after the AD. The single pulses were too weak to elicit epileptic phenomena in more animals. Some differences between the groups in LB occurrence were noted, which tended to be higher in the group subjected to interictal stimulation with four

pulses. Prolongation of ADs (acute kindling) was not observed in any group.

We were able to trigger new short seizures during the postictal period, if an appropriate stimulation paradigm was chosen. Stimulated SM cortex did not display relative or absolute refractoriness in terms of resistance to both types of stimuli with lower intensity (single pulses or 4P). Trains of four stimuli were able to trigger epileptic phenomena more often than single pulses during the PI after ADs in our experiments. No difference in AD duration, EEG pattern, or behavioral severity of seizures was found in the first AD when comparing group A with group B. Given that the first AD was similar in group A and group B, we can hypothesize that the postictal period also was similar; thus we can assume that short seizures evoked in the postictal period were caused by an acute direct influence of 4P on neuronal excitability. We cannot rule out some long-lasting effects of 4Ps on excitability, but in our experiment, the occurrence of short seizures does not seem to be a consequence of changes induced by 4P during the preceding AD in naive animals.

The parameters of the stimulation used in our previous work (1) to trigger AD and test the duration of the PI were the same as in the intense stimulation in the present experiment. It was shown (1,13) that the application of the same type of intense stimulation that was used to elicit ADs (i.e., intense stimulation) leads to clear signs of PI during the first minutes after the end of the previous AD. This was not the case when weak stimuli (4P) were used. An explanation involves at least two processes participating in the PI. We propose that a hidden increase in activity of the excitatory system persists on the background of active inhibition and synaptic exhaustion (10,11).

Our short seizures may appear on the background of evoked oscillations in excitability (14). This is supported by the result of the experiment (12), in which stimulations of greater intensity and frequency (50 Hz) and short duration (2 s) were used to evoke ADs, and the occurrence of spontaneous recurrent seizures was described. A short train of weak pulses may enhance excitability increased by the previous AD by mechanisms similar to those anticipated in paired-pulse stimulation.

Although our data do not provide more information about involved mechanisms, it is tempting to compare our results with the recent findings in the hippocampus. Partial explanation of our results is similar to the discussed theory of "irritable mossy cell" (15). In acute experiments, such as our study, it is unlikely that the cell death would be responsible for the epileptic events observed. More likely, functional impairment of excitatory and inhibitory interneurons could be the main culprit. In the hippocampus, mossy cells respond to depolarization with an increase in excitability [reflected in sharp excitatory postsynaptic potentials (EPSPs)]. If the 4P

exerted such an effect on a functionally similar neuronal system and/or a transient impairment of inhibitory interneuron function, the net effect could be the occurrence of short afterdischarges detectable on the ECoG. Another intense stimulation delivered after the AD termination would suppress "irritable" cells and also support activity of the inhibitory systems.

In our present experiment, both types of weak stimulation before the first AD and during the interictal period influenced subsequent seizures. This phenomenon was especially emphasized when the 4Ps were used. Significantly longer ADs after the second intense stimulation were observed in group B in comparison to group A. Occurrence of LB also was higher in the group B. However, AD repetitions in the neocortex did not lead to the AD prolongation (acute kindling) [see (1)]. Observed differences could be related to stimulation paradigms in groups A and B.

We suppose that the stimulation during the PI may play a role in acute kindling manifestation. Conversely, not only the seizure but also the presence of PI may be important for the kindling phenomenon. However, the relation between acute kindling and PI does not have to be direct.

Our results show that during the PI, it is possible to evoke or unmask increased excitability concealed by activated proinhibitory systems in this period. Attempts to elicit a seizure by intense stimulation may paradoxically act more to accentuate inhibitory factors than to increase excitability. In such a case, the result of stimulation is reinforcement of refractoriness.

Our results contribute to the explanation of mechanisms involved in the development of SE. On the basis of all the new evidence, the concept of the postictal period should be revised.

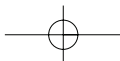
**Acknowledgment:** This study was supported by grants GA

UK 98/1999/C, HEDF 1815 F3, and Ministry of Education J13/98:111100005.

## REFERENCES

1. Mareš J, Mareš P, Kadlecová-Jursíková D. Changes in the excitability of rat cerebral cortex after a self-sustained after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1982;53:283–8.
2. Swartzwelder HS, Wegener ST, Johnson CT, et al. Depressed excitability and integrated EEGs following hippocampal afterdischarges. *Brain Res Bull* 1980;5:509–17.
3. Aldenkamp AP. Effect of seizures and epileptiform discharges on cognitive function. *Epilepsia* 1997;38(suppl 1):S52–S5.
4. Daniel WF, Crovitz HF, Weiner RD, et al. ECT-induced amnesia and postictal EEG suppression. *Biol Psychiatry* 1985;20:344–8.
5. Kriss A, Halliday AM, Halliday E, et al. Evoked potentials following unilateral ECT, II: the flash evoked potential. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1980;48:490–501.
6. Vanore G, Giraldez L, Rodriguez de Lores Arnaiz G, et al. Seizure activity produces differential changes in adenosine A1 receptors within rat hippocampus. *Neurochem Res* 2001;26:225–30.
7. Velíšek L, Mareš P. Differential effects of naloxone on postictal depression. *Epilepsy Res* 1992;12:37–43.
8. Št'astný F, Mareš J, Trojan S. Rapid modulation of rat cortical Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase during recovery following self-sustained afterdischarges. *Physiol Bohemoslov* 1981;30:79–83.
9. Rocha L, Ackermann RF, Engel JJ. Effects of chronic morphine pretreatment on amygdaloid kindling development, postictal seizure and suppression and benzodiazepine receptor binding in rats. *Epilepsy Res* 1996;23:225–33.
10. Young D, Dragunow M. Status epilepticus may be caused by loss of adenosine anticonvulsant mechanisms. *Neuroscience* 1994;58:245–61.
11. Langmeier M, Mareš J, Fischer J. Number of synaptic vesicles in rat cortex immediately after cessation of the self-sustained afterdischarge during kindling. *Epilepsia* 1983;24:616–27.
12. Mareš J, Beneš P, Mareš P, et al. Influence of certain stimulation parameters on the character of the cortical self-sustained afterdischarge. *Physiol Bohemoslov* 1983;32:30–7.
13. Marešová D, Valkounová I, Jandová K, et al. Excitability changes of cortical neurons during the postnatal period in rats exposed to prenatal hypobaric hypoxia. *Physiol Res* 2001;50:215–9.
14. Penttonen M, Nurminen N, Miettinen R, et al. Ultra-slow oscillation (0.025 Hz) triggers hippocampal afterdischarges in Wistar rats. *Neuroscience* 1999;94:735–43.
15. Ratzliff AH, Santhakumar V, Howard A, et al. Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? *Trends Neurosci* 2002;25:140–4.





## SEMI-INTERACTIVE DETECTION OF ACTION POTENTIALS USING LOCAL WAVE FEATURES AND CLUSTERING

LUKÁŠ TŮMA<sup>1,2</sup>, KLÁRA BERNÁŠKOVÁ<sup>2</sup>, JAN MAREŠ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>4<sup>th</sup> Department of Internal Medicine, General Teaching Hospital in Prague, Czech Republic,  
<sup>2</sup>Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

### Abstract

Impressive achievements in neuronal waveform processing branch into abundant pool of dedicated algorithms - modifications of few core principles. This paper details design and implementation of effective customizable algorithm for detection of extracellularly recorded action potentials demonstrated on recordings from brain cortex of adult male Wistar rats. At first signal is filtered using surroundings amplitude averaging and moving average subtraction. Subsequently, location of data points in which first derivation of waveform crosses zero value steeper than in common artefacts found in background activity is estimated. For description of the point's surroundings, amplitude and steepness with their bilateral symmetry are calculated and utilized to select graphoelements that are subsequently clustered by modified K-means algorithm. This procedure allows formation of shape patterns of action potentials. Comprehensive offline analysis of our recordings demonstrated this approach as well utilizable for typifying and consecutive selection of action potentials, which fluctuate due to experimental interventions. Moreover, it facilitates distinguishing activity of separate neurons in multi-unit waveforms.

