

Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



**FUNKČNÍ DŮSLEDKY EPILEPTICKÝCH ZÁCHVATŮ A HYPOXICKO-
ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ CNS**

Autoreferát dizertační práce

MUDr. David Krýsl

Praha, 2013

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka.

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

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

Autor: MUDr. David Krýsl

Školitel: doc. MUDr. Jan Mareš, CSc.

Adresa:

Ústav normální, patologické a klinické fyziologie 3. LF UK
Ke Karlovu 4
120 00 Praha 2

Neurologická klinika 2.LF UK a FN Motol
V Úvalu 84
150 06 Praha 5

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertace se koná:
před komisí pro obhajoby doktorských dizertací.

*S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy,
Ruská 87, 100 00 Praha 10*

Seznam zkratek

2-VO	two vessel occlusion u potkana	iNOS	inducibilní NO-syntáza
2-VOg	two vessel occlusion u pískomila	MCA	a. cerebri media
4-VO	four vessel occlusion u potkana	MCAO	okluze a. cerebri media
4P	salva čtyř pravoúhlých pulzů	MES	maximum electroshock model
ADP	adenosindifosfát	MLCK	myosin light chain kinase
AEDs	antiepileptika (antiepileptic drugs)	MWM	Morrisovo vodní bludiště
ATP	adenosintrifosfát	NADH	nikotinamidadeninukleotid
BDNF	brain derived neurotrophic factor	NF- κ B	nukleární faktor kappa B
BOLD	blood oxygenation dependent signal (fMRI)	NMDA	N-methyl D-aspartát
CBF	průtok krve mozkem (cerebral blood flow)	nNOS	neuronální NO-syntáza
CCA	a. carotis communis	NO	oxid dusnatý
CCD	zkřížená mozečková diaschíza (crossed cerebellar diaschisis)	NR1	NR1 podjednotka NMDA receptorů
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát	NR2A	NR2A podjednotka NMDA receptorů
CMP	cévní mozková příhoda	NR2B	NR2B podjednotka NMDA receptorů
CMRglu	spotřeba glukózy mozkem	p-MCAO	permanentní okluze a. cerebri media
CMRO2	spotřeba kyslíku mozkem	pCO2	parciální tlak CO2
CNS	centrální nervový systém	PET	pozitronová emisní tomografie
CPS	parciální komplexní záchvat	PGI2	prostacyklin
CPSE	parciální komplexní status epilepticus	PKC	proteinkináza C
CSD	Leãova šířící se deprese (cortical spreading depression)	PLA2	fosfolipáza A2
dMCA	distální úsek a. cerebri media	pMCA	proximální úsek a. cerebri media
DMTU	dimethylthiourea	pO2	parciální tlak kyslíku
DNA	deoxyribonukleová kyselina	PT	fototrombóza
EB	Evansova modř	PTZ	pentylentetrazol
ECA	a. carotis externa	RB	Bengálská červeň
ECoG	elektrokortikografie	RNA	ribonukleová kyselina
EEG	elektroencefalografie	RNS	reaktivní sloučeniny dusíku (volné dusíkové radikály)
eMCAO	okluze a. cerebri media navozená endothelinem-1	ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku (volné kyslíkové radikály)
eNOS	endoteliální NO-syntáza	SE	status epilepticus
EP	evokované potenciály	SEP	somatosenzorické evokované potenciály
ET-1	endothelin-1	SMA	senzomotorická area u potkana
FDG	18F-fluorodeoxyglukóza	SN	substantia nigra
fMRI	funkční magnetická rezonance	SNR	substantia nigra pars reticulata
FR	volné radikály	SOD	superoxiddismutáza
GABA	kyselina γ -amino máselná	SPECT	jednofotonová emisní computerová tomografie
GAERS	genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg	SSAD	self sustained afterdischarge (následný výboj)
GCSE	generalizovaný tonicko-klonický status epilepticus	sTK	systolický TK
GEPR	genetically epilepsy-prone rats	t-MCAO	transitorní okluze a. cerebri media
GPx	glutathionperoxidáza	TK	krevní tlak
GTCS	generalizovaný tonicko-klonický záchvat	TMS	transkraniální magnetická stimulace
HEB	hematoencefalická bariéra	trkB	tyrosin kináza B
HIF	hypoxia inducible factor	TUNEL	terminal deoxyuridine nick end labeling
HMPAO	hexamethylpropylenaminomim	TXA2	tromboxan A2
HRP	křenová peroxidáza	VA	a. vertebralis
HSE	heat-shock responsive elements	VPL	ventrální posterolaterální jádro thalamu
HSF	heat-shock factors		
ICA	a. carotis interna		
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1		
ILAE	Mezinárodní liga proti epilepsii		

Obsah

Souhrn	5
1. Úvod	7
2. Hypotézy	8
3. Metodika	9
4. Jednotlivé experimenty: skupiny zvířat, metodika a výsledky	10
4.1. Prolomení postiktální inhibice krátkou salvou stimulačních pulzů	10
4.1.1. Skupiny zvířat, operativa a elektrofyziologie	10
4.2. Ovlivnění prahu pro flurothylový záchvat a jeho důsledků na prostorové učení	12
4.2.1. Skupiny zvířat a metodika	12
4.2.2. Výsledky	14
4.3. Ovlivnění rozsahu ischemické léze hypoxickým preconditioningem a podáním melatoninu	14
4.3.1. Skupiny zvířat a metodika	14
4.3.2. Výsledky	15
4.4. Elektrofyziologické změny v hyperakutní fázi kortikální fototrombózy.	16
4.4.1. Skupiny zvířat a metodika	16
4.4.2. Výsledky	18
4.5. Lokální a vzdálená změna propustnosti hematoencefalické bariéry v důsledku fotochemicky navozené fokální kortikální ischemie	20
4.5.1. Skupiny zvířat a metodika	20
5. Diskuze	22
6. Závěry	29
7. Literatura	30
Publikace autora	35

Souhrn

Hypoxie a ischemie CNS jsou často doprovázeny epileptickými záchvaty. Epileptické záchvaty a epilepsie naopak akutně i chronicky ovlivňují průtok krve mozkiem (CBF). Fokální ischemie CNS a fokální epileptické záchvaty ovlivňují CBF, metabolismus a excitabilitu nejen v místě ložiska, ale i ve vzdálených, funkčně propojených oblastech CNS (diaschíza). Negativní důsledky hypoxie (ischemie) a epileptických záchvatů jsou obvykle vysvětlovány buněčnou ztrátou. Tato práce mj. dokumentuje, že též méně závažné infarkty mohou, i přes nepřítomnost závažných strukturálních změn, vést k významným a dlouhotrvajícím důsledkům. K hodnocení těchto důsledků a možností jejich ovlivnění jsme využili akutní modely hypoxie CNS, fokální ischemie CNS a epileptických záchvatů. Experimentální část práce je rozdělena do několika částí. První část se dotýká excitability po epileptickém záchvatu. V modelu kortikálního následného výboje (SSAD) jsme zjistili, že pomocí krátkých salv čtyř pulzů o frekvenci 8 Hz lze prolomit postiktální inhibici těsně po generalizovaném tonicko-klonickém záchvatu (GTCS). V modelu flurothylových křečí jsme dokumentovali, že expozice GTCS vede ke snížení prahu pro další záchvat vyvolaný o 3 dny později. Druhá část práce se zabývá ovlivněním prostorového učení v Morrisově vodním bludišti (MWM) po izolovaném flurothylovém záchvatu. Ukázali jsme, že i jediný GTCS vede ke zhoršení procesu učení ještě 7. den po tomto záchvatu. Narušení procesu učení v MWM není způsobeno buněčnou ztrátou ani rekurentními záchvaty. Tato práce dokládá, že příčinou není ani přetrvávající porucha hematoencefalické bariéry (HEB). Negativním behaviorálním důsledkům záchvatu lze předejít vystavením zvířat hypobarické hypoxii tři dny před záchvatem či podáním melatoninu jednu hodinu před záchvatem. Protektivní efekt melatoninu a hypoxického preconditioningu jsme dále testovali v modelu fotochemicky vyvolané fokální ischemie CNS (fototrombózy). Ve následující sérii experimentů jsme pomocí fototrombózy zkoumali lokální a vzdálené elektrofyziologické změny v hyperakutní fázi fokální ischemie. Zjistili jsme, že v první hodině ischemie dochází ke změnám amplitud a latencí somatosenzorických evokovaných potenciálů n. ischiadicus nejen v místě léze (primární projekce), ale i kontralaterálně (v zrcadlové oblasti kůry). Zde však mají změny pouze tranzitorní charakter. Již v tomto velmi časném období jsme pozorovali spontánní elektrografické záchvaty, mj. s nezávislým začátkem z kontralaterální zrcadlové kůry. Poslední část práce ukazuje, že vzdálené důsledky fokální ischemie mohou zahrnovat i vzdálenou změnu propustnosti HEB, přestože výsledky jsou značně ovlivněny druhem anestezie.

Summary

Both hypoxia and ischemia of the central nervous system (CNS) are frequently accompanied by epileptic seizures. On the other hand, epileptic seizures and epilepsy lead both to acute and chronic changes in cerebral blood flow (CBF). Both focal ischemic lesions and focal epileptic seizures influence CBF, metabolism and excitability not only locally, but also in remote functionally connected areas (diaschisis). Functional deficits observed as a result of hypoxia (ischemia) or epileptic seizures are usually attributed to cell loss. One of the aims of this doctoral thesis is to show that even less severe insults (which do not cause marked cell loss) may lead to lasting functional changes. To study these functional changes and possible ways to modulate them, we utilized acute animal models of CNS hypoxia, focal ischemia and epileptic seizures. Experimental section of this thesis is divided into several parts. First part examines excitability following generalized tonic-clonic seizures (GTCS). In the model of cortical self-sustained afterdischarge (SSAD), we found that trains of four weak pulses (frequency 8 Hz) break postictal inhibition which occurs immediately after the GTCS. Next, we showed that exposition to a GTCS induced by flurothyl inhalation leads to lowering of threshold for another seizure induced three days later. Second part of the experimental section deals with impairment of spatial learning in the Morris water maze (MWM) following isolated flurothyl seizure. We demonstrated that even a single GTCS leads to spatial learning impairment which persists up to 7 days after this seizure. Learning disturbance is not caused by cell loss, recurrent seizures, or (as we showed) by lasting BBB disruption. Furthermore, we demonstrated that these behavioral consequences of isolated seizures can be prevented by hypoxic preconditioning or pretreatment with melatonin. In the next part, the protective effects of melatonin and hypoxic preconditioning were tested in the model of photochemically induced focal cerebral ischemia (photothrombosis). In the following part, the model of cortical photothrombosis was used to study local and remote electrophysiological changes during hyperacute stage of focal cerebral ischemia. During the first hour post ischemia, we observed changes in amplitudes and latencies of sciatic somatosensory evoked potentials (SEP) not only in the primary projection area, but also in the contralateral hemisphere. However, alteration of SEP in the “mirror” cortical region was only transitory. We also observed spontaneous electrographic seizures originating not only from the lesion, but also from the contralateral region. The final part the experimental section of my thesis shows that remote effects of focal ischemia may include remote changes of BBB permeability, although this finding is markedly influenced by the choice of anesthesia.

1. Úvod

Patofyziologie hypoxicko-ischemického poškození CNS a epileptických záchvatů má řadu společných rysů. Základní mechanismy, ať už poškozující (excitotoxicita, volné radikály, zánět, změny propustnosti hematoencefalické bariéry (HEB), nekrotická a zejména apoptotická buněčná smrt), anebo reparační (např. glióza, neuroplasticita, neurogeneze, vaskulární proliferace), se vyskytují u obou typů poškození, přestože mohou být vyjádřeny v odlišné míře a mohou probíhat v rozdílném čase. Hypoxie, ale též globální a fokální ischemie CNS, jsou jak u lidí, tak i v experimentálních modelech za určitých podmínek doprovázeny epileptickými záchvaty a zvýšením excitability mozku. Epileptické záchvaty naopak akutně i chronicky ovlivňují průtok krve mozkiem (CBF) a toto ovlivnění může být klinicky významné (např. změny CBF během status epilepticus, postparoxysmální Toddova hemiparéza atd.).

Fokální ischemie CNS má často důsledky ve vzdálených, ale funkčně propojených oblastech (diaschíza). Dochází ke vzdálenému ovlivnění nejen CBF a metabolismu, ale též excitability (Andrews R.J., 1991; Buchkremer-Ratzmann I. et al., 1996). Také v rámci fokální epilepsie často dochází k ovlivnění metabolismu a perfuze vzdálených oblastí (Stubgen J.P., 1995). Sekundární zvýšení excitability v oblastech vzdálených primárnímu epileptogennímu ložisku je též dobře známa (např. tzv. mirror focus (Morrell F. a de Toledo-Morrell L., 1999; Tsuru N., 1981; Wilder B.J. a Morrell F., 1967)).

Společné fenomény najdeme i při studiu důsledků opakované expozice epileptickým záchvatům či hypoxii/ischemii. Při opakování inzultů se může odolnost vůči následující expozici snižovat, nebo naopak zvyšovat (navození tolerance). Fenomén kindlingu, tj. postupného rozněcování epileptické odpovědi (a její generalizace) při opakované indukci fokálních záchvatů je velmi dobře znám (Racine R.J., 1972). Kindling je možné navodit jak akutní, tak chronickou expozicí záchvatům (stimulaci). Opačná situace, tedy epileptická tolerance (zvýšení odolnosti k opakovaným epileptickým záchvatům), byla dokumentována např. v modelu bikukulinových křečí (Sasahira M. et al., 1995) či při intrahipokampální aplikaci kainátu (Lere C. et al., 2002). Ischemická či hypoxická tolerance (=ischemický či hypoxický preconditioning), tedy zvýšení odolnosti vůči opakované hypoxii (ischemii) pomocí předchozí expozice hypoxii (ischemii) mírnější tíže, je známa cca od poloviny minulého století. Ischemický preconditioning byl podrobně studován zejména v srdci, ale cca od 90. let minulého století též v CNS (Kitagawa K. et al., 1990). Epileptickou a ischemickou toleranci lze vyvolat také zkříženě. Bylo pozorováno např. zmírnění následků fokální ischemie díky předchozí expozici epileptickým záchvatům (Plamondon H. et al., 1999) nebo příznivé ovlivnění důsledků experimentálního SE pomocí hypoxického preconditioningu (Emerson M.R. et al., 1999).

