

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta



Funkční důsledky epileptických záchvatů a hypoxicko-ischemického poškození CNS

MUDr. David Krýsl

Doktorská dizertační práce
v oboru fyziologie a patofyziologie člověka

Školitel: doc. MUDr. Jan Mareš, CSc.

Praha 2013

Poděkování

Tato práce by nemohla vzniknout bez pomoci a spolupráce řady kolegů.

Poděkování patří na prvním místě mému školiteli, doc. Janu Marešovi, CSc., nejen za vynikající odborné vedení, ale především za neutuchající vstřícnost a podporu během celého mého doktorského studia. Poděkování za odbornou pomoc patří dále všem kolegům z Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie, zejména MUDr. Lukáši Lambertovi, MUDr. Kláře Bernáškové, CSc., MUDr. Ivetě Matějovské, CSc., MUDr. Marii Pometlové, CSc., MUDr. Kateryně Nohejlové, Ph.D. a prof. MUDr. Richardu Rokytovi, DrSc. Velký dík za odbornou spolupráci na morfologické části této práce patří prof. MUDr. Jaroslavu Pokornému, DrSc. Za technickou pomoc s experimentální částí této práce bych mezi jinými rád poděkoval Jaroslavě Chvojkové a Pavlu Charvátovi. Svou podporou napomohli velkou měrou k dokončení této práce i mnozí kolegové z Neurologické kliniky 2. LF UK a FN Motol, zejména doc. MUDr. Martin Bojar, CSc., MUDr. Blanka Žižková, MUDr. Eva Meluzínová, MUDr. Jana Libertínová, MUDr. Petra Lišková, MUDr. Aleš Tomek, MUDr. Kateřina Zárubová, doc. MUDr. Jakub Hort, Ph.D., MUDr. Jana Amlerová, Ph.D. a MUDr. Ondřej Chudomel. Velký dík patří též prof. Kristině Malmgren (Sahlgrenska Universitet Göteborg). Zcela zvláštní poděkování patří MUDr. Haně Krijtové a doc. MUDr. Petru Marusičovi, Ph.D., jehož kritický, ale vždy konstruktivní přístup pro mě zůstává velkou inspirací. V neposlední řadě bych rád poděkoval celé své rodině, zejména svým rodičům (*in memoriam*) a dále svému bratrovi, Mgr. Šimonu Krýslovi, který mi velmi pomohl při získávání historických informací k teoretické části této práce a jehož kritické myšlení je pro mě celý život vzorem. Závěrečný a největší dík však patří mé ženě, MUDr. Markétě Krýslové, která v každé chvíli zůstává mou největší oporou.

Obsah

1. Teoretická část	
1.1. Úvod.....	6
1.2. Vzdálené důsledky ischemie CNS a fokálních epileptických záchvatů. Diaschíza.....	8
1.3. Fenomén preconditioningu u ischemie CNS a epileptických záchvatů.....	19
1.4. Modely hypoxického a ischemického poškození CNS.....	25
1.5. Modely akutních epileptických záchvatů.....	36
1.6. Hypotézy.....	44
2. Vlastní pozorování	
2.1. Prolomení postiktální inhibice krátkou salvou stimulačních pulzů.....	45
2.1.1. Metodika.....	45
2.1.2. Výsledky.....	48
2.2. Ovlivnění prahu pro flurothylový záchvat a jeho důsledků na prostorové učení.....	50
2.2.1. Metodika.....	50
2.2.2. Výsledky.....	52
2.3. Ovlivnění rozsahu ischemické léze hypoxickým preconditioningem a podáním melatoninu	56
2.3.1. Metodika.....	56
2.3.2. Výsledky.....	58
2.4. Elektrofyziologické změny v hyperakutní fázi kortikální fototrombózy.....	59
2.4.1. Metodika.....	59
2.4.2. Výsledky.....	66
2.5. Lokální a vzdálená změna propustnosti hematoencefalické bariéry v důsledku fotochemicky navozené fokální kortikální ischemie.....	71
2.5.1. Metodika.....	71
2.5.2. Výsledky.....	75
3. Souhrnná diskuze.....	77
4. Závěry.....	90
Publikace autora.....	92
Literatura.....	94
Přílohy.....	106

Seznam zkratek

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

1. Teoretická část

1.1. Úvod

Hypoxicko-ischemické postižení CNS a epileptické záchvaty mají řadu společných patofyziologických rysů. Základní mechanismy, ať už poškozující (excitotoxicita, volné radikály, zánět, změny propustnosti hematoencefalické bariéry, nekrotická a zejména apoptotická buněčná smrt), nebo reparační (glióza, neuroplasticita, neurogeneze, vaskulární proliferace) se vyskytují u obou typů poškození, mohou však být vyjádřeny v různé míře a mohou probíhat v různém časovém horizontu.

Hypoxie, ale též globální a fokální ischemie CNS, jsou u lidí i v experimentálních modelech za určitých podmínek doprovázeny epileptickými záchvaty. Epileptické záchvaty naopak akutně i chronicky ovlivňují průtok krve mozkem (CBF). CBF a mozkový metabolismus je zásadně ovlivněn při status epilepticus (SE). Změny CBF mohou významně přispívat k patofyziologickým důsledkům záchvatů a mohou mít vztah i k některým jejich klinickým projevům (např. postparoxysmální Toddově hemiparéze (Mathews M.S. et al., 2008; Yarnell P.R., 1975)).

Fokální ischemie CNS má často důsledky ve vzdálených, ale funkčně propojených oblastech (diaschíza). Dochází ke vzdálenému ovlivnění nejen průtoku krve a metabolismu, ale též excitability (Andrews R.J., 1991; Buchkremer-Ratzmann I. et al., 1996b). Také v rámci fokální epilepsie¹ často dochází k ovlivnění metabolismu a perfúze vzdálených oblastí (Stubgen J.P., 1995). Sekundární epileptogeneze v oblastech vzdálených primárnímu epileptogennímu ložisku je též 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 zvyšovat, nebo naopak snižovat. Epileptická tolerance (zvýšení odolnosti k opakovaným epileptickým záchvatům) byla dokumentována např. v modelu bikukulinových křečí (Sasahira M. et

¹ Mezinárodní klasifikace epilepsií a epileptických syndromů (ICEES, 1989) rozlišuje epilepsie a epileptické syndromy parciální (1), generalizované (2), bez možnosti určení zda parciální či generalizované (3), a speciální syndromy (4). Termín fokální epilepsie (v angl. focal epilepsy) je jako synonymum termínu parciální epilepsie běžně používán. Mezinárodní klasifikace epileptických záchvatů (ICES, 1981) dělí epileptické záchvaty obecně na parciální (1), generalizované (2) a neklasifikovatelné (3). Návrh nové klasifikace epileptických záchvatů a epilepsií (ILAE, 2001, 2006) kritizuje termín parciální (v angl. partial = částečný, neúplný) a doporučuje jej nahradit termínem fokální (focal), který lépe vystihuje představu záchvatu vznikajícího v určité ohraničené části mozku. V této dizertační práci jsou termíny fokální a parciální používány jako synonyma. Přiklon k jednomu či druhému termínu (zvláště ve slovních spojeních) je volen dle tradičních zvyklostí (např. fokální epilepsie a ne parciální epilepsie; parciální komplexní záchvaty a nikoli fokální komplexní záchvaty, atd.)

al., 1995) či při intrahipokampální aplikaci kainátu (Lere C. et al., 2002). Fenomén kindlingu, tj. postupného rozněcování epileptické odpovědi (a její generalizace) při opakované indukci fokálních záchvatů je též velmi dobře znám (Racine R.J., 1972). Ischemická či hypoxická tolerance, známější dnes pod pojmem ischemický či hypoxický preconditioning, 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 navíc vyvolat zkříženě, např. bylo pozorováno zmírnění následků fokální ischemie díky předchozí expozici epileptickým záchvatům (Plamondon H. et al., 1999), či atenuaci důsledků experimentálního SE pomocí hypoxického preconditioningu (Emerson M.R. et al., 1999).

Studium společných mechanismů hypoxie/ischemie a epileptických záchvatů má nepochybný význam pro klinickou praxi. Může přispět mj. k pochopení patofyziologie symptomatických epilepsií při cévních onemocnění mozku (CMP), posthypoxických epilepsií u dětí, postparoxysmálních neurologických deficitů či pozdních 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.