**Key words:** spike detection, clustering, action potential, K-means, neuronal network.

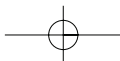
### INTRODUCTION

Automated action potential detection and processing constitutes an inherent precondition for modern evaluation and interpretation of all recordings of electrical activity of excitable cells. In our experiment, changes in neuronal activity in cortex of the rat during development of cortical ischemic lesion caused by photothrombotic vessel occlusion were investigated [1, 2, 3, 4, 5]. An electric signal is recorded both from inside and from the vicinity of a developing ischemic focus. Changes in extracellular space are anticipated in our experiments. Therefore, alteration in shape and other characteristics of extracellular activity record of particular neuron can be obviously expected. This may be caused either by response of a cell (and its neighbours) to ischemia or neuron dislocation due to development of perifocal oedema as well as its eventual lysis. The nominal impedance of registration microelectrode determines the capability to register multiple unit activity. Because of mutual displacement of electrode and tissue during recording, more than one type of cell activity can be registered and the shape of action potential may vary in time.

Indisputably, the process of detection and analysis of recordings of action potentials is computationally intensive; sensitivity and specificity enhancement of an algorithm is burdened with increased computational complexity. Respective methods can be divided according to their complexity, the usage of artificial intelligence, fuzzy operators, clustering and the necessity of human interaction during the process of data evaluation. Peak tracking based on sole amplitude is an unsophisticated and simple method with linear time complexity [6, 7]. Employment of shape border constraints [8], or sliding clipping window determining steepness and amplitude of a peak has also been reported. Another method is the Maximum Integral Transform Alignment, which is based on integration of positive and negative part of an action potential [9]. Graphoelements showing little variation in time can be tracked by searching for their characteristic features [6]. Next technique that allows identifying action potentials is filtration. More sophisticated methods use transformation of a signal into another domain: for example wavelet or Fourier transforma-

Address for correspondence:

Lukas Tuma M.D. Ing., Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic



tion, both otherwise profusely exploited in multimedia compression [10, 11]. Clustering of similar spikes and principal component analysis facilitate recognition of both outlying values and signals from multiple cells recorded simultaneously in one waveform – multiple unit activity [6, 7, 12]. Rapid progress in computer technology allows implementation of algorithms with growing complexity and accuracy for automated signal evaluation even in real time on machines with affordably priced computational force.

The objective of this work was to invent and implement sufficiently accurate algorithm for tracking and sorting of single unit potentials in recordings of electrical activity of one or a small group of neurons. It was necessary to create an algorithm for off-line evaluation of waveforms recorded within our experimental work. Activity changes in time as an expected response to the experimental intervention had to be considered as well. The algorithm was designed to evaluate 20 minute waveform sampled at 10 kHz in same-order time growing linearly with the number of data points.

Detection of single unit potentials is an especially specific task. Combination of previously mentioned principles is necessary to achieve high-quality results. Furthermore, additional complexity is required to evaluate recordings of varying technical quality.

## METHODS

**Subjects:** The data were recorded in adult male Wistar rats weighing from 200 to 250 g. The animals were raised under a controlled light cycle (12 hours light, 12 hours dark, lights on at 6:00 am) with free access to food and water. All procedures were performed in accordance with Ethical Guidelines of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, and in agreement with Guidelines of the Animal Protection Law of the Czech Republic, which corresponds to respective EU regulations. Ethical Commission approved the experimental protocol. Special care was given to minimize animal suffering. After induction to anaesthesia (Urethane, 20%, 6.5ml/kg, intraperitoneally), the skull was uncovered and two trephine openings 3 mm in diameter were made bilaterally over the somatosensory cortex. A peripheral catheter was inserted into caudal vein and the animal was fixed in a stereotactic apparatus. Glass microelectrodes (impedance  $6 \times 1.5$  M) filled with 3 mol NaCl solution were used for registering the activity of cortical neurons in the right sensorimotor area. Obtained signal was amplified with an operational amplifier with adjustable resistance in the feedback loop. A 16-bit A/C converter Micro 1401 by Cambridge

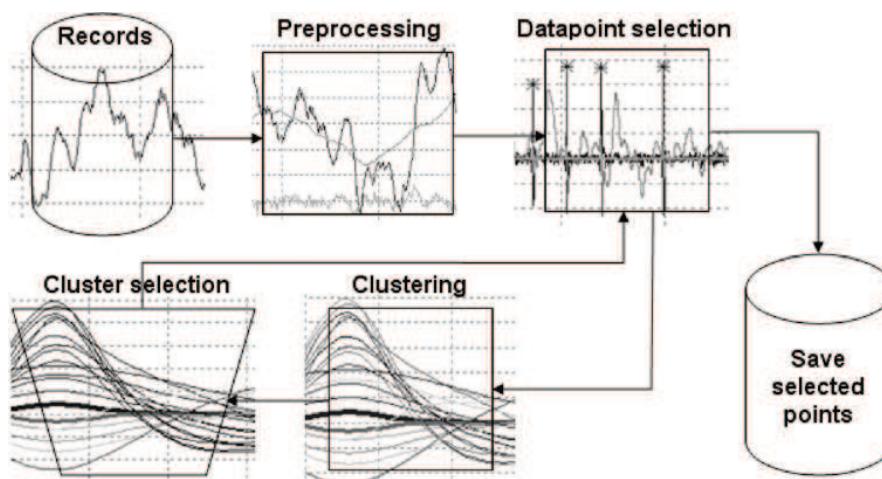
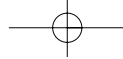


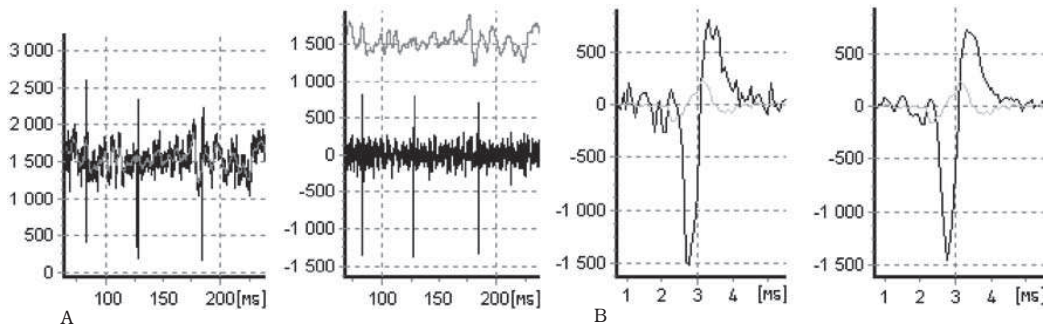
Fig. 1: Algorithm flowchart.



