

STUDIJNÍ PROGRAM: FYZIOLOGIE ŽIVOČICHŮ

STUDIJNÍ OBOR: NEUROBIOLOGIE

UNIVERZITA KARLOVA

Bc. Daria Morozova

EEG koreláty a změny aktivity vápníků v modelu perinatální fokální ischemie

EEG correlates and Ca releasing changes in perinatal focal ischemia model

Diplomová práce

Vedoucí práce: **Mgr. Grygoriy Tsenov, Ph.D.**

Praha 2025

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracovala samostatně a použila výhradně uvedené citované prameny, literaturu a další odborné zdroje. Na získání a vyhodnocení určitých výsledků práce se podíleli RNDr. Viera Kútina, Ph.D., Mgr. Alessandro Negri a Mgr. Grygoriy Tsenov, Ph.D.

Současně dávám svolení k tomu, aby má závěrečná práce byla používána ke studijním účelům.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému Theses.cz a Turnitin za účelem soustavné kontroly podobnosti závěrečných prací.

V Praze, 29.4.2025

Poděkování

Ráda bych vyjádřila své upřímné poděkování vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Grygoriyovi Tsenovovi, Ph.D., za jeho neocenitelnou podporu ve všech fázích tohoto projektu a za veškeré znalosti, které jsem díky jeho vedení mohla získat.

Dále děkuji celému skupině experimentální neurobiologie NUDZ za technickou i osobní podporu, která mi byla během práce poskytována.

V neposlední řadě patří mé velké poděkování mé rodině a zejména Bc. Alinu-Alexandrovi Balovi, který poskytl zvláštní technickou a morální podporu po celou dobu studia a přípravy této diplomové práce.

Abstrakt

Cerebrovaskulární onemocnění u dětí, zejména perinatální fokální ischemie, představuje vážný a dosud nedostatečně prozkoumaný medicínský problém. I přesto, že ischemické příhody u novorozenců nejsou vzácné, jejich diagnostika zůstává komplikovaná a podhodnocená, což vede k opožděné nebo nedostatečné terapii. Včasná detekce fokální ischemie by mohla přispět ke zlepšení klinické péče a dlouhodobé prognózy postižených dětí.

Tato práce se zaměřuje na identifikaci elektrofyziologických korelátů v animálním modelu perinatální fokální ischemie. Cílem je nalézt specifické elektrofyziologické biomarkery, které odrazí průběh ischemického poškození a mohly být využity k rychlejší diagnostice v klinické praxi. EEG analýza přináší cenné informace o dynamice mozkové aktivity během ischemické epizody a je v klinické praxi neinvazivní, zatímco studium vápníkových signálů pomáhá objasnit patofyziologické mechanismy této poruchy zejména v oblasti penumbry.

Závěry studie by mohly pomoci nejen k lepšímu pochopení patogeneze perinatální fokální ischemie, ale také otevřít cestu k novým diagnostickým možnostem. Důraz je kladen na včasnou identifikaci nejranějších příznaků ischemického poškození, což by mohlo pomoci zlepšit výsledky léčby a snížit dlouhodobé dopady na vývoj CNS u dětí. Výzkum tohoto typu je zásadní, jelikož prevalence cerebrální ischemie u dětí se v posledních letech zvyšuje a její diagnostika vyžaduje inovativní přístupy pro lepší zdravotní prognózy.

Tato diplomová práce se skládá:

Z teoretické části, která zahrnuje úvod do problematiky cerebrální ischemie a shrnuje aktuální stav poznání v oblasti perinatální fokální ischemie. Dále jsou popsány různé experimentální modely ischemie, jejich využití k objasnění patofyziologických mechanismů a možnosti sledování ischemického poškození. V neposlední řadě se teoretická část věnuje také využití elektrofyziologických metod, zejména EEG, k monitorování průběhu a důsledků ischemického infarktu

Z experimentální části, která popisuje použitý animální model perinatální fokální ischemie indukovaný endothelinem-1 (ET-1). Věkové skupiny, a aplikované metodiky. Dále je popsán postup

analýzy výkonové spektrální hustoty (PSD), frekvenčních pásem a výpočtu poměrových ukazatelů (např. delta/theta, gama/theta). Podstatnou část tvoří výsledky experimentů, kde jsou přehledně shrnuty hlavní výstupy EEG záznamů, včetně výskytu záchvatové aktivity, změn v jednotlivých frekvenčních pásmech a analýzy EEG poměrů. Výsledky jsou prezentovány formou grafů, tabulek a schémat.

Z poslední části (diskuze), která interpretuje získané výsledky v kontextu předchozích studií, hodnotí význam pozorovaných změn z hlediska epileptogeneze a možného klinického využití EEG biomarkerů u pacientů s perinatálním ischemickým infarktem.

V závěru práce shrnujeme klíčová zjištění, hodnotíme jejich potenciální využití v praxi a navrhuje směry dalšího výzkumu v oblasti EEG sledování po perinatální mozkové ischemii.

Abstract

Cerebrovascular diseases in children, particularly perinatal focal ischemia, represent a serious and still insufficiently explored medical issue. Although ischemic events in newborns are not uncommon, their diagnosis remains challenging and often underestimated, leading to delayed or inadequate treatment. Early detection of focal ischemia could contribute to improved clinical care and long-term outcomes for affected children.

This thesis focuses on the identification of electrophysiological correlates in an animal model of perinatal focal ischemia. The goal is to find specific electrophysiological biomarkers that reflect the course of ischemic damage and could be utilized for faster diagnosis in clinical practice. EEG analysis provides valuable insights into the dynamics of brain activity during ischemic episodes and is non-invasive in clinical settings, while calcium signal monitoring helps clarify the pathophysiological mechanisms of this disorder, particularly in the penumbra region.

The conclusions of this study may contribute not only to a better understanding of the pathogenesis of perinatal focal ischemia but also open the door to new diagnostic approaches. Emphasis is placed on the early identification of the first signs of ischemic injury, which could help improve treatment outcomes and reduce the long-term impact on CNS development in children. Research of this kind is essential, as the prevalence of cerebral ischemia in children has been increasing in recent years, and its diagnosis requires innovative approaches to improve health prognoses.

Obsah

1 TEORTICKÁ ČÁST	1
1.1 Definice a druhy ischemie	1
1.1.1 Globální cerebrální ischemie	2
1.1.2 Fokální cerebrální ischemie	2
1.2 Epidemiologie ischemie	3
1.3 Perinatální cerebrální ischemie	4
1.4 Etiologie perinatální ischemie	5
1.5 Patofyziologie mozkové ischemie	8
1.6 Model mozkové ischemie	12
1.6.1 Modely úplné globální ischemie	13
1.6.2 Modely fokální ischemie	14
1.6.3 Multifokální modely ischemie	15
1.7 Endothelin a endotelinové receptory	18
1.8 Endotelinový model cerebrální ischemie	20
1.9 EEG v ischemiei	21
1.10 Optická fotometrie	26
Cíle práce a hypotézy	30
2 PRAKTICKÁ ČÁST	31
2.1 Metodika	31

2.1.1 Experimentální zvířata	31
2.1.2 Chemické látky	31
2.1.3 Injekce Endotelinu-1	31
2.1.4 Registrace a vyhodnocení EEG	32
2.1.5 Metoda sledování změn Ca²⁺ aktivity pomocí optické fotometrie	34
2.1.5.1 Injekce virálního vektoru	34
2.1.5.2 Metoda sledování změn koncentrace Ca²⁺	34
2.1.6 Histologie	36
2.1.7 Metody analýzy výsledků	37
2.1.7.1. Analýza EEG	37
2.1.7.2 Statistická analýza	38
2.2 Výsledky	39
2.3 Diskuze	66
Závěr	74
Summary	75
Seznam použité literatury	77

Seznam použitých zkratk

EEG – Elektroencefalografie

MRI – Magnetická rezonance (Magnetická rezonance, někdy MR)

OPC – Oligodendrocytová progenitorová buňka (Oligodendrocyte Precursor Cell)

HIE – Hypoxicko-ischemická encefalopatie

VO – Vegetativní obtíže

ATP – Adenosintrifosfát

NMDA – N-methyl-D-aspartát (nebo N-methyl-D-aspartátový receptor)

ROS – Reaktivní formy kyslíku (Reaktivní kyslíkové druhy)

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

FADD – Fas-asociovaný protein s doménou smrti

DISC – Komplex indukovaný smrtícím signálem (Death-inducing signaling complex)

EKG – Elektrokardiografie

CNS – Centrální nervový systém

DIC – Diseminovaná intravaskulární koagulace

ETE – Exon-terminalní element

EPP – Konečný ploténkový potenciál (End-plate potential, nervosvalová ploténka)

ETA – Endotelinový receptor typu A

ETB – Endotelinový receptor typu B

ETE – Exon-terminální element

AT2 – Angiotenzinový receptor typu 2

PDA – Perzistující ductus arteriosus

PSD -- Power Spectral Density

1 TEORTICKÁ ČÁST

1.1 Definice a druhy ischemie

Cerebrální ischemie představuje kritický stav v neurofyziologii, který je charakterizován nedostatečným prokrvením mozkové tkáně, což vede k buněčné dysfunkci a potenciálně nevratnému poškození. V odborné literatuře je ischemie definována jako stav nedostatku kyslíku a živin v důsledku zhoršeného průtoku krve, často v důsledku arteriální okluze nebo zúžení (Michael Marnane 2010).

Cerebrální ischemii lze obecně rozdělit na dva hlavní typy: globální ischemii a fokální ischemii. Globální ischemie zahrnuje systémové snížení průtoku krve mozkiem, které postihuje velké oblasti mozku. K tomu může dojít při srdeční zástavě nebo těžké hypotenzi, což vede k rozsáhlému poškození neuronů a neurologickému deficitu (Gusev E. I. 2012).

Naproti tomu fokální ischemie se týká lokalizovaných oblastí s nedostatečným krevním zásobením (Gusev E. I. 2012). Mezi její příčiny patří trombotický nebo embolický uzávěr mozkových tepen, prasknutí aterosklerotického plátu vedoucí ke stenóze cévy nebo cévní spasmus (Martin 1997). Fokální ischemie je hlavní příčinou ischemické cévní mozkové příhody, která představuje většinu případů cévní mozkové příhody na celém světě. Fokální ischemie může mít za následek specifické neurologické deficity odpovídající postižené oblasti mozku, jako je motorická slabost, ztráta citlivosti nebo porucha řeči (Gusev E. I. 2012).

U fokální ischemie objasňuje koncept ischemického jádra a penumbry heterogenní povahu poškození tkáně. Ischemické jádro představuje nevratně poškozenou tkáň s vážně narušeným průtokem krve a metabolickým selháním. Naproti tomu ischemická penumbra zahrnuje oblast obklopující jádro, charakterizovanou mírným snížením perfuze a zachovanou životaschopností neuronů. Penumbra je považována za zachránitelnou tkáň, kde včasný zásah může zabránit infarktu a usnadnit funkční zotavení (Gusev E. I. 2012.)

Průtok krve mozkiem je klíčový fyziologický parametr, který udává perfuzi krve v mozku. U ischemických stavů, ať už fokálních, nebo globálních, může být průtok krve mozkiem výrazně

změněn (Trogyin V. D. 2006). Níže jsou uvedeny některé obecné číselné ukazatele průtoku krve mozkem při fokální a globální ischemii:

1.1.1 Globální cerebrální ischemie

- Při těžké globální ischemii, například při srdeční zástavě: průtok krve mozkem může zpočátku klesnout téměř na nulu v důsledku zástavy srdeční funkce a následné systémové hypoperfuze.
- Po resuscitaci: průtok krve mozkem se může postupně zvyšovat, ale může zůstat výrazně nižší než normální hodnoty, v závislosti na délce trvání a závažnosti ischemického infarktu.

1.1.2 Fokální cerebrální ischemie

- V ischemickém jádru: průtok krve mozkem může klesnout pod 20 % normální hodnoty. V této oblasti dochází k závažné hypoperfuzi, která vede k nevratnému poškození tkáně.
- V ischemické penumbře: průtok krve mozkem se může pohybovat v rozmezí 20–40 % normální hodnoty. Tato oblast představuje zachránitelnou tkáň s mírným snížením perfuze a zachovanou životaschopností neuronů.

Hlavní rozdíly mezi typy ischemie jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tab. 1 Souhrn znázorňující rozdíly mezi fokální a globální ischemií s charakteristickými znaky. Převzato a shrnuto z Traystman 2003.

Mozková ischemie			
Globální		Fokální	
Úplná	Neúplná	Multifokální	Proximální MCAO
Srdeční zástava	Krvácení	Embolie	MCAO + Karotidní
Aortální okluze krční manžety	Intrakraniální hypertenze		Fotochemická trombóza
Okluze hlavové tepny	2 VO 4 VO Trvalá reperfuze		Intraluminální vlákno Trvalá reperfuze

1.2 Epidemiologie ischemie

Za posledních třicet let došlo v 80 % rozvojových zemí k významné změně v povaze nemocí, přičemž infekční choroby ustupují neinfekčním, z nichž nejčastějším závažným onemocněním patří cévní mozková příhoda. Cévní mozková příhoda je druhou nejčastější příčinou úmrtí a třetí nejčastější příčinou let života prožitých s postižením. Ischemická cévní mozková příhoda tvoří 70 % všech případů tohoto onemocnění a nese s sebou vysoké riziko dlouhodobého opakování (Jiahui Fan 2023). V roce 2019 bylo zaznamenáno 3,29 milionu úmrtí spojených s ischemií, což představuje 50,3 % všech úmrtí na cévní mozkovou příhodu a 17,7 % všech úmrtí souvisejících s kardiovaskulárními chorobami, což podtrhuje důležitost prevence IS (Jiahui Fan 2023).

Situace v České republice je obdobná té ve světě. Z celkového počtu 41 690 osob postižených cévní mozkovou příhodou bylo hlášeno 11 567 případů ischemické cévní mozkové příhody (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR). Tyto údaje ilustrují závažnost problému a zdůrazňují potřebu zaměřit se na prevenci a léčbu ischemické cévní mozkové příhody i na národní úrovni.

U dětí je výskyt ischemické cévní mozkové příhody znepokojivě vysoký, což je podobně alarmující jako u dospělých. Úmrtnost se obecně pohybuje kolem 0,6 případu na 100 000 dětí (Pokrovsky A. V. 2005). Více než 5 % všech případů mozkové ischemie končí smrtelným následkem, což poukazuje na závažnost tohoto onemocnění (Carvalho K. S. 2002).

1.3 Perinatální cerebrální ischemie

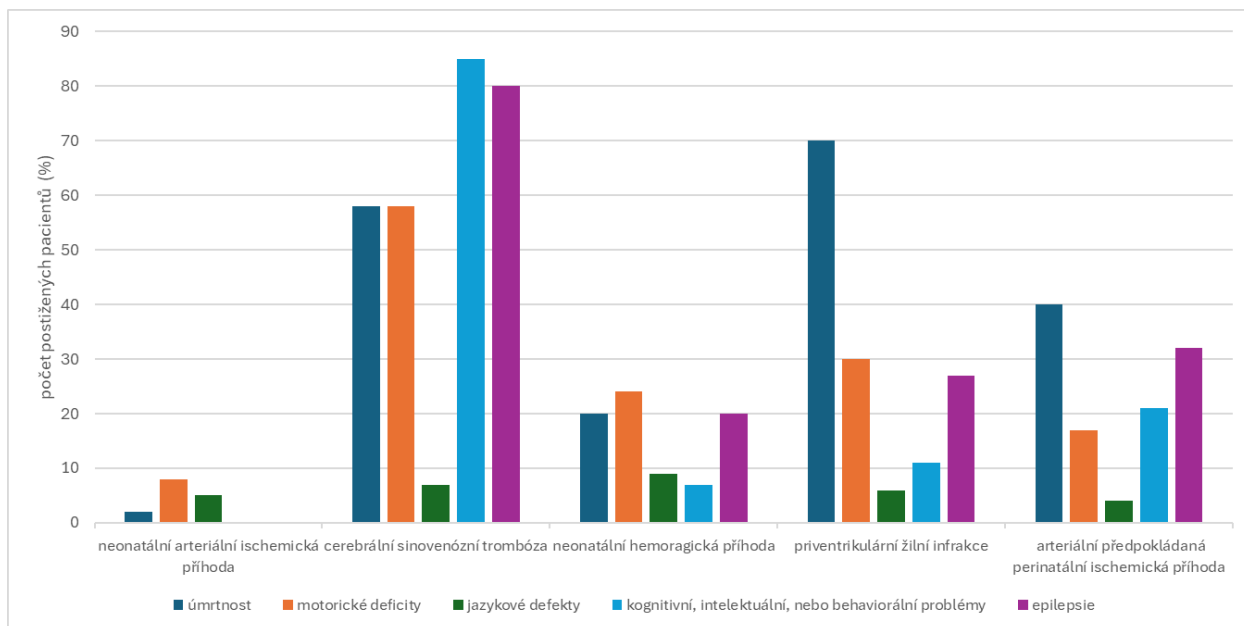
Perinatální ischemická mozková příhoda je běžná a způsobuje značnou nemocnost a vážné dlouhodobé neurologické a kognitivní deficity, včetně dětské mozkové obrny, epilepsie, neurovývojových postižení, behaviorálních poruch a poruch zraku a řeči (Nelson KB., 2007). Více než polovina všech dětí s dětskou mozkovou obrnou se narodí v termínu a v mnoha případech je příčinou nějaká forma cerebrovaskulárního poškození (Lee J. 2005). Studium patologických změn v dětském mozku spojených s ischemickými procesy nabývá na významu zejména v kontextu rostoucího výskytu sekundárního mozkového zánětu u dětí v důsledku multifaktoriálního zánětlivého procesu souvisejícího s onemocněním COVID-19 (Schupper, Alexander J., Kurt A. Yaeger, and Peter F. Morgenstern, 2020). Výzkumy prokazují přítomnost neurologických komplikací u pacientů s diagnózou multisystémového zánětlivého syndromu u dětí (MIS-C). Například studie Schuppera et al. analyzuje dopady MIS-C na centrální nervový systém a poukazuje na možnou souvislost tohoto syndromu s výskytem encefalopatie, cévních mozkových příhod a dalších zánětlivých reakcí v mozkové tkáni. Díky dostupnosti a bezpečnému použití magnetické rezonance (MRI) u novorozenců, starších kojenců a dětí v posledních dvou desetiletích se hodně zjistilo o tom, jak se fenotyp ischemie liší v těchto věkových skupinách ve srovnání s dospělými, stejně jako o základních příčinách a patofyziologii (Kirton A., 2011). U předčasně narozených novorozenců se poškození mozku spojené s hypoxií–ischemií obecně shoduje s obdobím vysoké náchylnosti progenitorů oligodendrocytů (OPC) k excitotoxicitě, oxidačnímu stresu a zánětu (Back SA 2002), což nepříznivě ovlivňuje diferenciaci OPC na zralé, myelinizující

oligodendrocyty. Zastavení diferenciacie OPC pak predisponuje mozek k defektnímu vývoji bílé hmoty, včetně poškození periventrikulární bílé hmoty a dětské mozkové obrny (Volpe, 2009). Subplotní neurony, které existují přechodně během vývoje lidského fetálního mozku, se podílejí na tvorbě talamokortikálních projekcí vidění a jsou další populací buněk selektivně zranitelnou vůči H-I u předčasně narozených dětí, což vede k dlouhodobým deficitům. Několik přehledů se zabývalo jedinečnými rysy neurozánětu a poškození fetálního mozku u lidí a v odpovídajících modelech poškození (Buser JR 2012).

1.4 Etiologie perinatální ischemie

Perinatální ischemie je definována jako poškození vzniklé od 20. týdne těhotenství, včetně období *in utero*, do 28 dnů po porodu (Nelson, KB., 2007). Subkategorie perinatální ischemie zahrnují novorozeneckou arteriální ischemickou příhodu, novorozeneckou cerebrální sinovenózní ischemickou příhodou a předpokládanou perinatální příhodou.

Zvyšující se důkazy naznačují, že placenta hraje významnou roli v neonatálních neurologických poruchách. Abrupce placenty s následným snížením perfuze byla spojena s neonatální mozkovou příhodou a hypoxicko-ischemickou encefalopatií (HIE). Studie patologie placenty u novorozenců s perinatální arteriální ischemickou příhodou ukázala důkazy chronické špatné perfuze placenty s akutními změnami v době porodu (Elbers J. 2011). Navíc je s neonatální příhodou spojena i chorioamnionitida placenty, i když se u matky neprojevují žádné symptomy. Předchozí studie, ve kterých byly diagnostikovány děti s dětskou mozkovou obrnou, včetně hemiplegické mozkové obrny, později v životě a u kterých byla placenta dostupná pro patologické vyšetření, často ukazovaly vysoký výskyt chronických infarktů, vaskulární patologie, anomálií v úponu pupečníku nebo délce pupeční šňůry či cév (Kraus FT. 1997). Rozložení nejčastějších důsledků perinatální fokální ischemie je znázorněno na Obrázku č. 1, který je uveden níže.



Obr. 1 Důsledky perinatální cévní mozkové příhody podle typu cévní mozkové příhody (Dumbar et al. 2018).

Typy ischemie, jako je fokální, globální nebo multifokální, se liší ve svých neurofyzilogických projevech a klinických dopadech. Podrobný přehled těchto odlišností je uveden v Tabulce č. 2.

Tab. 2 Přehled typů mozkové ischemie (fokální, globální, multifokální) a jejich nejčastějších neurologických důsledků. Tabulka shrnuje charakteristické projevy jednotlivých typů ischemie a rozdílů v jejich klinickém „outcome“.

Cerebrální ischemie	Etiologie	Reperfuze (přechodná ischemie) nebo trvalá ischemie	Příklady

Globální (úplná nebo neúplná) = model zástavy oběhu nebo těžké hypotenze	Intravaskulární	Přechodná nebo trvalá	Zástava srdce s kardiopulmonální resuscitací nebo bez ní
	Extravaskulární	Přechodná nebo trvalá	Stlačení krční páteře krční manžetou; podvázání několika tepen zásobujících mozek
Fokální	Intravaskulární	Přechodná nebo trvalá	Model intraluminální nitkové okluze střední mozkové tepny
	Extravaskulární	přechodná nebo trvalá	Chirurgické modely okluze střední mozkové tepny pomocí ligace, klipování, elektrokauterizace atd.; endotelinem-1 indukovaná okluze střední mozkové tepny
Multifokální	Intravaskulární	Přechodná (u krevních sraženin možná spontánní)	Embolizační modely využívající krevní

		nebo trombolytická léčba) nebo trvalá	sraženiny, mikrosféry nebo jiný materiál
--	--	---------------------------------------	--

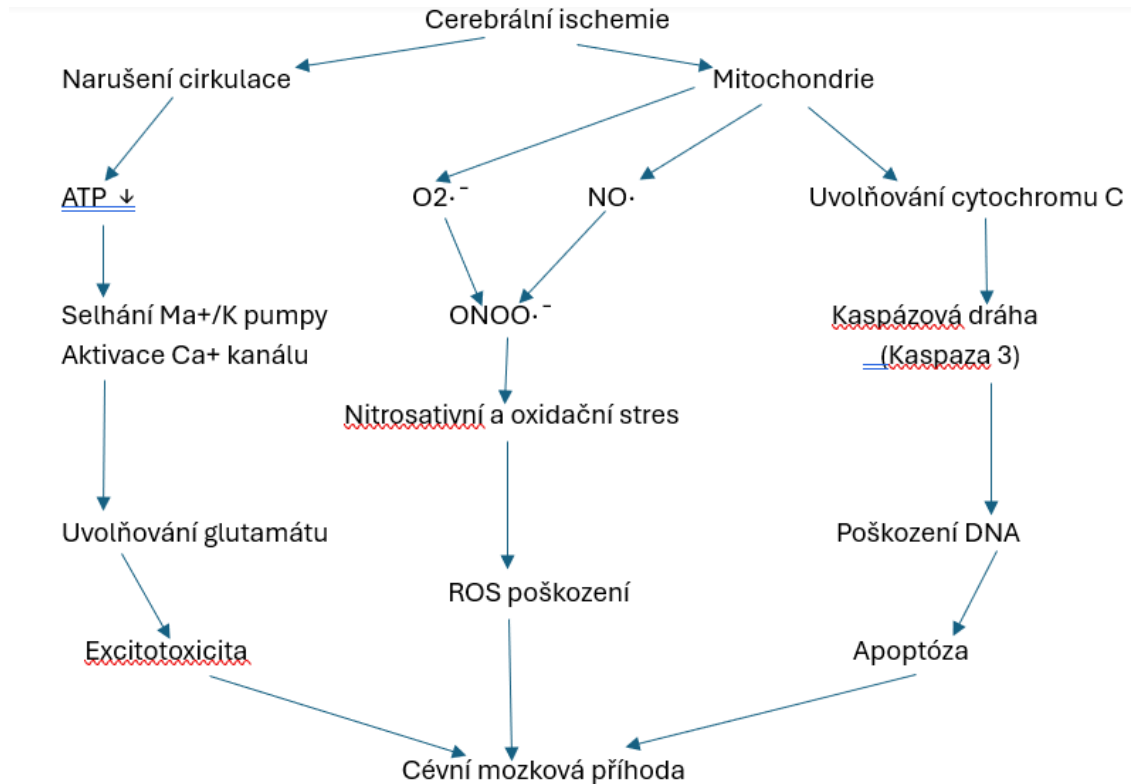
1.5 Patofyziologie mozkové ischemie

Při analýze dynamiky molekulárních a biochemických procesů probíhajících během ischemie byla zjištěna jejich jasná časová posloupnost: v prvních 3 h se zvyšuje energetický deficit v ischemické tkáni, v 3–6 h glutamátová excitotoxicita, porucha homeostázy vápníku a laktátová acidóza, které ustupují do konce prvního dne. Vzdálené následky ischemie se začínají projevovat za 2–3 h a nejvýraznější jsou za 12–36 h (oxidační stres a rozvoj autoimunitní zánětlivé reakce), stejně jako 2–3. den (apoptóza). Tato dynamika přetrvává dlouhou dobu (několik měsíců) a přispívá k progresi aterogeneze, autoimunitních procesů a difuzního neurodegenerativního poškození mozkové tkáně v období po mozkové příhodě (Gomazkov OA., 2003).