Pokoušet se postihnout v jedné práci všechny vzájemné vztahy mezi hypoxií/ischemií a epileptickými záchvaty by bylo velmi nepokorné, a jistě odsouzené k neúspěchu. Zaměřuji se proto na některé vybrané funkční důsledky epileptických záchvatů a hypoxie/ischemie v akutních experimentech a možnostmi jejich ovlivnění. Společným jmenovatelem této práce je též teze, že i podněty a infarkty o relativně malé intenzitě mohou i přes nepřítomnost závažných strukturálních změn (buněčná smrt) vést k významným a mnohdy i dlouhotrvajícím důsledkům.

V teoretické části shrnuji hlavní poznatky týkající se vzdálených důsledků fokálních lézí, hypoxicko/ischemického preconditioningu, a podávám přehled akutních modelů hypoxie, globální a fokální ischemie a generalizovaných epileptických záchvatů.

1.2. Vzdálené důsledky ischemie CNS a fokálních epileptických záchvatů. Diaschíza.

Fokální ischemické poškození CNS a fokální epileptické záchvaty ovlivňují funkci buněk nejen v místě léze a v jejím okolí, ale též v oblastech vzdálených. Tyto vzdálené důsledky mohou být významné jak z patofyziologického, tak klinického hlediska. Kromě možného podílu na kompenzaci patofyziologických změn v ložisku mohou mít mj. úzký vztah k sekundární epileptogeneze.

Vzdálenými důsledky fokálních lézí CNS se již kolem roku 1870 zabýval Brown-Sequard (Feeney D.M. a Baron J.C., 1986). Domníval se, že tyto jevy jsou podmíněny ovlivněním excitace či inhibice v oblastech funkčně propojených s oblastí léze. Tento koncept podrobně rozvedl na počátku 20. století významný německý neuropatolog Constantin Von Monakow, který zavedl termín *diaschíza*, v původní definici označující funkční útlum („zástavu“) v oblastech propojených s oblastí léze (v důsledku „diskonekce“ a ztráty excitace, nikoli aktivní inhibice). Ve většině případů měl na mysli náhle vzniklý funkční útlum („šok“ – jako analogii k míšnímu šoku). Důležitou vlastností diaschízy v originálním pojetí bylo její přechodné trvání – působením aktivních reparačních procesů diaschíza postupně odeznívá. Dynamika diaschízy a reparace se pro různé oblasti CNS a též individuálně liší. „Vlna diaschízy“ se, podle Von Monakowa, šíří po anatomicky definovaných drahách. Popisuje diaschisis cortico-spinalis, commisuralis (zejména přes corpus callosum) a associativa (asociační vlákna v rámci jedné hemisféry) (Feeney D.M. a Baron J.C., 1986). Později se význam termínu diaschíza rozšířil na všechny vzdálené důsledky akutního či chronického poškození mozku (Meyer J.S. et al., 1993). Během posledních šedesáti let byl blíže popsán charakter vzdálených důsledků, jež zahrnují změny průtoku krve mozkem (cerebral blood flow – CBF), změny metabolismu (cerebral metabolic rate – CMR), ovlivnění elektrofyziologických projevů (EEG, elektrokortikografie - ECoG, evokované potenciály - EP), ovlivnění neurotransmise a také vzdálené změny genové exprese a proteosyntézy (Bidmon H.J. et al., 1997). Možnosti vzdáleného ovlivnění propustnosti hematoencefalické bariéry se dotýkám v experimentální části této práce. Slater a kol. jako první studoval časový vývoj transhemisférické diaschízy u pacientů s CMP a zjistil, že snížení CBF v ischemií nepostižené kontralaterální hemisféře se rozvíjí progresivně od počátku iktu a dosahuje maxima v řádu 5-10 dnů po příhodě (Slater R. et al., 1977). Je třeba podotknout, že snížení CBF v oblastech postižených diaschízou nevede k hypoxii a nemá zřejmě ani zřetelné klinické projevy.

Konkrétní mechanismy podmiňující diaschízu nejsou známy. Možnost, že jde o pouhé koincidenční nálezy ve vzdálených oblastech v důsledku předchozích inzultů byla vyloučena studii již v 70. letech. Důležitost funkčního propojení místa léze a oblasti postižené diaschízou dokládají zejména práce Andrewse, který v modelu retrakční ischemie pozoroval vymizení kontralaterálního ovlivnění CBF po protěti corpus callosum. Původní Von Monakowova představa o rozvoji diaschízy v důsledku přerušeni excitační aferentace z místa léze do vzdálené oblasti je stále přijímána jako jedno z možných vysvětlení. Nicméně projevy diaschízy např. u fokálních epilepsií naznačují možnost aktivních mechanismů, např. vzdálenou propagaci interiktálně zvýšené aktivity inhibičních sítí z oblasti epileptického ložiska. U fokální ischemie nalézáme v oblasti diaschízy (v kontrastu k výše zmíněnému poklesu CBF) spíše zvýšenou excitabilitu. Příčinou této diskrepance může být prostorové uspořádání a relativní rozsah ischemického jádra a penumbry: zatímco přerušeni excitačních spojů z oblasti ischemického jádra může vést k útlumu aktivity neuronů v kontralaterální zrcadlové oblasti (a sekundárně ke snížení CBF), spoje z oblasti penumbry (která často sama vykazuje známky hyperexcitability) mohou vést ke zvýšené excitaci kontralaterálních oblastí. Společným jmenovatelem všech typů diaschízy je však zřejmě narušení tzv. neurovaskulárního couplingu, tj. regulace CBF na základě změn neurální aktivity (viz dále).

Pro úplnost je třeba dodat, že k ovlivnění excitability, CBF a CMR vzdálených oblastí mozku může kromě diaschízy docházet (akutně) i mechanismem šířící se deprese (cortical spreading depression, CSD), kterou popsal Leão již v roce 1943. CSD se projevuje vlnou depolarizace šířící se v kortexu rychlostí 3-5 mm/min, která je doprovázena akutní hyperperfúzí a následována protražovanou hypoperfúzí (Leao A.A., 1986). CSD je zřejmě spouštěna zejména akutním vzestupem extracelulární hladiny kalia a glutamátu a zásadní roli v její propagaci hraje glie. CSD však byla úspěšně navozena i primárním ovlivněním cév (např. podáním endothelinu-1) (Dreier J.P. et al., 2002). Tento nálezy může vysvětlovat přítomnost CSD např. v rámci vazospasmů u subarachnoidálního krvácení.

1.2.1. Vzdálené změny průtoku krve a metabolismu.

Normální průtok krve mozkiem (CBF) u dospělého člověka činí asi 50-65 ml/100g tkáně/min, což pro celý mozek činí asi 750–900 ml/min, tj. asi 15 % klidového minutového srdečního výdeje. CBF je úzce spjat s metabolickou aktivitou mozkové tkáně. Dle klasické představy je regulován zejména v závislosti na arteriálním pCO₂, pH a pO₂. Pro regionální změny CBF v důsledku změn neuronální aktivity je však významnější regulace četnými neuronálními a gliovými

mechanismy (tzv. neurovascular coupling). Mozkové arterioly, kapiláry, pericyty, astrocyty a nervová zakončení tvoří totiž úzce propojený funkční celek (neurovaskulární jednotku). V důsledku lokální aktivity se regionální CBF může zvýšit o 100 až 150 %.

Normální hodnota spotřeby kyslíku mozkiem se pohybuje kolem 3,5 ml/100g tkáně/min (cerebral metabolic rate for oxygen - CMRO₂), normální parciální tlak O₂ v mozkové tkáni činí 35–40 mmHg. Při poklesu pO₂ pod cca 30 mmHg se okamžitě zpětnově zvyšuje CBF. Klinicky významná hypoxie přitom nastává až při hodnotách pO₂ kolem 20 mmHg. Normální spotřeba glukózy v mozku (cerebral metabolic rate for glucose - CMR_{glu}) činí cca 5,5 mg/100g tkáně/min.

In vivo měření CBF a CMR je možné zejména díky metodám nukleární medicíny: jednofotonové emisní tomografii (SPECT) a pozitronové emisní tomografii (PET). Klasický ¹³³Xe-SPECT byl v klinické praxi nahrazen SPECT vyšetřením s využitím ^{99m}Tc-HMPAO (hexamethylpropylenaminoxim) a ^{99m}Tc-bicisátu. Tyto metody nicméně neumožňují kvantitativní měření CBF. V případě PET se pro zobrazení metabolických změn obvykle využívá ¹⁸F-deoxyglukóza (FDG), ke kvantitativnímu měření CBF byla úspěšně použita H₂¹⁵O a další tracers. Z ostatních *in vivo* metod měření CBF lze zmínit perfúzní computerovou tomografii (CT), která využívá diluční princip s použitím jodové kontrastní látky a dále metody magnetické rezonance (MRI). Nevýhodou perfúzního CT je možnost měřit CBF pouze v jedné předem definované vrstvě. MRI využívá k měření CBF změnu magnetického pole při průchodu MRI-kontrastu (Gd). Přesné kvantitativní měření CBF ale MRI v současné době neumožňuje. Zcela zvláštním případem je hodnocení regionálních změn CBF ve vztahu k neuronální aktivitě pomocí funkční MRI (fMRI). Funkční MRI využívá rozdílného chování oxyhemoglobinu a deoxyhemoglobinu v magnetickém poli. V oblastech zvýšené neuronální aktivity (a tedy zvýšeného metabolismu) dochází ke krátkému zvýšení obsahu deoxyhemoglobinu v krvi s následným zvýšením CBF a nárůstem podílu oxyhemoglobinu. Takto vyvolaná změna magnetického pole je označována jako BOLD signál (blood oxygenation level dependent) a lze ji zaznamenat pomocí MRI.