Studium těchto společných mechanismů hypoxie/ischemie a epileptických záchvatů má nepochybný klinický význam. Může přispět mj. k pochopení patofyziologie sekundárních epilepsií při cévních onemocnění mozku (CMP), posthypoxických epilepsií (u dětí či pacientů po srdeční

zástavě), postparoxysmálních neurologických deficitů a důsledků SE. Kromě toho však vede k hlubšímu pochopení obecných principů reakce nervové tkáně na různé poškozující děje a tak umožňuje hledat nové terapeutické strategie.

Ve své práci pomocí akutních experimentálních modelů zkoumám některé funkční důsledky ischemie CNS a epileptických záchvatů a zabývám se možnostmi jejich ovlivnění. Konkrétně se jedná o lokální a vzdálené změny elektrofyzilogických vlastností a excitability v důsledku fokální ischemie, lokální a vzdálené změny propustnosti HEB v důsledku fokální ischemie, ovlivnění excitability v důsledku epileptických záchvatů (postiktální inhibice, práh pro opakované záchvaty), změny propustnosti HEB v důsledku izolovaných epileptických záchvatů a konečně ovlivnění důsledků epileptických záchvatů a fokální ischemie pomocí preconditioningu. Společným jmenovatelem této práce je též teze, že i podněty a inzulty o relativně malé intenzitě mohou i přes nepřítomnost závažných strukturálních důsledků (buněčná smrt) vést k významným a mnohdy i dlouhotrvajícím důsledkům.

V teoretické části dizertační práce jsou shrnuty hlavní poznatky týkající se vzdálených důsledků fokálních lézí a hypoxicko/ischemického preconditioningu. Současně je podán přehled akutních modelů hypoxie, globální a fokální ischemie a generalizovaných epileptických záchvatů, neboť některé z těchto modelů využívám v experimentální části práce.

2. Hypotézy

1. Vhodnými parametry stimulace lze prolomit postiktální inhibici po generalizovaném tonicko-klonickém epileptickém záchvatu.
2. Předchozí expozice generalizovanému tonicko-klonickému záchvatu ovlivňuje práh pro záchvat následující.
3. Izolovaný epileptický záchvat má přetrvávající behaviorální důsledky, jejichž příčinou je porucha hematoencefalické bariéry.
4. Přítomnost a charakter behaviorálních důsledků izolovaných epileptických záchvatů lze ovlivnit preconditioningem (hypoxií, záchvaty) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin).
5. Preconditioningem (hypoxií) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin) lze ovlivnit též rozsah fokální ischemie.
6. V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným elektrofyzilogickým změnám.
7. V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným změnám excitability.
8. Vzdálené důsledky fokální ischemie zahrnují též vzdálenou změnu propustnosti hematoencefalické bariéry.

3. Metodika

Veškeré experimenty byly prováděny v souladu s doporučeními Ministerstva zdravotnictví ČR a schváleny Etickou komisí 3. LF UK. Laboratorní zvířata byla vždy aklimatizována nejméně tři dny před experimentem v podmínkách dvanáctihodinového cyklu světlo/tma s volným přístupem k vodě a potravě.

Experimentální zvířata a skupiny: Ve všech experimentech byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar (ANLAB, ČR). Skupiny zvířat jsou popsány u každého experimentu zvlášť.

Operativa: Je popsána zvlášť u experimentů, kde byly použity chirurgické techniky.

Elektrofyzilogické metody: Biosignál byl zaznamenáván pomocí diferenčního zesilovače CED 1401 (Cambridge Electronic Design Limited, UK). Elektrokortikogramy, evokované potenciály a interhemisférické odpovědi byly zaznamenávány pomocí firemního software Signal for Windows 1.80 utility (Cambridge Electronic Design Limited, UK). Stimulace byly konfigurovány a spouštěny pomocí stejného firemního software. Konkrétní protokoly elektrofyziologických měření jsou blíže popsány u jednotlivých experimentů.

Flurothylové záchvaty: Zvířata byla umístěna do vzduchotěsné komory ($V=14$ l) se zevním přívodem vzduchu. Na filtrační papír umístěný ve stropu komory byl infuzní pumpou konstantní rychlostí 30 ul/min aplikován flurothyl (di-(2,2,2,-trifluoroethyl) ether). Aplikace pokračovala do té doby, než byl pozorován tonicko-klonický záchvat s pádem (GTCS). Latence ke GTCS byla zaznamenána. Ihned po záchvatu byla směs flurothylu se vzduchem z komory odsáta a nahrazena vzduchem.

Hypobarická hypoxie: Zvířata byla v hypobarické komoře vystavena na jednu hodinu simulované výšce 9000 m n.m. (barometrický tlak 210 mmHg; $pO_2 = 44$ mmHg; teplota = 24 ± 1 °C). Výstup a sestup trval 10 minut (pro experiment 4.2.) či 15 minut (pro experiment 4.3.). Tato doba byla zavzata v celkovém čase 1h. Parciální tlak CO_2 byl udržován na normálních hodnotách.

Fototrombóza: Po uvedení zvířete do hluboké anestezie byla incidována kůže na hlavě ve střední čáře a exponována kalva. Anestezie se v jednotlivých experimentech lišila (viz 4.3., 4.4., 4.5.). Bezprostředně před zahájením svícení laserem byla zvířatům cestou ocasní žíly pomalu aplikována Bengálská červeň (RB: 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein; 20 mg/kg/2ml v 0,9% NaCl). Po aplikaci RB byla zvířata přemístěna do stereotaktického rámu. Předem stereotakticky definovaná oblast byla následně ozařována zeleným světlem diodového laseru (LAGR50: vlnová délka 532 nm, hustota výkonu 50 mW/mm², ozářený povrch <1 mm², pracovní teplota 20-30 °C, odhadovaná hloubka průniku 333 um). Délka ozařování, cílové stereotaktické koordináty a konkrétní způsob provedení (transkalvární svícení, či svícení přímo na kortex po předchozí kraniektomii) se v jednotlivých experimentech lišily (viz 4.3., 4.4., 4.5.).

Prostorové učení v Morrisově vodním bludišti (MWM): Nehodnotili jsme vybavení již naučeného, ale proces učení u naivních zvířat. Použili jsme klasický test, při němž má zvíře za úkol nalézt ostrůvek ukrytý pod hladinou. Zvířata byla testována během sedmi po sobě jdoucích dnů. Každý

den bylo dané zvíře testováno osmkrát. Potkan byl umístěn hlavou směrem ke stěně bazénku, a to na jedné ze čtyř startovacích pozic (SZ, SV, JZ, JV kvadrant). Po umístění do bazénku plaval tak dlouho, dokud nenašel skrytý ostrůvek (čas byl zaznamenán) anebo dokud neuplynulo 60 s. V takovém případě byl zaznamenán čas 60 vteřin a zvíře bylo z bazénku vyjmuto. Všechny čtyři startovací pozice byly jedenkrát zopakovány. Z osmi zkoušek byl spočítán průměrný čas pro dané zvíře, a následně průměrný čas pro danou skupinu a daný den.

Morfologie: Metody využití k morfologickému zhodnocení jsou podrobněji popsány u jednotlivých experimentů. Zde pouze výčet:

1. Hodnocení poruchy hematoencefalické bariéry (HEB) po flurothylovém záchvatu pomocí fluorescenční mikroskopie extravazace Evansovy modři (viz 4.2.).
2. Hodnocení rozsahu fototrombotických lézí pomocí TTC (viz 4.3.).
3. Hodnocení lokálních a vzdálených změn propustnosti HEB v důsledku fototrombózy pomocí fluorescenční mikroskopie extravazace Evansovy modři (viz 4.5.).

Statistické zhodnocení: Statistika byla zpracovávána v programu GraphPad Prism® 5.01. Hladina významnosti byla vždy stanovena jako $p < 0,05$. Konkrétní zvolené statistické metody jsou blíže popsány u jednotlivých experimentů.

4. Jednotlivé experimenty: skupiny zvířat, metodika a výsledky

4.1. Prolomení postiktální inhibice krátkou salvou stimulačních pulzů

V tomto experimentu jsme testovali hypotézu, zda lze vhodnými parametry stimulace prolomit postiktální inhibici po generalizovaném tonicko-klonickém epileptickém záchvatu (GTCS). Pro tento účel jsme zvolili model kortikálního následného výboje (SSAD).

4.1.1. Skupiny zvířat, operativa a elektrofyziologie

Dospělí samci laboratorního potkana kmene Wistar (N=18) byli rozděleni do dvou skupin (A, B). V anestezii pentobarbitalem (70 mg/kg i.p.) byla chirurgicky odhalena kalva a na předem určených stereotaktických koordinátách byly po provedení návrtů implantovány elektrody: dvě bipolárně zapojené stimulační elektrody byly umístěny na povrch mozku v oblasti pravé senzomotorické arey (SMA) (AP=1,-1; L=0,2), registrační elektrody byly umístěny na SMA vlevo (AP=0, L=-2) a dále na oblast zrakové kůry vlevo (AP=6, L=-4). Pro registraci z pravé SMA byly využity stimulační elektrody. Referenční elektroda byla fixována na nosní kosti zvířete. Po implantaci byly všechny elektrody upevněny pomocí akrylátové čepičky. Týden po implantaci elektrod byla zvířata připojena k digitálnímu EEG přístroji (referenční zapojení, taktovací frekvence 1 kHz). Po nahrání 5 min spontánního ECoG byl u každého zvířete zjištěn práh pro interhemisférickou odpověď (IHR) pomocí postupného zvyšování intenzity stimulace (kroky aa 10 μ A). Jakmile bylo při dané intenzitě zaznamenáno pět po sobě jdoucích IHR, předchozí intenzita

stimulace byla označena jako prahová a byla využita jako referenční hodnota intenzity stimulace. V experimentu jsme použili dva druhy stimulace: ve skupině A jednotlivé bipolární pravoúhlé pulzy (tzv. 1P: intenzita stimulace 2,5x práh, trvání pulzu 1ms, interval mezi jednotlivými pulzy 20 s) a ve skupině B krátké salvy stimulačních pulzů (tzv. 4P: salva čtyř pravoúhlých pulzů s frekvencí 8 Hz, intenzitou 2,5x práh, trvání jednotlivého pulzu 1 ms). Po stanovení prahu pro IHR bylo ve skupině A aplikováno 20 1P a ve skupině B 20 4P. V další fázi byl u každého zvířete vyvolán 4x následný výboj (stimulace: trvání 20 s, frekvence 8 Hz, intenzita 5x práh, trvání jednoho pulzu 1 ms). Interval mezi jednotlivými následnými výboji trval vždy 10 minut. Během těchto 10 minut byly u zvířat aplikovány 1P (skupina A) a 4P (skupina B). Schéma pokusu viz Obr. 4.1.1. V experimentu bylo hodnoceno trvání jednotlivých následných výbojů a přítomnost elektrografických záchvatů v intervalu mezi následnými výboji.

Statistika: Pro srovnání počtu elektrografických záchvatů ve skupině A a B byl použit Mann-Whitneyho U-test. Rozdíl mezi skupinou A a B co do průměrného trvání 1., 2., 3., resp. 4. následného výboje byl testován pomocí nepárového t-testu.

Obr. 4.1.1.: Schéma stimulace

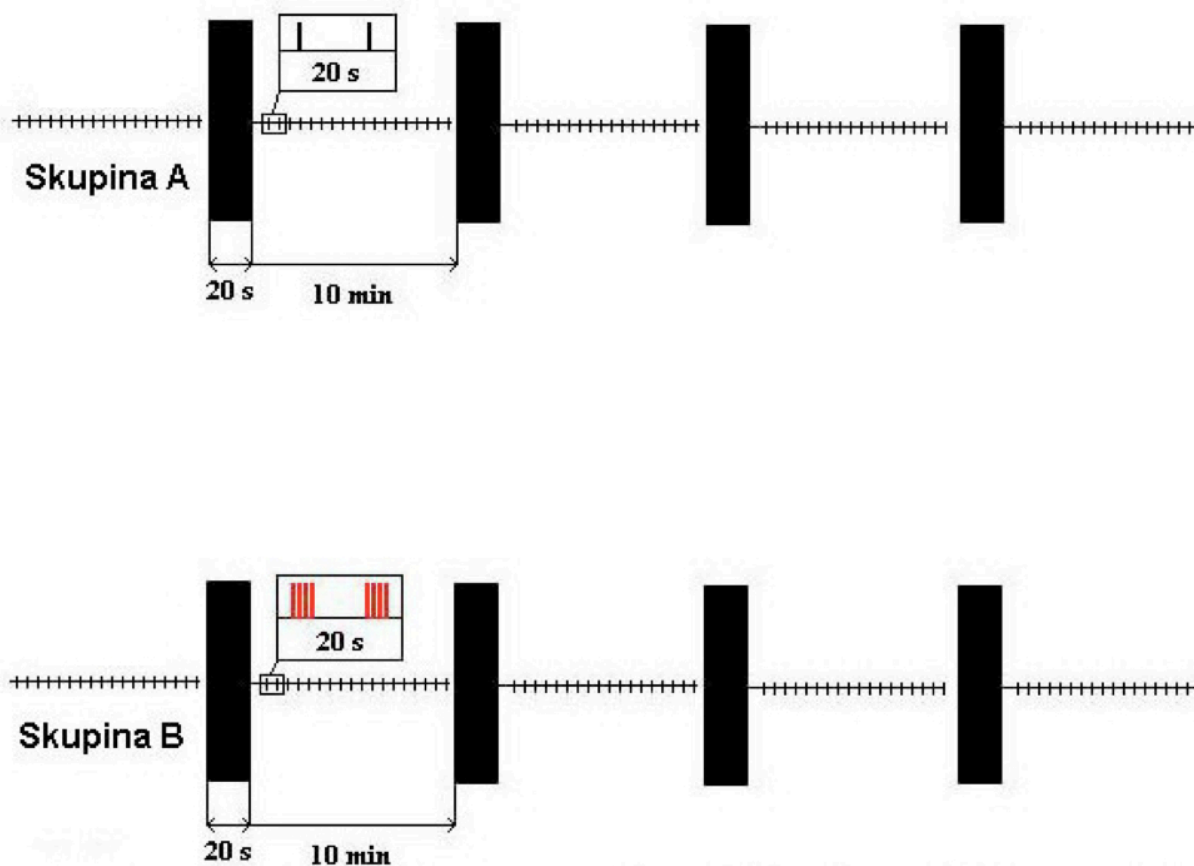


Schéma pokusu ve skupině A (horní část obrázku) a ve skupině B (dole). Černé obdélníky představují stimulaci vedoucí k vyvolání následných výbojů (trvání 20s, $f=8$ Hz, intenzita 2,5x práh). Z obrázku je patrný rozdíl mezi oběma skupinami: ve skupině A byly v intervalech mezi jednotlivými následnými výboji aplikovány jednotlivé pulzy (intenzita 2,5x práh, trvání 1ms), zatímco ve skupině B salvy čtyř pulzů (intenzita 2,5x práh, trvání pulzu = 1 ms, $f=8$ Hz).