V současné době se předpokládá, že jednou z cest, které vedou k ireverzibilnímu poškození, je zvýšení intracelulárního vápníku (Lushnikov EF., 1987). Selhání transportu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ závislého na ATP a následné zvýšení extracelulárního K^+ způsobí depolarizaci neuronální membrány. Tato situace má za následek otevření napět'ově citlivých vápníkových kanálů a zvýšení intracelulárního volného vápníku (Ca^{2+}). Tento příliv vápníku je zesílen selháním ATP-dependentního $\text{Na}^+\text{-K}^+$ antiportního systému, selháním ATP-dependentní sekvestrace Ca^{2+} endoplazmatickým retikulem a elektroforetickou akumulací vápníku mitochondriemi, což rozpojí oxidativní fosforylaci (Leist M., 1998).

Dalším článkem v tomto řetězci procesů, který má výrazný škodlivý účinek, je glutamátová excitotoxicita, která je doprovázena uvolňováním velkého množství glutamátu. Glutamát hromadící se v extracelulárním prostoru způsobuje nadměrné vzrušení NMDA receptorů neuronů, což vede k jejich depolarizaci, zvýšení přílivu vápníku do buněk, aktivaci Ca^{2+} -závislých enzymů, tvorbě volných radikálů a oxidu dusnatého (NO), což nakonec způsobuje masivní poškození buněk a tvorbu volných radikálů (Lai TW., 2014). Tyto události vedou buď k nekróze, nebo k programované buněčné smrti v závislosti na intenzitě hypoxie a metabolickém stavu neuronů (Lipton P., 1999). Intracelulární signální cesty, které se aktivují při excitotoxicitě, mohou

také vyvolat expresi genů, které iniciují postischemický zánět, jenž zhoršuje ischemické poškození. Za účelem znázornění hlavních patologických mechanismů ischemie bylo sestaveno schéma uvedené na Obrázku č. 2.



Obr. 2 Schéma patologického procesu vznikajícího v důsledku mozkové ischemie a vedoucího k iktusu. Převzato a přepracováno z Traystman 2003.

Následně dochází k rozvoji oxidačního stresu, iniciovaného bioenergetickou nedostatečností buňky a rozvojem glutamátové excitotoxicity, se zvýšením tvorby volných radikálů a syntézy NO. Patofyziologicky má NO dva protichůdné účinky. Na jedné straně produkce NO endotelovými buňkami vede k dilataci cév, zlepšení průtoku krve a snížení hypoxického poškození, na druhé straně v neuronech NO přispívá k zhoršení glutamátové excitotoxicity a oxidačního poškození (Michael B., 2009).

Jednu z klíčových rolí v procesu rozvoje oxidačního stresu hrají poruchy mitochondrií, jejichž jednou z funkcí je tvorba reaktivních forem kyslíku, t.z. - ROS. (Boveris A., 1973). Při

ischemii jsou narušeny procesy využití ROS, které indukují oxidační procesy bílkovin a peroxidaci lipidů. Kromě toho jsou jedním z cílů ROS mitochondriální DNA, která je obzvláště náchylná k ROS-zprostředkovanému poškození v důsledku absence ochranných histonů, což vede k mitochondriální genomové nestabilitě a narušení funkce dýchání.

Výsledkem je tvorba defektních mitochondrií, narušení regulace transportu Ca^{2+} , snížení produkce energie, oxidační poškození a aktivace vnitřního programu buněčné smrti (Lipton P. 1999), což dále zhoršuje ischemické poškození. Mitochondrie tak hraje roli nejen v energetickém zabezpečení buňky, ale také určuje její další osud: je zodpovědná za smrt buňky, pokud není schopna pokračovat ve své životní činnosti.

Všechny výše popsané procesy tak či onak vedou k buněčné smrti prostřednictvím nekrózy, která je výrazně zastoupena v zóně ischemického jádra. V penumbře převažuje apoptotický mechanismus buněčné smrti, který představuje aktivní a kontrolovaný proces poškození buněk, doprovázený tvorbou nových bílkovin. Právě v této zóně není účinek ischemie dostatečně silný, aby způsobil nekrózu (Waters C., 1997), ale je dostatečný ke spuštění jiného programu, v němž bude „sebevražda“ buněk mít méně patologických následků (Gomazkov OA., 2003). Existuje také několik faktorů, které určují, který z procesů (nekróza nebo apoptóza) bude převažovat: stupeň a délka lokální ischemie, stupeň zralosti buněk, koncentrace intracelulárního volného Ca^{2+} , buněčné mikroprostředí (Leist M., 1998).

Procesu apoptózy se účastní několik enzymatických systémů, které se aktivují prostřednictvím složitého systému signálních drah. Centrální roli jak při iniciaci apoptózy, tak při realizaci jejích procesů hrají kaspázy a receptory indukující apoptózu. Jak je známo, kaspázy se syntetizují ve formě neaktivních proenzymů, k jejichž aktivaci je potřeba buď proteolytické zrání, nebo interakce s allosterickým aktivátorem (Orrenius S., 2015). Spuštění apoptózy nastává při rozpoznání Fas-receptorem svého ligandu (CD95L), exprimovaného na neuronech a glii po ischemii, což vede k interakci jeho intracelulární domény s adaptorovým proteinem FADD a vytvoření komplexu nazývaného DISC (Strasser A., 2009). Tento komplex se pak váže na molekulu prokaspázy-8, což má v závislosti na typu buňky dva možné vývoje. V prvním případě kaspáza-8 přímo aktivuje prokaspázu-3, což vede k tvorbě bílkovin iniciujících apoptózu (Orrenius S., 2015). Ve druhém případě je aktivace prokaspázy-3 delší proces, začínající štěpením bílkoviny

Bid, která aktivuje proapoptotické bílkoviny Bax a Bak, mění propustnost vnější mitochondriální membrány, a vede k uvolnění cytochromu C z vnitřní membrány mitochondrií (Gillies LA., 2014). Výsledkem je vytvoření apoptotického signálního komplexu, zahrnujícího cytochrom C, aktivační faktor apoptotické proteázy-1 a deoxy-ATP, což iniciuje tvorbu kaspázy-9 a vede k aktivaci prokaspázy-3.

A právě pod jejím vlivem dochází k další smrti buňky, doprovázené fragmentací DNA a tvorbou apoptotických tělísek, která jsou rychle fagocytována makrofágy s uvolněním protizánětlivých cytokinů. V případě neefektivního odstranění apoptotických buněk vzniká riziko rozvoje autoimunitních procesů v mozku. Proces apoptózy může také probíhat bez aktivace kaspáz, vyhýbající se tvorbě bílkovin. Tato cesta je zprostředkována speciálním proteinem nazývaným apoptózou-indukující faktor (Gomazkov OA., 2003).

Další fází ischemické kaskády je vznik vzdálených následků ischemie v podobě lokálního zánětu, mikrovaskulárních poruch hematoencefalické bariéry a rozvoje nekrózy. Hlavní představitelé zánětu reakce při ischemii jsou molekuly buněčné adheze a transkripční regulátory (Hallenbeck JM. 1996). Hlavní buněčné prvky přispívající k postischemickému zánětu jsou mikroglie a astrocyty, které jsou indukovány reaktivními formami kyslíku (Brouns R. 2009). Je známo, že jedněmi z prvních účastníků zánětlivého procesu při ischemii jsou makrofágy — mikroglie a makrofágy monocytárních původu (Donnelly DJ. 2008). Aktivace makrofágů a následné spuštění neurozánětlivých reakcí může způsobit poškození nervové tkáně, tak i procesy její opravy (Chernykh ER. 2017). funkce makrofágů je spojena s přítomností nejméně dvou podtypů makrofágů — M1-a a M2-buněk, přičemž M1-buňky jsou neurodestruktivní (zajišťují obranu proti patogenům). M2-buňky mají naopak neuroprotektivní účinek, stimulují neuro-, synapto – a angiogenezi, růst a myelinizaci axonů, ke kterým dochází v důsledku zvýšené genové exprese neurotrofních faktorů GDNF, BDNF, VEGF, BMP-7 a protizánětlivých cytokinů např. interleukinů 4 a 5 (Narantuya D. 2010). Z klinického hlediska se aktivace M2-makrofágů projeví snížením neurologického deficitu a zlepšením neurologického zotavení. Maximální infiltrace makrofágů je pozorována 5. –7. den od vzniku lokální ischemie (Gusev EI. 2001).

Hlavními zástupci zánětlivé reakce jsou astrocyty, které za běžných podmínek podporují přežití neuronů a gliálních buněk, udržují celistvost hematoencefalické bariéry (Sofroniew MV.

2010) a také plní řadu dalších reparačních funkcí pro udržení homeostázy (Sofroniew MV 2010). V počátečních fázích ischemie mozku astrocyty vykazují neurotoxické a prozánětlivé vlastnosti: uvolňují interleukiny 1 a 6, CC-chemokinový ligand-2 (Colombo E., 2016), neurotoxiny, které způsobují rychlou smrt neuronů a oligodendrocytů, také brání proliferaci a diferenciaci těchto buněk (Liddelow SA., 2017), což přispívá k rozšíření oblasti ischemie a zvýšení objemu infarktu s nárůstem neurologického deficitu (Wang W., 2008). Největší aktivita astrocytů se projevuje 4–6 hodin po začátku ischemie. Ale už ke konci 1. až začátku 2. týdne získávají protizánětlivé vlastnosti, podílí se na tvorbě jizev a omezuje zánět uvolňováním tumor nekrotizujícího faktoru- β (Hu X. 2015). Později se k těmto procesům připojují infiltrace mozku leukocyty, neutrofilů a lymfocyty (DeGraba TJ. 1998), které stále více zintenzivňují zánět, narušují integritu hematoencefalické bariéry a snižují její kvalitu sekundárním poškozením buněk v zóně penumbry (Danton GH. 2003).

1.6 Model mozkové ischemie

Jedním z hlavních požadavků na vývoj experimentálních modelů mozkové ischemie je jejich klinická relevantnost. Jsou diskutovány výsledky experimentálních studií zabývajících se patogenezi mozkové ischemie s využitím různých modelů (úplná a neúplná globální ischemie, lokální ischemie, multifokální ischemie) a metod jejich provedení (podvazování tepen, koagulace, embolizace apod.). Zvláštní pozornost je věnována „stabilitě“ následků akutního selhání mozkové cirkulace – tedy tomu, zda dochází k ireverzibilnímu ischemickému poškození mozku, nebo k reverzibilnímu poškození s následnou reperfuzí. Poznává se, že důležitý význam v těchto studiích by měly sehrávat moderní metody celoživotní vizualizace ložisek akutního ischemického poškození, které umožňují sledovat dynamiku patologického procesu v čase.

V současné době se k modelování mozkové ischemie nejčastěji používají hlodavci (myši, králíci, potkani), a to z důvodu ekonomické výhodnosti a podobnosti jejich mozkové angioarchitektoniky s lidským mozkem (Casals J. B. 2011). Rozsah ischemického poškození se posuzuje magnetickou rezonancí a rentgenem, počítačovou tomografií, dopplerovským ultrazvukem. Funkční poškození se hodnotí pomocí behaviorálních a neurologických testů. Nejčastěji používané testy jsou osmiramenné radiální bludiště, Morrisovo vodní bludiště, vedený

zúžený trám, otevřené pole, test vzpřimovačů, rohový test a test umístování. Dále se používá Garciova škála, škála „strokeindex” s modifikacemi (Fluri F. 2015).

Důležitým směrem experimentálních modelů mozkové ischemie je studium poruch neurotransmise. V tomto případě je hlavní role přisuzována glutamátu, jehož uvolňování vede ke smrti z excitace (Niizuma K. 2009). Vytváří se uzavřený patologický kruh, v němž lze vysledovat kaskádu vzájemně souvisejících patologických reakcí s ischemickým poškozením neuronů, zvýšenou produkcí excitačních neurotransmiterů, nedostatkem makroergních látek, hromaděním volného vápníku, oxidu dusnatého, prozánětlivých cytokinů, endogenních kanabinoidů a dalších látek, což následně vyvolává zvýšení závažnosti lipoperoxidačních procesů (Pellegrini-Giampietro D. E. 2009).

1.6.1 Modely úplné globální ischemie

Úplná globální ischemie mozku může být důsledkem srdeční zástavy, oboustranné okluze společných krčních tepen, sestupné aorty, dolní duté žíly a hypoxie plodu a novorozence u hlodavců. Srdeční zástava je modelována inhibicí automatiky a kontraktilní funkce srdce intrakardiálním podáním roztoku chloridu draselného zvířatům (Vasil'ev I. A. 2015).

Na základě použití tohoto modelu se ukázalo, že ochranné vlastnosti hypotermie po zotavení byly studovány ochranné vlastnosti hypotermie po zastavení srdce a neuroprotektivní účinek nadměrné exprese superoxidismutázy-1 (Kofler J. 2005). Tato technika byla častěji používána ve studiích JIMM na velkých zvířatech a na myších – ke studiu apoptózy v neuronech CA1 hipokampu, kaudatoputamenu, předním a zadním mozku (Vahidinia Z. 2017). Okluze sestupné části aorty nebo dolní duté žíly umožňuje komplexně posoudit vliv akutní ischemie na vnitřní orgány a CNS a různé varianty tohoto modelu umožňují minimalizovat mimomozkové projevy celkové ischemie (Shmonin A. A. 2012).

Hypoxická anoxie novorozených hlodavců byla využita ke zkoumání role různých molekulárních buněčných cílů v patogenezi ischemických lézí mozku a také k hodnocení moderních prostředků cílové terapie pro stanovení nových farmakologických strategií v léčbě této patologie. Pomocí tohoto modelu byla zejména stanovena úloha anoxie při rozvoji syndromu

hyperreaktivity CNS, studovány mechanismy zranění nervové tkáně a stanoven význam hipokampu při realizaci prostorové paměti (Morgun A. V. 2014).

Model intrauterinní ischemie (anoxie) u březích hlodavců je jedním z nejbližších reálným podmínkám asfyxie při porodu člověka a umožňuje studovat její krátkodobé i dlouhodobé důsledky (příčiny letálního výsledku, opoždění psychomotorického vývoje), jakož i roli energetického a elektrolytového deficitu novorozenců v patogenezi ischemických lézí novorozenci v patogenezi ischemické léze CNS. V těchto studiích byly studovány molekulární a buněčné cíle pro terapeutické ovlivnění ischemických lézí CNS buněčné cíle pro terapeutické působení k prevenci nebo omezení následků asfyxie pomocí blokátorů mezibuněčných kanálů a receptorů pro růstové faktory, inhibitorů apoptózy, jakož i vlivu hypotermie na rozvoj zánětu v CNS zánětlivý proces v postischemickém období. Hlavní nevýhoda modelu souvisí s problémy přesného určení gestačního věku potkanů (Morgun A. V. 2014).

U potkanů se okluze kortikálních žil a horní sagitální dutiny vyvolává aplikací různých chemických látek. Zejména byl popsán poměrně jednoduchý a reprodukovatelný model, při kterém byla u potkanů po trepanaci lebky vyvolána trombóza žilního sagitálního sinu centrálního mozku aplikací chloridu železitého. V tomto případě se v krátké době po jeho aplikaci vytvořil cytotoxický edém mozku s následným vazogenním edémem spojeným s rekanalizací venózního sagitálního sinu. Morfologickým podkladem globální ischemie bylo ložisko nekrózy s následným nahrazením zóny poškození jizevnatou tkání s cystickou degenerací. Jako účinnou metoda odstranění neurologického deficitu v těchto případech byla navržena transplantace mezenchymálních kmenových buněk (Cvetovskiy S. B. 2012).

1.6.2 Modely fokální ischemie

Místní (ohniskové, fokální) mozková ischemie arteriální nebo žilní geneze simuluje snížení průtoku krve do specifických oblastí centrálního mozku. Tato technika se reprodukuje s reperfuzí nebo bez ní. Hlavní charakteristikou morfofunkčních důsledků tohoto působení je vytvoření ischemického jádra, zóny penumbry s mrtvými a přežívajícími neurony. Stupeň poškození mozku závisí v tomto případě na úplnosti a délce trvání okluze, počtu kolaterál a objemu léze (Longa E.Z. 1989).

Po přechodné nebo dlouhodobé fokální ischemii v zóně penumbry byla stanovena citlivost neuronů na kaspázu-3 a další proapoptotické proteiny (Belousova M. A. 2014). „Single-vessel“ okluze společné karotidy nebo vnitřní karotidy, včetně použití hypotenziv, reprodukuje fokální poškození mozku, včetně fenoménu interhemisférické asymetrie u dospělých i novorozeneckých potkanů.

V modelech používajících dočasné nebo trvalé podvázání těchto tepen je důležité minimalizovat krvácení a učinit chirurgický zákrok racionálním, což je důležitým předpokladem pro období rehabilitace. Použití tohoto modelu pro zkoumání patofyziologických mechanismů poškození a reparace nezralé mozkové tkáně a byly poskytnuty důkazy o specifických morfofunkčních vzorcích těchto změn (Belousova M. A. 2014).

Model permanentní okluze střední mozkové tepny u desetidenních potkanů je minimálně invazivní a lze jej použít ke studiu změn mozku v hipokampální a kortikální zóně, včetně změn traumatické geneze. Při modelování fokální ischemie v perinatálním období je poškození ipsilaterálního striata a parietotemporální kůry reprodukováno bez kontralaterálních změn v období akutní ischemie. Model se používá ke studiu mechanismů poškození mozku u epilepsie, paralýzy, jakož i změn spojených s opožděním mentálního a fyzického vývoje a dalších forem motorických a vrozených poruch (Stavrovskaya A. V. 2016).

1.6.3 Multifokální modely ischemie

Multifokální mozkové ischemie reprodukuje klinické situace vznikající při mnohočetné embolii mozkových tepen malými tromboemboly odloučenými z chlopní mitrální nebo aortální chlopně, k níž dochází v případech infekční endokarditidy, sepse a DIC (disseminovaná intravaskulární koagulace). Modely mnohočetné tromboembolie nám umožňují studovat účinnost různých antikoagulancií a proti destičkových léků při léčbě ischemické cévní mozkové příhody. Nevýhodou těchto modelů je jejich nízká reprodukovatelnost s ohledem na lokalizaci a objem poškození mozku (Myasishcheva O. V. 2014).

Modelování ischemie se praktikuje injekcí laurátu sodného do vnitřní karotické dutiny (Casals J. B. 2011). Endotelin-1 (ET-1) indukovaná konstriktce tepen a žil je způsobena vazospastickou okluzí jedné cévy, stejně jako injekcí ET-1 do striata, bílé hmoty v podkorové

oblasti nebo do vnitřního pouzdra. U potkanů a myši způsobuje endotelin podaný intravenózně na pozadí blokády syntézy oxidázy extrasystolii a atrioventrikulární blokádu. Ganglioblokátory, cholinové blokátory a beta-adrenoblokátory snižují arytmogenní potenciál endotelinu, což ukazuje na důležitou roli autonomní regulace při vzniku poruch srdečního rytmu (Fluri F. 2015)

Výhoda modelu spočívá v jeho vysoké reprodukovatelnosti a vysoká reprodukovatelnost ischemických lézí v kortikální a subkortikální zóně a nízká letalita zvířat v experimentu. Nevýhodou modelu je, že oblast akutní ischemie není kontrolovatelná a indukce astrocytózy a axonálního větvení může komplikovat interpretaci výsledků (Morgun A. V. 2014). Chemická metoda multifokální ischemie se provádí injekcí suspenze síranu barnatého do pravé krční tepny a také aplikací chloridu železitého (Lychko V. S. 2015).

Výhody modelu ET-1 zahrnují jeho méně invazivní techniku, nízkou úmrtnost a schopnost indukovat přímou fokální ischemii jak v hlubokých, tak i povrchových oblastech mozku. Tento model je však omezen skutečností, že receptory ET-1 a enzymy konvertující ET-1 jsou také exprimovány neurony a astrocyty (Nakagomi et al. 2000). Bylo prokázáno, že ET-1 indukuje astrocytózu a usnadňuje axonální výběžky (Uesugi et al. 1998), což může ovlivnit interpretaci experimentů zaměřených na neuronální opravy (Zülch et al. 1981).

Nespornou výhodou tohoto modelu je možnost kontrolovat rozsah poškození úpravou koncentrace nebo dávky vazokonstriktoru. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli tento model použít v našich experimentech.

Pro lepší přehled ischemických modelů popsaných výše byla sestavena Tabulka č. 3, která stručně a přehledně shrnuje jednotlivé typy animálních modelů ischemie, včetně jejich hlavních výhod a nevýhod.

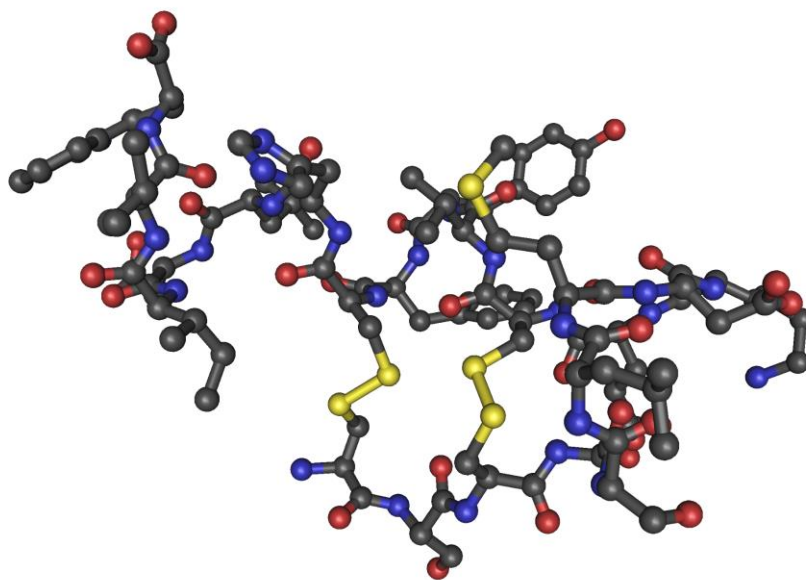
Tab. 3 *Přehled animálních modelů mozkové ischemie s uvedením jejich potenciálních přínosů a omezení.*

Model	Princip	Pozitivní aspekty	Negativní aspekty
Permanentní MCAO (okluze střední mozkové tepny)	Okluze distálního nebo proximálního konce střední mozkové tepny	Výběr místa okluze a mozkové oblasti	Variabilita ve velikosti poškozené oblasti. Obtíže při chirurgickém zákroku
Dočasná MCAO		Výběr místa okluze a mozkové oblasti s možností reperfuze	Variabilita ve velikosti poškozené oblasti Obtíže při chirurgickém zákroku
Embolický model	Injekce trombinu, mikročástic nebo makročástic	Reprodukovatelný model lidské kardioembolické mozkové příhody Navíc umožňuje studovat tromboembolické terapie	Multifokální model mozkové příhody Nestabilní model: možnost spontánní trombolýzy
Fototrombotický model	Intravenózní aplikace fotosenzitivních barviv s	Intenzita záření umožňuje kontrolu infarktové oblasti	Penumbra není přítomna

	následným osvětlením		
Endotelinový model	Injekce vazokonstrikční látky	Reprodukovatelný model lidské mozkové příhody s vysokou kontrolou infarktové oblasti (v závislosti na koncentraci ET- 1) Nízká úmrtnost Hluboká a/nebo povrchová ischemie	Astrocytóza Usnadnění axonálního klíčení

1.7 Endothelin a endotelinové receptory

Endotelin je nejsilnější vazokonstrikční bicyklický polypeptid, který se skládá z 21 aminokyselin. Aminokyselinové zbytky jsou spojeny dvěma bisulfidovými vazbami a tvoří izomery. V současné době byly identifikovány tři izoformy endotelinu. Jeho hlavní formou je endotelin-1 (ET-1), struktura daného polypeptidu je znázorněna na Obrázku č. 2, a dalšími izoformami jsou endotelin-2 a endotelin-3 (ET-2 a ET-3), které se od sebe liší zvláštnostmi aminokyselinové sekvence ve struktuře sloučeniny. Během četných experimentů bylo zjištěno, že endotel vylučuje velký endotelin (proendotelin; 38 aminokyselinových zbytků). A působením enzymu konvertujícího endotelin, který se nachází uvnitř a na povrchu endotelu, vznikají z velkého endotelinu jeho izomery (Gomazkov OA. 2003).



Obr. 3 Chemická struktura polypeptidu Endothelinu-1.

<https://www.biomol.com/products/proteins-and-peptides/peptides/other/endothelin-1-human-porcine-trifluoroacetate-salt-cay24127-500>, nedatováno.