Během fokálních epileptických záchvatů či při fokální elektrické stimulaci dochází k lokálnímu vzestupu CBF a CMR v oblasti vzniku záchvatu (nebo elektrické stimulace) a v oblastech, do nichž se záchvat (elektrická aktivita) šíří (Nelissen N. et al., 2006; Tolias A.S. et al., 2005). Mechanismy regulující CBF v důsledku změn neuronální aktivity (tj. mechanismy neurovaskulárního couplingu) nejsou zcela objasněny. Již Roy se Sherringtonem (1890) postulovali zpětnově regulaci CBF pomocí produktů neuronálního metabolismu. Tato úvaha byla později podpořena zjištěním, že v důsledku lokálního zvýšení pCO₂, zvýšení produkce adenosinu, laktátu, či zvýšení extracelulární koncentrace draselných iontů dochází k regionální vazodilataci.

Kvantitativními měřeními změn CBF a CMRO₂ v závislosti na elektrické stimulaci se zabýval v 70. letech podrobně Herman Metzger (Metzger H., 1979), jehož výsledky naznačovaly možnost ovlivnění CBF v důsledku aktivní sekrece neurotransmiterů a neuromodulátorů, zejména oxidu dusnatého (NO). Pozdější práce odhalily, že zásadní roli v lokální regulaci CBF v závislosti na neurální aktivitě hraje glutamát a NO produkovaný nitridergními neurony (Attwell D. a Iadecola C., 2002). Zvýšení glutamatergní synaptické aktivity vede k otevření iontových kanálů sdružených s NMDA receptory. Následné zvýšení intracelulární hladiny kalcia vede v neuronech exprimujících neuronální NO-syntázu (nNOS) k produkci NO. NO difunduje z nervových zakončení v těsné blízkosti cév k hladkému svalu arteriol. V buňkách hladkého svalu aktivuje NO enzym guanylátcyklázu, což způsobí zvýšení intracelulární produkce cGMP. Zvýšení koncentrace cGMP navozuje v hladkém svalu arteriol (cestou specifických kináz) jeho relaxaci, a tím vazodilataci a zvýšení regionálního CBF. Produkce cGMP se zvyšuje též působením acetylcholinu produkovaným cholinergními neurony inervujícími cévní stěnu. Významný podíl na regulaci CBF mají ale i astrocyty (Pellerin L. a Magistretti P.J., 2004). Zvýšené uvolňování glutamátu z presynaptických zakončení aktivuje metabotropní glutamátové receptory (mGluR) na membráně přilehlých astrocytů, což vede ke zvýšení intracelulární koncentrace kalcia v astrocytech, k aktivaci fosfolipázy A₂ (PLA₂), uvolnění kyseliny arachidonové a sekundárně ke zvýšení syntézy vazodilatačně působícího prostaglandinu PGE₂. Současně dochází k produkci některých vazokonstričních eicosanoidů, jejich syntéza je však zpětnovazebně tlumena NO a to zejména v podmínkách hypoxie. K vazodilataci přispívá též výše zmíněný vzestup extracelulární koncentrace kalia. Regulace extracelulární koncentrace kalia (tzv. spatial buffering) je přitom jednou z důležitých funkcí astrocytů.

Interiktálně je u fokálních epilepsií pozorována naopak hypoperfúze a hypometabolismus v oblasti epileptogenní zóny, ale též ve vzdálených částech CNS (diaschíza). V případě epilepsie temporálního laloku je hypometabolismus přítomen zejména ipsilaterálně fronto-orbitálně, kontralaterálně temporálně a kontralaterálně v mozečku (zkřížená cerebellární diaschíza) (Engel J., Jr., 1984).

V důsledku fokální ischemie obecně dochází ke snížení lokálního CBF. V oblasti penumbry lze někdy pozorovat přítomnost hyperperfúze, která je jinak charakteristicky přítomna během reperfúze (Marchal G. et al., 1999; Takahashi A. et al., 1997; Tran Dinh Y.R. et al., 1997). Průtok krve a zároveň i metabolismus ve vzdálených oblastech, ať už ipsilaterálně, nebo kontralaterálně se mění v závislosti na lokalizaci (ischemické) léze:

Léze v oblasti mozkového kmene: Pacienti s poruchou vědomí v důsledku poškození mozkového kmene vykazují bilaterální snížení kortikálního CBF a CMR a zpomalení v EEG (Lassen N.A., 1959). U zvířat s jednostrannými lézemi mozkového kmene dochází k redukci CMRGlu v ipsilaterální mozkové kůře a subkortikální bílé hmotě (Lindsley B.D. et al., 1949). Léze v oblasti serotonergního ncl. raphe způsobují redukci CMRGlu v ncl. dentatus hipokampální formace (McCulloch J. a Edvinsson L., 1984). Léze v oblasti substantia nigra (SN) podmiňují redukci CMR v ipsilaterálních frontálních oblastech, ipsilaterálního striata a hypermetabolismu v kontralaterálním globus pallidus a habenule (Feeney D.M. a Baron J.C., 1986). Tyto důsledky bylo možné zablokovat podáním dopaminergních agonistů či L-DOPA.

Léze v oblasti thalamu: Práce dokumentující snížení CMRO₂ a CMRGlu v ipsilaterální hemisféře v důsledku jednostranných thalamických lézí byly publikovány již v 80. letech (¹³³Xe-SPECT a později C¹⁵O₂ a ¹⁵O₂-PET) (D'Antona R. et al., 1985). Tyto nálezy korelují s tíží funkčního deficitu a zlepšují se během rehabilitace. Výsledek byl reprodukován i v novějších studiích u pacientů s ischemickými CMP postihujícími thalamus (Tanaka et al. 1996). Thalamické léze u zvířat i u lidí současně indukují velmi mírnou depresi CMR i v kontralaterální hemisféře. Může se jednat o sekundární projev – transkalosální diaschízu (Girault et al. 1985). Snížení ipsilaterálního hemisferálního metabolismu může být způsobeno anterográdní Walleriánskou degenerací vláken z oblasti léze do vzdálené oblasti, retrográdní degenerací (axony neuronů ze vzdálené oblasti běžící do místa léze), trans-synaptickou degenerací kortikálních neuronů v důsledku ztráty aferentů či snížením aktivity kortikálních neuronů v nedostatku vstupních impulsů (bez přítomnosti neuronální degenerace).

Léze v oblasti bazálních ganglií a bílé hmoty mozkové: Vzdálenými funkčními důsledky lézí v oblasti bazálních ganglií a bílé hmoty se zabývalo jen málo autorů. U lidí je navíc selektivní postižení bazálních ganglií či bílé hmoty vzácné. Jednostranné léze striata indukované u potkanů pomocí aplikace kainátu nezpůsobují metabolické změny v kůře (Kelly P.A.T. et al., 1982). Zvyšuje se však CMRGlu v ipsilaterálním globus pallidus a substantia nigra pars reticularis (SNR). Tento efekt je blokován podáním GABA agonisty muscimolu a autoři jej proto interpretují jako projev ztráty tonické GABAergní inhibice.

V modelech na zvířatech vedla léze v radiatio optica k metabolické depresi ipsilaterální zrakové kůry. U drobných lakunárních lézí nebyly signifikantní změny CBF a CMR pozorovány. K navození výraznější metabolické korové deprese je zřejmě nutné současné postižení thalamu.