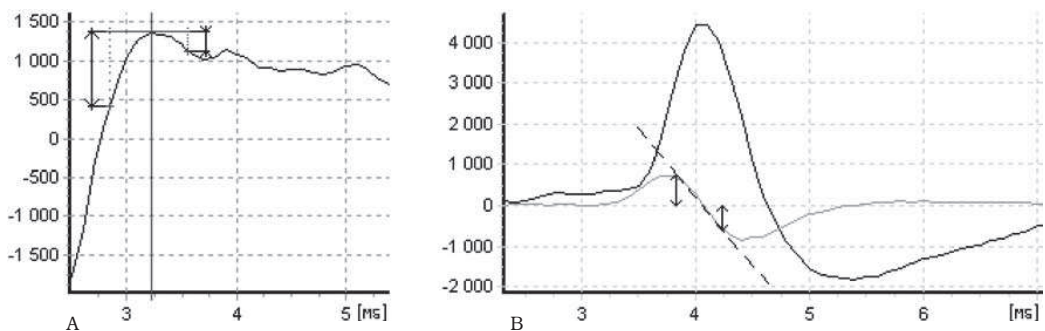
Electronic Design with input range  $\pm 5$  V was used for data digitalization. The experiment started with registration of 5 minutes of spontaneous waveform. Afterwards either photosensitive dye Rose Bengal (20 mg/2 ml/kg, dissolved in 0.9 % NaCl) was applied slowly into systemic circulation in the experimental group or saline solution in equal volume in the control group. Subsequently a diode laser irradiation was used as a light source for photothrombosis (duration 9 minutes, wavelength 532 nm, power density 50 mW/mm<sup>2</sup>, illuminated area < 1 mm<sup>2</sup>). After that, recording continued for another 11 minutes.

**Algorithm:** The algorithm was implemented in C++, which was chosen for its simplicity, versatility and effective code generation. The recordings were processed on a PC running on AMD Sempron 3000+ mobile processor with 512 MB of RAM. We decided to implement a three-phase waveform evaluation procedure (Fig. 1).

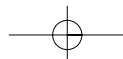
**First phase:** Initially, the waveform is preprocessed. Low frequencies are eliminated by subtraction of moving average from the waveform (Fig. 2a). Duration of the base of sliding average is at least three times longer than the expected duration of an action potential, which attains in our case typically 12 points, i.e. 1.2 ms. A 36 points long base yields cut-off frequency around 100 Hz. Waveform smoothing and filtering off a high-frequency noise is achieved by substitution of a data point with an average of its surroundings with a typical size of  $\pm 0.1$  ms i.e.  $\pm 1$  data point in our particular case (Fig. 2b).

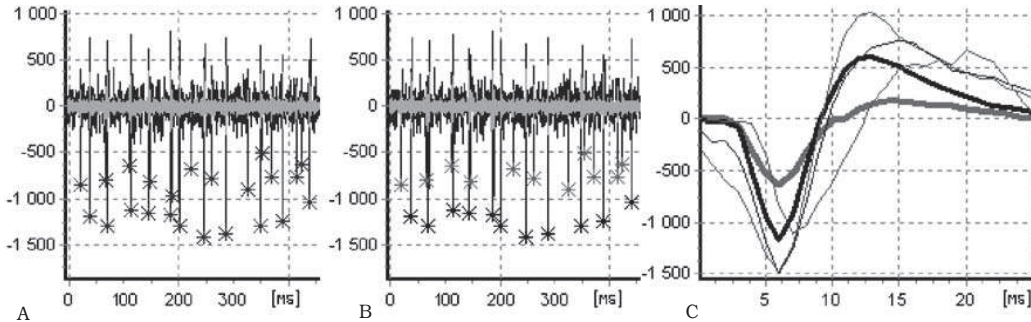
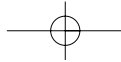


**Fig. 2.** A: Moving average – a highpass filter: original waveform (black) and moving average (grey) on the left; filtered signal (black) and subtracted moving average (grey) on the right. B: Neighborhood averaging – a lowpass filter: original waveform (black) and steepness (grey) on the left, smoothed waveform (black) on the right.



**Fig. 3.** A: Asymmetry of the data point neighborhood: waveform (black), arrowheads delineate amplitude variation in constant time interval that corresponds with wave asymmetry. B: Steepness of the data point neighborhood: original waveform (black), steepness (grey). Arrowheads delineate steepness variation in constant time interval.





**Fig. 4.** A: Preselected action potentials: preprocessed waveform (black) with preselected points marked with stars (\*). B: Action potentials matched to cluster patterns: preprocessed waveform (black) with preselected points marked with stars (\*), the two colors distinguish two clusters. C: Clusters matching action potentials in Figure 4b.

**Second phase:** The objective of the second part of waveform processing is to reduce the number of points entering the third, the most computationally demanding part to minimum. We search the points that resemble action potentials in their features or in features of their surroundings. Points embodying defined characteristics mark most likely spikes we are looking for. Amplitude, steepness (Fig. 3a) and symmetry (Fig. 3b) were chosen as the most helpful to differentiate action potential from other activity. Both amplitude and steepness are considered as upper boundary values for the background noise and are calculated from the data point surroundings with adjustable size, typically  $\pm 5$  data points, i.e.  $\pm 0.5$  ms in our particular case. The symmetry criterion determines the maximal ratio of amplitude or steepness before and after particular data point, thus excluding usually asymmetric artefacts. Common values range from 0.1 to 10-fold. At the end of the second part, the set of „interesting“ points contains only a fraction of its initial size (Fig. 4a).

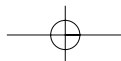
**Third phase:** The last part, the clustering, is operator dependent. The objective is to assign preselected waves (the output from the second part) to a defined number of the closest patterns. This allows to pinpoint the time variability of action potentials or to distinguish activity of multiple cells. For clustering, modified K-means algorithm was chosen [9, 12, 13, 14, 15, 16]. The algorithm assigns particular vectors  $\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2 \dots \mathbf{x}_m$  with  $n$  components as data points of action potentials in our case to the closest cluster pattern. The pattern, which has minimal distance from a particular vector, is updated proportionally to its strength (i.e. the number of already associated vectors), so that their mutual distance decreases. This step guarantees convergence of the algorithm as well. The distance between two vectors is defined as:

$$\| \mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2 \| = \sum_{i=1}^n | x_{1,i} - x_{2,i} |$$

and the closest vector is the only one with minimal distance.

Since the diversity among the patterns can hardly be estimated in advance, the number of patterns is not implicitly dependent on the variance of the spikes, but it is preset by the operator. If the distance of two closest patterns is lower than the distance of the examined vector and its closest pattern, a new pattern originating in the particular vector is created.

If the number of patterns exceeds the limit initially set by the operator, the two closest merge proportionally to their respective strength. Further destiny of the patterns is interactively determined by the operator considering their shape and number of associated spikes, as displayed on the screen. Vectors that were associated with undesired patterns can be easily erased. Clustering and selection can be iterated and so can clusters be divided into even smaller subsets (Fig. 4b and 4c). The third part is the most computationally demanding one: the time complexity rises about linearly with the number of preselected data points and less than exponentially with the





number of patterns. The computation time can be improved by limiting the number of clusters usually to 10 to 20.

## RESULTS

The developed algorithm was successfully implemented and employed in our experimental work for detection of single unit potentials in recordings counting  $n = 12$  million data points i.e. 20 minutes sampled at 10 kHz. Specificity and sensitivity was tested on signal mixed from artificial neuron model [17] (Fig. 5a) and uniform background noise recording (Fig. 5b) in respective ratios. The 1:1 ratio (maximal amplitude of generated signal : maximal amplitude of noise) yielded brilliant 0.89% misplaced or missed action potentials (Fig. 5c). The time complexity of the second part (the point preselection) is  $O(n)$  and of the third part (the clustering)  $O(nv^2)$ , where  $v$  is the preset number of patterns. The final output of the program is a binary file containing vectors of selected action potentials including their timestamp. Groups of such files are subsequently analyzed in a different environment. The program features output from intermediate stages of the analysis (patterns, selected vectors) in form of a table that can be easily processed in a standard spreadsheet program.