4.1.2. Výsledky

Baseline stimulace (tj. stimulace před indukcí 1. následného výboje) jednotlivými pulsy nevyvolala elektrografické záchvaty u žádného zvířete. Baseline stimulace salvou 4P vedla u jednoho z devíti testovaných zvířat k atypické elektrokortikografické odpovědi. V intervalech mezi jednotlivými následnými výboji vyvolala stimulace jednotlivými pulsy jen několik krátkých elektrografických záchvatů. Počet elektrografických záchvatů zaznamenaných ve skupině B (tj. při použití stimulace 4P) byl ve srovnání se skupinou A signifikantně vyšší po prvním, třetím a čtvrtém následném výboji ($p < 0,05$), nikoli však po druhém následném výboji (viz Graf 4.1.1.). I celkový počet takto vyvolaných elektrografických záchvatů byl ve skupině B vyšší (Mann–Whitney U test, $p < 0.01$). Elektrokortikografické záchvaty se ve skupině B podařilo vyvolat i bezprostředně po ukončení následného výboje.

Následné výboje vyvolané elektrickou stimulací byly ve skupině B v průměru delší, i když tento rozdíl byl statisticky signifikantní pouze v případě druhého následného výboje. Průměrná délka prvního, druhého, třetího a čtvrtého následného výboje uvnitř skupin se statisticky významně nelišila.

4.2. Ovlivnění prahu pro flurothylový záchvat a jeho důsledků na prostorové učení

V této části jsme zkoumali: 1) zda předchozí expozice GTCS ovlivňuje práh pro záchvat následující, 2) zda izolovaný GTCS má přetrvávající behaviorální důsledky, jejichž příčinou je porucha hematoencefalické bariéry (HEB) a 3) zda přítomnost a charakter těchto důsledků lze ovlivnit preconditioningem (hypoxií, záchvaty) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin).

4.2.1. Skupiny zvířat a metodika

Skupiny zvířat: Dospělí samci laboratorního potkana Wistar (200-250g; N=78) byli rozděleni do sedmi experimentálních a jedné kontrolní skupiny (C: n=12). Kontrolní skupina byla testována pouze v Morrisově vodním bludišti (MWM). Popis metodiky flurothylových křečí, hypobarické hypoxie a testování v MWM viz sekce 3. Metodika. Přehled skupin:

1. “F” = pouze flurothylový záchvat (n=10). U zvířat v této skupině byl pomocí inhalace flurothylu navozen GTCS. 24 h po záchvatu bylo zahájeno učení v MWM.
2. “H” = pouze hypoxie 9000 m n.m. (n=8). Zvířata v této skupině byla vystavena 1 h trvající hypobarické hypoxii v simulované výšce 9000 m n.m. 24h po hypoxii bylo zahájeno učení v MWM.
3. “H1hF” = hypoxie 9000 m n.m., hodinu poté flurothylový záchvat (n=10). Zvířata v této skupině byla vystavena 1 h trvající hypobarické hypoxii v simulované výšce 9000 m n.m. O jednu hodinu

později byl u nich pomocí inhalace flurothylu navozen GTCS. 24h po záchvatu bylo zahájeno učení v MWM.

4. "H3dF" = hypoxie 9000 m n.m., 3 dny poté flurothylový záchvat (n=9). Zvířata v této skupině byla vystavena 1 h trvající hypobarické hypoxii v simulované výšce 9000 m n.m. O tři dny později byl u nich pomocí inhalace flurothylu navozen GTCS. 24h po záchvatu bylo zahájeno učení v MWM.
5. "F1hF" = flurothylový záchvat, za hodinu poté znovu flurothylový záchvat (n=10). U zvířat v této skupině byl indukován flurothylový záchvat, který byl o jednu hodinu později zopakován. 24h po druhém záchvatu bylo zahájeno učení v MWM.
6. "F3dF" = flurothylový záchvat, za 3 dny poté znovu flurothylový záchvat (n=10). U zvířat v této skupině byl indukován flurothylový záchvat. Za tři dny byl záchvat zopakován. 24h po druhém záchvatu bylo zahájeno učení v MWM.
7. "M1hF" = Melatonin i.p., za hodinu poté flurothylový záchvat (n=9). U těchto zvířat byl nejprve i.p. aplikován melatonin (100mg/kg/2ml ve 2% roztoku Tweenu ve fyziologickém roztoku). Za hodinu byl u zvířat vyvolán GTCS. 24h po záchvatu bylo zahájeno učení v MWM.

Porucha HEB po flurothylovém záchvatu: Před flurothylovým GTCS byla potkanům (n=3) i.v. aplikována Evansova modř ("EB"; 0.04 g/kg/2ml; rozpuštěna v 0.9 % NaCl). U kontrol (n=4) byla aplikována EB bez následného vyvolání záchvatu. 24h poté byla zvířata utracena, mozky perfundovány roztokem paroformaldehydu, fixovány a nakrájeny na 40 μ m silné řezy. EB se v plasmě váže ochotně na albumin. EB-albumin komplex emituje v zeleném světle červený fluorescenční signál. Pomocí fluorescenčního mikroskopu lze tedy zkoumat extravazaci EB-albuminu. Za standardních podmínek (zvětšení, expozice, ISO, rozlišení, formát) jsme pořídili u každého zvířete digitální mikrofotografie všech jednotlivých řezů. Fotografie vybraných mozkových oblastí (CA1, CA2, CA3, thalamus, subthalamus, piriformní kůra) byly pořízeny i ve větším zvětšení. Fotografie byly analyzovány pomocí programu ImageJ 1.37v. Kromě vizuálního hodnocení jsme fluorescenci v různých oblastech mozku hodnotili kvantitativně. Nad danou oblast jsme umístili virtuální rámeček (1x2mm v oblasti kortexu, resp. 200x200 μ m v oblasti CA1, CA2, CA3, subthalamu, thalamu a piriformní kůře). V tomto rámečku byla pomocí nástrojů ImageJ změřena průměrná desita signálu. Tímto způsobem jsme získali soubor hodnot průměrné denzity pro danou oblast a danou skupinu zvířat.

Statistika: K porovnání skupin jsme využili testu ANOVA s Bonferroniho post-testovým srovnáním, a nepárového (nebo párového v případě porovnání konsektivních dnů v rámci jedné skupiny) t-testu. K porovnání hodnot signálové denzity fluorescence EB mezi experimentální a kontrolní skupinou byl použit Mann-Whitneyho U-test.

4.2.2. Výsledky

Ve skupině F3dF došlo u druhého záchvatu k signifikantnímu zkrácení latence ke GTCS ve srovnání se všemi ostatními skupinami (F3dF: $355,0 \pm 28,3$ s vs. F: $615,5 \pm 55,6$ s, $p=0,0007$, nepárový t-test). Byl-li odstup dvou GTCS 1h (skupina F1hF), ke zkrácení latence nedošlo. Expozice hypobarické hypoxii tři dny před záchvatem ani expozice melatoninu 1 hodinu před záchvatem nevedly ve srovnání se skupinou F k signifikantní změně prahu pro GTCS. Byl však zaznamenán signifikantní rozdíl v prahu pro GTCS mezi oběma zmíněnými skupinami navzájem (Mel1hF: průměrná latence $668,0 \pm 39,1$ vs. H3dF: průměrná latence $520,0 \pm 33,1$, $p=0,0097$ nepárový t-test).

Jednotlivý GTCS vyvolaný inhalací flurothylu zhoršuje prostorové učení v Morrisově vodním bludišti. Tento efekt přetrvává ještě 7 dní po záchvatu (F: průměrná latence 7. den $19,66 \pm 1,62$ s vs. C: průměrná latence 7. den $10,44 \pm 0,49$ s, $p=0,0001$, nepárový t-test). Po jednotlivé expozici hypobarické hypoxii jsme přetrvávající zhoršení učení v MWM nepozorovali. Melatonin podaný 1h před flurothylovým záchvatem rušil negativní dopad záchvatu na učení (F: průměrná latence 7. den $19,66 \pm 1,62$ s vs. Mel1hF: průměrná latence 7. den $12,80 \pm 0,92$, $p=0,0429$, nepárový t-test). Podobný efekt měla hypobarická hypoxie aplikovaná 3 dny, nikoli však 1h, před záchvatem (F: průměrná latence 7. den $19,66 \pm 1,62$ s vs. H3dF: průměrná latence 7. den $9,28 \pm 1,07$, $p=0,006$, nepárový t-test). Vizuální ani kvantitativní hodnocení neprokázalo přítomnost extravazace komplexu EB-albumin a tedy přítomnost signifikantní poruchy HEB během flurothylového záchvatu či 24h po něm.

4.3. Ovlivnění rozsahu ischemické léze hypoxickým preconditioningem a podáním melatoninu

V tomto experimentu jsme testovali hypotézu, zda preconditioningem (hypoxií) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin) lze ovlivnit rozsah fokální ischemie.

4.3.1. Skupiny zvířat a metodika

Dospělí samci potkana kmene Wistar (N=49, váha 200-220g) byli rozděleni do čtyř skupin:

1. "H3dPT": Hypoxie, za tři dny poté fototrombóza (n=11). První experimentální skupina byla vystavena hodinové hypobarické hypoxii 9000 m n.m. O tři dny později byla u ní pomocí fototrombózy indukována ischemická léze v oblasti sensorimotorické kůry.
2. "M1hPT" = Melatonin i.p., za hodinu poté fototrombóza (n=14). U těchto zvířat byl hodinu před zahájením fototrombózy i.p. aplikován melatonin (100mg/kg/2ml ve 2% roztoku Tweenu ve FR). O tři dny později byla u ní pomocí fototrombózy indukována ischemická léze v oblasti sensorimotorické kůry.
3. "PT": Pouze fototrombóza (n=16). Zvířata v této skupině nebyla vystavena jakékoli experimentální manipulaci před fototrombózou.

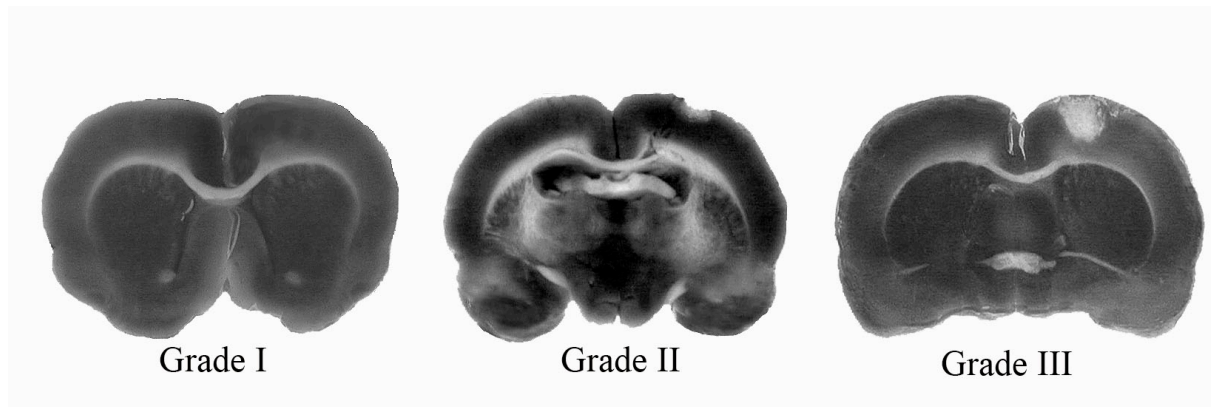
4. "C": Kontroly (n=8). Tato skupina sloužila k ověření účinnosti našeho fototrombotického modelu. V této skupině byl zvířatům podán před svícením laserem místo RB stejný objem fyziologického roztoku.

Fototrombóza: viz 3. Metodika

Hodnocení rozsahu fototrombotických lézí pomocí TTC: 72h po fototrombóze byla zvířata v hluboké anestezii urethanem transkardiálně perfundována fyziologickým roztokem (37 °C) a dekapitována. Mozky zvířat byly okamžitě vyňaty a nakrájeny v koronární rovině na 500 µm silné řezy na úrovni předpokládané fototrombotické léze. K detekci ischemické léze jsme využili redukční test 2,3,5-trifenyltetrazolium chloridem (TTC). Řezy mozku byly na dobu 45 minut ponořeny do barvicího roztoku (2% TTC v 0.1 M fosfátovém pufru zahřátém na 37°C) ve zcela zatemněné inkubační nádobě vyhřívané na 37 °C. K zhodnocení morfologických změn byly pořízeny digitální mikrofotografie řezů.

Hodnocení lézí: Metabolicky neaktivní tkáň (ischemická léze) se v barvení TTC zobrazí jako oblast vyblednutí. Léze byly na základě tíže rozděleny do tří stupňů: I = žádná léze, II = mírná léze (jen kortikální), III = hluboká léze zasahující i oblast striata (viz Obr. 4.3.1.). Počet zvířat s daným stupněm léze byl zaznamenán pro každou skupinu. Ke srovnání skupin byl využit Fisherův exaktní test v kontingenční tabulce.

Obr. 4.3.1.: Tři stupně fototrombotické léze



Stupně fototrombotické léze v barvení TTC (převedeno do odstínů šedi). Zleva žádná léze (stupeň I), lehká léze (stupeň II): léze postihující pouze kortex či jeho část, těžká léze (stupeň III): léze zasahující hluboko ke corpus callosum a subkortikálním strukturám.