Tabulka 1.2.1.1: Projevy transhemisférické (transkalosální) diaschízy u ischemických iktů

Měřený parametr	Akutní (do 24h od počátku inzultu)		Subakutní a chronické (dny-měsíce)	
	ipsilaterálně	kontralaterálně	ipsilaterálně	kontralaterálně
Amplituda SEP	↓ ↓ ^{a,h}	↑ (124-132% původních hodnot) ^a	↓ ↓ ^h	↑ (vlna N22, ne u subkortikálních infarktů) ^h
Amplituda IHR	-	↓ či beze změny ^a	nd	nd
“Paired-pulse inhibition”	nd	nd	↓ či beze změny (oblast penumbry) ^a	↓ ↓ ^a
CBF	↓ ↓ ^{a,h}	↓ nebo ↑ (vliv rozsahu inzultu) ^{a,h}	↓ ↓	↓ (pokles má maximum 5-10 den, následně úprava v řádu měsíců) ^h
CMRO ₂ , CMRGlu	↓ ↓ ^{a,h}	beze změny nebo ↓ ^{a,h}	↓ ↓	beze změny nebo ↓ ^{a,h}

Tabulka předkládá přehled nálezů jak z pozorování u lidí, tak ve zvířecích modelech. Ve zvířecích modelech je důraz kladen na měření v hyperakutní fázi (do 24h), naopak u lidí je tento úsek z pochopitelných důvodů méně prozkoumán. Naopak chronická data jsou k dispozici více u lidí, než u zvířat. Hodnocení paired-pulse inhibition bylo prováděno u potkanů 7–28 dní po jednostranné okluzi a. cerebri media. Počet šipek naznačuje relativní velikost změny. V tabulce není zahrnuto ovlivnění výsledků kalózotomií, neboť se týká pouze zvířecích modelů, nálezy jsou značně inkonzistentní a závislé na způsobu provedení a použitém modelu.

^a práce na zvířecím modelu

^h pozorování u lidí

Zkratky: CBF = cerebral blood flow, CMRO₂ = cerebral metabolic rate for oxygen, CMRGlu = cerebral metabolic rate for glucose, IHR = interhemisférická odpověď, nd = not done, SEP = somatosenzorické evokované potenciály

Upraveno dle (Andrews R.J., 1991)

Kortikální léze - transhemisférická (transkalosální, interhemisférická) diaschíza (viz Tabulka

1.2.1.1): U pacientů s kortikálně uloženou fokální ischemickou lézí (ischemickou CMP) bylo opakovaně pozorováno snížení CMR a CBF nejen v postižené, ale i v kontralaterální hemisféře (tzv. transkalosální či transhemisferická diaschíza). Ve studii Slatera a kol. vykazovalo 12 z 15 pacientů s CMP týden po vzniku léze bilaterální snížení CBF (měřeno pomocí SPECT s inhalací ¹³³Xe). Podobné výsledky publikovali i další autoři (Meyer J.S. et al., 1979; Reivich M. et al., 1978). Později byly tyto změny reprodukovány s použitím ¹⁸FDG-PET (Fiorelli M. et al., 1991). Narozdíl od zvířecích modelů však mohou být změny CBF a CMR u lidí výrazně ovlivněny přítomností komorbidit či medikací. Ve zvířecích modelech není kontralaterální snížení metabolismu a CBF pravidlem – viz např. (Ginsberg M.D. et al., 1977; Hossmann K.A. a Schuier F.J., 1980; Reivich M. et al., 1977). Přesto v jedné z novějších prací dokumentoval Kataoka a spol. v modelu MCAO u

potkanů snížení CBF v oblasti léze a současně sníženou utilizaci glukózy v ipsilaterálním thalamu a v homotopické kontralaterální oblasti kortexu (Kataoka K. et al., 1989).

Kortikální léze - ipsilaterální diaschíza: Ke vzdálenému ovlivnění může docházet i v rámci jedné hemisféry (ipsilaterální diaschíza, tzv. *diaschisis associativa* ve von Monakowově pojetí). Odlišení ipsilaterální diaschízy od vlastní fokální léze je složité, zvláště u ischemie CNS. Dochází zde k překryvu mezi oblastí ještě zasaženou ischemií (penumbra) a oblastmi intaktními, ale funkčně utlumenými v důsledku diaschízy. Pomocí PET studií bylo sice zjištěno, že v hemisféře ipsilaterální k ischemické lézi dochází k plošnému snížení CBF a CMRO₂ (Astrup J. et al., 1981), nicméně tento nález může být podmíněn řadou jiných faktorů než diaschízou: přítomností edému, zvýšením nitrolebního tlaku, buněčnou smrtí v oblasti penumbry, zasažení subkortikálních struktur apod. Tyto metodologické potíže zatím nevyřešily ani zvířecí modely. Jak již bylo uvedeno výše, ipsilaterální vzdálené změny CBF lze pozorovat též u pacientů s fokální epilepsií.

Zkřížená cerebellární diaschíza: Na základě vyšetření PET popsal hypometabolismus v mozečkové hemisféře kontralaterální ke kortikální lézi (zkříženou cerebellární diaschízu, CCD) jako první Baron (Baron J.C., 1996). Tento fenomén byl posléze opakovaně pozorován u pacientů CMP (Kanaya H. et al., 1983; Lenzi G.L. et al., 1982), supratentoriálními nádory (Patronas N.J. et al., 1984) či epileptogenními lézemi (Nelissen N. et al., 2006). CCD se objevuje v důsledku lézí lokalizovaných ve frontálním i parietálním laloku, v thalamu, bazálních gangliích a capsula interna. Nejvýraznější je při rozsáhlých postiženích zasahujících více než jeden mozkový lalok, či naopak u ohraničených lézí v capsula interna. Byla popsána i zkřížená cerebello-cerebrální diaschíza u pacienta s mozečkovou ischemií (Broich K. et al., 1987). Pravděpodobnou příčinou těchto metabolických změn je ovlivnění kortiko-pontinní dráhy, jejíž vlákna přináší převážně excitační vstup granulárním buňkám kontralaterální mozečkové hemisféry. Při přerušení těchto vláken může ztrátou excitační aferentace dojít k inhibici granulárních buněk. Vzhledem k tomu, že cerebro-cerebellární smyčka je dobře vyvinuta jen u primátů, bylo obtížné pozorovat CCD např. u laboratorních potkanů (Feeney D.M. a Baron J.C., 1986). Poněkud problematický je fakt, že CCD není transitorní. Naopak, po ischemických příhodách se může v průběhu času spíše zvyrazňovat - není tedy splněno základní Von Monakowovo kritérium diaschízy, tj. reverzibilita. Na druhou stranu byla pozorována i přechodná CCD, konkrétně u pacientů s epilepsií, u kterých byla přechodně vyřazena funkce jedné hemisféry amobarbitalem (Biersack H.J. et al., 1988). Funkční (ipsilaterální)

důsledky takto vzniklé CCD jsou neposouditelné, s ohledem na převažující obraz hemiparézy při vyřazení hemisferálních funkcí amobarbitalem.

1.2.2. Vzdálené změny excitability

Vzdálené důsledky fokálních lézí se, kromě změn CBF a CMR, mohou projevovat také změnou excitability. Zatímco změny CBF a CMR jsou měřitelné dnes již jasně definovanými reprodukovatelnými metodami, hodnocení změn excitability je, zejména u lidí, metodologicky složitější. Jednotliví autoři využívají v tomto směru různé postupy, např. hodnocení četnosti výskytu interiktálních epileptických grafoelementů, výskytu spontánních elektrografických záchvatů, hodnocení změn amplitudy evokovaných potenciálů, již od 80. let také pomocí transkraniální magnetické stimulace (TMS). Ve zvířecích modelech je testování excitability (tedy reakce na elektrický podnět) snazší. Hodnotit lze odpovědi při různých protokolech elektrické stimulace *in vivo* a *in vitro*: stimulace párovými pulsy (paired-pulse stimulation), hodnocení prahu pro vyvolání následných výbojů (SSAD), hodnocení trvání a dalších charakteristik SSAD, hodnocení přítomnosti a parametrů postiktální inhibice apod. Lze též hodnotit přítomnost a případnou facilitaci dlouhodobé potenciace (LTP) a dlouhodobé deprese (LTD).

Experimentální hodnocení závislosti změn CBF a změn excitability je metodologicky nesnadné, protože vyšetření excitability (jako reakce na podnět) musí zahrnovat určitý druh stimulace, která sama o sobě navozuje v dané oblasti změny CBF - jak ukazují některé studie s TMS. Vztah mezi excitabilitou a CBF je komplexní. Zvýšená aktivita glutamátergní transmise vyvolává výše zmíněnými (neuronálními, gliovými a metabolickými) mechanismy sekundární regionální zvýšení CBF. Zvýšení CBF však teoreticky může být navozeno také zvýšením aktivity inhibičních gabaerních okruhů (metabolické mechanismy, adenosin). Pokles CBF může vést v závislosti na své tíži a aktuální potřebě O₂ a energie ve tkáni buď k obrazu útlumu neurální aktivity a snížení excitability (smrt buněk v ischemickém jádře), k hyperexcitabilitě (intra-ischemické depolarizace v ischemické penumbře, CSD) či zůstat z pohledu excitability bez odezvy.