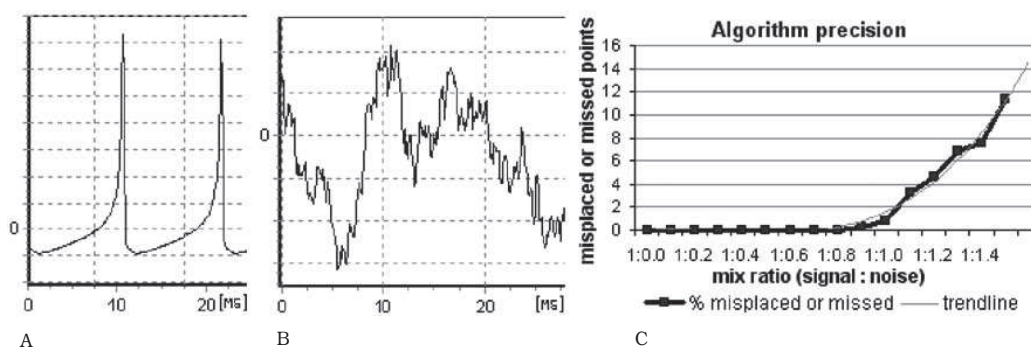


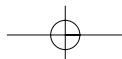
Fig. 5. A: Artificial neuron model; B: Background noise; C: Algorithm precision chart.

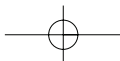
## DISCUSSION

Semi-interactive detection algorithm of action potentials using local wave features and clustering combines two principles of detection of graphoelements: tracking of local features of a wave and clustering with subsequent selection of patterns. In certain parts, it is operator dependent. In our recordings, it attains sufficient accuracy and it can be efficiently employed for evaluation of non-stationary recordings of action potentials. Measured in the percentage of missed or misplaced spikes, our algorithm outperforms many other methods. However, this point of view is biased by the diversity of benchmarks used in establishing algorithm performance.

The development of waveform in time as a response to experimental intervention is the main subject of our research. Semi-interactive method for detection of action potentials allows us to observe changes in electrical activity (discharge frequency, coupling of discharges) of observed cells as a reaction to ischemia.

Neuronal death begins within 1 or 2 minutes after complete vascular occlusion in the core of the ischemic focus. Simultaneously, an area with gradually decreasing blood flow called penumbra develops around the ischemic core. Some neurons in penumbra become electrically inactive. These silent neurons may perish or recover. Our research revolves around changes in unit activity shortly before the activity disappears and in activity of surviving neurons. We assume that a change in activity of neurons synaptically connected with those in penumbra or in the core area





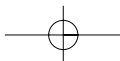
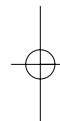
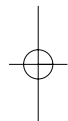
takes place. Therefore we evaluate unit activity of cortical neurons in contralateral hemisphere.

For routine evaluation, setup profiles for all adjustable constants will be necessary to implement in the program in order to introduce uniformity in the data processing and allow semi-skilled users to use it effectively. Our system is comparably as fast as marketed programs, however, its principal strength lies in effortless adjustability to a particular experiment.

#### REFERENCES

1. Pevsner PH, Eichenbaum JW, Miller DC, Pivawer G, Eichenbaum KD, Stern A, Zakian KL, Koutcher JA. A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2001; 45 (3): 227-33.
2. Matejovska I, Bernaskova K, Krysl D, Mares J. Influence of melatonin pre-treatment and preconditioning by hypobaric hypoxia on the development of cortical photothrombotic ischemic lesion. *Physiol Res* 2007.
3. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 1985; 17 (5): 497-504.
4. Yao H, Sugimori H, Fukuda K, Takada J, Ooboshi H, Kitazono T, Ibayashi S, Iida M. Photothrombotic middle cerebral artery occlusion and reperfusion laser system in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 2003; 34 (11): 2716-21.
5. Markgraf CG, Kraydieh S, Prado R, Watson BD, Dietrich WD, Ginsberg MD. Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Stroke* 1993; 24 (2): 286-92; discussion 292-3.
6. Lewicki MS. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network* 1998; 9 (4): R53-78.
7. Bergman H, DeLong MR. A personal computer-based spike detector and sorter: implementation and evaluation. *J Neurosci Methods* 1992; 41 (3): 187-97.
8. Stewart CM, Newlands SD, Perachio AA. Spike detection, characterization, and discrimination using feature analysis software written in LabVIEW. *Comput Methods Programs Biomed* 2004; 76 (3): 239-51.
9. Andrew D, Craig AD. Responses of spinothalamic lamina I neurons to maintained noxious mechanical stimulation in the cat. *J Neurophysiol* 2002; 87 (4): 1889-901.
10. Rinberg D, Bialek W, Davidowitz H, Tishby N. Spike sorting in the frequency domain with overlap detection. *Physics.data-an* 2003; arXiv:physics/0306056v2: (Internet: <http://arxiv.org/abs/physics/0306056>).
11. 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; 117 (1): 1-12.
12. Horn CC, Friedman MI. Detection of single unit activity from the rat vagus using cluster analysis of principal components. *J Neurosci Methods* 2003; 122 (2): 141-7.
13. Takahashi S, Anzai Y, Sakurai Y. Automatic sorting for multi-neuronal activity recorded with tetrodes in the presence of overlapping spikes. *J Neurophysiol* 2003; 89 (4): 2245-58.
14. Borisoff JF, McPhail LT, Saunders JT, Birch GE, Ramer MS. Detection and classification of sensory information from acute spinal cord recordings. *IEEE Trans Biomed Eng* 2006; 53 (8): 1715-9.
15. Brozovic M, Andersen RA. A nonparametric quantification of neural response field structures. *Neuroreport* 2006; 17 (10): 963-7.
16. 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; 46 (3): 265-72.
17. Izhikevich EM. Simple Model of Spiking Neurons. *IEEE Transactions On Neural Networks* 2003; 14 (6): 1569-1572.

Aknowledgements: This work was supported by following grants: VZ 0021620816, GAUK 104/2004/C/3LF.



D. KRYSL<sup>1,2</sup>, K. DEYKUN<sup>1</sup>, L. LAMBERT<sup>1</sup>, J. POKORNY<sup>3</sup>, J. MARES<sup>1</sup>

## PERIFOCAL AND REMOTE BLOOD-BRAIN BARRIER DISRUPTION IN CORTICAL PHOTOTHROMBOTIC ISCHEMIC LESION AND ITS MODULATION BY THE CHOICE OF ANESTHESIA

<sup>1</sup>Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, <sup>3rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic;  
<sup>2</sup>Department of Neurology, <sup>2nd</sup> Faculty of Medicine, Motol Hospital, Charles University, Prague, Czech Republic;  
<sup>3</sup>Department of Physiology, <sup>1st</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