4.3.2. Výsledky

U kontrolní skupiny nebyly ischemické léze pozorovány. Ve skupině PT jsme pozorovali ischemické léze u všech zvířat (v 15 případech stupeň III, tj. hluboké léze zasahující k podkorovým strukturám, v jednom případě lehká léze stupně II). U skupiny "H3dPT" byly výsledky podobné (v 11 případech léze stupně III, v jednom případě stupně II). Ve skupině M1hPT jsme léze stupně III zaznamenali pouze u čtyř zvířat, léze stupně II byly přítomny u dvou zvířat. U zbývajících osmi

zvířat léze nebyly přítomny (stupeň I). Redukce počtu zvířat s lézí stupně III ve skupině premedikované melatoninem byla statisticky významná jak ve srovnání se skupinou PT ($p < 0,0005$), tak se skupinou H3dPT ($p < 0,005$). Stejně tak počet zvířat bez léze byl ve skupině předléčené melatoninem signifikantně vyšší ve srovnání se skupinou PT ($p < 0,0005$) i se skupinou H3dPT ($p < 0,0005$).

4.4. Elektrofyziologické změny v hyperakutní fázi kortikální fototrombózy.

V tomto experimentu jsme testovali: 1) zda v hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným elektrofyziologickým změnám a 2) zda v hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným změnám excitability. Jako model fokální ischemie jsme použili kortikální fototrombózu.

4.4.1. Skupiny zvířat a metodika

Dospělí samci potkana kmene Wistar ($N=21$, váha 300-400g) byli rozděleni do dvou skupin:

1. První skupina zvířat (PT; $n=12$) byla v průběhu experimentu podrobena kortikální fototrombóze v oblasti pro zadní končetinu senzomotorické kůry pravé hemisféry.
2. U druhé skupiny (Las; $n=9$) byla stejná oblast exponována pouze laserovému světlu, bez současného podání fotodynamického generátoru (Bengálské červeně). Namísto toho byl zvířatům podán stejný objem FR. Experimentální protokol se jinak u obou skupin nelišil, a sloužily proto vůči sobě jako kontroly.

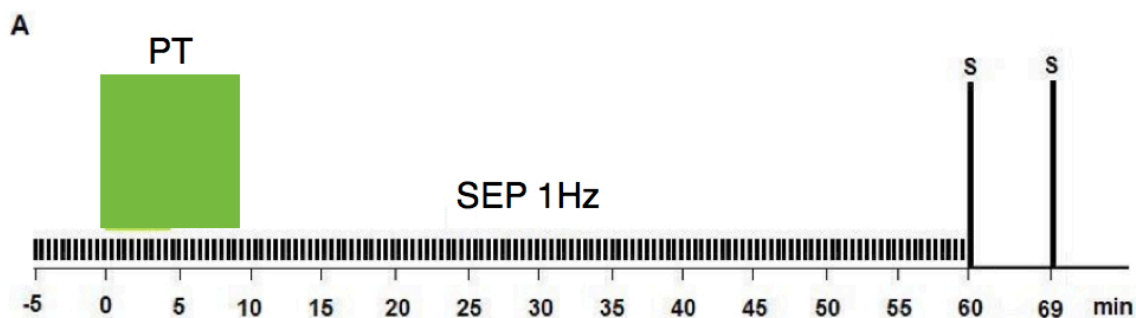
Anestezie: i.p. podaná směs ketaminu (100 mg/kg i.p.; Narkamon, Spofa) a xylazinu (7 mg/kg i.p.; Rometar, Spofa). Hloubka anestezie byla v průběhu experimentu každých pět minut testována jemným stíhnutím kůže na plantě zadní končetiny zvířete. V případě flekční reakce byl podán i.p. bolus stejné směsi v redukované dávce (25% dávky použité pro úvod do anestezie). Teplota zvířat byla během experimentu udržována pomocí podložky vyhřívané na 37 °C.

Operativa: Po uvedení zvířete do hluboké anestezie byla incidována kůže na hlavě ve střední čáře a exponována kalva. Pomocí trepanu byly vyvrtány dva otvory o průměru 5 mm nad pravým a levým senzomotorickým kortexem (oblast pro zadní končetinu). Následně byl vypreparován levostranný n. ischiadicus a na nerv pravidelně svlažovaný FR byla naložena bipolární stříbrná stimulační elektroda. Po této přípravě byla zvířata přemístěna do stereotaktického rámu. Stereotaktický rám byl uložen v odstíněné kleci s cílem minimalizovat síťový artefakt.

Fototrombóza: viz 3. Metodika. Sterotaktické koordináty laseru vůči bregmatu: AP = -2 mm, L=2 mm, doba expozice v obou skupinách 9 minut. Během svícení byla levá část kalvy odstíněna pomocí akrylátové lamely potažené alobalem. Pokus probíhal v zatemněné místnosti s cílem vyloučit nechtěnou aktivaci RB světlem z prostředí.

Elektrofyziologie: Hodnotili jsme 1) změny kortikálních somatosenzorických evokovaných potenciálů (SEP) a 2) reakci na přímou kortikální stimulaci. Schéma pokusu znázorňuje Obr. 4.4.1. Dvě stříbrné elektrody o průměru $0,8 \pm 0,2$ mm byly v místě trepanačních otvorů opatrně umístěny

Obr. 4.4.1.: Schéma pokusu



Před zahájením svícení laserem byl u každého zvířete 5 minut zaznamenáván elektrookortikogram za současné registrace SEP z levého n. ischiadicus (stimulace n. ischiadicus každou vteřinu, tj. frekvencí 1 Hz). V čase $t=0$ bylo zahájeno svícení laserem, které trvalo 9 minut. Zaznamenávání SEP pokračovalo do $t+60$ minut. Po skončení tohoto období byla na pravou senzomotorickou kůru aplikována přímá elektrická stimulace v trvání 20 s (pravoúhlé pulsy v trvání 1 ms, intenzita 2,5x práh pro SEP, frekvence 8 Hz). Po 10 minutách byla stimulace ještě jednou zopakována. **Na ose x vyneseno čas v minutách, PT = fototrombóza (svícení), SEP = somatosenzorické evokované potenciály, S = přímá kortikální elektrická stimulace.**

na dura mater nad levou a pravou senzomotorickou oblast ($AP = 2$ mm, $L=2$ mm, resp. -2 mm).

První z elektrod tak byla uložena kontralaterálně vůči stimulaci n. ischiadicus a ipsilaterálně vůči svícení laserem (tj. vpravo) a sloužila nejen jako registrační, ale v druhé části experimentu též jako stimulační elektroda. Druhá z elektrod pak byla uložena v zrcadlové oblasti - ipsilaterálně vůči stimulaci n. ischiadicus a kontralaterálně vůči svícení laserem (tj. vlevo). Referenční elektroda byla uložena na nosní kosti zvířete. Laserový paprsek byl zacílen na kortex v těsném sousedství pravostranné registrační elektrody, kterou přímo neosvětloval.

A. Somatosenzorické evokované potenciály n. ischiadicus (SEP). Ke stimulaci n. ischiadicus jsme využívali jednotlivé bipolární pravoúhlé pulzy v trvání 1 ms. U každého zvířete byl nejprve zjištěn práh pro SEP postupným zvyšováním intenzity stimulace (kroky po 10 μA). Intenzita stimulace byla následně stanovena na 2,5 násobek prahu. Snímání SEP probíhalo v 1 s trvajících přebězích (frames). Stimulace n. ischiadicus byla zahájena 5 minut před začátkem svícení a pokračovala během následujících 60 minut (viz Obr. 4.4.1.). U každého zvířete byly následně analyzovány tři časové epochy: 1) “baseline”, tj. SEP v čase od -5 do 0 minut, 2) “svícení”: tj. SEP během druhé části svícení a těsně po něm (čas od 4,5 do 10,5 minut) a 3) pozdní fáze: tj. SEP pozdní postiradiační fáze (čas od 30 do 45 minut). Po sobě následující SEP v dané epoše byly zprůměrovány pomocí Signal for Windows v1.80. U takto zprůměrovaných SEP jsme hodnotili: 1) latenci k prvnímu pozitivnímu peaku (P1), 2) amplitudu P1, 3) latenci k prvnímu negativnímu peaku (N1), 4) amplitudu N1, 5) latenci k druhému pozitivnímu peaku (P2), 6) amplitudu P2. Amplitudy byly měřeny peak-to-peak. Z takto získaných dat byly následně dopočítány průměrné

latence a amplitudy jednotlivých komponent SEP pro každou z epoch v dané skupině a na dané straně.

B. Přímá kortikální stimulace: Ve druhé fázi pokusu (60 minut po zahájení - viz Obr. 4.4.1.) jsme u každého zvířete provedli dvakrát po sobě přímou elektrickou stimulaci pravostranné senzomotorické kůry (trvání stimulace 20s, intenzita 2,5x práh SEP, pravoúhlé pulzy v trvání 1ms, frekvence 8 Hz). Interval mezi jednotlivými stimulacemi byl 9 minut. Byla hodnocena přítomnost následných výbojů, případně jejich trvání.

C. Spontánní elektrografické záchvaty: S ohledem na anestezii nebylo možné hodnotit přítomnost záchvatů elektroklínickou korelací. Pro účely našeho pokusu byly elektrografické záchvaty definovány jako paroxysmální události v trvání nejméně 2 vteřiny s morfologií hrot-vlna, či v podobě rytmických hrotů nebo ostrých vln s amplitudou zřetelně převyšující základní linii (nejméně 2x baseline), či mající zřetelný vývoj frekvence a/nebo amplitudy.

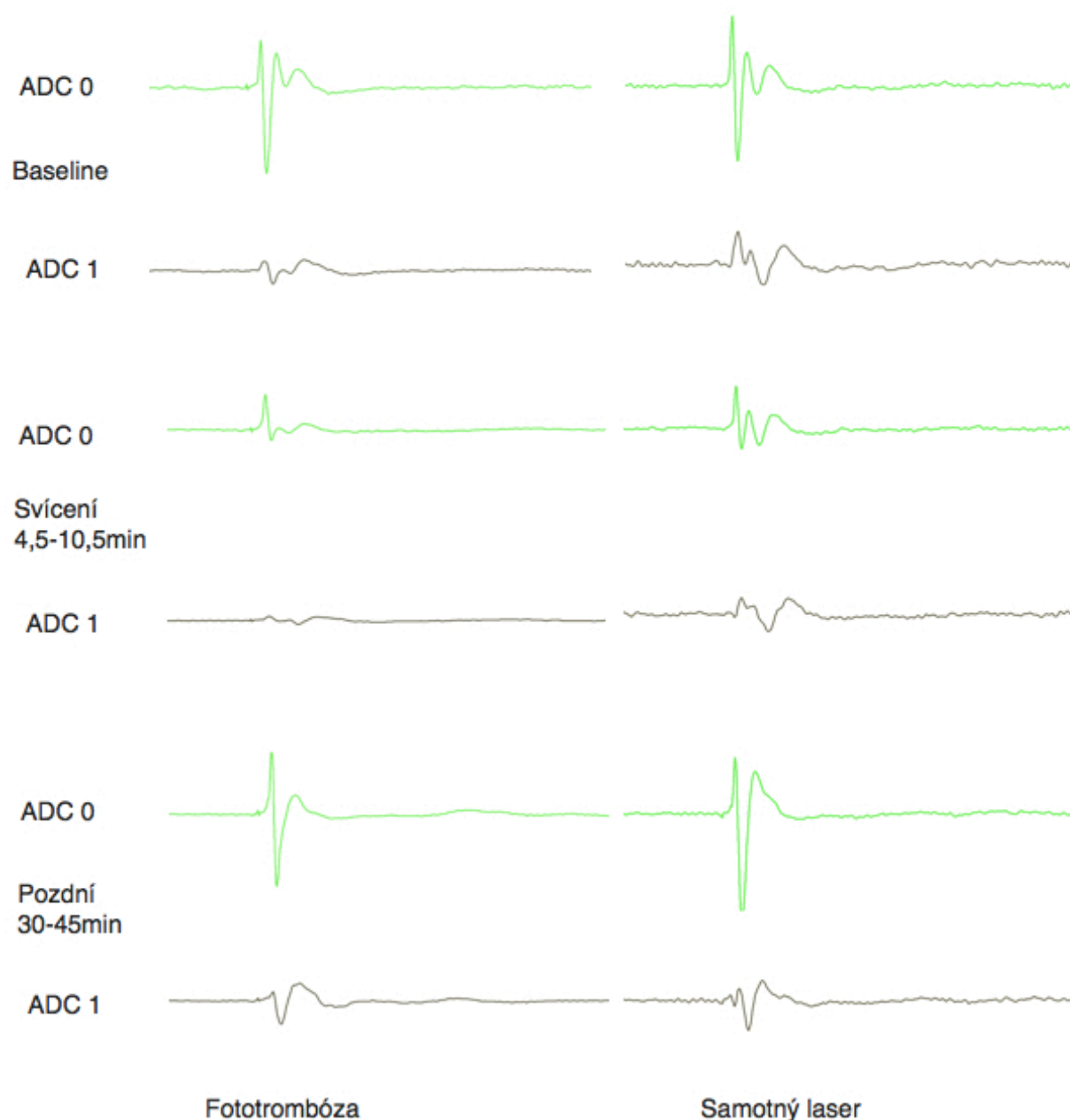
Hodnocení rozsahu fototrombotických lézí pomocí TTC: viz Experiment 4.3.

Statistika: Použité statistické testy: repeated measures ANOVA s Tukeyho post-testovým porovnáním skupin, Friedmannův test s post-testovým porovnáním podle Dunnse, párový t-test, Wilcoxonův test, one-way ANOVA s Tukeyho post-testovým porovnáním skupin, Kruskal-Wallisův test s post-testovým porovnáním podle Dunnse, nepárový t-test, Mann-Whitneyho U test. Výskyt následných výbojů ve skupinách byl porovnán Fisherovým exaktním testem. Medián trvání následných výbojů ve skupinách byl porovnán Mann-Whitneyho U testem.