Vzhledem k tomu, že přerušení funkčního propojení mezi oblastí léze a oblastí diaschízy přinejmenším v některých studiích zabraňuje vzniku diaschízy (Andrews R.J. et al., 1993), je pravděpodobné, že primárně je ve vzdálené oblasti ovlivněna neurální aktivita a změny CBF jsou sekundární. Přítomnost hyperexcitability by v takovém případě byla spíše následkem částečného snížení CBF, nebo jevem na CBF zcela nezávislým.

Změny excitability lze zkoumat též v závislosti na lokalizaci léze:

Léze thalamu: Změny excitability neokortexu v důsledku selektivních thalamických lézí nebyly systematicky studovány. Při jednostranných lézích v oblasti nespecifických projekčních jader thalamu bylo pozorováno u lidí i ve zvířecích modelech ipsilaterální zpomalení v EEG (zde však nelze striktně vzato hovořit o změnách excitability) (Knott J.R. et al., 1985). Zpomalení v EEG se nachází též v důsledku lézí v bílé hmotě a na kortiko-subkortikálním pomezí (Gloor P. et al., 1977). Jednotlivé kazuistiky pacientů s jednostrannými thalamickými lézemi naznačují ztrátu inhibice v ipsilaterálním motorickém kortexu (hodnoceno pomocí TMS) (Inoue M. et al., 2012; Liepert J. et al., 2005). Podobný výsledek byl zaznamenán i v ojedinělých studiích na zrakové kůře u koček (Singer W., 1982).

Ipsilaterální kortikální změny: Studie zabývající se excitabilitou vzdálených oblastí mozkové kůry ipsilaterálně k lézi narážejí na stejné metodologické problémy, jako studie zabývající se vzdálenými ipsilaterálními změnami CMR a CBF, tedy především problém s odlišením penumbry od již intaktní, ale funkčně ovlivněné oblasti mozku. Obecně lze říci, že tkáň v okolí ischemické léze vykazuje spíše zvýšenou excitabilitu. Tento fakt dokumentoval ve fototrombotickém modelu u potkanů Domann a spol. pomocí stimulace párovými pulsy – hyperexcitabilita v těchto experimentech přetrvávala nejméně 60 dní po vzniku ischemie (Domann R. et al., 1993). Výsledky byly replikovány i jinými autory (Fujioka H. et al., 2004). Podobně jako u interhemisférického ovlivnění (viz dále) byla v okolí fototrombotické ischemické léze pozorována down-regulace GABA_A receptorů (Que M. et al., 1999a).

Transhemisférické (transkalosální, interhemisférické) ovlivnění: Interhemisférické ovlivnění excitability je prozkoumáno asi nejlépe (viz též Tabulka 1.2.1.1). K popisu těchto změn přispěl významně Kempinsky s využitím různých modelů fokálních lézí mozkové kůry u koček. Léze vytvářel podvazováním cév, elektrokauterizací, lokálním zmrazením apod. Jako první např. zkoumal vliv transekce corpus callosum na amplitudu kontralaterálních evokovaných potenciálů. Formuloval také základní kritéria diaschízy: léze vyvolávající diaschízu by měla být ohraničená (1), jev je podmíněn změnou funkce neuronů (2), projevuje se ve vzdálených oblastech vůči lézi (3), je možné identifikovat dráhy funkčně propojující obě oblasti (4) a jedná se o reverzibilní proces (5) (Kempinsky W.H., 1956, 1958, 1966). Ve velmi důležité práci z roku 1993 se Andrews a kol. zabývali důsledky kalózotomie na vzdálené projevy fokální ischemie. V modelu retrakční ischemie mozku u prasat pozorovali autoři při intaktním corpus callosum přechodné zvýšení CBF a

amplitudy evokovaných potenciálů kontralaterálně k lézi. Po transsekci corpus callosum se tento efekt neprojevil (Andrews R.J. et al., 1993). Důsledky přetětí corpus callosum na propagaci epileptiformní aktivity (v modelu penicilinového epileptického ložiska u potkanů) popsali již v 70. letech Mareš a kol. (Mares P. et al., 1978a). V modelu permanentní okluze a. cerebri media (MCAO) a kortikální fototrombózy u laboratorních potkanů bylo pomocí stimulace párovými pulsy (test vypovídající zejména o míře GABAergní inhibice) zjištěno zvýšení excitability v širokých oblastech kontralaterální mozkové kůry (Buchkremer-Ratzmann I. et al., 1996b; Reinecke S. et al., 1999). Kontralaterálně k ischemické lézi byla dále pozorována zvýšená frekvence krátkých salv epileptických grafoelementů (Buchkremer-Ratzmann I. et al., 1998). Tato aktivita nebyla tlumena podáním NMDA antagonisty MK-801. Kontralaterálně k fokální ischemické lézi se ale významně snižuje vazebná denzita GABA_A receptorů (měřeno vazbou [³H]muscimolu) (Que M. et al., 1999b; Que M. et al., 2000). Zároveň však nedochází ke ztrátě gabaergních interneuronů (Frahm C. et al., 2004). Zdá se tedy, že fokální ischemie vede ke kontralaterálnímu funkčnímu potlačení GABAergní inhibice a tímto způsobem k výše uvedeným projevům hyperexcitability.

1.2.3. Vzdálené změny propustnosti hematoencefalické bariéry

Akutní (a chronické) změny propustnosti hematoencefalické bariéry (HEB) lze *in vivo* v klinické praxi hodnotit zejména na základě postkontrastních MRI sekvencí, čehož se využívá se především při zobrazování mozkových nádorů. Tato metodika však postihuje spíše hrubé strukturální léze HEB a nikoli jemnější funkční změny. Postkontrastní sycení na MRI se může vyskytovat u části pacientů v časně fázi ischemické CMP – v takovém případě bývá sdružena s větším rizikem hemoragické transformace ischemického ložiska. Novější metodou *in vivo* hodnocení permeability HEB je tzv. MRI permeability imaging (Bang O.Y., 2009) – s touto metodou jsou však zatím jen omezené zkušenosti a do praxe se nerozšířila. U epileptických záchvatů ani SE nebylo postkontrastní sycení (nezávislé na etiologii záchvatů či SE) pozorováno. Po kumulovaných záchvatech můžeme zaznamenat abnormity na difuzně vážených sekvencích, které však vypovídají spíše o přítomnosti intracelulárního edému, než o poruše HEB (Yaffe K. et al., 1995). U experimentálních zvířat je k hodnocení propustnosti HEB využívána řada exogenních tracerů, ať už fluorescenčních (např. Evansova modř či natrium fluorescein), nebo radioaktivně značených. Hojně jsou též využívány imunohistochemické techniky ke zobrazení endogenních i exogenních proteinů (např. křenuvová peroxidáza - HRP). Přehled experimentálních metod využívaných ke zobrazení propustnosti HEB je uveden v Tabulce 1.2.3.1.

Tabulka 1.2.3.1: Tracery a metody využívané k hodnocení propustnosti hematoencefalické bariéry

Exogenní tracery

Markery permeability pro proteiny

Evansova modř

Fluorescein isothiocyanate-albumin (MW: 67,000)

Křenová peroxidáza* (MW: 40,000)

Mikroperoxidáza* (MW: 1900)

¹²⁵I-značený sérový albumin

¹⁴C-značený dextran (MW: 70,000)

Markery permeability pro ionty a soluty

Iontový Lanthan* (MW: 138.9)

Sodná sůl fluoresceinu (MW: 376)

Lucifer Yellow (MW: 457)

Ruthenium Red* (MW: 800)

Fluorescein isothiocyanate-dextran (MW: 3000)

¹⁴C- α -Aminoisobutyryát (MW 103)

¹⁴C Sukróza (MW: 342)

¹⁴C- Methotrexát (MW: 455)

¹⁴C-Inulin (MW: 5000)

Extravazace endogenních proteinů

Imunohistochemické hodnocení plazmatických proteinů

Immunoperoxidáza

Imunofluorescence

Immunogold technique

Tabulka předkládá přehled exogenních tracerů (fluorescenčních nebo radioaktivně značených) a imunohistochemických metod k hodnocení propustnosti hematoencefalické bariéry. Je zřejmé, že pro hodnocení propustnosti pro ionty, soluty a proteiny je nutné využívat rozdílných tracerů a technik. Z hlediska hodnocení typu poruchy hematoencefalické bariéry je také významná molekulární hmotnost jednotlivých tracerů. (Upraveno podle (Nag, 2003)).