Hlavní množství ET-1 je produkováno v cévním endotelu a nejvíce se podílí na aktivitě endotelinového systému. Kromě buněk cévního endotelu mohou ET-1 produkovat buňky hladkého svalstva aorty, epitelové buňky ledvin, hepatocyty, astrocyty, buňky endometria, buňky bronchiálních žláz, neutrofilů a alveolární makrofágy. ET-1 se neukládá intracelulárně. Je syntetizován v reakci na různé podněty a okamžitě vylučován do vnějšího prostředí. Sekrece tohoto peptidu je rozsáhle regulována na úrovni jeho de novo syntézy (Antonopoulos A. 2007).

Prekurzorem endothelinu je preproendotelin, který se skládá z 212 aminokyselinových zbytků. Vlivem specifické endoproteázy se z něj odštěpuje tzv. velký endothelin (bigET). BigET je dále štěpen endothelin-konvertujícím enzymem (ETE), čímž vzniká ET-1. EPP patří do skupiny metaloproteináz vázaných na membránu, které se podílejí na tvorbě mnoha peptidových hormonů a neuropeptidů. EPP je lokalizována v cévách plic, srdce, ledvin, slinivky břišní a dalších orgánů. Důležitou roli při syntéze endothelinu hraje trombin a krevní destičky. Svým způsobem aktivují

enzymy konvertující endotelin. Samotný endotelin však může způsobit adhezi nebo agregaci destiček (Gomazkov O. A. 1999).

ET-1 působí spíše jako parakrinní a autokrinní mediátor než jako cirkulující endokrinní hormon, takže jeho plazmatická koncentrace nemůže plně odrážet jeho fyziologické působení (Antonopoulos A. 2007).

ET_A receptory převažují v buňkách hladkého svalstva cév a srdce, zatímco v endotelu chybí. Interakce ET-1 s ET_A receptory způsobuje trvalou vazokonstrikci a proliferaci buněk hladkého svalstva. ET_B receptory jsou složeny z 442 aminokyselinových zbytků a vážou všechny endoteliny se stejnou afinitou. Receptory ET_B se nacházejí v endoteliálních a hladkých svalových buňkách a vyskytují se především v mozku, plicích, ledvinách a aortě. Za patologických stavů jsou ET receptory regulovány odlišně, což vede k nerovnováze účinků ve směru vazokonstrikce a buněčné proliferace (Arai H. 1990).

Počet receptorů ET na buněčné membráně a hladina endotelinu v krevní plazmě jsou regulovány stejnými faktory. Bylo zjištěno, že počet endotelinových receptorů se snižuje se zvyšující se koncentrací ET-1 nebo AT2 a zvyšuje se při ischemii nebo pod vlivem cyklosporinu A (Shiffirin E. L. 1998)

1.8 Endotelinový model cerebrální ischemie

Ke studiu ischemie byly vyvinuty různé experimentální modely, mezi nimiž si značnou pozornost získal endotelinový model, a to díky své schopnosti vyvolat fokální a přechodnou ischemii s vysokou reprodukovatelností. Endotelin-1, silný vazokonstriktor, byl široce používán k modelování mozkové ischemie u zvířat. Vyvolává ischemii tím, že zužuje mozkové cévy, čímž snižuje průtok krve mozkem (CBF) a vede k lokalizovanému infarktu. Studie ukázaly, že aplikace ET-1 v blízkosti střední mozkové tepny (MCA) napodobuje patologické charakteristiky lidské ischemické cévní mozkové příhody, včetně hypoxie, apoptózy neuronů a zánětlivých reakcí. (Zgavc, T. 2012).

Na několika animálních modelech byl ET-1 použit ke studiu ischemie. Výzkum Horieho et al. (Horie N. et al. 2008) ukázal, že myši modely fokální ischemie využívající ET-1 nabízejí

jednoduchou, ale účinnou metodu pro zkoumání mechanismů cévní mozkové příhody. Podobně Windle et al. (Windle V. et al. 2006) porovnávali několik metod ischemie vyvolané ET-1 u potkanů a zdůraznili rozdíly ve velikosti a trvání infarktu v závislosti na místě aplikace ET-1. Novější studie zkoumala prasečí modely mozkové ischemie vyvolané ET-1 a poskytla cenné poznatky pro translační výzkum na velkých zvířatech (Zhang Z. 2014).

Ischemie zprostředkovaná ET-1 je spojena s nekrotickou i apoptotickou buněčnou smrtí. Na zapojení aktivace kaspázy-3 do apoptózy neuronů bylo poukázáno v modelech ischemie ET-1 (Dojo Soeandy C. et al. 2019).– Studie navíc identifikovaly souvislost mezi endotelinovými receptory a mitochondriální dysfunkcí, což naznačuje roli antagonistů endotelinových receptorů v neuroprotekcí. Další zkoumání nekrotických a apoptotických interakcí při ischemicko-reperfučním poškození pomocí modelu ET-1 odhalilo komplexní regulační cesty ovlivňující přežívání a smrt buněk (Dojo Soeandy C. et al. 2019).

Vzhledem ke kontrolované povaze ischemie vyvolané ET-1 se tento model často používá k testování neuroprotektivních strategií. Bylo například zjištěno, že hyperbarická oxygenoterapie zmírňuje účinky ischemie vyvolané ET-1 na modelu potkanů tím, že zlepšuje okysličení tkání a snižuje velikost infarktu (Cao L. et al. 2014) Kromě toho byl model ET-1 užitečný při studiu interakce mezi systémovým zánětem a cévní mozkovou příhodou, kdy bylo prokázáno, že mechanismy závislé na endotelinu zhoršují reperfuzi tkání po ischemickém poškození (Pradillo J. et al. 2017).

1.9 EEG v ischemie

Klíčovým faktorem ischemické cévní mozkové příhody je hypoxie, která způsobuje charakteristické změny v buněčném metabolismu a je doprovázena specifickými změnami bioelektrické aktivity. Tyto změny odrážejícími nejen přítomnost cévní mozkové příhody, ale také funkční stav nervových buněk (Zhang Z., 2013). Elektroencefalogram vykazuje rozdíly mezi zónou nekrózy (ischemické jádro), kde bioelektrická aktivita zcela chybí, zónou penumbry (oblast v blízkosti ischemického jádra), kde je aktivita výrazně změněná, ale potenciálně obnovitelná při adekvátní terapii, a zónou zdravé tkáně. Studium bioelektrické aktivity mozku je zároveň cenné z hlediska hodnocení účinnosti farmakologické léčby ischemické cévní mozkové příhody. V tomto

ohledu je nezbytné využívat informativní a reprezentativní modely, k jejichž realizaci se běžně používají laboratorní zvířata.

Tradiční neurofyziologické prognostické markery, klinická vyšetření a chemické biomarkery nejsou dostatečně přesné s ohledem na pravděpodobnostní hodnocení výsledku ischemické cévní mozkové příhody a neodrážejí přímo aktivitu neuronů, přestože zůstávají základem klinické praxe. Studium bioelektrické aktivity mozku u ischemických poruch je další diagnostickou a prognostickou metodou zaměřenou především na studium postischemické dysfunkce (Hazime M. 2021).

EEG se běžně zaznamenává v rozsahu 0,3 až 50 Hz. Zahrnuje hlavní mozkové rytmy:

Delta (Δ)-rytmus (od 0,3 do až 4 Hz),

Theta (θ)-rytmus (od 4 do 8 Hz),

α -rytmus (od 8 do 13 Hz),

Nízkofrekvenční beta (θ) rytmus (od 8 do 13 Hz),

Nízkofrekvenční beta (β)-rytmus nebo β_1 -rytmus (od 13 až 25 Hz),

Vysokofrekvenční β -rytmus nebo β_2 -rytmus (25 až 35 Hz),

A gama (γ)-rytmus neboli β_3 -rytmus (35 až 50 Hz).

Tyto rytmy odpovídají Δ -aktivitě, θ -aktivitě, α -aktivitě, β -aktivitě a γ -aktivitě mozku. Spontánní elektrická aktivita představuje kumulativní aktivitu korových neuronů mozku. Je třeba poznamenat, že elektrická aktivita jednotlivých neuronů odráží aktivitu při zpracování a přenosu informací, zatímco celkové EEG odráží aktivitu neuronálních populací a funkční aktivitu populací neuronů a funkční aktivitu mozku jako celku (Buzsaki G. 2006).

První popisy změn EEG u pacientů s cévní mozkovou příhodou se objevily ve 30. –40. letech 20. století. Od té doby jsou výsledky této výzkumné metody široce využívány v klinické praxi jako jedno z prognostických kritérií průběhu onemocnění a regrese ložiskových neurologických poruch a také pro účely výběru farmakoterapie a hodnocení její účinnosti.

Ve většině klinických studií věnovaných změnám EEG u ischemie bylo prokázáno, že v akutní fázi infarktu v hemisféře mozku vykazuje EEG difuzní změny biopotenciálů s povrchově lokalizovanými ložisky charakterizovanými lokálními vysokoamplitudovými vlnami se zachovaným nebo sníženým α -rytmem. Podle výsledků EEG mapování se v prvních hodinách rozvíjí fokální, převážně kortikální ischemické léze, je registrováno fokální zvýšení síly α - a β -pásem v postižené hemisféře s difuzním minimálním zastoupením pomalé aktivity. To může být způsobeno kompenzační hyperaktivací retikulární formace kmene a talamických jader s potlačením aktivity předního hypotalamu v důsledku funkční disociace jeho spojení s ostatními částmi nespecifického systému, který hraje důležitou roli v prvních hodinách akutní ischemie (Burghaus 2007). Rozsáhlé změkčení s edémem mozku, stejně jako změkčení v podkorové oblasti se projevuje tím, že na EEG výraznějšími difuzními změnami s převahou θ - a Δ -aktivity s odpovídajícím poklesem spektra α - a β -aktivity. Často zjišťovaná oboustranná deprese celkového spektrálního výkonu EEG při infarktu v jedné hemisféře pravděpodobně souvisí s hrubou metabolickou poruchou v obou hemisférách (Petrova E.A. 2007).

Přítomnost interhemisferické asymetrie podle síly pásma α v důsledku jeho potlačení v parietálno-okcipitálních úsecích postižené hemisféry, fokální zvýšení výkonu θ - a Δ -oscilací v prvním dni onemocnění jsou prognosticky méně příznivé známky svědčící o přítomnosti výrazného fokálního neurologického defektu. Postupnému zhoršování stavu pacientů, zvyšování závažnosti celkových mozkových příznaků předchází zvýšení celkové síly spektra v důsledku zvýšení síly θ - a Δ -pásem. Nejzávažnějšímu průběh ischemie předchází posun dominantního spektra doleva, difuzní zvýšení výkonu pomalých oscilací, hrubý oboustranný pokles celkového energetického výkonu EEG spektra, nedominantní typ spektrogramů, prudké potlačení nebo vymizení rychlých pásem β -aktivity do 10–12 hodin onemocnění, doprovázené známkami dysfunkce kmene. Přetrvávání výrazného neurologického deficitu v podobě hemiplegie nebo výrazné hemiparézy předchází trvalé zachování asymetrie celkové síly a frekvenčně-energetické distribuce EEG spektra, vytvoření subdominantního píku v oblasti θ vln do 3–5 dnů od cévní mozkové příhody (Burghaus L. 2007).

Přetrvávání závažného neurologického deficitu v podobě hemiplegie nebo výrazné hemiparézy předchází přetrvávající zachování asymetrie celkového výkonu a frekvenčně-

energetického rozložení EEG spektra, vytvoření subdominantního píku v rozsahu θ vln do 3–5 dnů od cévní mozkové příhody (Burghaus 2007). Analýza EEG při různé závažnosti motorického deficitu ukázala, že závažnost motorických poruch koreluje s lokalizací reziduálních lézí: u lehké nebo středně těžké hemiparézy se abnormality v oblasti byly zaznamenány odchylky elektrické aktivity v přední části (frontální, centrální, anteroventrální), a to ve všech případech významného motorického deficitu a ve všech případech výrazného motorického deficitu — v zadních (týlních a parietálo-okcipitálních) oblastech. To lze vysvětlit kompaktním umístěním eferentních pyramidových drah v kaudálních částech mozku. Polymorfní Δ -oscilace a lokální změny v zadní kůře, bez ohledu na charakter elektrické aktivity, jsou tedy nepříznivými prognostickými znaky pro pacienty s ischemií při obnovení motorické funkce. Pokud po kognitivní poruše po cévní mozkové příhodě dojde k rozvoji kognitivních funkcí, jsou hlavní EEG charakteristikou korelující s poklesem intelektu pomalé vlny o frekvenci 1–3 a 7 Hz (Petrova E.A. 2007).

V procesu výzkumu se nevyhnutelně objevují obtíže při interpretaci výsledků vzhledem k rozdílům v projevech patologických změn u lidí a modelových zvířat, které jsou způsobeny genetickými, fyziologickými a anatomickými důvody. Například zánětlivá složka ischemického procesu u lidí a myši se liší v důsledku CpG-metylace lidského genu NOS2, která mění reakci chemokinů/cytokinů (Sommer C. J. 2017). Kromě toho je vzhledem k řadě zjevných anatomických rozdílů poměrně obtížné srovnávat lokalizační zóny ischemie u lidí a zvířat, což má závažný dopad na průběh a výsledek patologického procesu.

Je také nutné vzít v úvahu rozdíl mezi procentuálním zastoupením bílé hmoty v mozku lidí a laboratorních hlodavců — přibližně 60 % u lidí, 15 % u potkanů a 10 % u myši (Krafft 2012). Existují také rozdíly v anatomii cév v mozku, například u některých druhů myši může být Willisův kruh špatně vyvinutý nebo zcela chybět (McColl B. W. 2004). Zároveň je u potkanů běžné abnormální větvení střední mozkové tepny (Liebenstund L. 2020). Kromě toho je v průběhu reperfuze u lidí poškození kapilární složky hematoencefalické bariéry (BBB) méně výrazné (Skelton J. K. 2017).

Různé metody záznamu bioelektrické aktivity neuronů nacházejí uplatnění na různých úrovních organizace mozku. Například na mikro a meziúrovni, kde je možné analyzovat lokální

populace neuronů, se používá extracelulární záznam neuronální aktivity pomocí mikroelektrod nebo vícepólových elektrodových polí.

Na makroúrovni se široce používá skalpová elektroencefalografie (EEG), která se nejčastěji provádí klinicky pomocí externích elektrod připevněných ke skalpu. Elektrokortikografie (ECoG) je typ intrakraniální nebo invazivní elektroencefalografie.

Intrakraniální neboli invazivní elektroencefalografie je metoda záznamu mozkových biopotenciálů, která vyžaduje předchozí chirurgický zákrok a intrakraniální umístění elektrod. Prostorová rozlišení lze výrazně zlepšit ($<5 \text{ mm}^2$) použitím flexibilních, těsně umístěných subdurálních mřížkových nebo páskových elektrod. Elektroencefalografie je jednou z hlavních elektrofyziologických metod, která odráží časoprostorovou organizaci mozku a umožňuje přímé měření celkové korové aktivity organizaci mozku a umožňuje přímé měření celkové korové aktivity. EEG má údajně dostatečnou citlivost k odhalení chronických i akutních mozkových abnormalit. Zejména je tato metoda použitelná u pacientů v časně fázi (zejména v prvních 24 hodinách) hypoxického/ischemického poškození mozku (Wu J. 2016).

Kvantitativní elektroencefalografie umožňuje hodnotit elektrickou aktivitu mozku, především záznamem excitačních a inhibičních postsynaptických proudů ve vrstvách pyramidových buněk mozkové kůry (Rabiller G. 2015). Výhodou kvantitativní spektrální analýzy EEG (qEEG) je možnost rychle analyzovat značné objemy elektrofyziologických dat. Výsledky předchozích studií ukazují, že EEG lze popsat pomocí základních pravděpodobnostních rozdělení, ale pouze v relativně krátkých časových úsecích, obvykle ne delších než 10–20 s, protože EEG je nestacionární proces, a úspěšně bylo použito autoregresní modelování (Schlög A. 2000). Ve srovnání s klasickou metodou rychlé Fourierovy transformace je tato metoda spolehlivější a díky její odolnosti vůči aditivnímu šumu ji lze s vysokou přesností použít i při analýze krátkých fragmentů signálu. Na druhé straně se při analýze EEG poměrně úspěšně uplatňují metody nelineární dynamiky (nebo deterministického chaosu), které vycházejí z hypotézy, že elektrickou aktivitu mozku lze popsat stacionárními dynamickými modely. Studie ukázaly, že indexy komplexity EEG jsou dalšími vysoce citlivými ukazateli elektrofyziologických změn způsobených lokálními lézemi, jako např. subkortikální mozková příhoda (Zhang J. 1999).

Elektroencefalografie jako metoda přímého měření funkčního stavu mozku odhaluje jemné rozdíly ve frekvenčních složkách, které mohou být změněny mozkovou ischemií. Například EEG bylo úspěšně použito k monitorování stavu mozku v reálném čase během karotické endarterektomie a bylo pozorováno snížení výkonu alpha pásma (8–15 Hz) po sevření vnitřní krkavice, které vede k rozvoji ischemie. U modelů globální mozkové ischemie u zvířat dochází ke zploštění EEG (snížení všech frekvenčních složek) a následnému neúplnému zotavení (Shang A. 2011). U animálních modelů fokální mozkové ischemie několik studií zaznamenalo takové typy mozkové aktivity, jako jsou periinfarktové depolarizace, záchvaty bez křečí, polymorfni delta aktivita (PDA) a epileptiformní výboje (Williams A. J. 2004). Uvedené projevy jsou spojeny s progresivním poškozením mozku během ischemie, zatímco mohou být do určité míry eliminovány po podávání neuroprotektivních léků.

1.10 Optická fotometrie

Optická fotometrie je moderní, minimálně invazivní technika, která umožňuje sledovat funkční neuronální aktivitu v reálném čase u volně se pohybujících laboratorních zvířat. Zaznamenává změny fluorescence emitované geneticky kódovanými indikátory, které reflektují fyziologické signály, jako jsou intracelulární změny koncentrace vápníku (Ca^{2+}) nebo výkyvy v hladinách neurotransmiterů (Vickstrom C. R. 2022).

Tato metoda si získala oblibu díky své vysoké časové rozlišovací schopnosti, relativně jednoduchému chirurgickému zavedení a možnosti cílení na hluboké mozkové struktury s vysokou anatomickou specifikou (Aramuni G. & Griesbeck O. 2013). Na rozdíl od elektrofyzilogických metod nabízí optická fotometrie buněčně specifický záznam aktivity, obzvláště v kombinaci s virovými vektory pod specifickými promotory nebo u geneticky modifikovaných zvířat (Han S. Y. 2019).

Díky možnosti sledovat aktivitu nervových okruhů s vysokým poměrem signál/šum a monitorovat jemné dynamické změny po dlouhou dobu a u bdělých zvířat se optická fotometrie stala cenným nástrojem při studiu patologických stavů včetně ischemického poškození mozku, závislosti nebo epileptických onemocnění (Adami A. et al. 2016).

Optická fotometrie je založena na měření změn fluorescence indikátorů exprimovaných v cílové mozkové oblasti. Nejčastěji se používají geneticky kódované kalciové indikátory (např. GCaMP6 či GCaMP7), které reagují na zvýšenou intracelulární koncentraci Ca^{2+} při neuronálním vzruchu změnou fluorescence.

Kromě Ca^{2+} lze pomocí optické fotometrie sledovat také neurotransmitery (např. dopamin, serotonin, glutamát), využívající princip tzv. GRAB sond („GPCR activation-based sensors“), které mění konformaci při vazbě ligandu a emitují signál.

Při ischemickém infarktu dochází k narušení krevního zásobení mozku a následné metabolické krizi, která zásadně mění neuronální aktivitu. Optická fotometrie umožňuje sledovat průběh těchto změn v reálném čase, například:

- Vzestup Ca^{2+} signálu jako známka excitotoxicity a depolarizace neuronů.
- Dlouhodobé změny v aktivaci neuronálních obvodů v postižených oblastech.
- Útlum aktivity v pozdních fázích ischemie jako projev apoptózy či energetického kolapsu.

Tímto způsobem lze optickou fotometrii využít nejen ke kvantifikaci akutní fáze ischemie, ale i ke sledování regenerace a dlouhodobých následků, například Pochechuev et al. (Pochechuev M. S. 2022) popsal útlum aktivity amygdalo-akumbenních projekcí při morfinové abstinenci – model relevantní i pro ischemické narušení obvodu.

Optická fotometrie vyžaduje dvě klíčové komponenty:

1. Exprese fluorescenčního indikátoru – nejčastěji pomocí:
 - Geneticky modifikovaných zvířat.
 - Aplikace virových vektorů (např. AAV, lentiviry) stereotaktickou injekcí do cílové oblasti mozku.
2. Implantace optického vlákna – pomocí keramické ferule („guide-cannula“) s nízkou autofluorescencí, která slouží pro přenos excitačního i emisního světla.

Při využití virových vektorů dochází k expresi fluorescenčních indikátorů obvykle za 2–3 týdny. Poté lze zvíře pomocí optického vlákna připojit k systému pro záznam a signál snímat kontinuálně. Fluorescenční data se poté zpracují do formátu $\Delta F/F$, který kvantifikuje relativní změnu signálu oproti výchozí linii. Tato metoda je minimálně invazivní, má vysoký poměr signál-šum a umožňuje dlouhodobé sledování u volně se pohybujících zvířat (Boyce A. K. J. et al. 2025).

Zatímco většina dosavadních studií používá optickou fotometrii u dospělých laboratorních myši a potkanů, publikovaných prací zaměřených na perinatální období je velmi málo. Přitom právě u neonatálních modelů by tato metoda mohla zásadně přispět k:

- Časnou detekci epileptiformní aktivity.
- Sledování vývoje poškozených okruhů v reálném čase.
- Vyhodnocení účinnosti terapeutických zásahů.

S ohledem na současné technologické možnosti je optická fotometrie slibným nástrojem pro rozšíření poznatků o patofyziologii perinatální fokální ischemie. Díky své citlivosti, časovému rozlišení a možnosti použití u volně se pohybujících zvířat představuje unikátní přístup v preklinickém výzkumu ischemie – zejména tam, kde tradiční elektrofyziologické metody selhávají nebo jsou příliš invazivní.

Její využití u mláďat laboratorních hlodavců přináší specifické technické výzvy, ale zároveň velký potenciál pro objev nových biomarkerů a porozumění mechanismům rozvoje epileptogeneze a plasticity po ischemickém inzultu.

Shrnutí

Perinatální ischemické poškození mozku představuje závažný medicínský problém, který může výrazně ovlivnit další vývoj centrálního nervového systému a vést k trvalým komplikacím, jako je epilepsie, poruchy hybnosti nebo kognitivní dysfunkce. Včasná detekce těchto změn je zásadní pro zajištění cílené terapie a zlepšení prognózy pacientů. V tomto kontextu hrají klíčovou roli neinvazivní metody, zejména elektroencefalografie (EEG), která umožňuje sledovat jak akutní, tak dlouhodobé změny v mozkové aktivitě. EEG představuje snadno dostupný nástroj s vysokou časovou rozlišovací schopností a schopností detekovat epileptiformní aktivitu či zpomalení jako možné biomarkery ischemického poškození. Pro hlubší pochopení patofyziologických mechanismů se využívají experimentální animální modely, které umožňují detailní sledování vývoje ischemie v různých časových fázích. Významnou doplňující technikou je také optická fotometrie, která umožňuje v reálném čase měřit změny Ca^{2+} a neuronální aktivitu pomocí geneticky kódovaných indikátorů. Tato metoda, byť zatím málo využívaná u novorozeneckých modelů, nabízí vysokou míru specifity a potenciál pro identifikaci nových biomarkerů. Kombinace behaviorálního hodnocení, EEG a optických metod přináší komplexnější pohled na důsledky ischemického infarktu. Teoretická část tak podtrhuje nutnost pokračujícího výzkumu zaměřeného na vývoj citlivých a specifických diagnostických nástrojů pro perinatální ischemii.

Cíle práce a hypotézy

Hypotéza

Postischemické změny v EEG aktivitě budou mít specifický charakter v oblasti senzomotorické kůry a také v dorzálním hipokampu. Předpokládané EEG koreláty budou odrážet jak průběh fokální cerebrální ischemie, tak i vliv mozkového infarktu na vývoj těchto mozkových struktur. Očekáváme výskyt charakteristické aktivity v alpha a gama pásmech, která bude spojena s postischemickým ovlivněním mozkové excitability.

Cíle práce

1. Identifikovat a popsat specifické koreláty epileptických záchvatů nalezené pomocí analýzy EEG hipokampu potkana s perinatální fokální ischemií.
2. Porovnat patologickou EEG aktivitu v různých věkových kategoriích.
3. Popsat změnu aktivity Ca^{2+} v modelu fokální perinatální ischemie.

K identifikaci specifických korelátů epileptické aktivity byla provedena analýza záchvatů. V rámci této analýzy jsme se zaměřili na kvantifikaci počtu záchvatů u jednotlivých jedinců a na sledování délky jejich trvání.

Další použitou metodou byla analýza spektrální hustoty výkonu („Power Spectral Density“ dále PSD), která umožňuje zkoumat spektrální hustotu jednotlivých EEG pásem a časový profil PSD signálu v průběhu času. Tyto metody umožňují přesnější sledování změn v jednotlivých frekvenčních pásmech sledovaných kanálů a mohou sloužit jako detailnější nástroj pro včasnou diagnostiku epileptogenních procesů.