4.4.2. Výsledky

Somatosenzorické evokované potenciály n. ischiadicus (SEP): Stimulace levého n. ischiadicus vyvolala v obou skupinách reprodukovatelné SEP v senzomotorickém kortexu obou hemisfér. Zprůměrované baseline SEP vykazovaly charakteristickou morfologii s iniciální výraznou pozitivitou (P1), někdy předcházenou dvěma menšími pozitivními vlnami, následně hlubokou negativní výchylkou (N1) a další vysokou pozitivitou (P2) (viz Obr. 4.4.2). Tento pravidelný komplex P1-N1-P2 byl (již variabilně) následován dalšími pozdními komponentami. Tvarově se SEP z primární projekční oblasti a kontralaterální (levé) strany výrazně nelišily, byly však zaznamenány rozdíly co do amplitud a latencí. Latence SEP vpravo (primární projekční oblast) byly u obou skupin kratší než vlevo. Amplitudy všech komponent SEP vlevo byly u obou skupin signifikantně nižší než vpravo (viz též Obr. 4.4.2). Mezi skupinami (PT vs. Las) se latence ani amplitudy jednotlivých komponent SEP v jednotlivých fázích pokusu a na jednotlivých stranách signifikantně nelišily. Významné rozdíly však byly zachyceny uvnitř obou skupin během svícení laserem. Ve skupině PT došlo během svícení k významnému prodloužení latence P2 vlevo oproti baseline. Ve skupině vystavené pouze laseru (Las) bylo kromě toho při svícení zaznamenáno signifikantní prodloužení latence P2 i v primární projekční oblasti (vpravo), a dále signifikantní prodloužení latence N1 oboustranně. Kromě prodloužení latencí došlo během svícení v obou skupinách (PT i Las) též ke snížení amplitud oproti baseline, konkrétně u komponent N1 vpravo a

Obr. 4.4.2.: Ukázka SEP n. ischiadicus v hyperakutní fázi fototrombózy



Ukázka zprůměrovaného SEP n. ischiadicus z jednotlivých skupin. V levém sloupci je ukázka záznamu zvířete vystaveného fototrombóze, v pravém sloupci záznam zvířete vystaveného samotnému laserovému světlu bez podání Bengálské červeni. Jednotlivé dvojice SEP nad sebou představují vždy pravou (zelená) a levou (šedá) stranu (hemisféru). Ve sloupcích jsou uvedeny vždy tyto tři dvojice (viz označení v levé části obrázku): záznam baseline, záznam při svícení a záznam během pozdního postiradiačního období. V obou skupinách je patrný pokles amplitud SEP během svícení laserem, avšak pouze ve skupině PT se v pozdní postiradiační fázi amplituda pozdních komponent SEP na straně svícení nevrací k výchozím hodnotám. Záznamy nejsou filtrovány.

P1 i N1 vlevo (kontralaterálně ke svícení). Ve skupině Las došlo během svícení navíc k signifikantnímu snížení amplitudy komponenty P2 vpravo. V pozdním postiradiačním období se ve skupině Las latence a amplitudy signifikantně nelišily od hodnot baseline (došlo k plné restituci SEP). Ve skupině PT byly v pozdním postiradiačním období latence srovnatelné s baseline, avšak amplitudy N1 a zejména P2 zůstaly signifikantně snížené oproti baseline ($p=0,0496$, párový t-test). Průměrná doba k prvním známkám restituce SEP byla signifikantně delší ve skupině PT, než ve skupině Las: PT $1929 \text{ s} \pm 525,4 \text{ SEM}$ vs. Las $482,9 \text{ s} \pm 68,35 \text{ SEM}$ ($p=0,03$, Mann-Whitney U-test).

Přímá kortikální stimulace: U většiny zvířat v obou skupinách jsme pomocí elektrické stimulace vyvolali následné výboje (AD). Ve skupině PT se vyvolání AD zdařilo u 7/10 zvířat v první i druhé stimulaci, ve skupině Las u 7/9 zvířat v případě první stimulace a u 5/9 zvířat v případě druhé stimulace. Tento rozdíl však nebyl statisticky signifikantní (Fisherův exaktní test). V obou skupinách bylo trvání AD shodné v pravé a levé hemisféře, nezaznamenali jsme elektrograficky asymetrické ukončení výboje. Trvání AD u jednotlivých zvířat bylo rozdílné, průměrné délky AD se však významně nelišily, ať už při porovnání mezi skupinami, tak při porovnání 1. a 2. stimulace uvnitř každé skupiny. Spontánní záchvaty po stimulaci se vyskytly u dvou zvířat ve skupině PT. Jednalo se o dva záchvaty po první stimulaci (jeden zprava v trvání 4,04 s, druhý s bilaterálním začátkem v trvání 3,06 s) a 34 záchvatů po druhé stimulaci (13 se začátkem zprava, dva zleva a 19 s bilaterálním začátkem; celkové trvání záchvatů vpravo 131,3 s, vlevo 119,5 s).

Histologické zpracování: Fotorobotická ischemická léze se v barvení TTC zobrazovala jako lokalizované vyblednutí. Rozsah lézí byl variabilní, léze však vždy zasahovaly do značné hloubky, mnohdy do oblasti corpus callosum. U kontrol nebyly léze barvení TTC pozorovány.

4.5. Lokální a vzdálená změna propustnosti hematoencefalické bariéry v důsledku fotochemicky navozené fokální kortikální ischemie

V tomto experimentu jsme testovali, zda vzdálené důsledky fokální ischemie zahrnují též vzdálenou změnu propustnosti HEB.

4.5.1. Skupiny zvířat a metodika

Dospělí samci potkana kmene Wistar ($N=20$, váha 200-220g) byli rozděleni do těchto skupin:

1. V první experimentální skupině ("PB", $n=8$) byl k anestezii využit pentobarbital (20 mg/kg i.p.).
2. Ve druhé experimentální skupině ("KX", $n=8$) směs ketaminu s xylazinem (ketamin 80 mg/kg + xylazine 7 mg/kg i.p.).
3. Kontrolní skupina ($n=4$) nebyla vystavena fototrombóze (anestezie směsí ketaminu s xylazinem).

Operativa: Po uvedení zvířete do anestezie byla incidována kůže na hlavě ve střední čáře a exponována kalva.

Fototrombóza: viz 3. Metodika. V obou experimentálních skupinách byly laserem ozařovány tři stereotaktické koordináty laserového záření nad pravou senzomotorickou kůrou (AP 1, L 0,5; AP 0,

L-1; AP-1, L 0,5). Expozice laserovému světlu trvala na každé koordinátě 6 minut (tj. celková doba ozáření pro dané zvíře byla 18 minut).

Hodnocení propustnosti HEB pomocí fluorescenční mikroskopie extravazace Evansovy modři: viz též hodnocení propustnosti HEB u flurothylových záchvatů (4.2).

Hodnocení objemu ischemické léze a perifokální poruchy hematoencefalické bariéry: Oblast nekrózy byla na každém řezu ostře ohraničená. Pomocí nástrojů programu ImageJ byl rozsah oblasti nekrózy na každém řezu změřen a vynásoben tloušťkou řezu (40 μm). Součet takto získaných hodnot udával objem nekrózy (NV) pro dané zvíře. Podobně byl změřen objem tkáně s extravazací komplexu EB-albuminu (EBEV, objem tkáně s poruchou HEB). Oblast extravazace EB-albuminu byla na každém řezu manuálně označena. Její hranice byly definovány jako oblast, kde již není jasně patrné zvýšení fluorescenčního signálu. Obsah takto definované oblasti byl vynásoben tloušťkou řezu. Součet hodnot ze všech řezů udával objem tkáně s poruchou HEB (EBEV).

Všechna měření (608 řezů ve skupině PB, 546 řezů ve skupině KX group) byla provedena jedním hodnotitelem (D-K), aby byla minimalizována inter-rater variabilita.

Hodnocení vzdálených změn propustnosti HEB: Porucha HEB v kontralaterální hemisféře byla hodnocena dvěma způsoby. V první řadě byly všechny řezy vizuálně prozkoumány s cílem najít okrsky zvýšení fluorescence EB-albuminu, případně tzv. EB-pozitivní buňky (tj. buňky akumulující EB-albumin). Druhý způsob hodnocení spočíval v kvantifikaci fluorescenčního signálu EB-albuminu na pozadí a následném hodnocení rozdílů v tomto parametru u jednotlivých skupin. K tomuto účelu jsme na každém šestém řezu mozkem nad zrcadlovou oblast kortexu odpovídající kontralaterálně přítomné lézi umístili virtuální rámeček (1x2mm). V tomto rámečku byla pomocí nástrojů ImageJ změřena průměrná desita signálu. Rozdíly těchto denzit mezi skupinami byly statisticky porovnány.

Statistika: Parametrická data (rozdíly objemů léze ve skupině PB a KX) byla porovnána pomocí nepárového t-testu. Neparametrická data (průměrné hodnoty signálové denzity k kortexu kontralaterálně k lézi) byla porovnána pomocí Kruskal-Wallisova testu a Mann-Whitneyho U testu.

4.5.2. Výsledky

U obou experimentálních podskupin byly 24h po fototrombóze pozorovány ischemické léze v oblasti pravého senzomotorického kortexu. Léze byly tvořeny centrálním nekrotickým jádrem a obklopeny oblastí extravazace komplexu EB-albumin. Oblast porušené HEB zasahovala mnohdy až ke corpus callosum a do oblasti subkortikálních struktur. Na některých řezech byly na rozhraní nekrózy a oblasti s porušenou HEB pozorovány shluky jasně červeně nabarvených buněk, tj. buněk akumulujících komplex EB-albumin. EB-albumin byl dále přítomen v cévách kortikálně i subkortikálně v obou hemisférách. Endotel piálních cév a perforátorů běžících do hloubky (kolmo na povrch hemisféry) byl často pokryt fluorescenčním materiálem, u větších cév bylo možné pozorovat průnik komplexu EB-albumin do extracelulárního prostoru. Celkový objem léze (TLV = NV + EBEV) se v obou experimentálních podskupinách významně nelišil (TLV_{PB} = 9.4 \pm 1.3

mm³ SEM vs. TLV_KX = 8.3 ± 2.1 mm³ SEM). Objem nekrózy (NV) byl v podskupině anesteziované ketaminem-xylozinem poněkud vyšší, rozdíl však nebyl statisticky signifikantní (NV_PB = 5.1 ± 0.7 mm³ SEM vs. NV_KX = 6.3 ± 1.9 mm³ SEM). Objem extravazace komplexu EB-albuminu (EBEV), tj. objem tkáně s poruchou HEB byl ve skupině anesteziované ketaminem-xylozinem signifikantně nižší (EBEV_PB = 4.3 ± 0.8 mm³ SEM vs. EBEV_KX = 2.0 ± 0.5 mm³ SEM, p=0.0293, nepárový t-test). Ve skupině anesteziované pentobarbitalem byl statisticky významně vyšší medián signálové denzity EB-fluorescence v hemisféře kontralaterální vůči ischemické lézi (p < 0.0001, Mann-Whitney U test). Ve skupině anesteziované ketaminem-xylozinem byl medián signálové denzity EB-fluorescence v kontralaterální hemisféře srovnatelný s kontrolami. U dvou zvířat ze skupiny anesteziované pentobarbitalem bylo při vizuálním hodnocení pozorováno difúzní zvýšení fluorescence ve vzdálených oblastech kontralaterální hemisféry. Buňky akumulující EB-albumin však v kontralaterální kůře nalezeny nebyly.

5. Diskuze

Hypotéza 1: Vhodnými parametry stimulace lze prolomit postiktální inhibici po generalizovaném tonicko-klonickém epileptickém záchvatu.

Postiktální inhibice je definována jako stav (období) po záchvatu, během kterého je velmi obtížné vyvolání nového záchvatu stejným druhem stimulace. Mechanismy vedoucí k postiktální inhibici jsou pravděpodobně aktivovány již během záchvatu a přispívají k jeho ukončení. Selhání těchto mechanismů může vést k rozvoji status epilepticus (SE). V modelu kortikálního následného výboje (SSAD) lze postiktální inhibici testovat pomocí opakované stimulace aplikované v různých časových intervalech od skončení předchozího SSAD. U dospělých potkanů je vyvolání dalšího SSAD méně pravděpodobné během prvních 3-5 minut od ukončení předchozího záchvatu. Při stimulaci po více než 10 minutách od ukončení předchozího záchvatu lze někdy pozorovat prodloužení následujícího SSAD - akutní kindling (Mares J. et al., 1982; Mares P. a Maresova D., 1989; Velisek L. a Mares P., 1992). Stimulace bezprostředně po ukončení SSAD obvykle záchvat nevyvolá. V našem prvním experimentu se podařilo postiktální inhibici prolomit pomocí stimulace se stejnou frekvencí, jakou měla stimulace aplikovaná k vyvolání SSAD (8 Hz), ale s poloviční intenzitou a krátkým trváním (0,5 s). Tuto stimulaci jsme označili jako krátké salvy čtyř pulsů (tzv. 4P). Aplikace 4P dále vedla významně častěji k tzv. rekurentním záchvatům a to i v období bezprostředně po odeznění SSAD. Naše výsledky podporují úvahu, že postiktální inhibice je zprostředkována aktivními ději a nikoli pouze pasivním vyčerpáním synaptických mechanismů. Stimulace 4P tyto aktivní inhibiční mechanismy zřejmě narušuje. Jelikož se důsledky stimulace 4P projevují v řádu vteřin-minut, není pravděpodobné, že by je způsobovala buněčná smrt. V důsledku této stimulace však může docházet k akutním plastickým změnám na synaptické úrovni, např. u inhibičních GABAergních interneuronů či excitačně zapojených interneuronů typu mechových buněk (Ratzliff A. et al., 2002). Akutní plastické změny byly pozorovány v průběhu

generalizovaného tonicko-klonického SE, kdy dochází k internalizaci GABA_A receptorů (Chen J.W. et al., 2007; Naylor D.E. et al., 2005) a dále ke zvýšení počtu NMDA receptorů na neuronální cytoplasmatické membráně (Naylor D.E. et al., 2013). V důsledku záchvatů mohou však být ovlivněny receptory pro různé neuromodulátory (např. neuropeptidy, opioidy) (Velisek L. a Mares P., 1992).

Hypotéza 2: Předchozí expozice generalizovanému tonicko-klonickému záchvatu ovlivňuje práh pro záchvat následující.