* hvězdičkou jsou označeny exogenní tracery detekovatelné elektronmikroskopicky
MW = molekulové hmotnosti v Daltonech

Přítomnost vzdálených změn HEB v rámci diaschízy nebyla u lidí systematicky zkoumána. Přesto má tato myšlenka svoje opodstatnění. Jak už bylo uvedeno výše, vztah neuronální aktivity k lokální regulaci CBF je velmi úzký. Existují důkazy, že glutamátergní transmise (cestou NMDA receptorů) může do značné míry ovlivňovat propustnost HEB (Koenig H. et al., 1992; Pont F. et al., 1995). Není proto důvod se domnívat, že by propustnost HEB nemohla být změněna v důsledku

fokální léze i ve vzdálených oblastech. Alterace mikroprostředí vzdálených neurovaskulárních jednotek v důsledku zvýšení propustnosti HEB by mohla přispívat k funkčnímu i strukturálnímu poškození v těchto vzdálených oblastech.

V jednotlivých zvířecích modelech fokální ischemie se rozsah a anatomická distribuce poruchy HEB liší. Je například pravidelně přítomna v modelu transitorní MCAO a naopak obvykle nebývá přítomna v modelu permanentní MCAO (Nagaraja T.N. et al., 2008; Yang G.Y. a Betz A.L., 1994). Při bližší charakterizaci fototrombotického modelu zjistili jeho autoři pomocí extravazace Evansovy modři (EB) a křenuvé peroxidázy (HRP) porušenou HEB nejen v místě fototrombotické léze, ale i ve vzdálených oblastech ipsilaterální hemisféry. Výrazné kontralaterální změny nebyly pozorovány, nicméně iniciální práce nebyly na hodnocení vzdálených změn cílené (Dietrich W. et al., 1987b). V modelu tranzitorní fokální ischemie pozorovali Murakami a kol. v buňkách vzdálených oblastí mozku akumulaci EB (jenž je markerem extravazace sérového albuminu) (Murakami K. et al., 1998). Autoři v této práci demonstrovali souvislost buněk akumulujících Evansovu modř a buněk podléhajících apoptóze. Funkčního význam buněk akumulujících plazmatické proteiny byl diskutován řadou dalších autorů (Bolwig T.G., 1988; Ivens S. et al., 2006; Seiffert E. et al., 2004). Zdá se, že se jedná o univerzální jev v řadě typů poškození. Nedávno byl postulován vztah tohoto jevu k epileptogeneze (Ivens S. et al., 2006). Vychytávání plazmatických proteinů buňkami ve vzdálených oblastech mozku v důsledku fokálních lézí lze interpretovat jako důsledek vzdálené poruchy HEB, nelze však vyloučit i jiné mechanismy. Např. Tengvar a kol. ve své velmi zajímavé práci popisují axonální transport HRP z místa fokální chladové léze do vzdálených oblastí, a to i kontralaterálně cestou corpus callosum, a dokonce i do oblasti cervikální míchy (Tengvar C. a Olsson Y., 1982). Axonální transport sérových proteinů z místa léze do vzdálených oblastí představuje další možnost pohledu na funkční důsledky fokálních lézí a vyžaduje podrobnější experimentální zkoumání.

1.3. Fenomén preconditioningu u ischemie CNS a epileptických záchvatů

Předtrénování (preconditioning) lze obecně chápat jako navození přechodné částečné tolerance k patologickému inzultu (obvykle hypoxii či ischemii) pomocí předcházející expozice lehčí formě téhož poškozujícího děje, případně jinému ději s patofyziologicky podobnými důsledky. Hlavní motivací ke studiu tohoto fenoménu je snaha o identifikaci molekulárních cílů zodpovědných za navození tolerance a využití těchto znalostí při návrhu nových terapeutických

strategií. Pochopení mechanismů preconditioningu je důležité též pro výzkum postconditioningu, který již má přímý terapeutický potenciál.

Fenomén hypoxického/ischemického předtrénování byl studován zejména v myokardu (u nás např. (Ošťádalová I. et al., 1998)) a mozku, dále např. v retině, játrech a ledvinách. Navození tolerance bylo popsáno nejen u samotného hypoxického a ischemického poškození, ale též v modelech epileptických záchvatů (např. kainátového SE (Lere C. et al., 2002; Plamondon H. et al., 1999), záchvatů po podání bikukulinu (Sasahira M. et al., 1995) a lithium-pilokarpinového SE (Yang J. et al., 2007)). Hypoxie a ischemie navíc nejsou jediným možným stimulem k navození tolerance – preconditioning byl experimentálně indukován pomocí hypertermie (Duveau V. et al., 2005), hypotermie (Nishio S. et al., 1999), chemicky a elektricky navozených epileptických záchvatů (Mishima Y. et al., 2005; Plamondon H. et al., 1999; Sasahira M. et al., 1995; Towfighi J. et al., 1999) (nikoli však spontánních záchvatů (Herrmann M. et al., 2004)), pomocí šířící se deprese (Matsushima K. et al., 1996) a v důsledku podání řady látek: blokátorů Krebsova cyklu a respiračního řetězce (Wiegand F. et al., 1999), erythropoetinu (Baker J.E., 2005; Yang J. et al., 2007), desferioxaminu (Prass K. et al., 2002), isofluranu (Blanck T.J. et al., 2000; Kapinya K.J. et al., 2002), trombinu (Granziera C. et al., 2007), tumor necrosis faktoru alfa (Nawashiro H. et al., 1997), lipopolysacharidu (Zimmermann C. et al., 2001) a dalších.

Za hlavní patofyziologický mechanismus podmiňující preconditioning se obecně považuje změna genové exprese a *de novo* syntéza ochranných proteinů. Tato hypotéza je založena jednak na časových relacích mezi expozicí indukčnímu stimulu a rozvojem tolerance (potřebný interval cca několik dní) a za druhé na faktu, že po podání blokátorů proteosyntézy k rozvoji tolerance nedochází (Barone F.C. et al., 1998). Vzhledem k experimentálně dokumentovanému fenoménu zkřížené tolerance (navození odolnosti vůči určitému inzultu pomocí inzultu jiného druhu, např. navození tolerance ke globální ischemii pomocí kainátem indukovaných epileptických záchvatů) se dnes většina autorů přiklání k možnosti společného mechanismu podmiňujícího vznik tolerance v odlišných experimentálních situacích. Za hlavní faktory přispívající k navození ischemické tolerance jsou považovány: 1) aktivace buněčných obranných mechanismů, jako jsou antioxidantní systémy, heat shock proteiny, regulace pro-apoptotických a anti-apoptotických proteinů aj. 2) na tkáňové úrovni především regulace zánětu a 3) posílení inhibičních mechanismů oproti excitačním.

Významnou roli v preconditioningu pravděpodobně hrají volné radikály (FR) (Perez-Pinzon M.A. et al., 2005), neboť v různých experimentálních modelech bylo pozorováno zablokování preconditioningu po podání scavengerů FR (dimethylthiourea – DMTU, ebselen) (Puisieux F. et al., 2004). V důsledku preconditioningu překvapivě nebyla pozorována up-regulace antioxidantních

enzymů (Puisieux F. et al., 2004), nicméně byla dokumentována zvýšená mobilizace endogenních antioxidantů, např. kyseliny močové (Glantz L. et al., 2005). FR mají úzký vztah k regulaci proteosyntézy a genové exprese. Změna redoxního stavu buněk může jednak pozměnit průběh inzultu navozujícího preconditioning a za druhé průběh vlastního poškozujícího děje. Dalším hojně diskutovaným faktorem přispívajícím k navození preconditioningu patří adenosin (Heurteaux C. et al., 1995).

Důsledky preconditioningu jsou ve většině případů hodnoceny histologicky. Rozhodující je zmírnění rozsahu buněčné smrti v klíčových (vulnerabilních) oblastech (např. region CA1 u globální ischemie či rozměry fokální léze v modelech fokální ischemie). Navození tolerance lze však hodnotit i pomocí funkčních parametrů, např. kognitivních testů (prostorové učení) (Gozal D. et al., 2003; Row B. et al., 2003). Tyto testy mohou být citlivější (viz experimentální část této práce). Funkční testy mohou mít také v určitých situacích větší výpovědní hodnotu pro porovnávání s klinickou situací u člověka.

1.3.1. Ischemický preconditioning v mozku

Krátká expozice experimentálních zvířat ischemii má protektivní důsledky při opakované expozici ischemii. Když jsou za cca dva až čtyři dny zvířata exponována druhé (letální) ischemii, nedojde v případě globální ischemie k žádným změnám a v případě fokální ischemie je rozsah poškození výrazně menší (Lipton P., 1999).