We assessed blood-brain barrier (BBB) disruption in early stage of photothrombotic focal cerebral ischemia in the rat. We specifically looked for contralateral changes in BBB permeability and tested the influence of two anesthetics on the results. Adult Wistar rats were randomly anesthetized with pentobarbital (PB) or ketamine-xylazine (KX). Rats received intravenously (i.v.) Rose Bengal followed by Evans Blue (EB). Stereotactically defined spots on denuded skull were irradiated by laser (532 nm) for 18 min. Twenty four hours later, rats were killed, brains perfused, fixated, sectioned and slices analyzed by fluorescence microscopy. Volume of necrosis and volume of EB-albumin extravasation were calculated. Evidence of BBB breakdown in remote brain areas was sought and compared to sham handled controls. BBB disruption was consistently present, frequently with EB-albumin accumulating cells. Total lesion volume did not significantly differ among groups (TLV<sub>PB</sub>=9.4±1.3 mm<sup>3</sup> vs. TLV<sub>KX</sub>=8.3±2.1 mm<sup>3</sup>); same was true for the volume of necrosis (NV<sub>PB</sub>=5.1±0.7 mm<sup>3</sup> vs. NV<sub>KX</sub>=6.3±1.9 mm<sup>3</sup>). However, volume of EB-albumin extravasation area was significantly smaller in KX group (EBEV<sub>PB</sub>=4.3±0.8 mm<sup>3</sup> vs. EBEV<sub>KX</sub>=2.0±0.5 mm<sup>3</sup>; p=0.0293). Median background EB-fluorescence signal density was higher in PB group (p<0.0001). Furthermore, regional increase in EB-fluorescence was found in two animals in PB group. Our study shows that anesthesia with NMDA-antagonist ketamine and  $\alpha$ 2-adrenergic agonist xylazine may reduce BBB breakdown in photothrombosis. Pentobarbital anesthesia lead to increased BBB permeability in the contralateral hemisphere.

Key words : *anesthesia, blood-brain barrier, cerebral ischemia, ketamine, pentobarbital, photothrombosis, stroke*

### INTRODUCTION

Blood-brain barrier (BBB) permeability is altered in various pathological states, including ischemic stroke. Apart from being an important mechanism of secondary brain injury, BBB disruption with plasma protein extravasation was implied in late consequences of acute cerebral insults, namely epileptogenesis (1-4). The extent of BBB disruption differs among individual animal models of focal cerebral ischemia (5-9). Many factors contribute to this variability, including the choice of species, its vascular anatomy, capacity of collateral circulation, the duration of ischemia (transitory or permanent), the means of producing ischemia (large vessel occlusion, focal vasoconstriction, or microvascular occlusion, e.g. photothrombosis), and, possibly, the choice of anesthesia. Because BBB disruption in some models follows a biphasic course (10), the timing of evaluation becomes a major issue as well.

Usually, investigators focus on BBB disruption in the perilesional tissue. However, focal ischemia was shown to induce changes in the cerebral blood flow, brain metabolism and excitability also in remote functionally connected areas - a concept

known as diaschisis (11-14). The possibility that diaschisis could include remote changes in BBB permeability was not tested.

In the present study, we evaluated perifocal, as well as contralateral BBB disruption in photochemically induced focal cerebral ischemia in rats. We also tested, whether the choice of anesthesia can influence the results.

### MATERIAL AND METHODS

Adult Male Wistar albino rats (weight 200–220 g; ANLAB, Czech Republic) at postnatal day 60 and older were used. The animals were acclimated at least three days prior to the study and were maintained on a 12 hour light/dark cycle, with food and water available ad libitum. All experiments were performed in accordance with guidelines of the Ministry of Health, Czech Republic. Experimental protocols were approved by the Ethics committee of the 3<sup>rd</sup> Medical School, Charles University, Prague (Authorization No. for animal use: 17659/2007-30, issued on 9/7/2007; for numbers of funding grants see acknowledgements).

### Experimental groups and anesthesia

Sixteen rats were randomly assigned in two experimental groups. Pentobarbital (20 mg/kg i.p.; Sigma, Czech Republic) was used for anesthesia in the first group ("PB"; N=8), a mixture of ketamine and xylazine (ketamine 80 mg/kg+xylazine 7 mg/kg i.p.; Sigma, Czech Republic) in the latter ("KX"; N=8). For comparison of background fluorescence signals, a sham-handled control group was created (N=4). Depth of anesthesia was tested at regular 5 min intervals by pressing the skin of the animal's hind-limb sole with anatomical tweezers. In case of hind-limb flexion, additional intraperitoneal bolus of half the calculated dose of ketamine was given to ensure surgical anesthesia. Usually, one additional dose of anaesthetic was needed prior to fixation of the animal in the stereotactic frame (approx. 20 minutes after the induction of anesthesia). Throughout the experiment, the animals did not show signs of respiratory distress, or other deficits in vital signs.

### Surgery and photothrombosis

Photothrombosis was performed as previously described (15). After the induction of anesthesia, the scalp of the head was incised (2 cm length in midline) and the skull overlaying the left sensorimotor cortex was cleaned from soft tissues. A bolus of photosensitive dye Rose Bengal ("RB"-Sigma, Czech Republic; 20 mg/2 ml/kg, dissolved in 0.9% NaCl) was applied slowly into the systemic circulation *via* tail vein, followed by a bolus of Evans Blue ("EB"-Sigma, Czech Republic; 0.04 g/kg/2 ml; dissolved in 0.9% NaCl). After the application of dyes, the animals were positioned in a stereotactic frame. Next, three stereotactically defined adjacent points on the skull overlaying the hind-limb area of the left sensorimotor cortex were irradiated by a diode laser beam (532 nm; power density 50 mW/mm<sup>2</sup>; illuminated area <1 mm<sup>2</sup>). Each point was irradiated for 6 min (overall 18 min). After the end of photothrombosis, the animals were left to recover for 24 hours. In contrast to other tracers (*e.g.* natrium fluorescein), EB is almost completely bound to serum albumin. Thus, EB extravasation is a marker of albumin transport outside the blood vessels. We chose to apply EB prior to photothrombosis to mirror any change in BBB permeability within the first 24 hours of ischemia (from the onset of photothrombosis to brain perfusion and fixation).

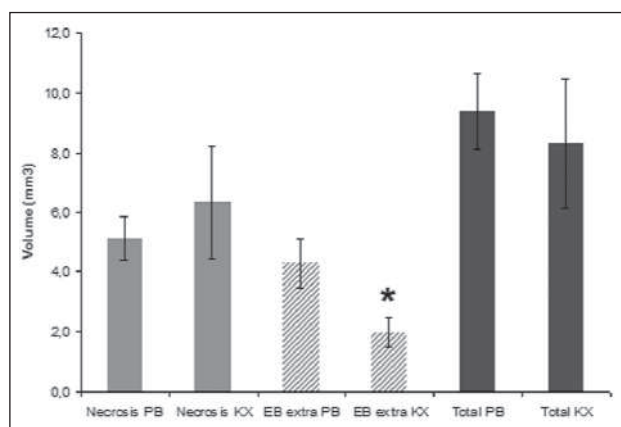


Fig. 1. Mean volumes of lesions in groups with different anesthesia. Values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Mean volume of necrosis is shown in light gray, mean volume of EB-extravasation in hatched gray and mean total lesion volume in dark gray. In the group anesthetized with pentobarbital (n=8), the area of BBB disruption was significantly larger compared to ketamine-xylazine (n=8) group ( $p=0.0293$ , two-sided unpaired t-test).