Akutní plastické změny, např. snížení exprese alfa1-podjednotky GABA_A receptoru (Ni H. et al., 2005) či zvýšení exprese podjednotek glutamátových NMDA receptorů (Bo T. et al., 2003), byly popsány i v modelu flurothylových křečí (izolované generalizované záchvaty). Podobně jako u SSAD, byl i v tomto modelu zaznamenán “akutní” kindling (snížení prahu pro generalizované záchvaty a prahu pro myoklonické záškuby) (Samoriski G. a Applegate C., 1997). Zvířatům byly v této práci flurothylové záchvaty indukovány každý den. Snížení prahu bylo vyjádřeno již u druhého záchvatu, maxima dosahovalo po pátém záchvatu (dny). Zkrácení latence ke GTCS u následujícího (druhého) flurothylového záchvatu jsme potvrdili i v našich experimentech. Interval mezi záchvaty nutný pro rozvoj této změny činil v našich podmínkách tři dny. Aplikace druhého záchvatu v intervalu 1h nevedla ke snížení prahu pro tento druhý záchvat. Možnost ovlivnění prahu pro GTCS ve flurothylovém modelu jsme testovali též pomocí jiných faktorů, jmenovitě hypobarické hypoxie aplikované jednu hodinu či tři dny před záchvatem a podání melatoninu 1h před záchvatem. Signifikantní ovlivnění latencí pro rozvoj GTCS jsme však nezaznamenali.

Zdá se, že fenomén akutního kindlingu popsáný v modelu SSAD a projevy kindlingu v modelu flurothylových křečí podmiňují odlišné mechanismy: v prvním případě jde o změny projevující se v řádu minut, v druhém případě o změny dostavující se během jednoho až několika dnů. Tento delší časový odstup potřebný ke zvýšení excitability (snížení prahu pro další flurothylový záchvat) lze vysvětlit ovlivněním genové exprese a neuroplasticity. Je pozoruhodné, že ani po opakovaných flurothylových záchvatech mnohdy nedochází k výrazným buněčným ztrátám: např. Wasterlain pozoroval cca 6% úbytek neuronů hipokampu po 20 epizodách flurothylových křečí (Wasterlain C.G., 1976), Sperber a kol. nepozorovali úbytek neuronů ani po flurothylovém SE (Sperber E. et al., 1999). Ani my jsme přítomnost významné neuronální ztráty po flurothylovém záchvatu nezaznamenali. Po izolovaném flurothylovém záchvatu však byla u C57BL/6J myši prokázána zvýšená mitotická aktivita a neurogeneze v oblasti hipokampu (Ferland R. et al., 2002) detekovatelná ještě 3. den po záchvatu. Po opakovaných záchvatech u mláďat potkanů byl pozorován též sprouting mechových vláken CA3 sektoru hipokampu a tvorba rekurentních excitačních kolaterál (Holmes G. et al., 1998; Huang L. et al., 1999; Liu Z. et al., 1999; Sogawa Y. et al., 2001). Všechny uvedené mechanismy se mohou na zvýšení excitability 3 dny po izolovaném flurothylovém záchvatu podílet.

Hypotéza 3: Izolovaný epileptický záchvat má přetrvávající behaviorální důsledky, jejichž příčinou je porucha hematoencefalické bariéry.

V našich experimentech jsme prokázali, že u zvířat exponovaných jednotlivému generalizovanému flurothylovému záchvatu dochází k poruše procesu prostorového učení v Morrisově vodním bludišti (MWM) u naivních zvířat, a že tato porucha přetrvává až 7 dní po prodělaném záchvatu (Mares J. et al., 2005). Současně bylo zjištěno, že hodinová expozice hypobarické hypoxii 9000 m n.m. tři dny před záchvatem tento negativní důsledek záchvatu ruší. Jedná se tak o projev hypoxického preconditioningu. Současně bylo dokumentováno, že horšení výkonu v MWM není dáno přetrvávajícími spontánními epileptickými záchvaty (Mares J. et al., 2005). Porucha prostorového učení byla popsána i v jiných modelech akutních záchvatů a byla většinou vysvětlována extenzivní neuronální ztrátou (Gayoso M. et al., 1994; Hort J. et al., 2000; Hort J. et al., 1999; Lere C. et al., 2002; Mao R.R. et al., 2009), kterou jsme však v našich podmínkách po flurothylových záchvatech nezaznamenali.

V poslední době je podrobně studován vztah epileptických záchvatů a poruchy hematoencefalické bariéry (HEB). HEB je v souvislosti s epilepsií a epileptickými záchvaty diskutována jednak z pohledu mechanismů farmakorezistence a dále z pohledu samotné patofyziologie záchvatů a epilepsie. V resekátech temporálních laloků získaných od pacientů s refrakterní epilepsií temporálního laloku byla zjištěna zvýšená propustnost HEB (van Vliet E.A. et al., 2006), stejně jako u chronických zvířecích modelů epilepsie (Westergaard E. et al., 1978). Zvýšený průnik sérových proteinů (zejména albuminu) skrze HEB a uptake těchto proteinů nervovými buňkami byl vztažen k epileptogeneze (Ivens S. et al., 2006; Seiffert E. et al., 2004). Akutně navozené zvýšení propustnosti HEB bylo v experimentu i u lidí sdruženo s epileptiformní aktivitou v EEG (Marchi N. et al., 2007; Zappulla R.A. et al., 1985a). Po záchvatech, zejména dlouhotrvajících konvulzích typu SE, byla prokázána porucha HEB (Bolwig T.G. et al., 1977; Yaffe K. et al., 1995; Zucker D.K. et al., 1983). Z tohoto důvodu jsme testovali, zda po jednotlivém flurothylovém záchvatu nedochází k přetrvávající poruše HEB. Tuto hypotézu jsme však, ani při velmi podrobném hodnocení jednotlivých oblastí mozku, nepotvrdili.

Hypotéza 4: Přítomnost a charakter behaviorálních důsledků izolovaného flurothylového záchvatu lze ovlivnit předtrénováním (hypoxií, záchvaty) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin).

Naše dosavadní výsledky dokumentující protektivní vliv hypobarické hypoxie na prostorové učení po izolovaném flurothylovém záchvatu jsme díky experimentům uvedeným v této dizertační práci rozšířili o zjištění, že podobný protektivní efekt jako hypobarická hypoxie má podání melatoninu 1h před záchvatem. Melatonin podaný bezprostředně, či oddáleně po záchvatu již tento účinek nemá. Přes své fyziologické účinky v modulaci cirkadiánních rytmů je melatonin účinný antioxidant a scavenger volných radikálů (FR) (Reiter R.J., 1997). Kromě toho, že je melatonin sám

schopen neutralizovat volné radikály včetně NO, jeho metabolity (cyklický 3-hydroxy melatonin a N-acetyl -formyl-kynurenin) jsou též účinnými antioxidanty. Kromě toho melatonin přes specifické receptory indukuje expresi superoxidodismutázy (SOD), glutathion peroxidázy (GPx) a katalázy. Jeho protektivní účinek byl prokázán v modelech různých inzultů spojovaných se zvýšenou produkcí FR: kromě epileptických záchvatů (Mohan P.V. a Yamamoto H.A., 2002) též hypoxicko-ischemického poškození (Hung M.W. et al., 2008).

Zvýšená produkce FR byla po epileptických záchvatech dokumentována jak nepřímo (Folbergrova J. et al., 1999), tak pomocí nových technik umožňujících přímé měření FR (Yokoyama H. et al., 1999). Pomocí metodik elektronové paramagnetické rezonance (EPR) jsme i my přímo prokázali vzestup produkce FR jednu hodinu po izolovaném flurothylovém záchvatu (Mareš, J, v tisku). Vzhledem k tomu, že hypoxie a melatonin zmírňují negativní důsledky flurothylového záchvatu na prostorové učení, lze se domnívat, že i tyto negativní behaviorální důsledky souvisí s produkcí FR během či v návaznosti na flurothylový záchvat.

Hypotéza 5: Předtrénováním (hypoxií) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin) lze ovlivnit též tíži fokální ischemie.

Pro hodnocení vlivu melatoninu a hypobarické hypoxie na tíži fokální ischemie jsme využili fototrombotický model fokální kortikální ischemie - viz sekce 3. Metodika. Narozdíl od jiných autorů využívajících odlišných modelů ischemie (Gidday J.M. et al., 1994; Matsushima K. a Hakim A.M., 1995) jsme u fototrombózy neprokázali příznivý efekt předchozí expozice hypobarické hypoxií (9000 m n.m., 3 dny předem) na rozsah ischemické léze. Naproti tomu efekt podání melatoninu 1h před zahájením fototrombózy byl nesporný. Příznivý efekt podání scavengeru FR v tomto modelu však není překvapivý, neboť postihuje i hlavní mechanismus fototrombózy, totiž poškození endotelu singletovým kyslíkem uvolněným z Bengálské červeně po ozáření laserovým světlem. Náš výsledek tak vlastně přináší další důkaz o efektivitě melatoninu jakožto antioxidantní látky. Otázkou zůstává, proč nevedl preconditioning hypoxií ke stejnému výsledku. Je možné, že i když expozice hypoxií podpoří v cílové tkáni její schopnost vyrovnat se se zvýšenou produkcí FR, intenzivní produkce singletového kyslíku na počátku fototrombózy zcela přesáhne dané kompenzační možnosti. Jakmile je singletovým kyslíkem poškozen endotel, dojde k rozvoji mikrovaskulární trombózy. Možnosti reperfuze dané oblasti jsou v takovém případě velmi malé, narozdíl od okluze a. cerebri media (MCAO), při které je u laboratorního potkana schopnost kompenzace kolaterální cirkulací značná. Dokáže-li předchozí hypoxie navodit toleranci buněk k ischemii, je šance na přežití buněk v oblasti penumbry u MCAO (ve srovnání s fototrombózou) výrazně větší.

Hypotézy 6 a 7: V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným elektrofyziologickým změnám. V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným změnám excitability.

V teoretické části dizertační práce je diskutována problematika vzdálených důsledků fokální ischemie CNS: problematika diaschízy. Zajímalo nás, zda lze takové vzdálené ovlivnění pozorovat také ve fototrombotickém modelu fokální ischemie a zda nastává již v její hyperakutní fázi. Testovali jsme ovlivnění SEP n. ischiadicus (SEP) v ipsilaterální a kontralaterální senzomotorické kůře (oblasti pro zadní končetinu). Kromě toho jsme hodnotili excitabilitu kortexu pomocí reakce na fokální kortikální stimulaci a sledování výskytu spontánních záchvatů.

Při elektrické stimulaci n. ischiadicus byly registrovány reprodukovatelné SEP jak z pravého somatomotorického kortexu (primární projekční oblasti), tak z levé strany (ipsilaterální ke stimulaci). Latence SEP byly v našem pokusu srovnatelné s publikovanými srovnávacími studiemi (Oguzhanoglu A. a Kurt T., 2001; Oguzhanoglu A. et al., 2003). Ve zjištění, že SEP n. ischiadicus mají u potkana oboustrannou kortikální reprezentaci, se shodujeme s jinými autory (Angel A. a Lemon R.N., 1975; Sakatani K. et al., 1990).

V našem experimentu jsme pozorovali oboustranné ovlivnění SEP během fototrombózy, ale též u kontrolní skupiny vystavené pouze laserovému záření. U obou skupin došlo k bilaterálnímu snížení amplitud některých komponent SEP během svícení laserem. U zvířat s fotochemicky navozenou ischemií však byla restituce SEP vpravo (v místě léze) delší a mnohdy inkompletní, zatímco u zvířat vystavených pouze laserovému záření se amplitudy SEP řádově během minut vracely k baseline stavu. Úplná restituce SEP byla publikována i v jiných modelech fokální ischemie, např. permanentní MCAO u potkana (Sakatani K. et al., 1990). Autoři této práce spekulují, že oblast senzomotorické kůry pro zadní končetinu se u potkana nachází na hranici jednotlivých povodí a má značné kolaterální cévní zásobení. V našich podmínkách je příčinou spíše malý počet buněk postižených ischemií během první hodiny fototrombózy. Přítomnost neúplné restituce amplitud však již v této fázi naznačuje přítomnost ireverzibilní patologie. Funkční ovlivnění SEP v důsledku samotného laserového záření bylo velmi zajímavé a nečekané zjištění. Během svícení jsme pozorovali snížení amplitud některých komponent SEP (N1, P2 v místě svícení a P1, N1 kontralaterálně) - působení záření v našich podmínkách mělo tedy inhibiční vliv. Nemnohé práce na toto téma podporují úvahu o možném inhibičním působení zeleného laserového světla s vlnovou délkou 532 nm na excitabilní buňky. Bylo prokázáno, že ozáření 532 nm laserem má schopnost inhibovat neurony hlemýžďě zahradního (*Helix aspersa*) a to zvýšením kondukce pro chloridové ionty (Reece P.J. et al., 2008). Olson dále dokumentoval snížení excitability neuronů mozečku novorozených krys v důsledku stejného laserového světla a koreloval ho s morfologickými atypiami mitochondrií (Olson J.E. et al., 1981a; Olson J.E. et al., 1981b). Ovlivnění funkce mitochondrií v důsledku zeleného laserového světla popsali i další autoři (Kassak P. et al., 2005). Vzhledem k parametrům laserového paprsku použitého v našem experimentu (vlnová délka 532nm, hustota výkonu 50 mW/mm², ozářený povrch <1 mm², pracovní teplota 20-30 °C, odhadovaná hloubka průniku 333 um) lze usuzovat, že pozorované fyziologické důsledky nejsou způsobeny lokální změnou teploty. S ohledem na předpokládanou hloubku průniku paprsku nelze vyloučit i ovlivnění subkortikálních struktur. Vzhledem ke stereotaktickým koordinátám

reprezentace zadní končetiny ve VPL jádru thalamu nelze zcela vyloučit ovlivnění této oblasti laserovým světlem. Lokální inhibice v této struktuře by mohla částečně vysvětlit námi pozorované výsledky. Biologické účinky laserového světla pozorované v tomto pokusu se staly východiskem další experimentální práce na toto téma (vlivu laserového světla na interhemisférické odpovědi, jednotkovou aktivitu a některé funkčně morfologické parametry).