V důsledku ischemie dochází ke změnám genové exprese a k novotvorbě řady proteinů. Velmi záhy po vzniku ischemie je zvýšena transkripce mRNA časných genů (immediate early genes) c-fos, c-jun, junB, krox-20 a zif-268 (Akins P.T. et al., 1996; Honkaniemi J. et al., 1997). Transkripce časných genů je blokována podáním NMDA antagonisty MK-801 (a je tedy zřejmě regulována intracelulární hladinou kalcia přes aktivaci glutamátových NMDA receptorů) (Collaco-Moraes Y. et al., 1994). Může být ovlivněna i přítomností volných radikálů. Není dosud jasné, zda produkty časných genů působí jako poškozující, nebo protektivní faktory.

Velmi studovanou skupinou genů a proteinů v souvislosti s mechanismy tolerance jsou heat-shock proteiny. Z obecných mechanismů indukujících heat-shock proteiny připadá během ischemie v úvahu zejména elevace intracelulární hladiny kalcia a dále elevace FR (reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku, ROS, RNS). V přítomnosti těchto induktorů jsou z dimerů Hsp-HSF uvolňovány heat-shock faktory (HSF), které translokují do jádra a zde vazbou na responsivní elementy HSE regulují transkripci genů. Do širší skupiny heat-shock proteinů lze zařadit i ubiquitin. U globální

ischemie dochází k plošnému snížení jeho aktivity. Po cca třech dnech se hladiny ubiquitinu vrací k původnímu stavu, avšak s výjimkou oblasti CA1, která vykazuje největší míru buněčné smrti (Ide et al. 1999). Up-regulace HSP se liší jak mezidruhově, tak v různých experimentálních modelech. U pískomilů se řádově během minut po vzniku globální ischemie ve všech regionech hipokampu zvyšuje transkripce mRNA pro Hsp70, Hsc70 a Hsp90 a dlouho pak přetrvává (Simon R.P. et al., 1991). Proteiny ze skupiny HSP70 jsou up-regulovány ve všech oblastech kromě vulnerabilní oblasti CA1. Naproti tomu u krys jsou HSP70 výrazně upregulovány i v CA1 (možná i silněji než v relativně rezistentní CA3), a přitom rozsah postižení je u pískomilů a krys podobný. Tato pozorování poněkud problematizují pohled na heat-shock proteiny jako univerzální faktory důležité pro přežití buněk v ischemických podmínkách. U fokální transitorní ischemie je korelace mezi HSP70 a přežitím buněk lépe vyjádřena. U transitorní ischemie MCA u krys vykazují neurony ischemického jádra nízkou aktivitu mRNA pro HSP70, proteiny ze skupiny HSP70 nebyly v jádře imunohistochemicky prokázány (Kinouchi H. et al., 1993). Naproti tomu výraznou aktivitu HSP70 vykazují neurony v oblasti ischemické penumbry. Mechanismus, jakým by heat-shock proteiny mohly navozovat toleranci vůči ischemii, není zcela objasněn. Jednou z možností je inhibice aktivace NF- κ B (při ischemii je aktivován a podporuje lokální zánět a mechanismy apoptózy) (Feinstein D.L. et al., 1996). Hsp70 může inhibovat apoptózu blokadou aktivace fosfolipázy A2 (PLA2), ochranou integrity jádra vůči kaspázám aj. Protektivní účinek heat-shock proteinů může vyplývat i z jejich primární funkce chaperonů - napomáhání v udržení tvorby efektivních proteinů v podmínkách jinak narušené proteosyntézy.

Další skupinu molekul, které mohou mít vztah k ischemickému preconditioningu jsou neurotrofní faktory. Ve vulnerabilní oblasti CA1 byla pozorována nižší bazální koncentrace BDNF a nižší denzita receptorů tyrosin kinasy B (trkB). Dala by se tak možná vysvětlit větší citlivost CA1 neuronů vůči poškozujícím inzultům. Experimentálně pozorovaný neuroprotektivní efekt nízkých dávek glutamátu zřejmě souvisí s uvolňováním BDNF v důsledku aktivace NMDA receptorů a vazbou BDNF na trkB receptory (Jiang X. et al., 2003). Aktivace tyrosinkinázového systému je důležitá pro udržení proteosyntézy a má svůj význam v regulaci apoptózy. Experimentálně byl též potvrzen neuroprotektivní efekt exogenního dodání růstových faktorů. Zajímavým faktem je, že není nutné růstové faktory podávat s výrazným předstihem, např. byl prokázán neuroprotektivní efekt BDNF při podání již 90s před zahájením hypoxie, a dokonce i krátce po navození ischemie. Z těchto časových relací může plynout důležitost přímého působení růstových faktorů (např. inhibicí apoptózy), spíše než sekundárních změn genové exprese. U fokální ischemie u potkanů (MCAO) nicméně nebyl pozorován rozdíl v transkripci mRNA pro nervový růstový faktor (NGF),

BDNF a ciliární neurotrofický faktor u zvířat s navozenou tolerancí a kontrol, což roli neurotrofických faktorů v ischemickém preconditioningu problematizuje (Pera J. et al., 2005).

Dosud nejlepším kandidátem na statut klíčového molekulárního faktoru ischemického preconditioningu v mozku je systém onkoproteinů Bcl-2/Bax. Antiapoptotický protein Bcl-2 je po jednorázové globální ischemii up-regulován v relativně rezistentních oblastech (a to jak v modelech využívajících pískomily, tak laboratorní potkany). Naproti tomu, mRNA pro Bcl-2 je zvýšeně transkribovaná i ve vulnerabilních regionech (CA1). Zdá se tedy, že v oblasti CA1 nedochází k translaci mRNA pro Bcl-2, pravděpodobně z důvodů selektivnějšího narušení proteosyntézy. Po navození ischemické tolerance subletální dvouminutovou globální ischemií byla u pískomilů naopak pozorována zvýšená imunoreaktivita Bcl-2 v CA1. Po jednominutové ischemii, nedostačující k navození ischemické tolerance nebylo zvýšení imunoreaktivity Bcl-2 v CA1 pozorováno (Shimazaki K. et al., 1994). U fokální ischemie jsou výsledky podobné: u jednorázové ischemie je Bcl-2 v oblasti penumbry detekován jen minimálně, naopak v mozkové tkáni vystavené preconditioningu je exprimován ve zvýšené míře (Shimizu S. et al., 2001). Dalším důkazem pro těsný vztah mezi Bcl-2 a fenoménem preconditioningu je experiment, ve kterém intracerebroventrikulární injekce Bcl-2 antisense oligonukleotidu vedla k snížení exprese Bcl-2 a zabránila navození tolerance u experimentálních zvířat. Po podání sense oligonucleotidu a samotného CSF tento efekt nebyl pozorován (Shimizu S. et al., 2001). Zvýšená exprese Bcl-2 byla pozorována i u jiných patologických dějů (např. kainátového SE (Wang C.H. et al., 2005)), a mohla by být jedním z hledaných společných molekulárních mechanismů preconditioningu.

Otázkou zůstává, jaký mechanismus podmiňuje protektivní roli Bcl-2. Mezi významné účinky Bcl-2 patří stabilizace mitochondrií, zlepšení jejich schopnosti pufovat intracelulární kalcium, inhibice tvorby membrane transition pore (MTP) a blokáda uvolnění cytochromu C z mitochondrií a endoplasmatického retikula (Nakatsuka H. et al., 2000). Všechny tyto účinky způsobují inhibici apoptózy.

Proapoptotický protein Bax je exprimován v podstatě opačným způsobem než Bcl-2, tedy po jednorázové ischemii více v CA1 u globální ischemie a v penumbře u fokální ischemie. Ischemický preconditioning této up-regulaci brání. Souhrnně lze říci, že všem uvažovaným mechanismům je společné potlačení apoptózy a udržení efektivní proteosyntézy.

1.3.2. Cerebrovaskulární důsledky ischemického preconditioningu.

Kromě mechanismů zvyšujících u buněk vystavených ischemii šanci na přežití, může preconditioning vést ke zmírnění vlastních poškozujících mechanismů. Zejména se jedná o ovlivnění cerebrovaskulárních důsledků ischemie. Této neméně zajímavé oblasti je zatím věnováno méně pozornosti, než mechanismům neuroprotektce, avšak určitá data k tomuto tématu existují.