Poslední použitou metodou bylo sledování uvolňování vápníku. Tato metoda umožňuje v reálném čase pozorovat změny koncentrace vápníku v poškozených oblastech.

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Metodika

2.1.1 Experimentální zvířata

Experimentální studie byla provedena na samcích potkanů kmene Wistar ve věku 12 (P12; n = 27) nebo 25 (P25; n = 12) dnů po narození. Den porodu byl označen jako den 0. Potkani byli chováni v přísně kontrolovaném prostředí s konstantní teplotou 22 ± 1 °C, relativní vlhkostí 50–60 % a světelným režimem od 6:00 do 18:00 hodin. Zvířata měla neomezený přístup k potravě a vodě. Všechny experimenty byly schváleny etickou komisí Ministerstva zdravotnictví České republiky a etickou komisí Národního ústavu duševního zdraví (NUDZ) pro využití laboratorních zvířat. Při práci se zvířaty bylo postupováno v souladu se zásadami 3R („refinement, reduction, replacement“), podle pokynů ARRIVE směrnice (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), v souladu s vnitrostátní legislativou — zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů — a rovněž podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely a Průvodce národními instituty zdraví pro péči a používání laboratorních zvířat (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

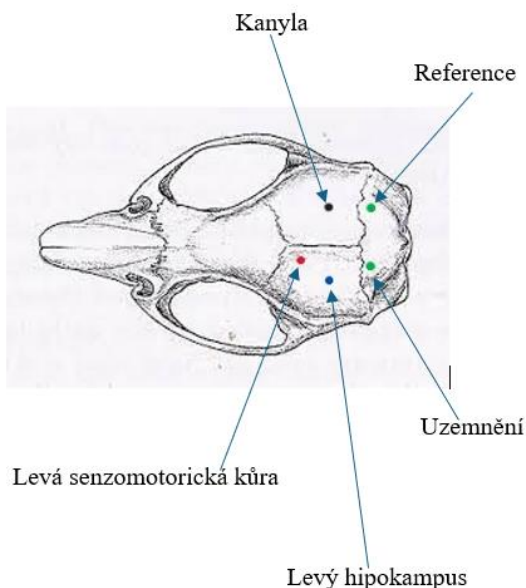
2.1.2 Chemické látky

Endothelin-1 v koncentraci 40 pmol/μl (#E7764, Sigma, St. Louis, MO, USA) byl připraven pomocí rozpuštění v 10 mM fosfátem pufovaném roztoku (PBS, pH 7,4). Látka byla podávána infuzní pumpou (KDS210, KD Scientific, Holliston, MA, USA) konstantní rychlostí 0,25 μl/min v celkovém objemu 1 μl. Kontrolní skupina dostávala 10 mM PBS (pH 7,4) ve stejném objemu 1 μl. Dvanáctidenní zvířata byla po celou dobu oddělení od matek udržována při teplotě hnízda ($34,5 \pm 0,5$ °C).

2.1.3 Injekce Endotelinu-1

Chirurgický zákrok byl proveden za použití izofluranové anestézie (1,5–2% izofluranu). K infuzi endotelinu-1 (ET-1) byla použita jemná kanyla (PlasticOne, Bilaney Consultants GmbH,

Düsseldorf, Německo; vnější průměr 200 μm), která byla zavedena do pravého dorzálního hipokampu na základě přesně stanovených souřadnic: u zvířat ve věku P12 AP = 3,0; DV = 3,0; ML = 3,0 mm vzhledem k bregmě a u zvířat ve věku P25 AP = 3.5; DV = 3.5; ML = 3.5 mm.



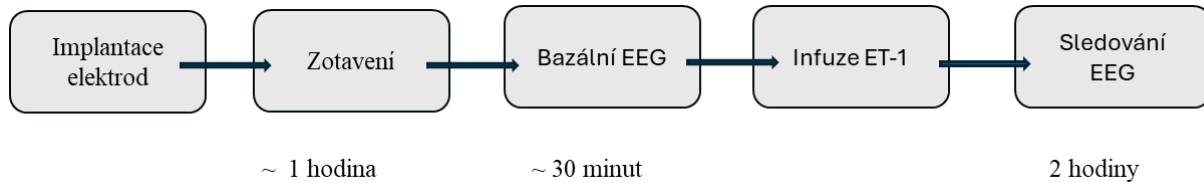
Obr. 4 Schematické znázornění umístění elektrod pro záznam EEG

Plochá stříbrná elektroda byla umístěná epidurálně nad levou senzomotorickou kůrou (AP = 0, ML = 2,5 mm), teflonem izolovaná stříbřená elektroda (OD = 200 μm) implantována do levého dorzálního hipokampu na stejných souřadnicích jako kanyla. Pro zajištění nezbytné referenční hodnoty byly indiferentní a uzemňovací elektrody implantované epidurálně nad oblastí mozečku (Obrázek 4). Elektrody a kanyly byly důkladně zafixovány na lebce pomocí zubního akrylu (#1208561, SpofaDental, Praha, Česká republika) a zvířatům byla poskytnuta nejméně hodinová doba na zotavení. Následně byla umístěna do plexisklových boxů na vyhřívanou podložku ($34,5 \pm 0,5$ °C) a připojena k EEG systému pomocí kabelů.

2.1.4 Registrace a vyhodnocení EEG

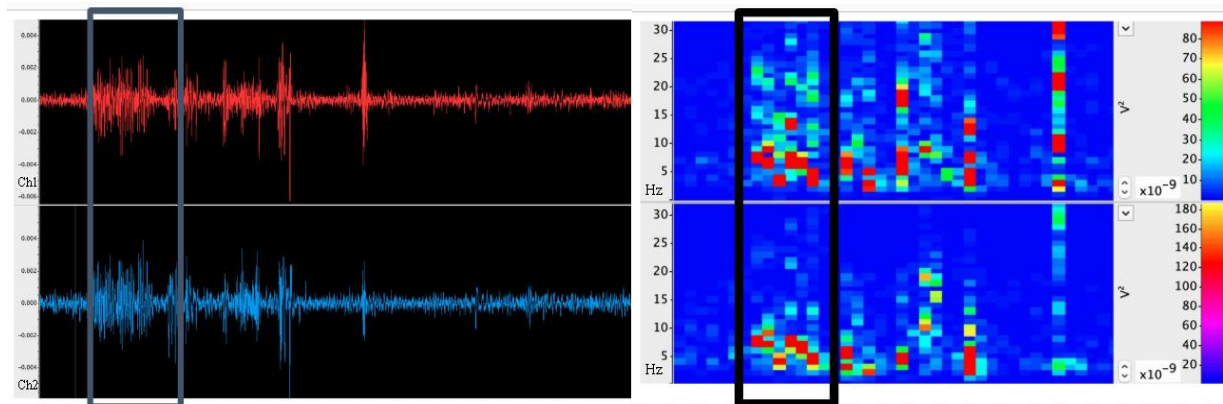
Před infuzí ET-1 byl po dobu 20 minut zaznamenáván bazální EEG. Poté byl podán ET-1 a EEG bylo dále zaznamenáváno po následujících 100 minut. Poté byla zvířata vrácena do svých

domovských klecí. Schéma průběhu experimentu s orientační dobou trvání jednotlivých kroků je uvedeno na Obrázku č. 5.



Obr. 5 Schéma znázorňuje průběh monitorování EEG, včetně všech jednotlivých komponent a jejich přibližného časování

Během obou registračních období byl odhadnut počet a délka elektrofyziologických záchvatů (tj. alespoň pětisekundové úseky rytmických ostrých vln), ukázka záznamu takového záchvatu je znázorněna na Obrázku č. 6. Celková doba záchvatů byla vyjádřena jako čas strávený v záchvatech na registrační období.



Obr. 6 Na obrázku je uveden příklad analyzovaného záznamu EEG provedeného pomocí softwaru LabChart. EEG záznam z kanálu 1 (červeně, senzomotorická kůra) a kanálu 2 (modře, hipokampus) u potkanů po aplikaci ET-1. Ve zvýrazněné oblasti je patrný výskyt spontánního epileptického záchvatu charakterizovaného vysokofrekvenčními výboji s výraznou amplitudou. Vpravo je uvedena spektrální analýza výkonu (PSD) odpovídající stejnému časovému úseku jako výše uvedené EEG záznamy. Zvýrazněná oblast ukazuje výrazný nárůst výkonu v pásmu 5–9 Hz během záchvatu, který je pozorovatelný v obou kanálech.

Jedním z klíčových parametrů měřených během těchto experimentů byla latence, tedy časový interval, který uplynul do prvního záchvatu. Během obou registračních období byl sledován počet záchvatů i jejich trvání. Záchvaty byly definovány jako rytmické ostré komplexy, které trvaly nejméně 5 sekund. Celková doba trvání záchvatů byla poté vyjádřena jako kumulativní čas strávený v záchvatech během celého sledovacího období.

Části zvířat byla ve stereotaktickém zařízení, za použití anestezie isofluranem, implantována kanyla do pravého dorzálního hipokampu a následně byla infundována látka ET-1 (n = 6) nebo PBS (n = 6), jak bylo popsáno výše. Poté byla kůže na hlavě uzavřena pomocí netoxického lékařského lepidla (Kollodium, PENTA, Česká republika) a po probuzení byla zvířata navrácena k matce. Po dosažení věku P25, tedy 13 dní po intrahipokampální infuzi, byly zvířatům implantovány elektrody, jak je popsáno výše, a byla provedena čtyřhodinová registrace spontánní EEG aktivity.

2.1.5 Metoda sledování změn Ca^{2+} aktivity pomocí optické fotometrie

2.1.5.1 Injekce virálního vektoru

Zvířata ve věku P5 byla uvedena do mírné anestezie pomocí isofluranu (1,5–2 %) a následně jim byl pomocí mikropipety intranazálně aplikován virový vektor AAV8.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40 (titr > 1E13 GC/ml) v objemu 700 nl (350 nl do každé nosní dírky). Po ukončení anestezie a úplném probuzení byla mláďata vrácena matce. Doba separace mláďat od matky nepřesáhla 10 minut.

2.1.5.2 Metoda sledování změn koncentrace Ca^{2+}

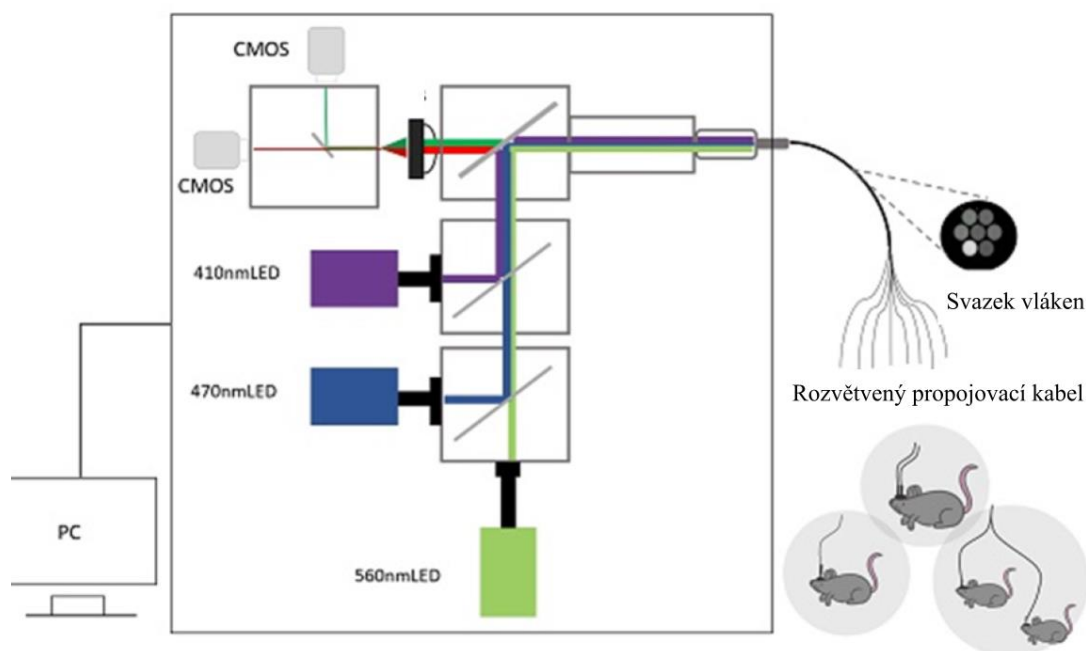
Operační zákrok byl proveden podobně jako v experimentu s EEG u zvířat ve věku P12. Zvířatům byla implantována kanyla a optické snímače o průměru 250 μm – jeden v blízkosti kanyly směrem posteriorně a druhý v kontralaterálním hipokampu. Kanyla i snímače byly zafixovány k lebce a kůži pomocí zubařského akrylátu (#1208561, SpofaDental, Praha, Česká republika) a po probuzení byla mláďata navrácena k matce.

Po hodinové rekonvalescenci byla zvířata připojena k nahrávacímu systému (TriColor Photometry, RWD, Čína) prostřednictvím optického vlákna a bylo monitorováno uvolňování vápníku v nervové tkáni po intrahipokampální infuzi (ET-1 nebo PBS). Podání látek proběhlo identicky jako v pokusu s EEG. Tento systém umožňuje simultánní sledování změn intracelulární koncentrace vápníku ve více mozkových oblastech pomocí vícevlňových LED zdrojů a detekční jednotky CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor). Monitoring probíhal maximálně 2 hodiny po infuzi. Obrázek 7 znázorňuje experimentální design.



Obr. 7 Schéma experimentálního postupu. V postnatálním dni P5 byla zvířatům intranazálně aplikována virová suspenze (AAV8.Syn.GCaMP6f.WPRE.SV40). V P12 byla provedena implantace kanyl a optických snímačů, následovaná hodinovým zotavením. Poté byla provedena intra-hipokampální infuze látky (ET-1 nebo PBS) a monitorování mozkové aktivity po dobu přibližně dvou hodin.

Optické signály byly generovány pomocí tří excitačních LED diod s vlnovou délkou 410, 470 a 560 nm – a vedeny skrze dichroická zrcadla do jednoho optického vlákna, které se větvalo do více snímačů připojených ke zvířatům. Vysílané světlo budilo fluorescenci indikátoru GCaMP6f exprimovaného v cílových strukturách, přičemž zpětný fluorescenční signál byl skrze stejný kabel zachycován a veden zpět do systému, kde byl analyzován pomocí CMOS detektorů. Měření bylo řízeno a zaznamenáváno pomocí softwaru připojeného k počítači. Fluorescenční signál byl vyhodnocen jako $\Delta F/F$, tedy relativní změna fluorescence vůči výchozí úrovni, a odrážel změny v neuronální aktivitě vyvolané ischemickým inzultem (ET-1) nebo kontrolní látkou (PBS). Schématické znázornění výše popsaného systému je uvedeno na Obrázku 8.



Obr. 8 Schéma systému TriColor Fiber Photometry (RWD) použitého k záznamu vápníkové aktivity u volně se pohybujících zvířat. Excitační světlo o vlnových délkách 410 nm, 470 nm a 560 nm je generováno třemi samostatnými LED diodami a následně vedeno optickou soustavou přes dichroická zrcadla do optického vlákna. Světlo je distribuováno rozvětveným kabelem („branching patch cord“) ke snímačům implantovaným do mozku zvířat. Emitovaná fluorescence z indikátoru GCaMP6f je sbírána stejným optickým kabelem a detekována pomocí CMOS kamer. Celý systém je řízen a zaznamenáván prostřednictvím počítače. Obrázek znázorňuje současný záznam u více zvířat během jednoho měření.

2.1.6 Histologie

Na konci všech experimentů (EEG či optické fotometrie) všechna zvířata byla anestetizována uretanem (2 g/kg, i.p.; #U2500, Sigma-Aldrich, USA) a následně transkardiálně perfundována 4% paraformaldehydem (Druga et al. 2005). Mozky byly vyjmuty, kryoprotektovány v postupně zvyšujících se koncentracích sacharózy, zmrazeny a koronárně krájeny na řezy o tloušťce 50 μm (každý pátý řez). Řezy byly shromážděny, uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v kryoprotektivním roztoku a následně použity pro další analýzu.

Histologická data nejsou součástí této diplomové práce. Verifikace polohy kanyly a elektrod byla provedená u všech zvířat.

2.1.7 Metody analýzy výsledků

2.1.7.1. Analýza EEG

Analýza EEG byla provedena offline pomocí softwaru LabChart Reader v.8 (ADInstruments Pty Ltd., USA) a vlastního skriptu v MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA). Každé zvíře bylo analyzováno individuálně. Na EEG signál byl aplikován „notch“ filtr na frekvenci 50 Hz a „band-pass“ filtr v rozsahu od 0,5 do 70 Hz.

Při analýze akutního EEG monitoringu byly kvůli možnému rušení způsobenému akutními manipulacemi z analýzy vyloučeny následující časové úseky: jedna minuta před zavedením infuzního katétru, samotná doba infuze (4 minuty) a první minuta po vytažení kanyly.

Každý EEG soubor byl analyzován z hlediska výskytu spontánních záchvatů, jejich časového rozložení, průměrné a celkové doby trvání a také přítomnosti epileptiformních paroxysmálních událostí. Spontánní záchvaty byly definovány jako epizody s frekvencí 5–9 Hz a amplitudou alespoň dvojnásobnou oproti základní EEG aktivitě subjektu. Minimální délka záchvatu činila 5 sekund a mezi dvěma samostatnými záchvaty mohl být maximální interval 1 sekunda. Epileptiformní události byly definovány obdobně s frekvencí 5–9 Hz a zvýšenou amplitudou, avšak s kratším trváním v rozmezí 2–4,5 sekundy.

Pro výpočet spektrální hustoty výkonu (PSD) byla použita rychlá Fourierova transformace (FFT) s Hannovým (cosine-bell) oknem o velikosti 1024 vzorků, bez překrytí a s odstraněním nulové frekvence. Tento postup umožnil reprezentovat frekvenční spektrum jednotlivých EEG pásem v 5sekundových pěti oknech celkového EEG záznamu.

Výpočet PSD byl proveden v programu LabChart Reader (AD Instruments) pro jednotlivá frekvenční pásma: delta (0,5–4 Hz), theta (4,5–8 Hz), alpha (8,5–13 Hz), beta (13,5–24 Hz) a gamma (24,5–68 Hz). Získaná data byla následně exportována do programu MATLAB (MathWorks, USA) pro další zpracování.

Relativní spektrální hustota výkonu EEG byla získána normalizací absolutní spektrální hustoty výkonu pro každou frekvenci vůči průměru absolutní spektrální hustoty výkonu napříč všemi frekvencemi. Normalizované hodnoty pětivteřinových intervalů byly následně zprůměrovány po 20 minutách a teprve poté použity pro statistickou analýzu dat.

Tento postup byl zvolen za účelem normalizace dat a snížení entropie výsledků, která mohla být ovlivněna faktory jako operační podmínky, odpor elektrod či spojovací kabely. Kromě toho jsme pro analýzu dynamických vztahů mezi různými frekvenčními složkami EEG vypočetili poměr PSD mezi pásmy alpha/theta a gama/theta.

2.1.7.2 Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byly shromážděny údaje týkající se detekce záchvatů, včetně počtu nevyprovokovaných elektrografických záchvatů, průměrné délky jejich trvání a průměrného počtu epizod. Pro výše uvedené parametry byl použit Studentův t-test. Jednofaktorová analýza (One-Way ANOVA) s následným Sidakovým post-hoc testem byla použita pro statistické porovnání výskytu hrotů. Dvoucestná analýza rozptylu (Two-Way ANOVA) s Tukeyho post-hoc testem byla použita pro statistickou analýzu změn spektrální hustoty EEG pásem.

Veškeré analýzy byly provedeny pomocí programu GraphPad Prism v9 (GraphPad, USA).

Hladina statistické významnosti byla stanovena * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Data prezentována jako průměr a standardní odchylka od průměru (SEM) a průměr a standardní odchylka (SD). Viz v popiscích k jednotlivým grafům.

2.2 Výsledky

Praktická část této diplomové práce byla zaměřena na analýzu EEG záznamů u mláďat potkanů s cílem sledovat vývoj a charakter epileptiformní aktivity v modelu fokální ischemie, navozené injekcí ET-1 do hippocampu. Celkem bylo analyzováno EEG 27 zvířat rozdělených do skupin podle věku a podle aplikované látky.

Experimentální potkani byli rozděleni do dvou věkových skupin: P12 (12 dní po narození) a P25 (13 dní po intrahipokampální infuze ve věku P12). Každá věková skupina byla dále rozdělena na dvě podskupiny – experimentální skupinu, které byla aplikována látka ET-1, a kontrolní skupinu, jež dostala fosfátový pufr (PBS). Přehledné rozdělení skupin a počet zvířat v jednotlivých podskupinách jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4 Rozdělení zvířat použitých pro analýzu EEG záznamů.

	P12	P12+13
ET-1	9	6
PBS	6	6

Druhá část praktické části diplomové práce byla zaměřena na sledování aktivity vápníku v průběhu fokální ischemie. Za tímto účelem byla vytvořena další skupina zvířat, která byla rozdělena na dvě podskupiny. Obě podskupiny obdržely ve věku P5 virální vektor (jeho aplikace je popsána výše v kapitole 2.2.4).

Ve věku P12 byla zvířatům chirurgicky implantována optická sonda pro snímání změn koncentrace vápníku. Následně byla tato skupina rozdělena na dvě části: jedna podskupina obdržela stejnou dávku endotelinu-1 jako skupiny určené pro EEG monitorování, zatímco druhé byla aplikována PBS a sloužila jako kontrolní skupina.

Přehledné rozdělení skupin se záznamem aktivity vápníku je uvedeno v Tabulce 5.

Tabulka 5 Ukázka rozdělení zvířat pro zkoumání aktivit vápníku.

	P12
ET-1	3
PBS	2

Přehled výskytu epileptických záchvatů napříč různými věkovými kategoriemi

Nejprve jsme u každé skupiny zvířat vyhodnotili celkový výskyt záchvatové aktivity během dvouhodinového záznamu u skupiny P12 a čtyřhodinového záznamu u skupiny P25, abychom získali základní přehled o výskytu epileptogenní aktivity v různých věkových kategoriích.

Generalizované elektrografické záchvaty byly zaznamenány u všech devíti zvířat ze skupiny P12, kterým byla podána látka ET-1. Podobný trend byl pozorován i ve skupině P25.

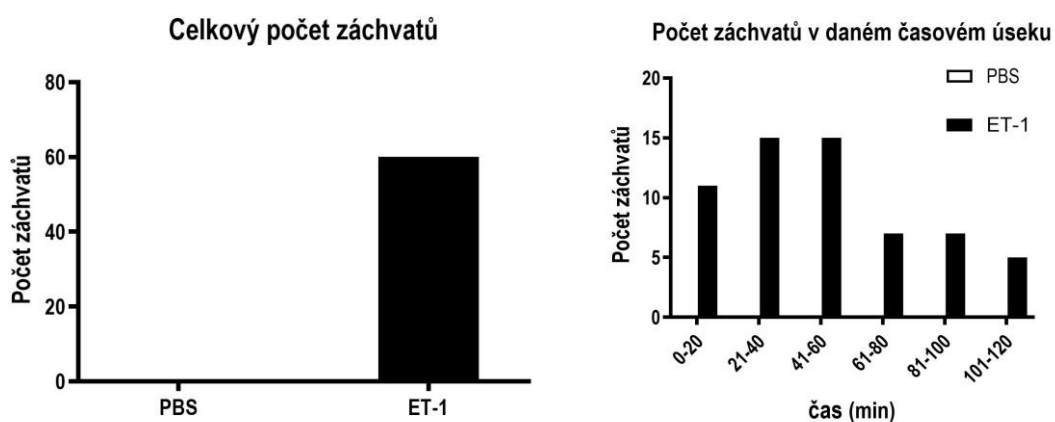
V souladu s předchozími studiemi (Tsenov et al. 2015; Vondráková et al. 2020) vedla intrahippokampální infuze ET-1 ke vzniku záchvatů u všech zvířat ve sledovaných experimentálních skupinách. V kontrolní skupině, které bylo aplikováno pouze vehikulum (PBS), nebyly záchvaty zaznamenány – vyskytly se pouze ojedinělé výboje a krátké série komplexů typu výboj– pomalá vlna s trváním kratším než 1 sekunda. Tyto jevy byly přítomné během celého záznamu a začínaly již před infuzí PBS. Jejich charakter naznačuje, že pravděpodobnou příčinou je akutní operační zákrok a mechanické poškození tkáně v důsledku implantaci elektrod

Naopak experimentální skupina s aplikací ET-1 vykazovala konzistentní výskyt elektrografických záchvatů. Každé zvíře z obou experimentálních skupin zaznamenalo alespoň jeden záchvat během monitorování. Po infuzi ET-1 byly pozorovány prodloužené série „polyspike“ a „spike-wave“ aktivity. Záchvaty byly lokalizovány výhradně v oblasti hipokampu a

bez výrazné propagace do senzomotorické kůry, což vysvětluje absenci motorických projevů (křečí).

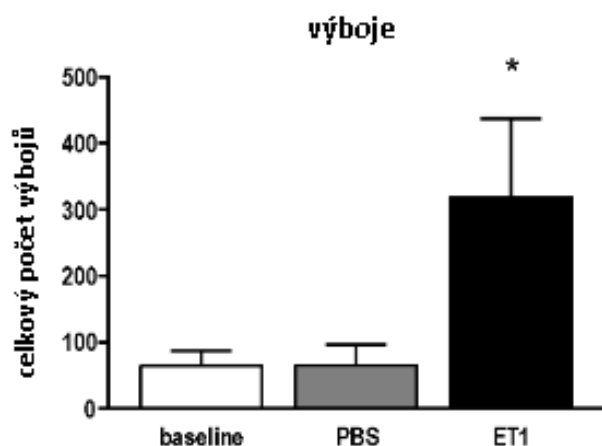
Elektrografické záchvaty byly pozorovány výhradně u zvířat s aplikací ET-1, nikdy však v kontrolní skupině (obrázek 9 a 10).