U našich zvířat jsme ani v jedné skupině nezaznamenali akutní kindling. Zaznamenali jsme však spontánní elektrografické záchvaty. Záchvaty byly čtenější ve skupině vystavené fototrombóze oproti zvířatům vystaveným samotnému laserovému záření. Nepřítomnost signifikantního rozdílu mezi skupinami lze vysvětlit celkově nízkým počtem záchvatů ve skupinách. Pozorovali jsme záchvaty se začátkem jak z místa léze (zprava), tak bilaterálně, a dokonce nezávisle zleva. Hyperexcitabilita ve fototrombotickém modelu byla dokumentována zejména v semichronických *in vitro* modelech na řezech mozku s využitím techniky stimulace párovými pulzy (Buchkremer-Ratzmann I. et al., 1996; Schiene K. et al., 1996). V subakutním stádiu fototrombózy byly zaznamenány také lokální a vzdálené změny exprese GABA_B receptorů (Que M. et al., 1999). Jediná studie zkoumající excitabilitu v akutním stádiu fototrombózy *in vivo* je studie Fujioky a kol., který pomocí stimulace párovými pulzy zjistil hyperexcitabilitu v místě léze již 1 hodinu po zahájení svícení (Fujioka H. et al., 2004). O mechanismech vedoucích ke zvýšené excitabilitě v akutní fázi fokální ischemie lze pouze spekulovat. Kromě plastických změn se nabízí možnost ovlivnění excitability v důsledku poruchy HEB, která je ve fototrombotickém modelu (narozdíl od permanentní MCAO) výrazně vyjádřena (Dietrich W.D. et al., 1987; Olsson Y. et al., 1971) a má zřejmě k iktogenezi a epileptogenezi úzký vztah (Marchi N. et al., 2007; Westergaard E. et al., 1978; Zappulla R.A. et al., 1985b).

Hypotéza 8: Vzdálené důsledky fokální ischemie zahrnují též vzdálenou změnu propustnosti hematoencefalické bariéry.

V posledním z experimentů popsaných v této práci jsme si kladli otázku zda ve fototrombotickém modelu dochází k významné poruše HEB a zda je tato porucha přítomna i ve vzdálených oblastech mozku. Testovali jsme, zda případné změny propustnosti HEB lze ovlivnit typem použité anestezie. Ve shodě s jinými autory (Hoff E.I. et al., 2005; Watson B. et al., 1985) jsme v našem fototrombotickém modelu pozorovali oblast rozsáhlé poruchy HEB v okolí nekrotického ischemického jádra. Kromě difuzně zvýšené fluorescence EB-albuminu v kortexu v okolí nekrotické léze jsme zaznamenali též akumulaci EB-albuminu v jednotlivých buňkách. Vychytávání plazmatických proteinů nervovými buňkami bylo popsáno v různých modelech fokální ischemie i jiných inzultů (Loberg E.M. et al., 1994; Loberg E.M. a Torvik A., 1991, 1992a, b; Matz P.G. et al., 2001; Murakami K. et al., 1998; Remmers M. et al., 1999; Sokrab T.E. et al., 1990) a vstup plazmatických proteinů do buněk může hrát důležitou roli v epileptogenezi (Bolwig T.G., 1988; Ivens S. et al., 2006; Seiffert E. et al., 2004).

Rozsah perifokální poruchy HEB byl při použití směsi ketaminu-xylazinu výrazně nižší, než při použití pentobarbitalu. Případný vliv α_2 -adrenergního agonisty xylazinu na propustnost HEB sice nelze vyloučit, ale autorovi není známa publikace zkoumající tento vztah. Naproti tomu snížení rozsahu perifokální poruchy HEB po předchozím podání antagonisty NMDA receptorů (MK-801) bylo dokumentováno též v modelu tranzitorní MCAO (Yang G. et al., 1994) a i důkazy svědčící pro vztah NMDA receptorů k integritě HEB jsou četné: podání NMDA stimulovalo vychytávání křenové peroxidázy (HRP) na izolovaných mozkových kapilárách laboratorního potkana (Koenig H. et al., 1992), intrastriální injekce NMDA vedla k extravazaci Luciferové žluti, které bylo možné zabránit předchozím podání NMDA antagonisty (Miller R.D. et al., 1996) a NMDA aplikovaný přímo na kortex vedl ke zvýšení permeability HEB (Chi O.Z. et al., 1997). Je však nutné zmínit, že existují studie, které vztah glutamátových NMDA receptorů k regulaci HEB nepotvrzují (Preston E. et al., 1998). Ve skupině zvířat anestetizovaných pentobarbitalem jsme (narozdíl od zvířat anestetizovaných ketaminem-xylazinem) pozorovali též změnu propustnosti HEB kontralaterálně (byť ve výrazně menší míře). Tyto výsledky lze považovat za jakýsi “proof-of concept”, že mechanismy diaschízy se v určitých situacích mohou dotýkat i změny propustnosti HEB, a že ovlivnění HEB (podobně jako elektrofyziologické či jiné cerebrovaskulární projevy diaschízy) má úzký vztah ke změnám neurotransmise. Cílem dalších výzkumů na toto téma by mělo být přesnější definování podmínek, za jakých ke vzdálené poruše HEB může docházet a posouzení důsledků tohoto jevu, především jeho vztahu k epileptogenezi.

6. Závěry

1. Postiktální inhibice po elektricky vyvolaném generalizovaném tonicko-klonickém záchvatu (SSAD) lze prolomit salvou čtyř pulzů o frekvenci 8 Hz.
2. Při opakování flurothylových GTCS dochází ke snížení prahu (latence) pro druhý ze záchvatů. Podkladem tohoto jevu je pravděpodobně změna transkripce časných genů a plasticita na úrovni synapsí, neboť pozorovaný interval mezi záchvaty, nutný k vyvolání tohoto jevu, byl 3 dny.
3. Jednotlivý GTCS (navozený inhalací flurothylu) dokáže dlouhodobě negativně ovlivnit prostorové učení. Tomuto negativnímu efektu lze předejít vystavením zvířat hypobarické hypoxii tři dny před záchvatem či podáním melatoninu jednu hodinu před záchvatem (nikoli po záchvatu). Zhoršení prostorového učení není možné připisovat neuronálním ztrátám, rekurentním spontánním záchvatům ani přetrvávající poruše hematoencefalické bariéry.
4. V podmínkách fotochemicky vyvolané fokální ischemie jsme neprokázali protektivní efekt hypoxického preconditioningu. Melatonin jakožto scavenger volných radikálů výrazně pozitivně ovlivnil výsledky fototrombózy.
5. V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným elektrofyziologickým změnám: během akutní fáze fototrombózy dochází ke změnám amplitud a latencí SEP n. ischiadicus nejen v místě léze, ale i kontralaterálně. V zrcadlové oblasti kůry však mají změny pouze tranzitorní charakter. Laserové světlo (532 nm) používané ve fototrombotickém modelu má samo o sobě elektrofyziologické (v našem případě inhibiční) důsledky.
6. V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným změnám excitability a k výskytu spontánních elektrografických záchvatů se začátkem nejen v místa léze (zprava) a bilaterálně, ale též nezávisle zleva.
7. Vzdálené důsledky fokální ischemie mohou zahrnovat též vzdálenou změnu propustnosti HEB, avšak přítomnost těchto změn je výrazně ovlivněna druhem použité anestezie.

7. Literatura

- ANDREWS, R.J. Transhemispheric diaschisis. A review and comment. *Stroke*. 1991, vol. 22, no. 7, s. 943-949.
- ANGEL, A. a LEMON, R.N. Sensorimotor cortical representation in the rat and the role of the cortex in the production of sensory myoclonic jerks. *J Physiol*. 1975, vol. 248, no. 2, s. 465-488.
- BO, T., JIANG, Y., CAO, H., WANG, J. a WU, X. [Long-term effects of recurrent seizures in neonatal rats on NMDA receptor expression in the brain]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2003, vol. 35, no. 3, s. 292-295.
- BOLWIG, T.G. Blood-brain barrier studies with special reference to epileptic seizures. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1988, vol. 345, no. s. 15-20.
- BOLWIG, T.G., HERTZ, M.M. a WESTERGAARD, E. Blood-brain barrier permeability to protein during epileptic seizures in the rat. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1977, vol. 64, no. s. 226-227.
- BUCHKREMER-RATZMANN, I., AUGUST, M., HAGEMANN, G. a WITTE, O.W. Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke*. 1996, vol. 27, no. 6, s. 1105-1109; discussion 1109-1111.
- CHEN, J.W., NAYLOR, D.E. a WASTERLAIN, C.G. Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2007, vol. 186, no. s. 7-15.
- CHI, O.Z., CHANG, Q. a WEISS, H.R. Effects of topical N-methyl-D-aspartate on blood-brain barrier permeability in the cerebral cortex of normotensive and hypertensive rats. *Neurol Res*. 1997, vol. 19, no. 5, s. 539-544.
- DIETRICH, W.D., BUSTO, R., WATSON, B.D., SCHEINBERG, P. a GINSBERG, M.D. Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1987, vol. 72, no. 4, s. 326-334.
- EMERSON, M.R., NELSON, S.R., SAMSON, F.E. a PAZDERNIK, T.L. Hypoxia preconditioning attenuates brain edema associated with kainic acid-induced status epilepticus in rats. *Brain Res*. 1999, vol. 825, no. 1-2, s. 189-193.
- FERLAND, R., GROSS, R. a APPELEGATE, C. *Increased mitotic activity in the dentate gyrus of the hippocampus of adult C57BL/6J mice exposed to the flurothyl kindling model of epileptogenesis*. 2002. 669-683 s. 0306-4522.
- FOLBERGROVA, J., HE, Q., LI, P., SMITH, M. a SIESJO, B. The effect of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron on bioenergetic state in substantia nigra following flurothyl-induced status epilepticus in rats. *Neurosci Lett*. 1999, vol. 266, no. 2, s. 121-124.
- FUJIOKA, H., KANEKO, H., SUZUKI, S.S. a MABUCHI, K. Hyperexcitability-associated rapid plasticity after a focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2004, vol. 35, no. 7, s. e346-348.
- GAYOSO, M., PRIMO, C., AL-MAJDALAWI, A., FERNANDEZ, J., GARROSA, M. a INIGUEZ, C. Brain lesions and water-maze learning deficits after systemic administration of kainic acid to adult rats. *Brain Res*. 1994, vol. 653, no. 1-2, s. 92-100.
- GIDDAY, J.M., FITZGIBBONS, J.C., SHAH, A.R. a PARK, T.S. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett*. 1994, vol. 168, no. 1-2, s. 221-224.
- HOFF, E.I., OUDE EGBRINK, M.G., HEIJNEN, V.V., STEINBUSCH, H.W. a VAN OOSTENBRUGGE, R.J. In vivo visualization of vascular leakage in photochemically induced cortical infarction. *J Neurosci Methods*. 2005, vol. 141, no. 1, s. 135-141. 10.1016/j.jneumeth.2004.06.004.

- HOLMES, G., GAIRSA, J., CHEVASSUS-AU-LOUIS, N. a BEN-ARI, Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. *Ann Neurol.* 1998, vol. 44, no. 6, s. 845-857.
- HORT, J., BROZEK, G., KOMAREK, V., LANGMEIER, M. a MARES, P. Interstrain differences in cognitive functions in rats in relation to status epilepticus. *Behav Brain Res.* 2000, vol. 112, no. 1-2, s. 77-83.
- HORT, J., BROZEK, G., MARES, P., LANGMEIER, M. a KOMAREK, V. Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 1999, vol. 40, no. 9, s. 1177-1183.
- HUANG, L., CILIO, M., SILVEIRA, D., MCCABE, B., SOGAWA, Y., STAFSTROM, C. a HOLMES, G. Long-term effects of neonatal seizures: a behavioral, electrophysiological, and histological study. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999, vol. 118, no. 1-2, s. 99-107.
- HUNG, M.W., TIPOE, G.L., POON, A.M., REITER, R.J. a FUNG, M.L. Protective effect of melatonin against hippocampal injury of rats with intermittent hypoxia. *J Pineal Res.* 2008, vol. 44, no. 2, s. 214-221. 10.1111/j.1600-079X.2007.00514.x.
- IVENS, S., KAUFER, D., FLORES, L.P., BECHMANN, I., ZUMSTEG, D., TOMKINS, O., SEIFFERT, E., HEINEMANN, U. a FRIEDMAN, A. TGF- β receptor-mediated albumin uptake into astrocytes is involved in neocortical epileptogenesis. *Brain.* 2006, vol. no. s.
- KASSAK, P., PRZYGODZKI, T., HABODASZOVA, D., BRYSZEWSKA, M. a SIKUROVA, L. Mitochondrial alterations induced by 532 nm laser irradiation. *Gen Physiol Biophys.* 2005, vol. 24, no. 2, s. 209-220.
- KITAGAWA, K., MATSUMOTO, M., TAGAYA, M., HATA, R., UEDA, H., NIINOBE, M., HANDA, N., FUKUNAGA, R., KIMURA, K., MIKOSHIBA, K. a ET AL. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res.* 1990, vol. 528, no. 1, s. 21-24.
- KOENIG, H., TROUT, J.J., GOLDSTONE, A.D. a LU, C.Y. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown. *Brain Res.* 1992, vol. 588, no. 2, s. 297-303.
- LERE, C., EL BAHH, B., LE GAL LA SALLE, G. a ROUGIER, A. A model of 'epileptic tolerance' for investigating neuroprotection, epileptic susceptibility and gene expression-related plastic changes. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002, vol. 9, no. 1, s. 49-56.
- LIU, Z., YANG, Y., SILVEIRA, D., SARKISIAN, M., TANDON, P., HUANG, L., STAFSTROM, C. a HOLMES, G. Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience.* 1999, vol. 92, no. 4, s. 1443-1454.
- LOBERG, E.M., HASSEL, B., FONNUM, F. a TORVIK, A. Early entry of plasma proteins into damaged neurons in brain infarcts. An immunohistochemical study on experimental animals. *Apmis.* 1994, vol. 102, no. 10, s. 771-776.
- LOBERG, E.M. a TORVIK, A. Uptake of plasma proteins into damaged neurons. An experimental study on cryogenic lesions in rats. *Acta Neuropathol (Berl).* 1991, vol. 81, no. 5, s. 479-485.
- LOBERG, E.M. a TORVIK, A. Neuronal uptake of plasma proteins in brain contusions. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl).* 1992a, vol. 84, no. 3, s. 234-237.
- LOBERG, E.M. a TORVIK, A. Plasma proteins in normal neurons. Immunohistochemical studies on autopsy material and experimental animals. *Apmis.* 1992b, vol. 100, no. 5, s. 431-436.
- MAO, R.R., TIAN, M., YANG, Y.X., ZHOU, Q.X., XU, L. a CAO, J. Effects of pentylenetetrazol-induced brief convulsive seizures on spatial memory and fear memory. *Epilepsy Behav.* 2009, vol. 15, no. 4, s. 441-444. 10.1016/j.yebeh.2009.05.015.
- MARCHI, N., ANGELOV, L., MASARYK, T., FAZIO, V., GRANATA, T., HERNANDEZ, N., HALLENE, K., DIGLAW, T., FRANIC, L., NAJM, I. a JANIGRO, D. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia.* 2007, vol. 48, no. 4, s. 732-742.