### Histology, image processing and evaluation

Twenty-four hours after photothrombosis, in deep urethane anesthesia, all animals were transcardially perfused with a solution of paraformaldehyde and decapitated. Brains were removed, fixated in paraformaldehyde and sectioned into 40  $\mu$ m coronary slices. Lesion dimensions and the distribution of red fluorescence signal emitted by EB-albumin complex in green light were then studied with a fluorescence microscope (Olympus<sup>TM</sup>). Digital microphotographs of all slices (both ipsilateral and contralateral cortex) were obtained at fixed image acquisition parameters (magnification, exposition, sensitivity, resolution, image format). Additional higher power microphotographs were acquired as needed. All digital photographs were then analyzed with a freely available utility ImageJ 1.37v (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

#### 1. Ischemic lesions and perifocal blood-brain barrier disruption

Area of necrosis was clearly delimited on each section (Fig. 3). With ImageJ tools, the area of necrosis was measured on each slice and multiplied by the thickness of the section – 40  $\mu$ m. The sum of values from individual slices gave the volume of necrosis (NV) in an individual animal. The volume of EB-albumin extravasation (volume of BBB disruption) was measured similarly. The area of EB-albumin extravasation was delineated manually on each slide. Its border was defined as the point where clear increase in fluorescence signal was not anymore observable (Fig 3A). Again, the sum of values from individual slices gave the volume of EB-albumin extravasation (EBEV) in an individual animal. All measurements (608 slices in the PB group, 546 slices in the KX group) were performed by a single investigator (DK) to avoid inter-rater variability.

#### 2. Remote blood-brain barrier disruption

BBB disruption in the contralateral hemisphere was evaluated by two methods. Firstly, all slices were visually examined for regions of increased fluorescence signal and for the occurrence of EB-positive cells (*i.e.* cells accumulating EB-

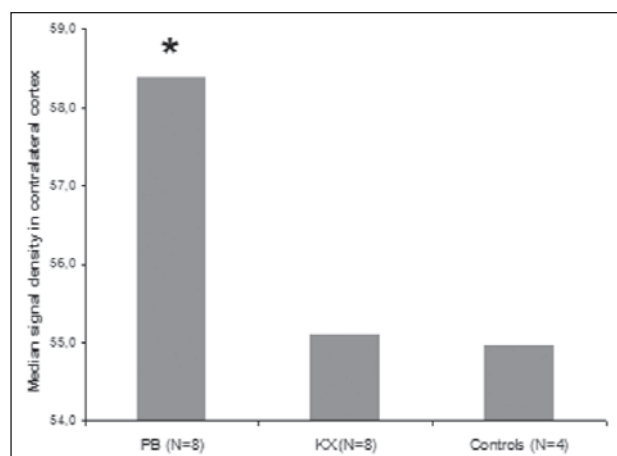
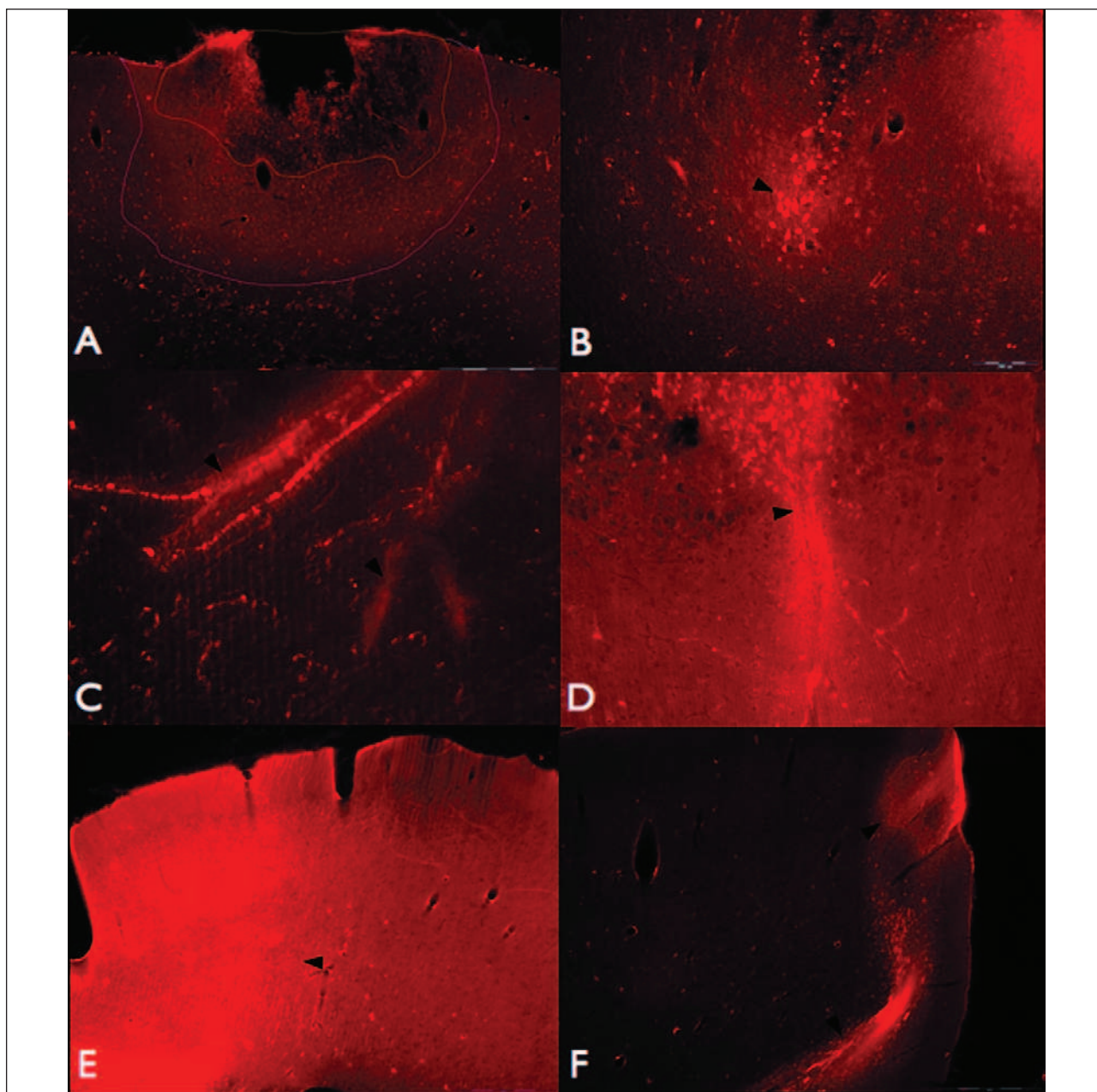


Fig. 2. Median EB-fluorescence signal density expressed as median gray value in a reference 1 $\times$ 2 mm section of the hemisphere contralateral to lesion. Median EB-fluorescence signal density was higher in PB group ( $p<0.0001$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison Test). Median EB-fluorescence signal density in KX group was not different from controls.