Skupina P12



Obr. 9 Analýza epileptické aktivity ve skupině P12 po aplikaci ET-1. Grafy znázorňují **(Vlevo)** celkový počet záchvatů, údaje jsou uvedeny jako průměr a SEM. **(Vpravo)** (směrodatná chyba průměru). Počet záchvatů (průměr + SEM) v jednotlivých časových úsecích (20min bloky) během dvouhodinového záznamu EEG u skupiny potkanů ve stáří P12 po intrahipokampální aplikaci ET-1 (černé sloupce). Záchvatová aktivita začíná brzy po aplikaci látky a dosahuje maxima mezi 21. a 60. minutou. V pozdějších fázích dochází k postupnému poklesu četnosti záchvatů. Skupina s aplikací PBS (kontrola) nevykazovala žádnou epileptiformní aktivitu. Data ukazují dynamiku výskytu záchvatů v čase po indukci ischemie.

Porovnání výskytu epileptiformní aktivity ve formě ostrých hrotů („spike“ aktivity) před aplikací látky a po ní bylo provedeno pouze u skupiny P12. Intrahipokampální infuze ET-1 významně zvýšila počet hrotů v EEG v porovnání s EEG kontrolní skupiny ($p < 0,05$).



Obr. 10. Celkový počet epileptiformních výbojů během bazálního záznamu a po aplikaci látek u skupiny P12. Sloupcový graf znázorňuje průměrný počet epileptiformních výbojů zaznamenaných během třicetiminutového bazálního EEG záznamu (baseline), po aplikaci PBS (kontrolní skupina) a po aplikaci ET-1 (experimentální skupina). Skupina ET-1 vykazuje statisticky signifikantně vyšší výskyt výbojů ve srovnání s ostatními skupinami ($p < 0,05$, označeno hvězdičkou). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr + SEM.

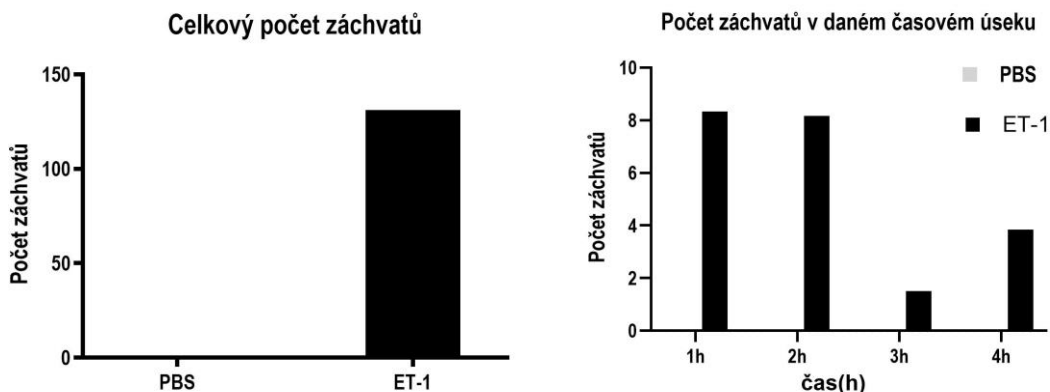
Skupina P25

Skupina P25 byla využita jako model výskytu generalizovaných epileptických záchvatů po ukončení hlavní fáze epileptogeneze. Zvířata podstoupila čtyřhodinové EEG monitorování, přičemž získaná data byla analyzována z hlediska celkového počtu záchvatů, průměrného trvání jednotlivých záchvatů a celkové délky záchvatové aktivity.

Podobně jako u mladších zvířat (skupina P12) vedla intrahipokampální aplikace ET-1 ke vzniku elektrografických záchvatů u všech jedinců. Ve skupině PBS se žádné záchvaty nevyskytly. Přestože obě věkové skupiny reagovaly na ET-1 epileptiformní aktivitou, bylo možné pozorovat výrazné rozdíly jak v celkovém množství záchvatů, tak v jejich časovém rozložení.

Ve skupině P25 bylo během čtyřhodinového záznamu zaznamenáno více než 130 záchvatů, což je téměř dvojnásobek oproti skupině P12, u které bylo během dvouhodinového záznamu zaznamenáno přibližně 70 záchvatů. Rozdíly byly patrné také v časovém průběhu –

zatímco ve skupině P12 byl výskyt záchvatů nejvyšší mezi 20. a 60. minutou, u skupiny P25 byla aktivita relativně konstantní během prvních dvou hodin, následně došlo k jejímu poklesu a v poslední (čtvrté) hodině se mírně obnovila (obrázek 11). Tato pozorování naznačují věkově závislé rozdíly v dynamice epileptiformní aktivity po ischemickém poškození.



Obr. 11 Analýza epileptické aktivity ve skupině P25 po aplikaci ET-1. **(Vlevo)** Celkový počet záchvatů dvě hodiny po infuzi léku u ischemické skupiny P25. Údaje jsou uvedeny jako průměry za hodinu. Počet záchvatů zaznamenaných v jednotlivých hodinách během čtyřhodinového EEG záznamu u skupiny potkanů P25 po aplikaci ET-1 (černé sloupce). V kontrolní skupině s aplikací PBS (šedé sloupce) nebyla epileptiformní aktivita zaznamenána. **(Vpravo)** Graf znázorňuje počet záchvatů v jednotlivých hodinových intervalech během čtyřhodinového záznamu EEG. U skupiny s aplikací ET-1 byl výskyt záchvatů nejvyšší během prvních dvou hodin, následně klesl a ve čtvrté hodině došlo k mírnému obnovení aktivity. V kontrolní skupině PBS se žádné záchvaty nevyskytly.

Analýza spektrální hustoty výkonu (PSD)

Za účelem hlubšího porozumění problematice perinatální fokální ischemie byla provedena doplňující analýza dříve získaných EEG záznamů. Všechny záznamy byly zpracovány metodou PSD, přičemž podrobný popis postupu analýzy je uveden v kapitole 2.1.4.

Skupina P12 zahrnovala dvouhodinové EEG záznamy, zatímco u skupiny P25 byly analyzovány čtyřhodinové záznamy. Vzhledem k této rozdílné délce monitorování se v níže uvedených výsledcích objevují určité odlišnosti, které je nutné zohlednit při jejich interpretaci.

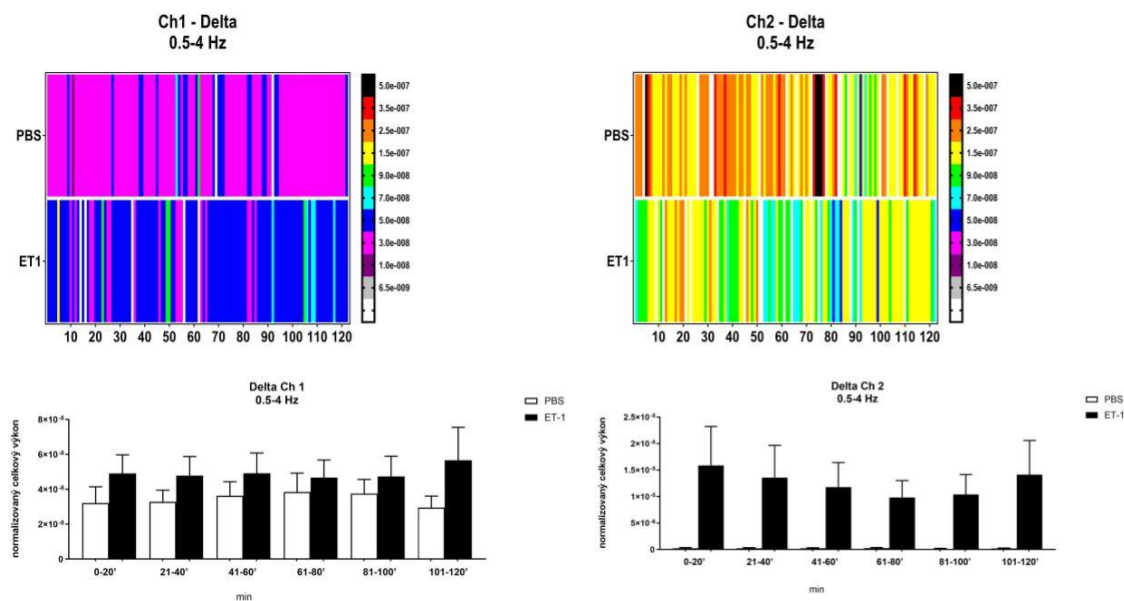
Výkonové spektrální hustoty (PSD) jednotlivých frekvenčních pásem

Skupina P12 – akutní

Ve skupině P12 bylo hlavním cílem práce podrobné sledování změn EEG signálu v čase. Proto jsme se zaměřili na detailní analýzu záznamů pomocí spektrální hustoty výkonu (PSD). Pro lepší přehled o výskytu epileptiformní aktivity byly vytvořeny tepelné mapy, které znázorňují rozložení PSD v jednotlivých frekvenčních pásmech v rámci jednoho minutového intervalu. Tento typ grafického zobrazení umožňuje detailně sledovat časový vývoj aktivity v jednotlivých frekvenčních pásmech a poskytuje důležité informace o průběhu akutní epileptiformní aktivity v kontextu fokální ischemie.

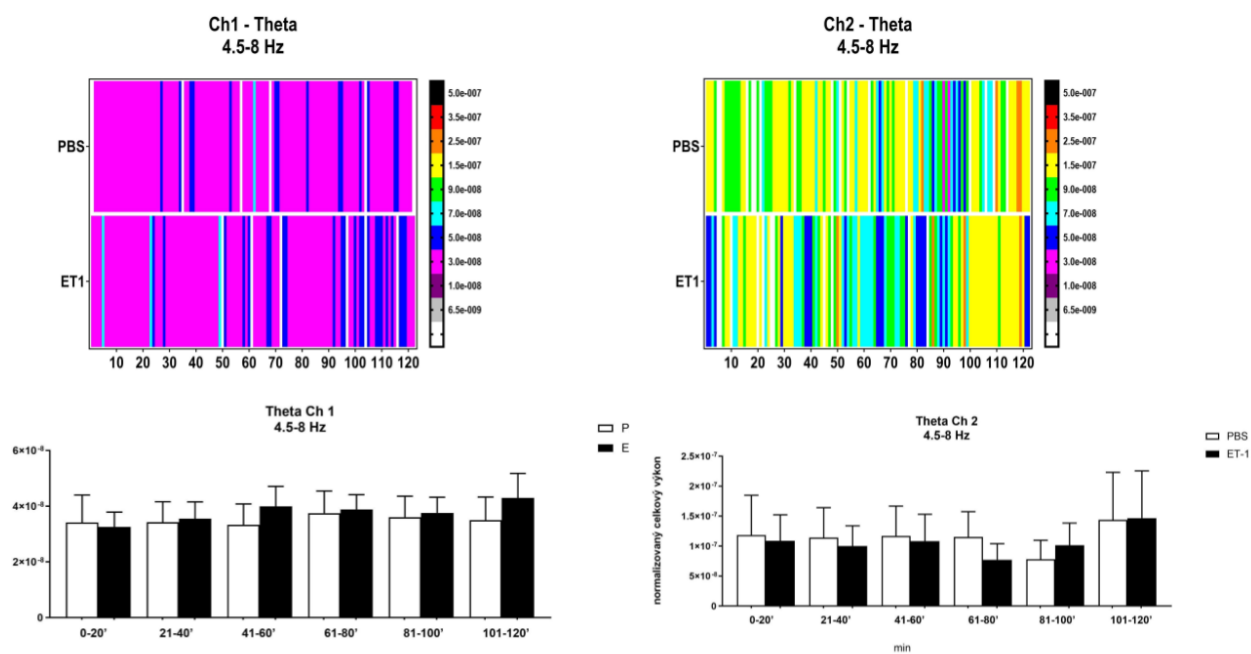
Grafické výstupy z těchto analýz jsou uvedeny na Obrázcích 12–16. Každý obrázek obsahuje čtyři části. Dva horní grafy znázorňují průměrnou PSD aktivitu během jednoho minutového úseku pro každou experimentální podskupinu – ET-1 a PBS – a to samostatně pro kanál Ch1 (kůra) a Ch2 (hipokampus). Spodní grafy porovnávají změny v jednotlivých frekvenčních pásmech v obou kanálech (Ch1 a Ch2) ve dvacetiminutových časových úsecích. Podle předchozích studií (Vondráková et al. 2020) právě tento časový rámec nejlépe odhaluje rozdíly ve výskytu epileptiformní aktivity.

Delta 0.5–4 Hz



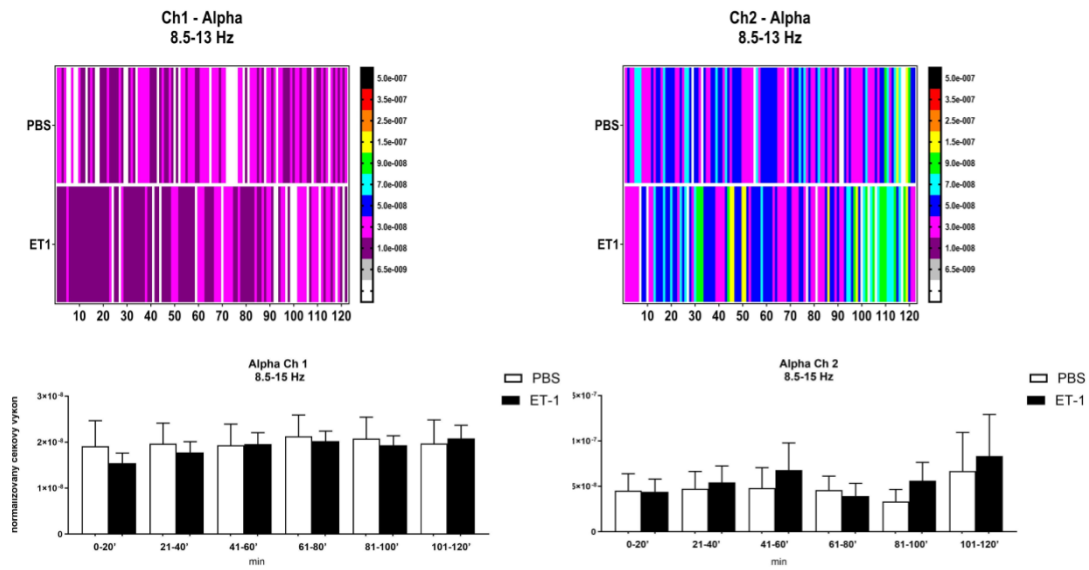
Obr. 12 Horní část obrázku zobrazuje tepelné mapy průměrného spektrálního výkonu v delta frekvenčním pásmu (0,5–4 Hz) pro jednotlivé minutové úseky během 120minutového EEG záznamu. Levý panel znázorňuje aktivitu v kanálu Ch1 (kůra), pravý panel v kanálu Ch2 (hipokampus). U každého kanálu je horní řádek mapy tvořen daty z kontrolní skupiny (PBS) a spodní řádek daty ze skupiny s aplikací ET-1. Barevná škála reprezentuje intenzitu normalizovaného spektrálního výkonu. Spodní část obrázku obsahuje sloupcové grafy znázorňující průměrný normalizovaný výkon v delta pásmu, zprůměrovaný po dvacetiminutových časových úsecích. Levý graf odpovídá kanálu Ch1 (kůra), pravý kanálu Ch2 (hipokampus). Černé sloupce označují skupinu ET-1, bílé sloupce kontrolní skupinu (PBS). Statisticky významné rozdíly byly hodnoceny pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA) s Tukeyho post-hoc testem. V žádném z analyzovaných časových intervalů nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi skupinami ($F = 0,14$; $p = 0,9804$; ns) a neprokázaly signifikantní vliv času ($F(1,56; 36,47) = 1,909$, ns). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr + SEM.

Theta 4.5–8 Hz



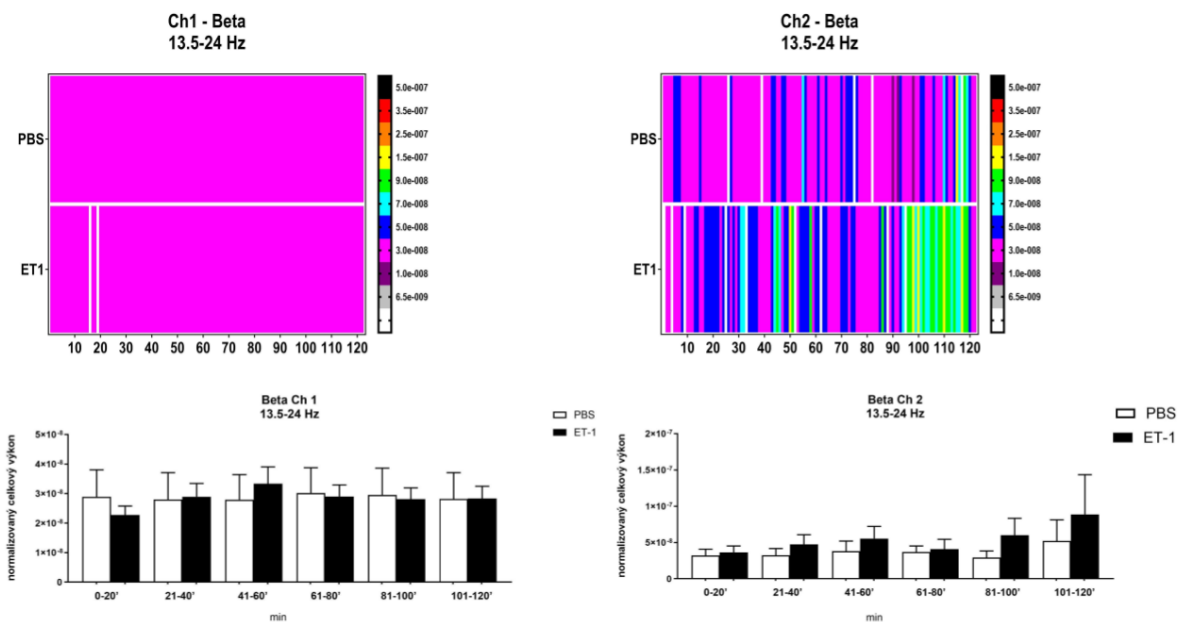
Obr. 13 Zobrazení je strukturováno stejně jako na Obrázku 12. Výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (*Two-Way ANOVA*) s Tukeyho post-hoc testem neprokázala žádný signifikantní statisticky významný efekt času ($F(2,521; 6,827) = 0,4109, p = 0,6506$), ani interakce mezi časem a skupinou ($F(1,547; 12,59) = 3,430, p = 0,1295$).

Alpha 8.5-13 Hz



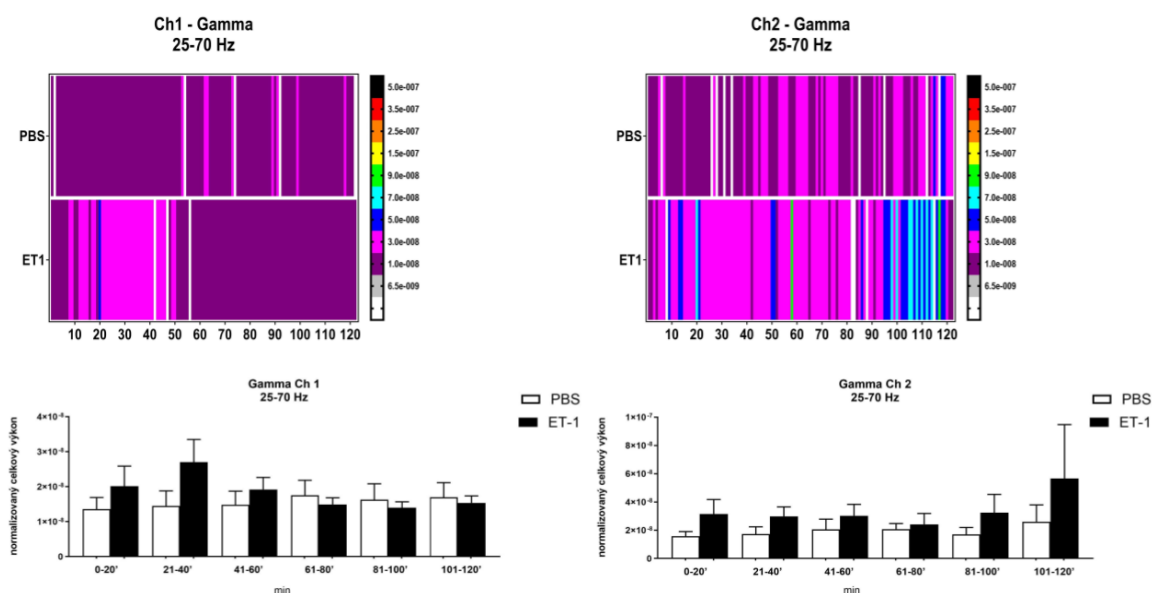
Obr. 14 Zobrazení je strukturováno stejně jako na Obrázku 12. Výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (*Two-Way ANOVA*) neprokázaly signifikantní vliv času ($F(4,002; 39,78) = 2,418, p > 0,05$), ale ukázaly významný rozdíl mezi skupinami ($F(1,15) = 2,024, p < 0,05$). Post-hoc test dle Tukeyho potvrdil statisticky významný rozdíl mezi skupinami v Ch2.

Beta 13.5–24 Hz



Obr. 15 Zobrazení strukturované jako na Obrázku 12. Výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (*Two-Way ANOVA*) neprokázaly statisticky významné jak pro faktor času ($F(14, 65) = 3,585, p < 0,05$), ale prokázaly pro faktor skupiny ($F(1, 6) = 57,621, p = 0,0002$). Post-hoc test dle Tukeyho potvrdil statisticky významný rozdíl mezi skupinou PBS a skupinou s aplikací ET-1 ($p < 0,001$) v Ch2.

Gamma 25—70 Hz



Obr. 16 Zobrazení je strukturováno stejně jako na Obrázku 12. Statistická analýza pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (*Two-Way ANOVA*) odhalila významné rozdíly jak pro faktor času ($F(17, 26) = 3,275$; $p < 0,0001$), tak pro faktor skupiny ($F(1, 4) = 49,82$; $p = 0,0002$). *Post-hoc test* podle Tukeyho potvrdil statisticky významný rozdíl mezi skupinami PBS a ET-1 ($p < 0,05$).

Pro celkový přehled provedených analýz byly vytvořeny Tabulka č.6 a Tabulka č. 7, které shrnují změny v chování jednotlivých frekvenčních pásem v průběhu celého 120minutového záznamu EEG. Tyto tabulky uvádějí statisticky významné rozdíly v aktivitě EEG ve skupině s aplikací ET-1 ve srovnání s kontrolní skupinou PBS.

Jak bylo zmíněno výše, hlavním cílem této práce bylo nalézt potenciální diagnostická kritéria pro jednoduché, neinvazivní a včasné stanovení perinatální fokální ischemie. Tabulka 6 (shrnuje signifikantní změny spektrální hustoty výkonu v kanálu Ch1, který odpovídá aktivitě v oblasti kůry) a 7 (obsahuje přehled výsledků pro kanál Ch2, odpovídající aktivitě v oblasti hipokampu) mohou sloužit jako první náznak možných biomarkerů.

Tabulka 6. Přehled signifikantních změn spektrálního výkonu v jednotlivých frekvenčních pásmech ve skupině ET-1 v porovnání s kontrolní skupinou PBS během 120minutového EEG záznamu v kortexu (Ch1) ve skupině P12.

Časový interval v minutách	Delta	Theta	Alpha	Beta	Gamma
0–20					↑
21–40	↓			↑	↑
41–60	↓			↑	↑
61–80	↓				↑
81–100			↑	↑	↑
101–120	↓			↑	↑

Šipky označují směr změny spektrálního výkonu (↑ = signifikantní zvýšení, ↓ = signifikantní snížení). Šedě vyznačená pole označují časové úseky bez signifikantních rozdílů. Analýza byla provedena zvlášť pro každé frekvenční pásmo v šesti dvacetiminutových úsecích pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA), $p < 0,05$.

Infuze ET-1 vedla k významnému poklesu aktivity v delta (1,2–4 Hz) a theta (4–7 Hz) pásmu, především během prvních 80 minut po aplikaci, což může reflektovat dynamiku akutní

fáze ischemického poškození kůry Naopak došlo ke zvýšení aktivity v beta (13,5–24 Hz) a gamma (25–70 Hz) frekvenčních pásmech, a to převážně ve všech časových intervalech po infuzi ET-1.

Tabulka 7. Přehled signifikantních změn spektrálního výkonu v jednotlivých frekvenčních pásmech ve skupině ET-1 v porovnání s kontrolní skupinou PBS během 120minutového EEG záznamu v hipokampu (Ch2) ve skupině P12.

Časový interval v minutách	Delta	Theta	Alpha	Beta	Gamma
0–20	↑		↓	↓	↑
21–40	↑		↓		↑
41–60	↑	↑		↑	↑
61–80	↑				↓
81–100	↑				↓
101–120	↑	↑			

Šipky označují směr změny spektrálního výkonu (↑ = signifikantní zvýšení, ↓ = signifikantní snížení). Šedě vyznačená pole označují časové úseky bez signifikantních rozdílů. Analýza byla provedena zvlášť pro každé frekvenční pásmo v šesti dvacetiminutových úsecích pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA), $p < 0,05$.