- MARES, J., MARES, P. a KADLECOVA-JURSIKOVA, D. Changes in the excitability of rat cerebral cortex after a self-sustained after-discharge. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1982, vol. 53, no. 3, s. 283-288.
- MARES, J., POMETLOVA, M. a ROKYTA, R. Improvement of learning in water maze elicited by hypoxic preconditioning is partially blocked by application of melatonin before the hypoxia. *Physiol Res.* 2005, vol. 54, no. s. 32P.
- MARES, P. a MARESOVA, D. Excitability cycles of epileptic after-discharges in rats. *Physiol Bohemoslov.* 1989, vol. 38, no. 1, s. 55-61.
- MATSUSHIMA, K. a HAKIM, A.M. Transient forebrain ischemia protects against subsequent focal cerebral ischemia without changing cerebral perfusion. *Stroke.* 1995, vol. 26, no. 6, s. 1047-1052.
- MATZ, P.G., LEWEN, A. a CHAN, P.H. Neuronal, but not microglial, accumulation of extravasated serum proteins after intracerebral hemolysate exposure is accompanied by cytochrome c release and DNA fragmentation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001, vol. 21, no. 8, s. 921-928.
- MILLER, R.D., MONSUL, N.T., VENDER, J.R. a LEHMANN, J.C. NMDA- and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow. *J Neurol Sci.* 1996, vol. 136, no. 1-2, s. 37-40.
- MOHANAN, P.V. a YAMAMOTO, H.A. Preventive effect of melatonin against brain mitochondria DNA damage, lipid peroxidation and seizures induced by kainic acid. *Toxicol Lett.* 2002, vol. 129, no. 1-2, s. 99-105.
- MORRELL, F. a DE TOLEDO-MORRELL, L. From mirror focus to secondary epileptogenesis in man: an historical review. *Adv Neurol.* 1999, vol. 81, no. s. 11-23.
- MURAKAMI, K., KAWASE, M., KONDO, T. a CHAN, P.H. Cellular accumulation of extravasated serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. *J Neurotrauma.* 1998, vol. 15, no. 10, s. 825-835.
- NAYLOR, D.E., LIU, H., NIQUET, J. a WASTERLAIN, C.G. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol Dis.* 2013, vol. no. s. 10.1016/j.nbd.2012.12.015.
- NAYLOR, D.E., LIU, H. a WASTERLAIN, C.G. Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J Neurosci.* 2005, vol. 25, no. 34, s. 7724-7733. 10.1523/JNEUROSCI.4944-04.2005.
- NI, H., JIANG, Y., BO, T., WANG, J. a WU, X. c-Fos, N-methyl-d-aspartate receptor 2C, GABA-A-alpha1 immunoreactivity, seizure latency and neuronal injury following single or recurrent neonatal seizures in hippocampus of Wistar rat. *Neurosci Lett.* 2005, vol. 380, no. 1-2, s. 149-154.
- OGUZHANOGLU, A. a KURT, T. Findings of somatosensory evoked potential to stimulation of the sciatic nerve in two different rat strains. *Exp Anim.* 2001, vol. 50, no. 5, s. 361-364.
- OGUZHANOGLU, A., KURT, T., ORTAC, R. a TURMAN, B. Somatosensory evoked potential and histopathological investigations in ischaemia-induced brain damage: effects of trimetazidine in rats. *The International Journal Of Neuroscience.* 2003, vol. 113, no. 4, s. 447-454.
- OLSON, J.E., SCHIMMERLING, W., GUNDY, G.C. a TOBIAS, C.A. Laser microirradiation of cerebellar neurons in culture. Electrophysiological and morphological effects. *Cell Biophys.* 1981a, vol. 3, no. 4, s. 349-371. 10.1007/BF02785119.
- OLSON, J.E., SCHIMMERLING, W. a TOBIAS, C.A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res.* 1981b, vol. 204, no. 2, s. 436-440.

- OLSSON, Y., CROWELL, R.M. a KLATZO, I. The Blood-Brain Barrier to Protein Tracers in Focal Cerebral Ischemia Caused by Occlusion of the Middle Cerebral Artery. *Acta Neuropathol.* 1971, vol. no. 18, s. 89-102.
- PLAMONDON, H., BLONDEAU, N., HEURTEAUX, C. a LAZDUNSKI, M. Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and K(ATP) channels. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999, vol. 19, no. 12, s. 1296-1308.
- PRESTON, E., WEBSTER, J. a PALMER, G.C. Lack of evidence for direct involvement of NMDA receptors or polyamines in blood-brain barrier injury after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1998, vol. 813, no. 1, s. 191-194.
- QUE, M., WITTE, O.W., NEUMANN-HAEFELIN, T., SCHIENE, K., SCHROETER, M. a ZILLES, K. Ganges in GABAA and GABAB receptor binding following cortical photothrombosis: A quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience.* 1999, vol. 93, no. 4, s. 1233-1240.
- RACINE, R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1972, vol. 32, no. 3, s. 269-279.
- RATZLIFF, A., SANTHAKUMAR, V., HOWARD, A. a SOLTESZ, I. Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? *Trends Neurosci.* 2002, vol. 25, no. 3, s. 140-144.
- REECE, P.J., DHOLAKIA, K., THOMAS, R.C. a COTTRELL, G.A. Green laser light (532nm) activates a chloride current in the C1 neuron of *Helix aspersa*. *Neurosci Lett.* 2008, vol. 433, no. 3, s. 265-269. 10.1016/j.neulet.2008.01.017.
- REITER, R.J. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol.* 1997, vol. 38, no. s. 103-117.
- REMMERS, M., SCHMIDT-KASTNER, R., BELAYEV, L., LIN, B., BUSTO, R. a GINSBERG, M.D. Protein extravasation and cellular uptake after high-dose human-albumin treatment of transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1999, vol. 827, no. 1-2, s. 237-242.
- SAKATANI, K., IIZUKA, H. a YOUNG, W. Somatosensory evoked potentials in rat cerebral cortex before and after middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1990, vol. 21, no. 1, s. 124-132.
- SAMORISKI, G. a APPLGATE, C. Repeated generalized seizures induce time-dependent changes in the behavioral seizure response independent of continued seizure induction. *J Neurosci.* 1997, vol. 17, no. 14, s. 5581-5590.
- SASAHIRA, M., LOWRY, T., SIMON, R.P. a GREENBERG, D.A. Epileptic tolerance: prior seizures protect against seizure-induced neuronal injury. *Neurosci Lett.* 1995, vol. 185, no. 2, s. 95-98.
- SCHIENE, K., BRUEHL, C., ZILLES, K., QUE, M., HAGEMANN, G., KRAEMER, M. a WITTE, O.W. Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow and Metabol.* 1996, vol. no. 16, s. 906-914.
- SEIFFERT, E., DREIER, J.P., IVENS, S., BECHMANN, I., TOMKINS, O., HEINEMANN, U. a FRIEDMAN, A. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci.* 2004, vol. 24, no. 36, s. 7829-7836.
- SOGAWA, Y., MONOKOSHI, M., SILVEIRA, D., CHA, B., CILIO, M., MCCABE, B., LIU, X., HU, Y. a HOLMES, G. Timing of cognitive deficits following neonatal seizures: relationship to histological changes in the hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001, vol. 131, no. 1-2, s. 73-83.
- SOKRAB, T.E., KALIMO, H. a JOHANSSON, B.B. Parenchymal changes related to plasma protein extravasation in experimental seizures. *Epilepsia.* 1990, vol. 31, no. 1, s. 1-8.

- SPERBER, E., HAAS, K., ROMERO, M. a STANTON, P. Flurothyl status epilepticus in developing rats: behavioral, electrographic histological and electrophysiological studies. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999, vol. 116, no. 1, s. 59-68.
- STUBGEN, J.P. Crossed cerebellar diaschisis related to recurrent focal seizures. *Epilepsia*. 1995, vol. 36, no. 3, s. 316-318.
- TSURU, N. Phylogenesis and kindling. *Folia Psychiatr Neurol Jpn*. 1981, vol. 35, no. 3, s. 245-252.
- VAN VLIET, E.A., DA COSTA ARAUJO, S., REDEKER, S., VAN SCHAİK, R., ARONICA, E. a GORTER, J.A. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*. 2006, vol. no. s.
- VELISEK, L. a MARES, P. Differential effects of naloxone on postictal depression. *Epilepsy Res*. 1992, vol. 12, no. 1, s. 37-43.
- WASTERLAIN, C.G. Effects of neonatal status epilepticus on rat brain development. *Neurology*. 1976, vol. 26, no. 10, s. 975-986.
- WATSON, B., DIETRICH, W., BUSTO, R., WACHTEL, M. a GINSBERG, M. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985, vol. 17, no. s. 497-504.
- WESTERGAARD, E., HERTZ, M.M. a BOLWIG, T.G. Increased permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels, evoked by electrically induced seizures in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1978, vol. 41, no. 1, s. 73-80.
- WILDER, B.J. a MORRELL, F. Analysis of single cell activity in the mirror focus of the frog. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1967, vol. 23, no. 1, s. 84.
- YAFFE, K., FERRIERO, D., BARKOVICH, A.J. a ROWLEY, H. Reversible MRI abnormalities following seizures. *Neurology*. 1995, vol. 45, no. 1, s. 104-108.
- YANG, G., CHAN, P.H., CHEN, S.F., BABUNA, O.A., SIMON, R.P. a WEINSTEIN, P.R. Reduction of vasogenic edema and infarction by MK-801 in rats after temporary focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 1994, vol. 34, no. 2, s. 339-345; discussion 345.
- YOKOYAMA, H., LIN, Y., ITOH, O., UEDA, Y., NAKAJIMA, A., OGATA, T., SATO, T., OHYANISHIGUCHI, H. a KAMADA, H. EPR imaging for in vivo analysis of the half-life of a nitroxide radical in the hippocampus and cerebral cortex of rats after epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*. 1999, vol. 27, no. 3-4, s. 442-448.
- ZAPPULLA, R.A., SPIGELMAN, M.K., OMSBERG, E., ROSEN, J.J., MALIS, L.I. a HOLLAND, J.F. Electroencephalographic consequences of sodium dehydrocholate-induced blood-brain barrier disruption: Part 1. Acute and chronic effects of intracarotid sodium dehydrocholate. *Neurosurgery*. 1985a, vol. 16, no. 5, s. 630-638.
- ZAPPULLA, R.A., SPIGELMAN, M.K., ROSEN, J.J., MAROTTA, D., MALIS, L.I. a HOLLAND, J.F. Electroencephalographic consequences of sodium dehydrocholate-induced blood-brain barrier disruption: Part 2. Generation and propagation of spike activity after the topical application of sodium dehydrocholate. *Neurosurgery*. 1985b, vol. 16, no. 5, s. 639-643.
- ZUCKER, D.K., WOOTEN, G.F. a LOTHMAN, E.W. Blood-brain barrier changes with kainic acid-induced limbic seizures. *Exp Neurol*. 1983, vol. 79, no. 2, s. 422-433.

Publikace autora

Publikace vztahující se k dizertační práci

a) publikace s impakt faktorem

Tůma L, Krýsl D, Mares J. Short bursts of weak pulses break postictal inhibition in the neocortex of Wistar rats. *Epilepsia*. 2003 May;44(5):636-9.

IF = 3,549 (2003)

Matejovská I, Bernásková K, Krýsl D, Mares J. Influence of melatonin pretreatment and preconditioning by hypobaric hypoxia on the development of cortical photothrombotic ischemic lesion. *Physiol Res*. 2008;57(2):283-8. Epub 2007 Feb 8.

IF = 1,43 (2008)

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

IF = 2,267 (2012)

Mareš J, Pometlová M, Deykun K, Krýsl D, Rokyta R. An isolated epileptic seizure elicits learning impairment which could be prevented by melatonin. *Epilepsy Behav*. 2012 Mar;23(3):199-204. Epub 2012 Feb 16.

IF = 1,844 (2012)

b) publikace bez impakt faktoru

1. Krýsl D. [Contemporary models of experimental cerebral ischemia: photothrombosis and intracerebral application of endothelin-1] *Cesk Fysiol*. 2007;56(1):4-9. Review. Czech.

2. Publikace bez vztahu k tématu dizertace

a) publikace s impakt faktorem

Horínek D, Brezová V, Nimský C, Belsan T, Martinkovic L, Masopust V, Vrána J, Kozler P, Plas J, Krýsl D, Varjassyová A, Ghaly Y, Benes V. The MRI volumetry of the posterior fossa and its substructures in trigeminal neuralgia: a validated study. *Acta Neurochir (Wien)*. 2009 Jun;151(6):669-75. doi: 10.1007/s00701-009-0283-8. Epub 2009 Apr 7.

IF = 1,472 (2009)

Krýsl D, Zamecnik J, Senolt L, Marusic P. Chronic repetitive nonprogressive epilepsy partialis continua due to rheumatoid meningitis. *Seizure*. 2013 Jan;22(1):80-2. doi: 10.1016/j.seizure.2012.10.006. Epub 2012 Nov 1. No abstract available. PMID: 23122511 [PubMed - in process]

IF = 2,004 (2012)

b) publikace bez impakt faktoru

Krijtová H, Krýsl D, Marusič P. Akutní symptomatické záchvaty a akutní symptomatický status epilepticus. *Neurol. praxi* 2011; 12(4): 256-264

Krýsl D, Marusič, M. Autoimunitní limbické encefalitidy. *Neurol. praxi* 2012; 13(3): 160-164

3. Kapitoly v monografii:

Krýsl D, Marusič P. Kontinuální monitorování EEG (cEEG). In Tomek A, et. al.: Neurointenzivní péče - praktická příručka, 1. vydání, Mladá fronta, 2012, ISBN:9788020426598

Krýsl D, Marusič P. Epileptické záchvaty a status epilepticus. In Tomek A, et. al.: Neurointenzivní péče - praktická příručka, 1. vydání, Mladá fronta, 2012, ISBN:9788020426598