*Fig. 3.* Fluorescence microscopy images of the lesions. (A) Typical photochemically induced cortical ischemic lesion. Necrotic core can be seen with a surrounding brightly red area of extravasated EB-albumin. Lines denote the borders of necrotic core and the area of BBB disruption. The brightly red material (EB-albumin) in the cortical blood vessels can be seen in the lower half of the image. (B) A detailed view of the rim of necrosis and area of BBB failure. EB-albumin accumulating cells can be seen as bright red dots with a surrounding halo of EB-albumin extravasation (*black arrowheads*). (C) A larger blood vessel with EB-albumin adhering to its walls and escaping into the extracellular space (*black arrowheads*). (D) A detail view of the rim of the necrosis with EB-albumin accumulating cells and a blood vessel extending to the area of blood brain barrier alteration (*black arrowhead*). The extravasation of EB along the blood vessel walls is evident. (E) Low power image of the hemisphere contralateral to ischemic lesion (animal anesthetized with PB). A change in the background signal in the left half of the hemisphere (representing change in blood-brain-barrier permeability) can be noted (*black arrowhead*). (F) Signal changes in the medial part of the hemisphere contralateral to ischemic lesion (animal anesthetized with PB) (*black arrowheads*).

albumin complex). Secondly, we measured differences in background EB-fluorescence signal between the groups. In every sixth contralateral section, a virtual frame of  $1 \times 2$  mm was placed on the contralateral cerebral cortex. The frame was consistently positioned in a "mirror" region corresponding to the contralateral area of ischemic lesion. Mean gray value (mean signal density) was measured within this region by ImageJ tools

(mean gray value = the sum of the gray values of all the pixels in the selection divided by the number of pixels; in RGB images, each pixel was converted to gray-scale using the formula:  $\text{gray} = (\text{red} + \text{green} + \text{blue}) / 3$ ). Thus, we have obtained a set of mean gray values (mean signal densities) in all groups (PB, KX, controls). Differences between the groups were then statistically evaluated.

### Statistical evaluation

GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc.) was used for statistical evaluation of the results. Normal distribution of the results was tested by D'Agostino&Pearson omnibus normality test. Statistical significance of differences between PB and KX group with respect to volume of necrosis and volume of EB-albumin extravasation were evaluated by unpaired t-test. Mean signal density values in the contralateral hemisphere were not normally distributed. Therefore, non-parametrical tests (Kruskal-Wallis test, and Mann-Whitney U test) were used to evaluate differences in this parameter among the groups.

## RESULTS

Ischemic lesions with central area of necrosis were observed in all animals of both experimental groups 24 hours after photothrombosis (Fig. 3A). As a rule, a large area of EB-albumin extravasation surrounded the lesions, extending sometimes to the corpus callosum and subcortical structures. In some slices, brightly red EB-albumin accumulating cells were observed (Fig. 3B-arrowhead). Clusters of these cells were usually found at the border of the necrotic core and the area of BBB breakdown (Fig. 3B, 3D). EB-stained material was found in the blood vessels both in the ipsilateral and contralateral hemisphere and in subcortical structures (see Fig. 3C, 3D-arrowhead). Pial blood vessels, as well as perforating blood vessels perpendicular to the pial surface were sometimes found to be lined with EB-albumin complex. In larger vessels, EB-albumin complex was found adhering to the vessel wall and escaping into the extracellular space (Fig. 3C, 3D-arrowhead).

Total volume of lesion (TLV; *i.e.* volume of necrosis + volume of EB-albumin extravasation) did not significantly differ between the groups (TLV<sub>PB</sub>=9.4±1.3 mm<sup>3</sup> vs. TLV<sub>KX</sub>=8.3±2.1 mm<sup>3</sup>). The volume of necrosis (NV) was slightly larger in the ketamine-xylazine group (NV<sub>PB</sub>=5.1±0.7 mm<sup>3</sup> vs. NV<sub>KX</sub>=6.3±1.9 mm<sup>3</sup>), however, the difference was not statistically significant. On the other hand, the volume of EB-albumin extravasation (EBEV) was significantly smaller in the KX group (EBEV<sub>PB</sub>=4.3±0.8 mm<sup>3</sup> vs. EBEV<sub>KX</sub>=2.0±0.5 mm<sup>3</sup>; *p*=0.0293, two-sided unpaired t-test) (see Fig. 1).

Median EB-fluorescence signal density in the hemisphere contralateral to ischemic lesion was significantly increased in PB group (*p*<0.0001, Mann-Whitney U test). Median EB-fluorescence signal density in the K/X group was similar to the control group (Fig. 2). Moreover, in two animals from the pentobarbital group, diffuse changes in EB-fluorescence signal intensity were found in remote areas in the contralateral hemisphere (Fig. 3E, 3F-arrowheads). Unequivocal EB-albumin accumulating cells were not found in the contralateral cortex.

## DISCUSSION

The extent and anatomical pattern of BBB disruption differs among experimental models of focal ischemia. Breakdown of BBB to proteins is invariably present in transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) (16-18), whereas it is not a typical feature of permanent occlusion model (p-MCAO) (6). Extensive perifocal vascular leakage is an important feature of photothrombosis (8), and it was shown to persist at least 24 hours after laser irradiation (19). In agreement with these findings, we have consistently observed areas of increased EB-albumin fluorescence surrounding necrotic core of ischemic lesions in the irradiated area. Areas of increased EB-fluorescence extended into the cerebral white matter and corpus

callosum. Within these regions, we observed adherence of EB-positive material to the walls of larger penetrating vessels and its leakage into the extracellular space (Fig. 3A-3D). Apart from diffuse staining of the parenchyma surrounding the lesion core, we have observed uptake of EB-albumin complex into cells (Fig. 3B, 3D-arrowheads). Plasma protein uptake into brain cells was described in various models of focal brain ischemia, as well as other insults (20-25) and may play an important role in epileptogenesis (2-4). Interestingly, animals subject to photothrombosis (where large BBB breakdown is typical) frequently develop seizures (26-27).

Our study demonstrates that the extent of BBB disruption in the photothrombotic model can be significantly reduced when a combination of NMDA antagonist ketamine and  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonist xylazine is used for anesthesia, in contrast to GABA<sub>A</sub> agonist pentobarbital. Similar results were observed when selective NMDA antagonist MK-801 was used in the t-MCAO model (28). We have found no direct evidence in the literature for xylazine-mediated alteration of blood-brain barrier permeability, although, in one study, a decrease of ethanol-induced BBB opening was observed following pretreatment with another  $\alpha$ 2-adrenoceptor agonist clonidine (29). On the other hand, the evidence for NMDA receptor mediated changes to BBB permeability is quite extensive (apart from other important pathophysiological roles of NMDA receptors, *e.g.* in excitotoxicity (30), memory consolidation, and mood disorders (31). NMDA stimulated uptake of HRP on isolated rat cerebral capillaries (32), NMDA antagonist Hu-211 protects against BBB disruption in photothrombosis (33), intrastriatal injection of NMDA induced extravasation of Lucifer yellow and this extravasation was prevented by NMDA antagonist (34) and NMDA applied topically on the cortex increased BBB permeability (35). Nevertheless, it must be noted, that in some models, this effect of NMDA receptor blockade on BBB permeability was not reproduced (36).

Although we cannot rule out the role of xylazine in producing the observed effects, we suggest that the presented evidence favors the main role of ketamine in the observed results. The mechanism of NMDA-receptor mediated regulation of BBB permeability remains to be elucidated. Other investigators observed glutamate-induced changes in expression, phosphorylation and distribution of tight-junction proteins, such as occludin (37). Increased transcellular transport of EB-albumin complex in a receptor mediated fashion is also possible (4).

Apart from evaluating perilesional changes in BBB integrity, we also tested whether focal ischemic lesion can induce BBB alteration in remote (but functionally connected) areas (diaschisis). The median background EB-fluorescence signal density was significantly increased in the pentobarbital group (Fig. 2), compared to KX and controls. Furthermore, in two animals from the PB group, we have found regional increase in EB-fluorescence signal density in the medial part of the contralateral hemisphere (Fig. 3E, 3F-arrowheads). Also, in our preliminary experiments in animals anesthetized with PB, we have observed occasional cellular uptake of EB-albumin in the cerebellum. Although limited, these findings may support the possibility that the concept of diaschisis is also relevant to the regulation of permeability of blood-brain barrier and that alteration of neurotransmission may be involved.