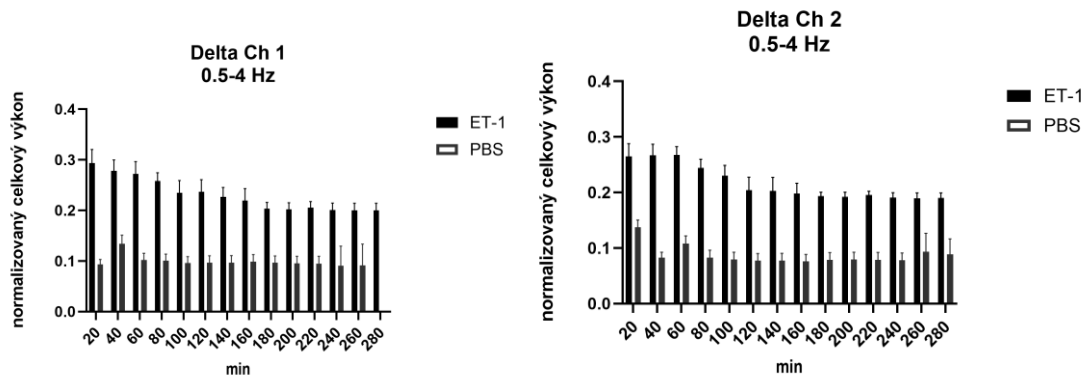
Na rozdíl od výsledků v kanálu Ch1 (kůra), kde byl zaznamenán pokles delta aktivity, intrahipokampální podání ET-1 vedlo k významnému zvýšení výkonu v delta pásmu napříč celým záznamem. V intervalu 21–40 minut zůstala alpha aktivita snižená a v období 41–60 minut byl pozorován výrazný nárůst a beta aktivity. V gamma pásmu byl zaznamenán nárůst aktivity během prvních 60 minut, následovaný výrazným poklesem v intervalu 60–100 minut. Tyto změny mohou odrážet odlišnou časoprostorovou dynamiku ischemického postižení hipokampu.

Skupina P25

Jedním z klíčových cílů této práce bylo nalézt nová diagnostická kritéria pro časné a neinvazivní odhalení perinatální fokální ischemie. Tato studie je první, která se zaměřila na zkoumání krátkodobých následků fokální ischemie v perinatálním období. Cílem bylo ověřit, zda i s krátkým časovým odstupem po ischemické události dochází k epileptogeneze a jak se mění aktivita v jednotlivých frekvenčních pásmech.

Stejně jako v případě analýzy PSD u skupiny P12 jsme i zde analyzovali spektrální výkon v jednotlivých frekvenčních pásmech v kanálech Ch1 (kůra) a Ch2 (hipokampus), a to samostatně pro kontrolní skupinu (PBS) a pro experimentální skupinu s aplikací ET-1. Výsledky této analýzy jsou shrnuty na Obrázcích 17–21.

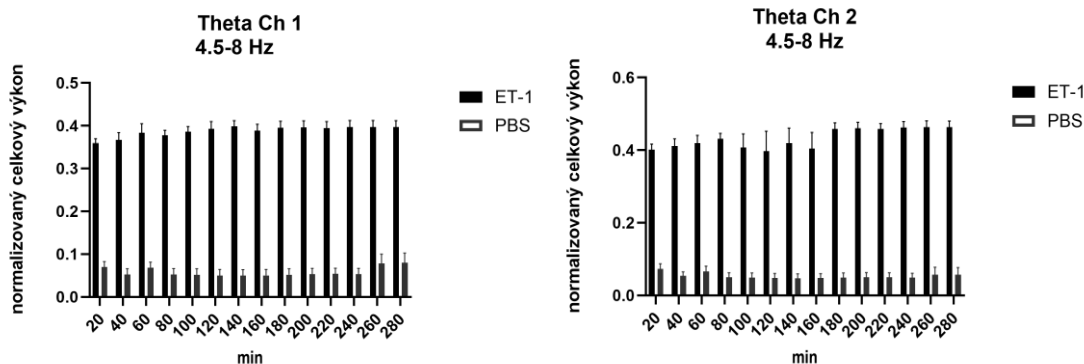
Delta 0,5-4 Hz



Obr. 17. Změny v delta pásmu u P25, t.j.13 dni po intrahipokampální infuzi (průměr + SEM).

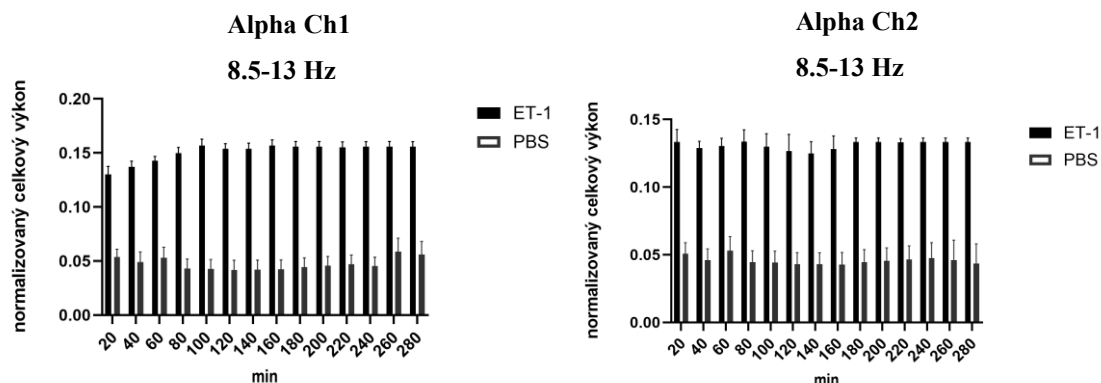
Výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA) statisticky významné jak pro faktor času ($F(3,927; 46,52) = 4,637, p = 0,0033$), tak pro faktor skupiny ($F(1,12) = 57,52, p < 0,0001$). Post-hoc test dle Tukeyho potvrdil statisticky významný rozdíl mezi skupinou PBS a skupinou s aplikací ET-1 ($p < 0,05$).

Theta 4,5-8 Hz



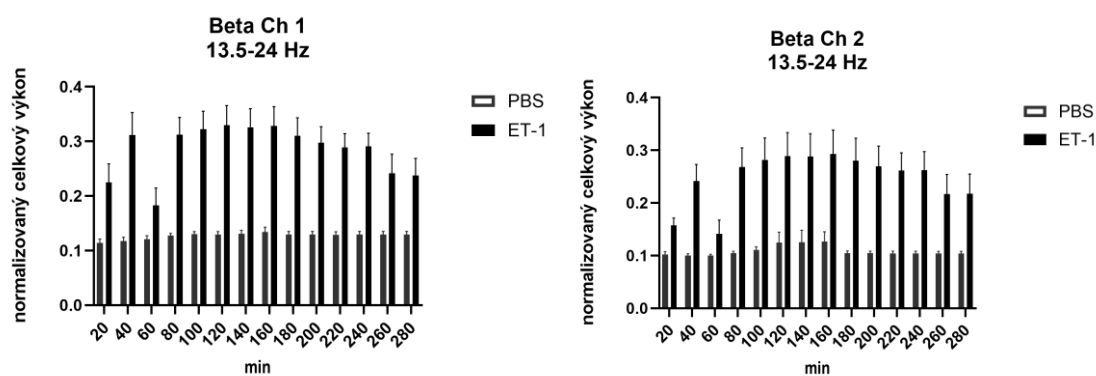
Obr. 18. Změny v theta pásmu u P25, t.j. 13 dní po intrahipokampální infuzi (průměr + SEM). Ve frekvenčním pásmu theta byly výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA) statisticky významné jak pro faktor času ($F(13, 78) = 6,845, p < 0,0001$), tak pro faktor skupiny ($F(1, 6) = 94,41, p < 0,0001$) a také pro interakci čas \times skupina ($F(13, 70) = 1,894, p = 0,0456$). Post-hoc test dle Tukeyho potvrdil statisticky významný rozdíl mezi skupinou PBS a skupinou s aplikací ET-1 ($p < 0,05$).

Alpha 8,5-13 Hz



Obr. 19. Změny v *alpha* pásmu u P25, t.j.13 dni po intrahipokampální infuzi (průměr + SEM). Výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (*Two-Way ANOVA*) neprokázaly signifikantní vliv času ($F(3,995; 45,48) = 2,309, p > 0,05$), ale ukázaly významný rozdíl mezi skupinami ($F(1,12) = 122,4, p < 0,05$). *Post-hoc* test dle Tukeyho potvrdil statisticky významný rozdíl mezi skupinami v obou mozkových oblastech.

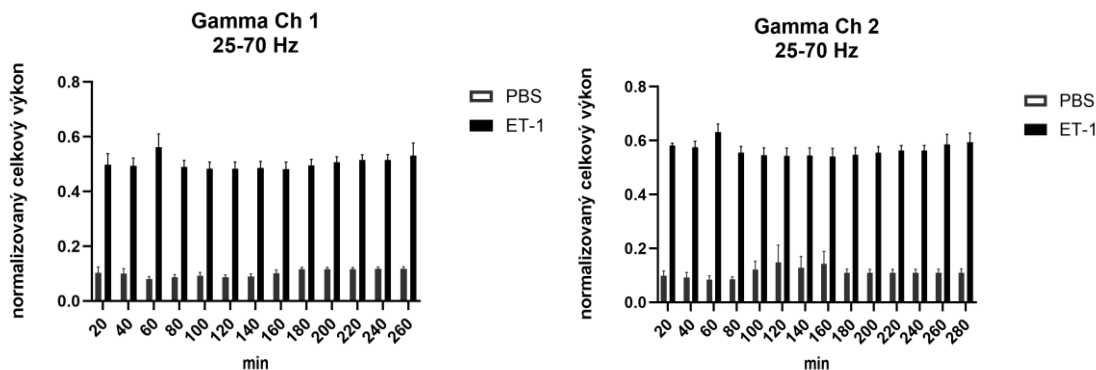
Beta 13,5-24 Hz



Obr. 20. Změny v *beta* pásmu u P25, t.j.13 dni po intrahipokampální infuzi (průměr + SEM). Ve frekvenčním pásmu *beta* byly výsledky dvoucestné analýzy rozptylu (*Two-Way ANOVA*) statisticky významné jak pro faktor času ($F(13, 78) = 4,565, p < 0,0001$), tak pro faktor skupiny ($F(1, 6) =$

69,71, $p = 0,0002$). Post-hoc test dle Tukeyho potvrdil statisticky významný rozdíl mezi skupinou PBS a skupinou s aplikací ET-1 ($p < 0,05$).

Gamma 25-70 Hz



Obr. 21. Změny v gamma pásmu u P25, t.j. 13 dní po intrahipokampální infuzi (průměr + SEM). Ve frekvenčním pásmu gamma nebyl zjištěn statisticky významný efekt času ($F(1,321; 7,927) = 0,3009$, $p = 0,6605$) ani interakce mezi časem a skupinou ($F(1,947; 10,49) = 2,630$, $p = 0,1195$). Byl však zaznamenán velmi silný statisticky významný rozdíl mezi skupinou PBS a skupinou s aplikací ET-1 ($F(1,000; 6,000) = 310,1$, $p < 0,0001$).

Za účelem získání uceleného přehledu o změnách spektrální aktivity v průběhu čtyřhodinového EEG záznamu ve skupině P25 byla sestavena Tabulka 8 a tabulka 9. Tyto tabulky poskytují souhrn statisticky významných rozdílů ve výkonové spektrální hustotě jednotlivých frekvenčních pásem mezi skupinou s aplikací ET-1 a kontrolní skupinou PBS.

Výsledky zachycují vývoj EEG aktivity v čase v kanálu Ch1 (kůra, Tabulka 8) a kanálu Ch2 (hipokampus, Tabulka 9) a umožňují sledovat dynamiku změn v jednotlivých pásmech během celého sledovaného období.

Tabulka 8 Tabulka shrnuje signifikantní změny výkonové spektrální hustoty v jednotlivých frekvenčních pásmech ve skupině ET-1 v porovnání s kontrolní skupinou PBS během čtyřhodinového EEG záznamu v kortexu (Ch1) ve skupině P25.

Časový interval v minutách	Delta	Theta	Alpha	Beta	Gamma
0-20	↑		↑	↑	↑
21-40	↑		↑	↓	↑
41-60	↑		↑	↑	↑
61-80				↓	
81-100					
101-120					
121-140		↓			
141-160		↓			
161-180		↓			
181-200					
201-220					
221-240					
241-260					
261-280					

Šipky označují směr změny spektrálního výkonu (↑ = signifikantní zvýšení, ↓ = signifikantní snížení), šedě vyznačená pole představují časové úseky bez signifikantních rozdílů. Analýza byla provedena zvlášť pro každé frekvenční pásmo v šesti dvacetiminutových úsecích pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA), $p < 0,05$.

Ve sledovaném období bylo zaznamenáno významné zvýšení výkonu v delta pásmu v časovém intervalu 0–60 minut, přičemž obdobné zvýšení bylo pozorováno také v pásmu alpha. V beta pásmu byl výkon signifikantně zvýšen ve dvou úsecích: v čase 0–20 minut a mezi 40–60 minutami. Naopak, výrazné snížení výkonu bylo zaznamenáno v intervalu 20–40 minut a 60–80 minut. Zvýšený výkon v theta pásmu byl zaznamenán v pozdější fázi záznamu, konkrétně mezi 140–200 minutami. V gamma pásmu bylo detekováno významné zvýšení výkonu v časovém intervalu 0–60 minut.

Tabulka 9. Přehled statisticky významných změn výkonové spektrální hustoty v jednotlivých pásmech mezi skupinou s aplikací ET-1 a kontrolní skupinou s PBS během čtyřhodinového EEG záznamu v hipokampu (Ch2) ve skupině P25.

Časový interval v minutách	Delta	Theta	Alpha	Beta	Gamma
0-20			↑		↑
21-40			↑		↑
41-60			↑		↑
61-80	↓			↓	↓
81-100	↓				
101-120	↓				
121-140					
141-160					
161-180		↑			
181-200					
201-220					
221-240					
241-260					
261-280					

Šipky označují směr změny spektrálního výkonu (↑ = signifikantní zvýšení, ↓ = signifikantní snížení), zatímco šedá pole znázorňují časové úseky bez zaznamenaných rozdílů. Analýza byla provedena zvláště pro každé frekvenční pásmo v šesti dvacetiminutových úsecích pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA), $p < 0,05$.

Ve srovnání se skupinou PBS vykazovala skupina ET-1 signifikantní snížení aktivity v delta pásmu v intervalu 80–120 minut. V pásmu theta bylo pozorováno zvýšení výkonu mezi 161–180 minutami, zatímco v pásmu alpha došlo ke zvýšení v časném období 0–60 minut. V beta pásmu bylo zaznamenáno zvýšení výkonu v intervalu 61–80 minut. V gamma pásmu byl výkon výrazně zvýšen během prvních 60 minut, následovaný poklesem mezi 61–80 minutami.

Poměr frekvenčních pásem

Jak již bylo uvedeno výše, jednou z běžně využívaných metod pro diagnostiku ischemie je analýza EEG záznamů. Změny v jednotlivých frekvenčních pásmech mohou být indikátorem patologické aktivity, nicméně samostatná hodnota spektrálního výkonu v jednom pásmu často neposkytuje dostatečně specifické informace pro spolehlivou diagnostiku.

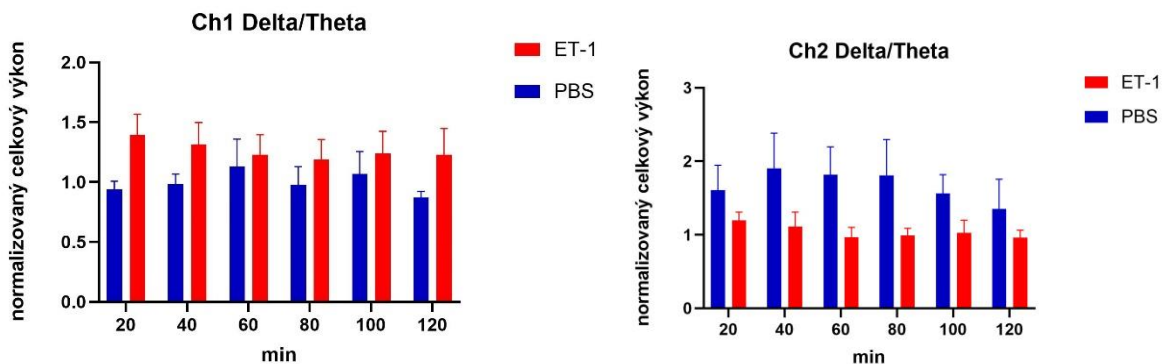
Z tohoto důvodu jsme přistoupili k analýze poměrů mezi jednotlivými frekvenčními pásmy (delta/theta, alpha/theta, gamma/theta), s cílem zvýšit výpovědní hodnotu EEG analýzy a identifikovat potenciálně přesnější biomarkery ischemického poškození mozku.

Použití poměrů frekvenčních pásem jako diagnostického nástroje je běžné například i při hodnocení úrovně vědomí, pozornosti nebo neurodegenerativních změn (Ben-Ari Y. et al., 2014) a je považováno za citlivější přístup než hodnocení jednotlivých pásem izolovaně. V naší práci jsme tento přístup aplikovali na model perinatální fokální ischemie s cílem ověřit jeho potenciál pro časnou detekci patologické aktivity.

Pro znázornění výsledků analýzy poměrů mezi jednotlivými frekvenčními pásmy jsme připravili grafické výstupy, které jsou uvedeny na obrázcích 22 až 24 pro skupinu P12 a na obrázcích 25 až 27 pro skupinu P25.

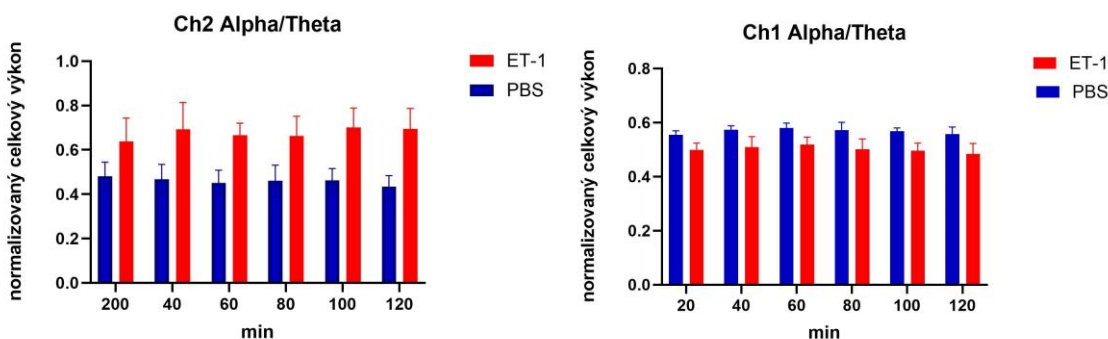
Skupina P12-akutnií

Delta/theta poměr



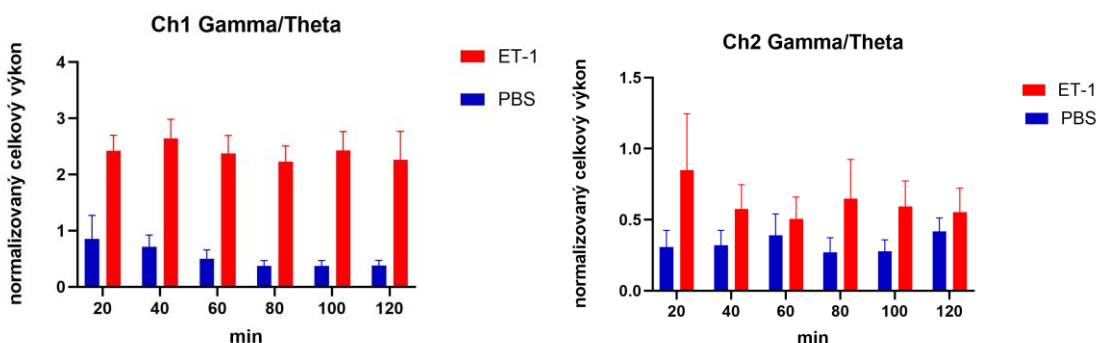
Obr. 22. Poměr výkonu mezi delta a theta u skupin s aplikací PBS (modře) a ET-1 (červeně), zvlášt' v kůře (Ch1) a hipokampu (Ch2). Data jsou prezentována jako průměr + směrodatná odchylka. V kůře (Ch1) odhalila dvoucestná analýza rozptylu (Two-Way ANOVA) statisticky významnou interakci mezi faktory čas \times skupina ($F(5, 40) = 3,016$; $p = 0,0211$), přičemž hlavní efekt skupiny ani času statistické významnosti nedosáhl ($p > 0,05$). Významný byl také vliv individuálních rozdílů mezi zvířaty ($F(8, 40) = 4,589$; $p = 0,0005$). V hipokampu (Ch2) nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly — ani v efektu času ($F(13, 78) = 0,4210$; $p = 0,9578$), ani ve skupinovém efektu ($F(1, 6) = 4,729$; $p = 0,0726$), ani v interakci čas \times skupina ($F(13, 70) = 0,8169$; $p = 0,6408$).

Alpha/theta poměr



Obr. 23 Poměr výkonu mezi alpha a theta. Popis jako na Obr. 22. V kůře (Ch1) neodhalila dvoucestná analýza rozptylu (Two-Way ANOVA) žádné statisticky významné rozdíly. Nebyla potvrzena ani interakce čas × skupina ($F(4, 32) = 0,8098$; $p = 0,5282$), ani hlavní efekt času ($F(1,588; 12,70) = 0,4631$; $p = 0,5962$) či skupiny ($F(1, 8) = 1,962$; $p = 0,1989$). V hipokampu (Ch2) nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly. Ani efekt času ($F(15, 68) = 0,5320$, $p = 0,8968$), ani efekt skupiny ($F(1, 5) = 5,128$, $p = 0,0827$), ani interakce čas × skupina ($F(14, 60) = 0,9067$, $p = 0,5507$) nedosáhly statistické významnosti.

Gamma/theta poměr

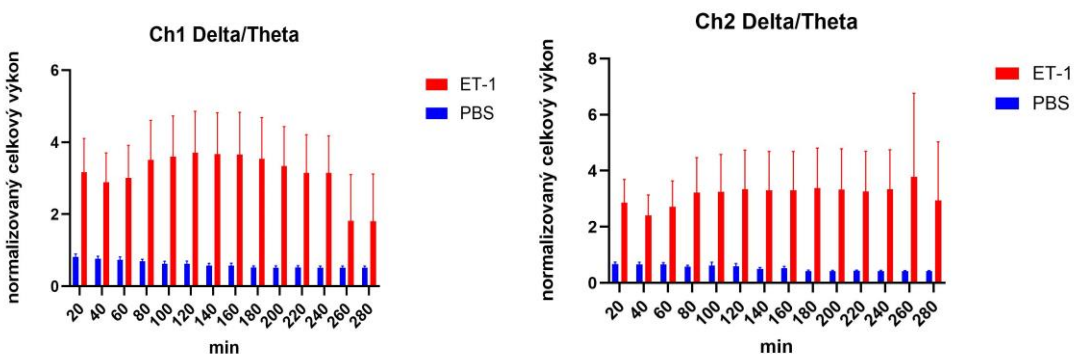


Obr. 24. Poměr výkonu mezi gamma a theta. Popis jako na Obr. 22. Dle výsledků dvoucestné analýzy rozptylu (Two-Way ANOVA) byly v kanálu Ch1 zjištěny vysoce signifikantní rozdíly. Prokázána byla významná interakce mezi časem a skupinou ($F(5, 48) = 17,46$; $p < 0,0001$), hlavní

efekt času ($F(5, 48) = 20,95; p < 0,0001$) a rovněž hlavní efekt skupiny ($F(1, 48) = 49,03; p < 0,0001$). V kanálu (Ch2) odhalila dvoucestná analýza rozptylu pro opakovaná měření (Two-Way ANOVA) statisticky významnou interakci čas \times skupina ($F(5, 40) = 2,618; p = 0,0387$) a hlavní efekt času ($F(1, 929; 15,43) = 4,044; p = 0,0399$). Hlavní efekt skupiny nebyl statisticky významný ($F(1, 8) = 0,0578; p = 0,8160$).

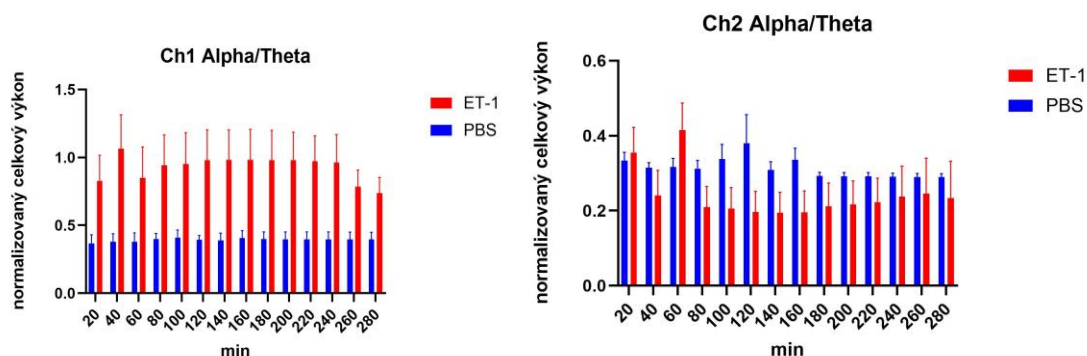
Skupina P25

Delta/theta poměr



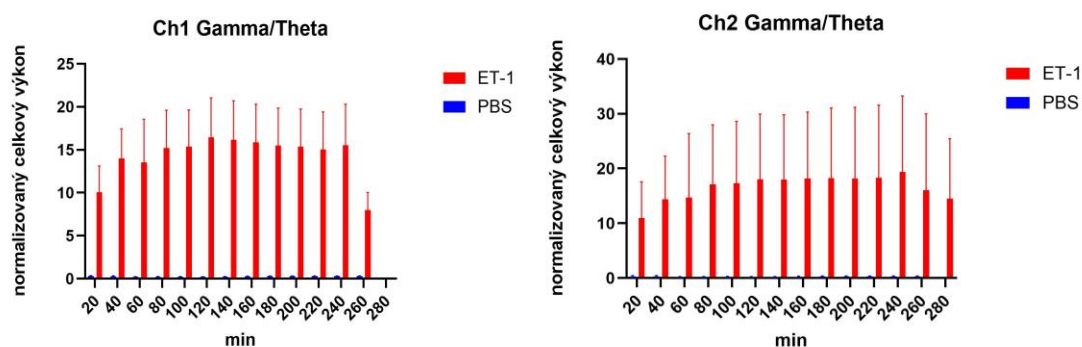
Obr. 25 Poměr výkonu mezi delta a theta. Popis jako na Obr. 22. V kůře (Ch1) ukázala dvoucestná analýza rozptylu (Two-Way ANOVA) statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($F(1, 000; 6, 000) = 7,316, p = 0,0354$). Nebyl však zjištěn žádný významný efekt času ($F(2, 151; 12, 90) = 0,8610, p = 0,4531$) ani interakce čas \times skupina ($F(2, 195; 11, 82) = 1,459, p = 0,2729$). V hipokampu nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly. Ani efekt času ($F(13, 78) = 0,4210, p = 0,9578$), ani efekt skupiny ($F(1, 6) = 4,729, p = 0,0726$), ani interakce čas \times skupina ($F(13, 70) = 0,8169, p = 0,6408$) nedosáhly statistické významnosti.

Alpha/theta poměr



Obr. 26. Poměr výkonu mezi alpha a theta. Popis jako na Obr. 22. V kůře odhalila dvoucestná analýza rozptylu (Two-Way ANOVA) statisticky významný efekt času ($F(13, 78) = 4,523, p < 0,0001$) a významnou interakci čas \times skupina ($F(13, 70) = 4,291, p < 0,0001$), zatímco hlavní efekt skupiny nebyl statisticky významný ($F(1, 6) = 1,619, p = 0,2503$). To naznačuje, že vývoj poměru alpha/theta v čase se mezi skupinami liší, i když celkové průměrné hodnoty se neliší významně. Naopak v hipokampu byly zjištěny jak statisticky významný efekt času ($F(13, 78) = 3,791, p = 0,0001$), tak i hlavní efekt skupiny ($F(1, 6) = 80,16, p = 0,0001$), což ukazuje na konzistentní rozdíly v poměru alpha/theta mezi skupinami v průběhu celého měřeného období.

Gamma/theta poměr



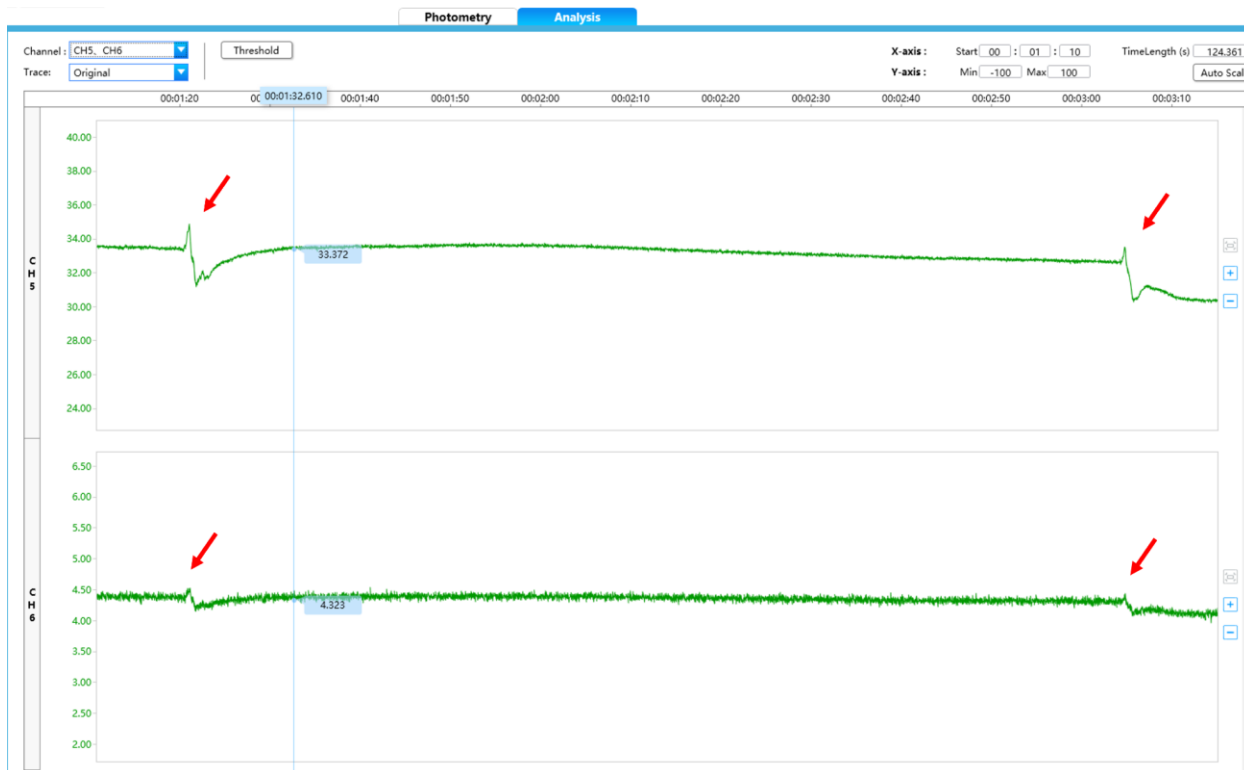
Obr. 27. Poměr výkonu mezi gamma a theta. Popis jako na Obr. 22. V kůře odhalila dvoucestná analýza rozptylu (Two-Way ANOVA) statisticky významný efekt času ($F(13, 78) = 6,983, p < 0,0001$), statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($F(1, 6) = 11,09, p = 0,0158$) a také

významnou interakci čas \times skupina ($F(13, 70) = 6,577, p < 0,0001$). V hipokampu byly výsledky rovněž statisticky významné pro všechny faktory: čas ($F(13, 78) = 3,385, p = 0,0004$), skupinu ($F(1, 6) = 15,81, p = 0,0073$) i interakci ($F(13, 70) = 3,411, p = 0,0004$). Dochází k výraznému nárůstu poměru gamma/theta v obou mozkových oblastech po aplikaci ET-1

Optická fotometrie

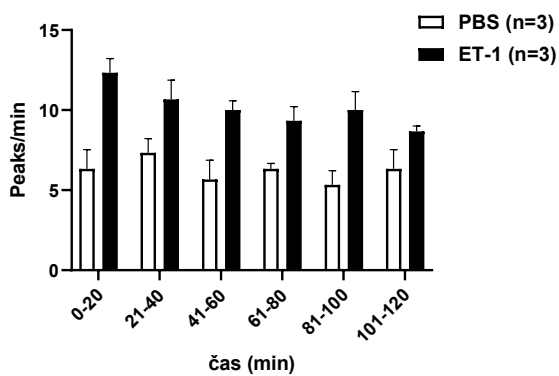
Jedním z cílů této práce bylo využití optické fotometrie jako moderní techniky umožňující sledování intracelulárních změn koncentrace Ca^{2+} v reálném čase. Tato metoda nabízí jedinečný přístup k pochopení dynamiky ischemického poškození mozkové tkáně, zejména v nezralém mozku, kde je ischemická kaskáda často odlišná od procesů v dospělém CNS. Pro realizaci tohoto experimentu bylo nezbytné využít geneticky upravené jedince exprimující Ca^{2+} -senzitivní fluorescenční indikátor (GCaMP6f), což vyžadovalo aplikaci virového vektoru.

Vzhledem k administrativnímu zpoždění při získávání povolení na použití virálního vektoru pro genetickou modifikaci objektu výzkumu došlo k výrazné časové prodlevě a nebylo tedy možné realizovat měření v plánovaném rozsahu pro dosažení hranice statistické významnosti. Celkový počet zahrnutých zvířat je $n = 6$ (3 kontroly s PBS a 3 ischemická zvířata s ET-1). Takto malý vzorek navíc výrazně ovlivňují individuální anatomické a fyziologické odchylky mezi jedinci, což dále snižuje vypovídací schopnost výsledků. Předběžná vizuální analýza dat však naznačuje změny koncentrace Ca^{2+} v oblasti ischemické penumbry po aplikaci ET-1, což odpovídá předpokládanému nárůstu neuronální excitability a lokální depolarizaci. V kontralaterálním hipokampu rovněž byl pozorován nárůst Ca^{2+} aktivity (Obrázek 28).



Obr. 28 Ukázka záznamu experimentu optické fotometrie. Signály a záznamy z ipsi- a kontralaterálního hipokampu (znázorněno zelenou barvou), červené šipky označují vrcholy uvolňování Ca^{2+} .

V obou hipokampech jsme pozorovali zvýšenou aktivitu Ca^{2+} o cca 65 % po infuzi ET-1 oproti kontrolní skupině s PBS (Obrázek 29), což do značné míry koreluje s průběhem záchvatu, který jsme pozorovali v předchozím experimentu.



Obr. 29. Změny signálu Ca^{2+} u P12 po intrahipokampální infuzi. Data jsou prezentovaná jako průměr a SEM.

Aby bylo možné vyvodit přesvědčivé závěry, je nutné:

1. Zajistit větší počet zvířat v experimentálních skupinách.
2. Zlepšit technické provedení samotné aplikace virového vektoru.
3. Optimalizovat nastavení měřicí aparatury a synchronizaci datového záznamu

Závěrem lze říct, že optická fotometrie představuje vysoce perspektivní metodu pro hlubší pochopení ischemické kaskády u perinatální ischemie.

2.3 Diskuze

Tato studie se zaměřuje na identifikaci biomarkerů EEG na modelu perinatální fokální ischemie u potkanů. Perinatální ischemie zůstává významným neurologickým problémem, který je často spojen s nepříznivými dlouhodobými následky, jako je opožděný neuropsychologický vývoj, poruchy pozornosti a nekonvulzivní formy epilepsie (Ronan V. 2025).

K simulaci fokální ischemie jsme použili model indukovaný endotelinem-1 (ET-1), který kopíruje patofyziologické procesy probíhající v lidském neonatálním mozku. Model ET-1 je široce uznáván pro svou schopnost vytvářet reprodukovatelné ischemické léze a napodobovat mikrovaskulární a neuronální reakce pozorované u perinatální cévní mozkové příhody (Adami A. et al. 2016).

Vývojové časové body zvolené pro tuto studii – postnatální den 12 (P12) a postnatální den 25 (P25) – byly vybrány tak, aby zachycovaly kritické fáze vývoje mozku. Má se za to, že stadium P12 u potkanů zhruba odpovídá neurovývojovému věku odpovídajícímu 8-11 měsíčnímu dítěti a P25 u potkanů zhruba odpovídá neurovývojovému věku odpovídajícímu šestiletému dítěti, takže je zvláště důležité pro modelování pozdních účinků ischemického poškození v raném věku (Schupper et al. 2020)

Zatímco mnoho předchozích studií se soustředilo na identifikaci akutních změn v EEG vzorcích bezprostředně po ischemii, poměrně málo jich zkoumalo dlouhodobé změny v kortikální a hipokampální aktivitě, které mohou předpovídat pozdější vznik epilepsie, jako jedné z možných postischemických komplikací, zejména nekonvulzivní generalizované epilepsie. Naše studie řeší tuto mezeru hodnocením opožděných elektrofyziologických korelátů časného fokálního poškození.

Údaje EEG byly shromážděny jak ze senzomotorické kůry, tak z kontralaterálního hipokampu, dvou oblastí, které se kriticky podílejí na vzniku a šíření záchvatů. Předchozí výzkum ukázal, že hipokampus je obzvláště zranitelný vůči ischemickému poškození jak u novorozenců, tak u dospělých modelů, přičemž často vykazuje hluboké změny excitability a synchronizace sítě (Johansen F. F. 1983). Naopak méně studií se zabývalo dlouhodobými změnami v senzomotorické

kůře, přestože je funkčně zapojena do generalizovaných záchvatových sítí. Dle předchozích výsledků (Tsenov et al., 2007; Tsenov et al., 2015), epileptická aktivita po intrahipokampální infuzi ET-1 byla detekována v ipsi- i v kontralaterálním hipokampu. Amplituda záchvatů však byla vyšší v ipsilaterálním hipokampu.

Předpokládali jsme, že zatímco hipokampální aktivita bude vykazovat nejvýraznější patologické znaky, senzomotorická kůra by mohla vykazovat jemné, nespecifické změny. Kritické je, že absence jasných abnormalit EEG v kůře v P25 by neměla být mylně interpretována jako nepřítomnost patologické aktivity v hlubších oblastech mozku, jako je hipokampus (Jaatela J. 2017)

Pro zachycení dynamických elektrofyziologických změn v čase byly zvoleny dvacetiminutové intervaly analýzy. Z dřívějších výzkumu (Vondráková et al. 2020) víme, že dvacetiminutový časový profil představuje optimální reprezentaci události z hlediska elektrofyziologie i neurochemických změn po intrahipokampální infuzi ET-1 do hipokampu 12-denních potkanů.

Kromě analýzy surového EEG byla do této studie zahrnuta analýza výkonové spektrální hustoty (PSD) vypočtené pro obě oblasti. Analýza PSD je v neurovědách široce používaná technika pro kvantifikaci rozložení výkonu v jednotlivých frekvenčních pásmech a ukázala se jako cenná při identifikaci časných příznaků abnormální mozkové aktivity u epilepsie a ischemie (Shrivastava H. 2022). Analýzou frekvenčně specifických vzorců PSD a výpočtem poměrů pásem (např. alpha/theta, delta/theta, gamma/theta) jsme se zaměřili na identifikaci potenciálních biomarkerů epileptogeneze a síťové dysfunkce, která se může vyvinout po perinatální ischemii (Sato M., 2022).

První část naší studie se zaměřila na hodnocení EEG aktivity ve dvou vývojových stádiích 12. postnatální den (P12) a 25. postnatální den (P25), tj. po vyvolání ischemie a s odstupem necelých dvou týdnů poté. Předchozí studie (Tsenov G. et al. 2007, 2017) používaly totožný model zahrnující intrahipokampální injekci ET-1 u nezralých potkanů, kde zaznamenaly rozvoj epileptiformní aktivity po ischemii. Naše výsledky u P12 toto pozorování potvrzují. Také bylo ukázáno, že intrahipokampální infuze ET-1 u P12 vede k epilepsii v dospělosti u P90 (Mátéffyová

A. et al. 2006). Velkým přínosem naší práce je zjištění, že k výskytu spontánních záchvatů dojde mnohem dříve, což jsme pozorovali ve skupině P25. V praxi to může znamenat relevantnost EEG vyšetření u dětí v předškolním věku s podezřením na dříve prodělanou cévní mozkovou příhodu anebo jako formu prevence/screeningu dětské epilepsie.

Na rozdíl od dřívějších prací Tsenova a koleg, ve kterých se primárně zaměřili na výskyt záchvatů v hipokampu, naše studie navíc zkoumala změny EEG v kontralaterální senzomotorické kůře. Toto bylo motivováno behaviorálními studiemi, které naznačují, že zvířata s ischemickým poškozením v raném věku vykazují dlouhodobé neurobehaviorální změny, včetně deficitů v motorické koordinaci, pozornosti a poznávání (Semple B. D. 2013). To podporuje potřebu hodnotit extrahipokampální oblasti z hlediska jemných elektrofyziologických abnormalit.

Dalším cílem naší studie bylo identifikovat specifické elektrofyziologické markery v hipokampu, které by mohly odrážet proces epileptogeneze. Předchozí výzkumy ukázaly, že perinatální ischemie, i když nedochází k zjevným záchvatům, může způsobit změny v hipokampální synaptické organizaci, jako je prorůstání mozaikových vláken, změny v expresi podjednotek receptorů GABA a dlouhodobá hyperexcitabilita (Isaeva E. & Isaev, D. 2010)

Jedním z pozoruhodných zjištění v naší studii byl vyšší výskyt záchvatovité aktivity ve skupině P12 ET-1 ve srovnání s P25. Toto pozorování lze přičíst vývojovým rozdílům v GABAergní signalizaci. V časném postnatálním věku působí GABA jako excitační neurotransmitter, a to v důsledku vysoké intracelulární hladiny chloridů udržované nezralou expresí chloridových transportérů (např. NKCC1), což činí mozek náchylnějším k záchvatům (Ben-Ari Y. et al., 2014). Kolem P25 se GABAergní přenos posouvá směrem k inhibici, a to především díky zvýšené expresi KCC2, což přispívá k větší odolnosti vůči záchvatům.

Ačkoli mezi zvířaty P12 a P25 nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v délce trvání záchvatů, u starší skupiny jsme zaznamenali mírné prodloužení délky záchvatů. Tento trend by mohl souviset s probíhajícím zráním mozku a myelinizací, která se u potkanů zrychluje kolem 20. postnatálního dne (Downes N. & Mullins P. 2014). Zlepšená myelinizace zlepšuje vedení neuronů a může vést k synchronizovanější a delší iktální aktivitě u starších mozků.

Model ET-1 odráží klinický stav perinatální fokální ischemie u lidí, která sice ne vždy způsobuje jasné morfologické léze, ale může významně narušit normální vývoj. Předchozí studie dokumentovaly, že takové poškození vede k synaptické reorganizaci, snížení neurogeneze v dentátovém gyru a zvýšení excitability hipokampu bez zjevné ztráty neuronů (Hernan A. E. et al. 2013).

Celkově naše zjištění podtrhují zásadní význam monitorování EEG u nezralého mozku po ischemickém poškození. Identifikace elektrofyziologických změn – zejména v podkorových strukturách, jako je hipokampus – může poskytnout cenné časné diagnostické biomarkery pro nekonvulzivní epileptogenezi. Kromě toho by časná analýza EEG mohla podpořit vývoj intervencí specifických pro daný věk a rozlišit mezi přechodnými změnami po úrazu a dlouhodobou patologickou reorganizací. To je zvláště důležité u dětských pacientů s anamnézou perinatální mozkové příhody nebo záchvatů, kde může včasná diagnóza změnit klinické výsledky.

Výkonová spektrální hustota (PSD) je základní metoda zpracování signálu, která se používá k analýze frekvenčního obsahu signálů EEG. Tento přístup nabízí podrobný přehled o rozložení výkonu v různých frekvenčních pásmech. PSD byla vypočtena pomocí rychlé Fourierovy transformace (FFT), která převádí data EEG v časové oblasti na reprezentaci ve frekvenční oblasti. Následně byla provedena extrakce příznaků za účelem získání průměrných charakteristik pro každé frekvenční pásmo podle metod zavedených Matouškem a Petersénem (Matoušek M. & Petersén I. 1983) a nověji aplikovaných Novitasarim et al. (Novitasari D. et al. 2019).

V této studii jsme použily metodu normalizace PSD za účelem snížení variability výsledků způsobené chirurgickou manipulací, odporem elektrod a dalšími technickými faktory. Záznamy EEG byly získány ze dvou kanálů: senzomotorické kůry (Ch1) a kontralaterálního hipokampu (Ch2). PSD byla vypočtena pro pět frekvenčních pásem – delta, theta, alpha, beta a gamma s použitím pětisekundového okna. Celková relativní PSD pro každé zvíře byla získána zpřůměrováním hodnot ve dvacetiminutových intervalech pro celý záznam EEG.

Ve skupině P12 po infuzi ET-1 jsme pozorovali významné zvýšení spektrálního výkonu ve všech frekvenčních pásmech ve srovnání s kontrolní skupinou PBS, zejména v

hipokampu. Toto rozsáhlé zvýšení výkonu naznačuje zvýšenou nervovou excitabilitu, což je v souladu s předchozími zjištěními, která zdůrazňují hipokampus jako zranitelnou oblast po ischemii v raném věku a klíčové místo při vzniku záchvatů (Isaeva E. & Isaev D. 2010).

Nejvýraznější změny byly pozorovány ve frekvenčním pásmu delta, které se významně zvýšilo jak u ET-1, tak u kontrolních zvířat. Zatímco aktivita delta je běžně spojována s hlubokým spánkem a fyziologickými stavy mozku, zvýšený výkon delta byl pozorován také u epileptických sítí, kortikální dysfunkce a postischemických stavů (Sato M., 2022). To naznačuje, že i subklinické změny výkonu delta mohou sloužit jako časné indikátory neurologického poškození.

Abychom získali další vhled do funkční dynamiky mozku, vypočítali jsme poměry frekvenčních pásem pro kůru a hipokampus, včetně alpha/theta, delta/theta a gamma/theta. Tyto poměry se běžně používají v klinickém i výzkumném kontextu k detekci kognitivních změn, nervové dysregulace a epileptogenní aktivity (Clarke A. R. 2009).

V naší studii byl poměr gama/theta zvýšený ve skupině s ET-1, zejména v hipokampu. Toto zjištění je v souladu s výzkumem, který ukazuje, že zvýšený poměr gama/theta je spojen s hipokampální hyperexcitabilitou a časnou epileptogenezí (Moretti D. V. et al. 2009). Kromě toho byly změny poměru gamma/theta spojeny se zhoršenou kognitivní výkonností a opožděním vývoje jak na animálních modelech, tak u klinické populace.

Naopak jsme zjistili, že poměr delta/theta se nápadně zvýšil v kortexu u 12tí denních zvířat po intrahipokampální infuzi ET-1. Tento poměr se používá ve studiích neurovývojových poruch a kortikálních dysfunkcí, kde zvýšené hodnoty často odrážejí opožděné nebo narušené nervové zrání (Bakheet D. M. 2022). Tyto výsledky podporují myšlenku, že časné ischemické poškození ovlivňuje nejen hipokampus, ale i širší korové sítě, což přispívá k dlouhodobým funkčním abnormalitám.

Ve skupině P25 jsme zaznamenali časné změny v EEG aktivitě, zejména ve frekvenčních pásmech delta, alpha a gama, přičemž nejvýraznější odchylky se objevily během prvních 90 minut záznamu. Tyto změny byly patrné nejen v senzomotorickém kortexu, ale také v hipokampu, což ukazuje na rozsáhlejší zapojení mozkových struktur. Toto pozorování poukazuje na specifický

časový vzorec charakteristický pro skupinu P25, který naznačuje, že nejrelevantnější elektrofyziologické změny nastupují již v rané fázi monitorování. Tento jev může být částečně vysvětlen experimentálním uspořádáním, kdy se zvířata během měření nacházela v otevřeném EEG boxu. Takové prostředí lze považovat za mírně stresující až anxiogenní, což mohlo ovlivnit kortikální aktivitu.

V přeneseném klinickém kontextu tato zjištění naznačují, že u dětí raného školního věku, u nichž existuje podezření na nedostatečně diagnostikovanou perinatální ischemii, by mohl již 90minutový EEG záznam poskytnout nejvýznamnější diagnostické informace. To by mohlo přispět k efektivnější diagnostice a zkrácení doby potřebné k vyhodnocení EEG u pediatrických pacientů.

V rámci této práce jsme provedly několik experimentů za použitím optické fotometrie pro sledování změn Ca^{2+} v oblasti hipokampu u P12 potkanů po aplikaci ET-1 či PBS. Předběžné pozorování ukazovalo změny v aktivitě neuronů, zejména v oblasti ischemické penumbry, což odpovídá očekávané excitabilitě této zóně ohrožené tkáně. Z důvodů formálních i technických, které byly podrobně rozebrány v kapitole výsledků, však nebylo možné provést kvantitativní analýzu, která by byla statisticky dostatečně průkazná. Přesto i z těchto prvních pokusů vyplývá, že optická fotometrie může být citlivým nástrojem pro detekci změn neuronální aktivity po ischemickém inzultu, jak ukazují i jiné studie, např. práce autorů Pisanello (Pisanello M. 2019), kteří pomocí GCaMP detekovali změny Ca^{2+} signálu po ischemickém poškození ve strukturách dospělého mozku.

Na rozdíl od většiny dostupné literatury jsme se v našem přístupu zaměřili na nezralý mozek laboratorních potkanů, kde byl virový vektor aplikován ve velmi raném věku (P5), což může vysvětlovat částečné rozdíly v intenzitě a časování signálu. I přes počáteční technické obtíže považujeme tuto metodu za slibný nástroj pro budoucí experimenty, který by mohl významně přispět k pochopení dynamiky perinatální ischemie a identifikaci nových biomarkerů neuronální dysfunkce.