The main limitation of our study is the absence of blood pressure monitoring throughout the experiment. However, with the intraperitoneal route of administration, the risk of hypotension is probably lower than with *i.v.* application. Moreover, episodes of hypotension would probably tend to influence the results in favor of pentobarbital as in the work by Chi *et al.* (38), which was not the case in our study.

In summary, our study shows that anesthesia with NMDA receptor antagonist ketamine decreases the extent of BBB breakdown in cortical photothrombosis. Furthermore, our results indicate that alteration of blood-brain barrier at sites contralateral to photochemically induced ischemic lesion is possible and that it may also be related to the choice of anesthesia. Further studies are needed to broaden these potentially clinically relevant observations.

*Acknowledgements:* The work was supported by following grants: Charles Univesity Pregue, research project UNCE204010; Charles Univesity Pregue, 264706/SVV/2012; Ministry of Education, Youth and Sports CMS 110/2012.

Conflict of interests: None declared.

#### REFERENCES

- Cornford EM, Oldendorf WH. Epilepsy and the blood-brain barrier. *Adv Neurol* 1986; 44: 787-812.
- Seiffert E, Dreier JP, Ivens S, *et al.* Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2004; 24: 7829-7836.
- Bolwig TG. Blood-brain barrier studies with special reference to epileptic seizures. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1988; 345: 15-20.
- Ivens S, Kaufner D, Flores LP, *et al.* TGF-beta receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain* 2007; 130: 535-547.
- Hossmann KA, Olsson Y. The effect of transient cerebral ischemia on the vascular permeability to protein tracers. *Acta Neuropathol* 1971; 18: 103-112.
- Olsson Y, Crowell RM, Klatzo I. The blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Neuropathol* 1971; 18: 89-102.
- Coyle P. Middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Stroke* 1982; 13: 855-859.
- Dietrich WD, Busto R, Watson BD, Scheinberg P, Ginsberg MD. Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol* 1987; 72: 326-334.
- Hughes PM, Anthony DC, Ruddin M, *et al.* Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 1276-1286.
- Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I. The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol* 1985; 68: 122-129.
- Hossmann KA, Schuier FJ. Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke* 1980; 11: 583-592.
- Kataoka K, Hayakawa T, Yamada K, Mushiroy T, Kuroda R, Mogami H. Neuronal network disturbance after focal ischemia in rats. *Stroke* 1989; 20: 1226-1235.
- Izumi Y, Haida M, Hata T, Isozumi K, Kurita D, Shinohara Y. Distribution of brain oedema in the contralateral hemisphere after cerebral infarction: repeated MRI measurement in the rat. *J Clin Neurosci* 2002; 9: 289-293.
- Buchkremer-Ratzmann I, August M, Hagemann G, Witte OW. Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke* 1996; 27: 1105-1109, discussion 1109-1111.
- Matejovska I, Bernaskova K, Krysl D, Mares J. Influence of melatonin pretreatment and preconditioning by hypobaric hypoxia on the development of cortical photothrombotic ischemic lesion. *Physiol Res* 2008; 57: 283-288.
- Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1994; 25: 1658-1664, discussion 1664-1665.
- Huang ZG, Xue D, Preston E, Karbalai H, Buchan AM. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci* 1999; 26: 298-304.
- Nagaraja TN, Keenan KA, Fenstermacher JD, Knight RA. Acute leakage patterns of fluorescent plasma flow markers after transient focal cerebral ischemia suggest large openings in blood-brain barrier. *Microcirculation* 2008; 15: 1-14.
- Hoff EI, oude Egbrink MG, Heijnen VV, Steinbusch HW, van Oostenbrugge RJ. In vivo visualization of vascular leakage in photochemically induced cortical infarction. *J Neurosci Methods* 2005; 141: 135-141.
- Loberg EM, Karlsson BR, Torvik A. Neuronal uptake of plasma proteins after transient cerebral ischemia/hypoxia. Immunohistochemical studies on experimental animals and human brains. *APMIS* 1993; 101: 777-783.
- Loberg EM, Torvik A. Neuronal uptake of plasma proteins in brain contusions. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 1992; 84: 234-237.
- Remmers M, Schmidt-Kastner R, Belayev L, Lin B, Busto R, Ginsberg MD. Protein extravasation and cellular uptake after high-dose human-albumin treatment of transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1999; 827: 237-242.
- Sokrab TE, Kalimo H, Johansson BB. Parenchymal changes related to plasma protein extravasation in experimental seizures. *Epilepsia* 1990; 31: 1-8.
- Matz PG, Lewen A, Chan PH. Neuronal, but not microglial, accumulation of extravasated serum proteins after intracerebral hemolysate exposure is accompanied by cytochrome c release and DNA fragmentation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 921-928.
- Murakami K, Kawase M, Kondo T, Chan PH. Cellular accumulation of extravasated serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. *J Neurotrauma* 1998; 15: 825-835.
- Kelly KM, Kharlamov A, Hentosz TM, *et al.* Photothrombotic brain infarction results in seizure activity in aging Fischer 344 and Sprague Dawley rats. *Epilepsy Res* 2001; 47: 189-203.
- Kharlamov EA, Jukkola PI, Schmitt KL, Kelly KM. Electrobehavioral characteristics of epileptic rats following photothrombotic brain infarction. *Epilepsy Res* 2003; 56: 185-203.
- Yang G, Chan PH, Chen SF, Babuna OA, Simon RP, Weinstein PR. Reduction of vasogenic edema and infarction by MK-801 in rats after temporary focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1994; 34: 339-345, discussion 345.
- Borisenko SA. Effects of drugs on blood-brain barrier permeability in rats chronically intoxicated by ethanol. *Ann Ist Super Sanita* 1990; 26: 39-42.
- Wyrembek P, Szczuraszek K, Majewska MD, Mozrzymas JW. Intermingled modulatory and neurotoxic effects of thimerosal and mercuric ions on electrophysiological responses to GABA and NMDA in hippocampal neurons. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 753-758.
- Lehner M, Wislowska-Stanek A, Skorzewska A, *et al.* Expression of N-methyl-D-aspartate (R)(GluN2B) - subunits in the brain structures of rats selected for low and high anxiety. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62: 473-482.
- Koenig H, Trout JJ, Goldstone AD, Lu CY. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown. *Brain Res* 1992; 588: 297-303.

33. Belayev L, Busto R, Watson BD, Ginsberg MD. Post-ischemic administration of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, protects against blood-brain barrier disruption in photochemical cortical infarction in rats: a quantitative study. *Brain Res* 1995; 702: 266-270.
34. Miller RD, Monsul NT, Vender JR, Lehmann JC. NMDA- and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow. *J Neurol Sci* 1996; 136: 37-40.
35. Chi OZ, Chang Q, Weiss HR. Effects of topical N-methyl-D-aspartate on blood-brain barrier permeability in the cerebral cortex of normotensive and hypertensive rats. *Neurol Res* 1997; 19: 539-544.
36. Preston E, Webster J, Palmer GC. Lack of evidence for direct involvement of NMDA receptors or polyamines in blood-brain barrier injury after cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1998; 813: 191-194.
37. Andras IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1431-1443.
38. Chi OZ, Chun TW, Liu X, Weiss HR. The effects of pentobarbital on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. *Anesth Analg* 1998; 86: 1230-1235.

Received: October 16, 2011

Accepted: March 28, 2012

Author's address: Dr. David Krysl, Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, 4 Ke Karlovu Street, 120 00 - Prague 2, Czech Republic; Phone: +420 224 923 241; E-mail: dkrysl@gmail.com