Naše zjištění odhalují změny PSD a poměrů frekvenčních pásem v závislosti na regionu a věku, které mohou odrážet postupné změny ve funkci mozkové sítě po časném ischemickém

poškození. Zejména zvýšené poměry gamma/theta v hipokampu a zvýšené poměry delta/theta v kůře by mohly představovat časně elektrofyziologické znaky epileptogenní transformace, a to i v nepřítomnosti zjevných záchvatů. Tyto biomarkery založené na EEG mohou nabídnout cenný nástroj pro včasnou diagnostiku a sledování nekonvulzivní epileptogeneze u dětských pacientů s anamnézou perinatální mozkové příhody nebo záchvatů.

Závěr

V naší práci jsme se pokusili prozkoumat procesy vzniku a formování epileptických změn v nezralém mozku vyvolaných fokálním ischemickým poškozením. Tato práce je výjimečná svým zaměřením na hledání nových EEG biomarkerů ve věkové skupině P25 a jejich porovnání se skupinou P12.

Výskyt záchvatů v obou věkových skupinách po aplikaci ET-1 jednoznačně potvrzuje, že perinatální ischemie může iniciovat rozvoj epileptické aktivity. Skutečnost, že jsme zaznamenali záchvaty u skupiny P25, naznačuje přechod z akutní epileptiformní aktivity do chronické fáze, tedy pokračující epileptogenezi i po odeznění počáteční ischemické příhody.

Analýza výkonové spektrální hustoty (PSD) v jednotlivých frekvenčních pásmech nám umožnila identifikovat specifické markery jak v senzomotorické kůře, tak v hipokampu. Poměr delta/theta, který byl u skupiny P12 po ischemie zvýšený, naznačuje přítomnost neurovývojových abnormalit a kortikálních dysfunkcí. Změny v poměru gama/theta, pozorované především u hippocampální aktivity, jsou ve shodě s předchozími studiemi, které tento ukazatel spojují se zhoršenou kognitivní výkonností a opožděným neurovývojem u animálních modelů i klinických pacientů.

Ve skupině P25 jsme poprvé zaznamenali specifický časový vzorec, kdy nejvýraznější změny ve frekvenčních pásmech delta, alpha a gama nastaly během prvních 90 minut záznamu. Tato skutečnost může mít klinický význam a naznačuje, že v diagnostickém kontextu může být právě toto časové okno nejrelevantnější pro zachycení patofyziologických změn souvisejících s prodělanou perinatální ischemií.

Naše výsledky mohou přispět k rozvoji nových klinických diagnostických přístupů, jelikož testování EEG u malých dětí bývá omezeno jak technicky, tak časově. Identifikace takových vzorců v EEG by mohla sloužit nejen jako nástroj pro časnou diagnostiku epileptogeneze, ale i jako indikátor účinnosti antiepileptické léčby a možný biomarker pro vývoj farmakologických intervencí u dětí s anamnézou perinatální ischemie.

K potvrzení těchto zjištění a k hlubšímu porozumění mechanismům, které epileptogenezi podmiňují, jsou však nezbytné další studie s větším souborem a delším časovým sledováním.

Summary

In this study, we aimed to investigate the processes underlying the onset and development of epileptic changes in the immature brain caused by focal ischemic injury. This work is unique in its focus on identifying novel EEG biomarkers in the P25 age group and comparing them with findings from the P12 group.

The occurrence of seizures in both age groups following ET-1 administration clearly confirms that perinatal ischemia can initiate the development of epileptic activity. The fact that seizures were also observed in the P25 group suggests a transition from acute epileptiform activity to a chronic phase, indicating ongoing epileptogenesis even after the initial ischemic event has subsided.

Analysis of power spectral density (PSD) across individual frequency bands enabled us to identify specific markers in both the sensorimotor cortex and the hippocampus. The elevated delta/theta ratio observed in the P12 group following ischemia indicates the presence of neurodevelopmental abnormalities and cortical dysfunction. Changes in the gamma/theta ratio, particularly in hippocampal activity, are consistent with previous studies linking this parameter to impaired cognitive performance and delayed neurodevelopment in both animal models and clinical populations.

In the P25 group, we identified for the first time a distinct temporal pattern, where the most prominent changes in delta, alpha, and gamma frequency bands occurred within the first 90 minutes of the recording. This finding may have clinical relevance, suggesting that this early time window could be the most informative for detecting pathophysiological changes related to past perinatal ischemia in a diagnostic context.

Our results may contribute to the development of new clinical diagnostic approaches, as EEG testing in young children is often limited by both technical and time constraints. The identification of such EEG patterns could serve not only as a tool for early diagnosis of epileptogenesis but also as an indicator of antiepileptic treatment efficacy and a potential biomarker for the development of pharmacological interventions in children with a history of perinatal ischemia.

However, to confirm these findings and to gain deeper insight into the mechanisms underlying epileptogenesis, further studies with larger sample sizes and longer follow-up periods are necessary.

Seznam použité literatury

Citovaná literatura

- Adami, A., et al. (2016). Neuroprotective effects of hypothermia in perinatal ischemia. *Neurobiology of Disease*, 92, 69–79. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.02.015>
- Antonopoulos A., K. C. (2007). Significance of Endothelin-1 in Myocardial Infarctio. *Hellenic J. Cardiol.*, Vol. 48. – P. 161-164.
- Antonopoulos A., K. C. (2007). Significance of Endothelin-1 in Myocardial Infarction . *Hellenic J. Cardiol*, Vol. 48. – P. 161-164.
- Arai H., H. S. (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, Vol. 348. – P. 730-732;.
- Aramuni, G., & Griesbeck, O. (2013). Chronic calcium imaging in neuronal development and disease. *Experimental neurology*, 242, 50-56.
- Astrup, J., Siesjö, B. K., & Symon, L. (1981). hresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke*, 12, 723-725.
- Back SA, H. B. (2002). *Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. J Neurosci.* 22:455–463.
- Bakheet, D. M. (2022). The developmental effects of neonatal seizures on cortical oscillations in a rat model. *University of Southampton*. Načteno z <https://eprints.soton.ac.uk/467871/>
- Belousova M.A., K. E. (2014). *New antioxidants as neuroprotectors for ischemic brain damage and neurodegenerative diseases. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 77(11): 36-44.

- Ben-Ari Y. et al. (2014). The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey. *Neuron*, 56(5), 751–753. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.006>
- Boveris A, C. B. (1973). . *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. 134:707-716.
- Boyce, A.K.J., Fouad, Y., Gom, R.C. et al. (2025). Contralesional hippocampal spreading depolarization promotes functional recovery after stroke. *Nat Commun*, 16.
- Brouns R, D. D. (2009). *The complexity of neurobiological processes in*. 2009;111(6):483-495.
- Brueggen, K., Fiala, C., Berger, C., Ochmann, S., Babiloni, C., & Teipel, S. J. (2017). Early changes in alpha band power and DMN BOLD activity in Alzheimer’s disease: a simultaneous resting state EEG-fMRI study. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 39.
- Burghaus, L. (2007). Early electroencephalography in acute ischemic stroke: prediction of a malignant course. *Clin. Neurol.*, Vol.109. – №1. – P. 45–49.
- Buser JR, M. J. (2012). *Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants*. *Ann Neurol*. . 71:93–109.
- Buzsaki G. (2006). Rhythms of the brain. *Oxford University Press*, 448 p.
- Cao, L., Huang, C., Wang, N., & Li, J. (2014). ET-1/NO: a controversial target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiology*, 127(2), 140-140.
- Carvalho K.S., G. B. (2002). Arterial stroke in children. *Neurol ClinN*, 20, 1079-10100.
- Casals J.B., P. N. (2011). *The use of animal models for stroke research: a review*. *Comparative Medicine*. . 61(4): 305-13.
- Clarke, A. R., Barry, R. J., McCarthy, R., & Selikowitz, M. (2009). Age and sex effects in the EEG: Development of the normal child. *Clinical Neurophysiology*, 112(5), 806–814. Načteno z [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(01\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(01)00513-7)

- Colombo E, F. C. (2016). *Astrocytes: Key regulators of neuroinflammation*. 37:608-620.
- Cvetovskiy S.B., V. I. (2012). Influence of mesenchymal stromal cells on the electrophysiological activity of rat brain in the model of focal disturbance of venous circulation. *Rossiyskiy neyrokhirurgicheskiy zhurnal im. A.L. Polenova*. 5-9.
- Danton GH, D. W. (2003). *Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke*. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62:127-136.
- DeGraba TJ. (1998). *The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy*. *Neurology*. 51:62-68.
- Dojo Soeandy, C., Salmasi, F., Latif, M., Elia, A. J., Suo, N. J., & Henderson, J. T. (2019). Endothelin-1-mediated cerebral ischemia in mice: early cellular events and the role of caspase-3. *Apoptosis*, 24, 578-595.
- Donnelly DJ, P. P. (2008). *Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury*. *Exp Neurol*. 209(2):378-388.
- Downes, N., & Mullins, P. (2014). The development of myelin in the brain of the juvenile rat. *Brain and Development*, 36(5), 370–377. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2014.01.003>
- Elbers J, V. S. (2011). *Iacental pathology inneonatal stroke*. *Pediatrics* . 127: e722–e729.
- Fluri F., S. M. (2015). *Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research*. *Drug desig, development and therapy*. 9: 3445–54.
- Fluri F., S. M. (2015). *Animal models of ischischemic stroke and their application in clinical research*. *Drug design, development and therapy*. 9: 3445–54.
- Gillies LA, K. T. (2014). *Apoptosis regulation at the mitochondrial outer*. 115(24):632-640 .
- Gomazkov O. A. (1999). Endothelin peptide system: mechanisms of cardiovascular pathologies. *Voprosy meditsinskikh khimii. Biomedical Chemistry*., T. 45, № 4. – C. 290-302.

- Gomazkov OA. (2003). *Neurochemistry of ischemic and aged-related brain pathologies*. M.: IAE.
- Gusev E.I., S. V. (2012). *Cerebral ischemia. Medicine*. Moscow: 321 p.
- Gusev EI, S. E. (2001). I. Cerebral Ischemia. M.: Medicine;.
- Hallenbeck JM. (1996). M. *Significance of the inflammatory response in brain ischemia. Acta Neurochir Suppl.* 1996;66:27-31.
- Han, S. Y., Kane, G., Cheong, I., & Herbison, A. E. (2019). Characterization of GnRH pulse generator activity in male mice using GCaMP fiber photometry. *Endocrinology*, 160, 557-567.
- Hellström-Westas L, d. V. (2008). *An Atlas of Amplitude-Integrated EEGs in the Newborn*. London : Parthenon Publishing.
- Hernan, A. E., et al. (2013). Early-life seizures: Long-term effects on cognitive function and hippocampal integrity. *Neurobiology of Disease*, 58, 1-8. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.003>
- Horie, N., Maag, A. L., Hamilton, S. A., Shichinohe, H., Bliss, T. M., & Steinberg, G. K. (2008). Mouse model of focal cerebral ischemia using endothelin-1. *Journal of neuroscience methods*, 173(2), 286-290.
- Hossmann KA. (1994). *Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia.* ;36:557-565. <https://www.biomol.com/products/proteins-and-peptides/peptides/other/endothelin-1-human-porcine-trifluoroacetate-salt-cay24127-500>. (nedatováno).
- Hu X, L. R. (2015). *Microglial and macrophage polarization — new prospects for brain repair.* *Nat Rev Neurol.* 11(1):56-64.
- Charles T Quinn, R. C. (2012). Acute Silent Cerebral Ischemic Events in Children With Sickle Cell Anemia. *JAMA neurology*, 58-65. [doi:https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/1387595](https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/1387595)

- Chernykh ER, S. E. (2017). *The Role of macrophages in the restoration of damage to the Central nervous system: new possibilities in the treatment of neurological disorders. Medical immunology.* 19(1):7-18.
- Isaeva, E., Isaev, D., & Holmes, G. L. (2010). Altered synaptic plasticity in the somatosensory cortex and hippocampus in a rat model of early-life seizures. *Neurobiology of Disease*, 38(3), 312–321. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.02.001>
- Jaatela, J. (2017). Power Spectral Density Analysis of Neonatal EEG: A method for early outcome prediction in hypoxic–ischemic encephalopathy. *Aalto University*. Načteno z <https://aaltodoc.aalto.fi/handle/123456789/29284>
- Jiahui Fan, M. X. (2023). Global Burden, Risk Factor Analysis, and Prediction Study of Ischemic Stroke, 1990–2030. *Neurology*, 101(2) e137-e150.
- Johansen, F. F., Balslev Jørgensen, M., & Diemer, N. H. (1983). Resistance of hippocampal CA-1 interneurons to 20 min of transient cerebral ischemia in the rat. *Acta neuropathologica*, 61, 135-140.
- Kirton A, A.-W. J. (2011). *Symptomatic neonatal arterial ischemic stroke: the International Pediatric Stroke Study. Pediatrics.* 128:e1402–e1410.
- Kirton, A., Armstrong-Wells, J., Chang, T., Deveber, G., Rivkin, M. J., Hernandez, M. (2011). Symptomatic neonatal arterial ischemic stroke: the International Pediatric Stroke Study. *Pediatrics*, 128(6), e1402-e1410.
- Kofler J., H. P. (2005). *SOD1 overexpression and female sex exhibit region-specific neuroprotection after global cerebral ischemia due to cardiac arrest. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 25: 1130–7.
- Krafft, P. R. (2012). Etiology of stroke and choice of models. *International Journal of stroke*, Vol. 7, no. 5. P. 398–406.

- Kraus, F. (1997). *Cerebral palsy and thrombi in placental vessels of the fetus: insights from litigation. Hum Pathol.* 28: 246–248.
- Lai TW, Z. S. (2014). *Excitotoxicity and stroke: identifying novel.* 115:157-188.
- Lee J, C. L. (2005). *redictors of outcome in perinatal arterial stroke: a population-based study. Ann Neurol.* 58:303–308.
- Leist M, N. P. (1998). *Calcium and neuronal death. Rev Physiol Biochem.* 132:79-125.
- Liddel SA, G. K. (2017). *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. Nature.* 541(7638):481-487.
- Liebenstund L. (2020). Predicting experimental success: a retrospective case-control study using the rat intraluminal thread model of stroke. *Disease models & mechanisms*, Vol. 13, no. 12.
- Lipton P. (1999). *Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev.* 79:1431-1568.
- Longa E.Z., W. P. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20(1): 84-91.
- Lushnikov EF, Z. V. (1987). *M. Apoptosis: morphology, biological role.* 1987;2:84-89.
- Lychko V.S., M. V. (2015). *Morphological changes in brain tissue in rats with an experimental model of ischemic stroke in the dynamics of treatment with an immunobiological drug cryo-cell cryocord. Sovremennye tekhnologii v meditsine.* 7(4): 58-63.
- M. Hazime, e. a. (2021). Prolonged deficit of low gamma oscillations in the peri-infarct cortex of mice after stroke . *Experimental Neurology*, . Vol. 341. P. 113696.
- Marnane M., D. C. (2010). *Stroke subtype classification to mechanism-specific and undetermined categories by TOAST, A-S-C-O, and causative classification system: direct comparison in the North Dublin Population Stroke Study // Stroke.* V. 41. - Pp. 1579-1586.

- Martin, R. L. (1997). *Experimental neuronal protection in cerebral ischaemia Part II: Potential neuroprotective drugs*,. V. 5. - P. 290 - 302.
- Mátéffyová A. at. al. (2006). Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death, development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life. *European Journal of Neuroscience*, 224.
- Matoušek, M., & Petersén, I. (1983). Automatic evaluation of EEG background activity by means of age-dependent EEG quotients. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 55(1), 71-75. Načteno z [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(83\)90128-9](https://doi.org/10.1016/0013-4694(83)90128-9)
- McColl B. W. (2004). Extension of cerebral hypoperfusion and ischaemic pathology beyond MCA territory after intraluminal filament occlusion in C57Bl/6J mice. *Brain research*, Vol. 997, no. 1. P. 15–23.
- Michael Brainin, W.-D. H. (2009). Textbook of stroke medicine. Cambridge University Press.
- Michael Marnane, M. M. (2010). Stroke Subtype Classification to Mechanism-Specific and. *Stroke*(41), 1579-1586.
doi:<https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/STROKEAHA.109.575373>
- Moretti, D. V., et al. (2009). MCI patients' EEGs show reduced coherence of gamma and theta rhythms. *Neuroscience Letters*, 462(3), 225–228. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.070>
- Morgun A.V., K. N. (2014). *Methods of experimental modeling of perinatal hypoxic-ischemic brain injury in vivo*. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 13(5): 31–6.
- Myasishcheva O.V., P. M. (2014). *Experimental models of ischemic brain damage*, *Nauchnye vedomosti. Seriya Meditsina. Farmatsiya*. 11(182): 123-6.
- Narantuya D, N. A. (2010). *Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement*. *PLoS One*. 5(7):11746.

- Nelson K. (2007). *Perinatal ischemic stroke. Stroke.* 2007;38:742–745.
- Nelson KB. (2007). Perinatal ischemic stroke. *Stroke.*
- Niizuma K., E. H. (2009). *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. J. Neurochem.* Vol. 109. Suppl. 1. P. 133-138.
- Novitasari, D., et al. (2019). EEG signal classification using fast Fourier transform (FFT) and support vector machine (SVM). *Procedia Computer Science, 157*, 400-406. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.procs.2019.11.106>
- Ohno K., I. U. (1984). Regional cerebral blood flow and stroke index after left carotid artery ligation in the conscious gerbil. *Brain Res. Brain research*(297(1)), 151-157.
- Orrenius S, G. V. (2015). *B. Calcium and mitochondria in the.* ;460(10):72-81.
- Pellegrini-Giampietro D.E., M. G. (2009). *Post-ischemic brain damage: the endocannabinoid system in the mechanisms of neuronal death. FEBSJ.* . Vol. 276. 1. P. 2-12.
- Petrova E. A. (2007). Dynamics of spectral-power ha-EEG characteristics in patients in the acute period of ischaemic stroke with additional activation of affected and Intact hemispheres. *Journal of Neurology and Psychiatry.*, 205.
- Petrova E.A. (2007). Dynamics of spectral-power characteristics of EEG in patients in the acute period of ischaemic stroke with additional activation of the affected and intact hemispheres. *Journal of Neurology and Psychiatry.*, p. 250.
- Pisanello, M., Pisano, F., Hyun, M., Maglie, E., Balena, A., De Vittorio, M. (2019). The Three-Dimensional Signal Collection Field for Fiber Photometry in Brain Tissue. *Frontiers in Neuroscience, 13*.
- Pochechuev, M. S., Bilan, D. S., Fedotov, I. V., Kelmanson, I. V., Solotenkov, M. A., Stepanov, E. A., Kotova, D. A., Ivanova, A. D., Kostyuk, A. I., Raevskii, R. I., Lanin, A. A., Fedotov, A. B., Belousov, V. V., & Zheltikov, A. M. (2022). Long-term circuit

- dysfunction in addiction revealed by GCaMP photometry. *Journal of biophotonics*, 15, 10.
- Pokrovsky A. V., S. A. (2005). Arterial dissection (literature review and clinical observations). *Zhurn. Angiology and Vascular Surgery*, -T.12, -№4, -C.27-38.
- Pradillo, J. M., Murray, K. N., Coutts, G. A., Moraga, A., Oroz-Gonjar, F., Boutin, H., ... & Allan, S. M. (2017). Reparative effects of interleukin-1 receptor antagonist in young and aged/co-morbid rodents after cerebral ischemia. *Brain, behavior, and immunity*, 61, 117-126.
- Rabiller G. (2015). Perturbation of brain oscillations after ischemic stroke: a potential biomarker for post-stroke function and therapy. *International journal of molecular sciences*, Vol. 16, no. 10. P. 25605–25640.
- Rijsdijk, M. (2008). Continuous EEG monitoring in the Intensive Care Unit. *Netherlands Journal of Critical Care* 12(4).
- Ronan, V. (2025). An open window: the crucial role of the gut-brain axis in neurodevelopmental outcomes post-neurocritical illness. *Frontiers in Pediatrics*, 12(1499330), 12-15.
- Sato M., e. a. (2022). Ortical low-frequency oscillations following stroke predict behavioral recovery in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 42(2), 343–354. Načteno z <https://doi.org/10.1177/0271678X221105677>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Frontiers in Neurology*, 4, 40. Načteno z <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00040>
- Shang A. (2011). Cerebral monitoring during carotid endarterectomy using near-infrared diffuse optical spectroscopies and electroencephalogram. *Physics in Medicine & Biology*, Vol. 56, no. 10. P. 3015.

- Shiffrin E. L., T. R. (1998). *Cardiovasc, Pharmacol.* Vol. 32, Suppl.3., P. 2-13.
- Shmonin A.A., B. A. (2012). *Protective effects of early ischemic preconditioning in focal cerebral ischemia in rats: the role of collateral blood circulation. Neuroscience and Behavioral Physiology.* 42(6): 643-50.
- Shrivastava, H., Ramaiya, M., Sah, H. R., & Gangrade, J. (2022). Network analysis of infant brain functional connectivity using spectral EEG. *International Journal of Electronic Healthcare.,* 12(12), 139-150.
- Schlög A. (2000). *The electroencephalogram and the adaptive autoregressive model: theory and applications. Aachen: Shake.*
- Schupper, Alexander J., Kurt A. Yaeger, and Peter F. Morgenstern. (2020). Neurological manifestations of pediatric multi-system inflammatory syndrome potentially associated with COVID-19. *Child's Nervous System,* 36, 1579-1580. Načteno z <https://link.springer.com/article/10.1007/s00381-020-04755-8>
- Skelton J. K., P. R. (2017). Preclinical models for studying immune responses to traumatic injury. *Immunology,* Vol. 37, no. 7. P. 2539–2554.
- Sofroniew MV, V. H. (2010). *Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol.* 119:7-35.
- Sommer C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta neuropathologica,* Vol. 133, no. 2. P. 245–261.
- Stavrovskaya A.V., Y. N. (2016). *Evaluation of the effects of new peptide compounds in experimental animals with toxic models of Alzheimer's disease Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii.* 10(2): 33-41.
- Strasser A, J. P. (2009). *The many roles of FAS receptor signaling in.* 30:180-192.
- Toet MC, v. d. (2002). Comparison between simultaneously recorded amplitude integrated electroencephalogram (cerebral function monitor) and standard electroencephalogram in neonates. *Pediatrics,* 772.-9.

- Traystman, R. (2003). *Animal models of focal and global cerebral ischemia*. ILAR journal.
- Trogyin V.D., G. A. (2006). Acute disorders of cerebral circulation. - M.: LLC “Medical Information Agency”. 432.
- Tsenov, G., et al. (2007). Intrahippocampal injection of endothelin-1: A new model of ischemia-induced seizures in immature rats. *Epilepsia*, 48(9), 1761–1773. Načteno z <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01282.x>
- Tsenov, G., et al. (2017). ETA or ETB receptor involvement in seizures following intrahippocampal ET-1 in immature rats. *Experimental Neurology*(271), 350–357. Načteno z <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.12.017>
- Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, . (2012). Načteno z <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=4998>
- Vahidinia Z., A. N. (2017). *Gonadal steroids block the calpain-1-dependent intrinsic pathway of apoptosis in an experimental rat stroke model*. *Neurol Res*. 39(1): 54-64.
- Vasil’ev I.A., S. V. (2015). *Experimental models of cerebral vascular lesions, Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 1(3): 366-9.
- Vickstrom, C. R., Snarrenberg, S. T., Friedman, V., & Liu, Q. S. (2022). Application of optogenetics and in vivo imaging approaches for elucidating the neurobiology of addiction. *Molecular psychiatry*, 27, 640-651.
- Volpe, J. (2009). *Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances*. *Lancet Neurol*. 8:110–124.
- Wang W, R. C. (2008). *Rat focal cerebral ischemia induced astrocyte proliferation and delayed neuronal death are attenuated by cyclindependent kinase inhibition*. *J Clin Neuroscience*. 5:278-285.
- Waters C. (1997). *RBI Neurotransmissions, Newsletter for Neuroscientist*. XIII:2:27.

- Williams A. J. (2004). Antiepileptic drug treatment of nonconvulsive seizures induced by experimental focal brain ischemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 311, no. 1. P. 220–227.
- Windle, V., Szymanska, A., Granter-Button, S., White, C., Buist, R., Peeling, J., & Corbett, D. (2006). An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Experimental neurology*, 201(2), 324-334.
- Wu J. (2016). Utility of EEG measures of brain function in patients with acute stroke. *Journal of neurophysiology*, Vol. 115, no. 5. P. 2399–2405.
- Zgavc, T., Ceulemans, A. G., & Hachimi-Idrissi, S. (2012). The neuroprotective effect of post-ischemic brief mild hypothermic treatment correlates with apoptosis, but not with gliosis in endothelin-1 treated rats. *BMC Neuroscience*, 13(1), 105. Načteno z <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-105>
- Zhang J., Z. C. (1999). Using complexity measurement to study the EEG signal of focal ischemic cerebral injury. *Journal of Biomedical Engineering*, Vol. 16, no. 1. P. 37–41, 45.
- Zhang S., e. a. (2013). EEG patterns from acute to chronic stroke phases in focal cerebral ischemic rats: correlations with functional recover. *Physiological measurement*, Vol. 34, no. 4. P. 423.
- Zhang, Z. (2014). The dual role of hypoxia-inducible factor-1 in ischemic stroke: Neuroprotection and blood-brain barrier disruption. Načteno z <https://core.ac.uk/download/pdf/213407101.pdf>