V modelu MCAO byla jako důsledek ischemického preconditioningu pozorována redukce extracelulárního edému a zmenšení rozsahu narušení HEB (měřeno přestupem [3H]inulinu) (Masada T. et al., 2002). Výsledky replikovali ve stejném modelu Zhang a spolupracovníci (s využitím Evansovy modře jako indikátoru porušené HEB), kteří kromě toho prokázali sníženou transkripci mRNA pro matrixovou metaloproteinázu-9 (MMP-9; enzym implikovaný mj. v patogenezi poruchy HEB u fokální ischemie) a sníženou expresi samotné MMP-9 v důsledku ischemického preconditioningu (Zhang F.Y. et al., 2006). Podobná redukce extracelulárního edému a obecně snížení rozsahu léze u fokální ischemie byla pozorována po intracerebrální injekci trombinu (Masada T. et al., 2000). Zatímco aplikace vysoké dávky trombinu vede k ischemii a výraznému extracelulárnímu edému, malé dávky trombinu tomuto efektu brání (tzv. trombinový preconditioning). Příčina protektivního efektu trombinu není známa. Zřejmě je ale nutná interakce trombinu s jeho specifickým receptorem. K navození trombinového preconditioningu je nutná aktivace c-JUN-N-terminal kinázy (Granziera C. et al., 2007). Byl uvažován též vztah tohoto fenoménu k aktivaci heat-shock proteinů, zejména Hsp27 či zvýšené expresi hypoxia inducible faktoru 1 (HIF-1).

Zajímavou oblastí je zkřížený preconditioning, zejména mezi epileptickými záchvaty a hypoxií či ischemií. Studie v této oblasti by mohly přinést zajímavé nové pohledy na patofyziologii jak epileptogeneze, tak ischemického poškození.

1.4. Modely hypoxického a ischemického poškození CNS.

Klasická patofyziologie rozděluje hypoxii (nedostatek O₂ ve tkáních) na (1) hypoxickou (způsobenou snížením arteriálního pO₂), (2) transportní, při které je sníženo množství hemoglobinu přenášejícího O₂ do tkání, (3) ischemickou (stagnační), při které je snížena nebo přerušena dodávka O₂ do tkání v důsledku snížení průtoku krve, a (4) histotoxickou, při které nejsou schopny tkáně účinně kyslík využívat. Přestože má poškození při hypoxické a ischemické hypoxii řadu společných mechanismů, je třeba tyto dva typy odlišovat.

Důsledky hypoxické hypoxie CNS ovlivňuje zejména její tíže (míra poklesu arteriálního pO₂), délka trvání a doprovodné metabolické faktory (např. přítomnost hyperglykémie aj.). Pro důsledky ischemické hypoxie (tj. ischemie) CNS je rozhodující, zda šlo o inzult permanentní či tranzitorní (kde se značnou měrou uplatňuje tzv. reperfuční postižení) a zda se jedná o ischemii globální či fokální. Pro druhou z uvedených je charakteristický gradient postižení směrem od centra do periferie, kdy lze rozlišit tzv. jádro ischemie ("ischemic core") a oblast ischemického polostínu (penumbry).

Tyto faktory se snaží zohlednit i experimentální modely hypoxického a ischemického poškození CNS. *In vivo* modely lze podle typu inzultu dělit na čtyři skupiny (viz Tabulka 1.4.1-4.): 1) modely hypoxické hypoxie 2) modely globální ischemie (kompletní vs. inkompletní), 3) modely fokální ischemie (permanentní a tranzitorní) a 4) modely hypoxie/ischemie, např. tzv. Levinův model, při kterém je jednostranná okluze arteria carotis interna kombinovaná se systémovou hypoxií (Levine S., 1960). *In vitro* modely se snaží zohlednit rozdílnost situace při hypoxické a ischemické hypoxii tím, že exponují řezy mozku či buněčné kultury anoxii, či anoxii v nepřítomnosti glukózy (tj. *in vitro* ischemii).

1.4.1 Hypoxická hypoxie

Modely hypoxické hypoxie (viz Tabulka 1.4.1.) lze využít ke studiu důsledků pobytu ve vysoké nadmořské výšce a dále všech chorob projevujících se hypoxickou hypoxií, ať už jde o onemocnění vzniklá v důsledku selhání transporu plynů v plicích, či v důsledku venozního zkratu. *In vivo* lze normobarickou hypoxickou hypoxii navozovat u anestetizovaných zvířat ventilací tzv. hypoxickou směsí (kdy se koncentrace O₂ pohybuje kolem 9%), anebo čistým N₂. Práce využívající těchto modelů na různých druzích laboratorních zvířat byly publikovány již od 30. let minulého

Tabulka 1.4.1.: Modely hypoxické hypoxie CNS *in vivo*

Model	Provedení	Autor	Poznámka
Ventilace hypoxickou směsí	anestezovaná zvířata, UPV směsí s nízkou koncentrací O ₂ (9%)	Yant, 1934	různé varianty zahrnují současnou hyperkapnii i normokapnii, různé druhy zvířat
Ventilace N ₂	anestezovaná zvířata, UPV s N ₂	Hicks, 1950	—
Arteficiální hypotenze	závažná hypotenze navozená krevní ztrátou	Harper, 1965	—
Hypobarická hypoxie	snížení tlaku vzduchu v hypobarické komoře	Jílek, 1953*	nevyžaduje anestezii, tíže a délka hypoxie variabilní

První tři uvedené lze modely lze označit za normobarické, v kontrastu s hypobarickou hypoxií.

* Hyperbarické a hypobarické komory jsou známy již od konce 19. století, citovaný odkaz je jedna z prvních prací využívající hypobarické hypoxie při výzkumu důsledků hypoxie CNS u laboratorního potkana. UPV = umělá plicní ventilace

století. Během pokusu lze kontrolovat též parciální tlak CO₂ v krvi či různým způsobem ovlivňovat metabolické parametry. Kromě značné invazivity je nevýhodou těchto modelů nutnost celkové anestezie, která může významně ovlivňovat výsledky.

Ve své práci využívám ke studiu hypoxického preconditioningu model hypobarické hypoxie. Pomocí hypobarické komory lze navozovat hypoxii u volně pohyblivých zvířat bez nutnosti anestezie, přitom tíži hypoxie lze snadno regulovat mírou poklesu tlaku vzduchu v komoře. Výhodou je též možnost exponovat stejnému přesně definovanému stresoru více zvířat najednou.

Hyperbarické a hypobarické komory jsou známy již od konce 19. století. Zakladateli a propagátory jejich experimentálního využití pro výzkum hypoxie CNS byli u nás již v 50. letech prof. Lubor Jílek a prof. Stanislav Trojan (Jílek L. a Mysliveček J., 1953; Trojan S. a Jílek L., 1962). Lze simulovat akutní, chronickou či intermitentní hypobarickou hypoxii. V našich experimentech používáme simulaci hodinového výstupu do výše 9000 (nebo 8 000) m. n. m. (akutní hypobarická hypoxie). V tomto modelu je během 10 minut barometrický tlak v komoře snížen na 210 mmHg (pO₂ = 44 mmHg), tato hodnota je následně udržována po 40 minut a během posledních 10 minut je postupně tlak vrácen zpět k výchozí hodnotě. Parciální tlak CO₂ je udržován na normálních hodnotách.

Míra strukturálního poškození mozku při hypobarické hypoxii závisí jednak na její tíži, ale také na celkové délce jejího trvání. Zatímco v našem modelu hodinové expozice výši 9000 m n.m.

nebyly morfologické změny pozorovány (Mares J. et al., 2005), u dvoudenní expozice výšce 6400 m n.m. ($pO_2 = 74$ mmHg) již byly nalezeny lehké abnormality dendritů pyramidových buněk hipokampu (Titus A.D. et al., 2007). U třídní (a delší) expozice výšce 6100 m n.m. ($pO_2 = 77$ mmHg) byla u laboratorních potkanů zjištěna snížená arborizace dendritů, menší počet dendritických trnů a současně přítomnost apoptózy ve všech vyšetřovaných oblastech hipokampu (Maiti P. et al., 2008). U zvířat vystavených 24h trvající hypobarické hypoxii při barometrickém tlaku 330 mmHg ($pO_2 = 69$ mmHg) bylo již pozorováno regionální zvýšení propustnosti hematoencefalické bariéry (Natah S.S. et al., 2009) a tento jev byl potencován současnou hypertermií. U nezralých zvířat vede zvláště protražovaná hypobarická hypoxie k závažným strukturálním a funkčním změnám, zejména v oblasti hipokampu, corpus callosum, ale též neokortexu (Langmeier M. et al., 1989).

Krátkodobá hypobarická hypoxie nemusí vést ke strukturálním změnám, má ale další významné patofyziologické důsledky. Dochází při ní k dysfunkci mitochondrií (Wustmann C. et al., 1987) se současnou zvýšenou produkcí volných kyslíkových radikálů (ROS) (Koudelova J. a Mourek J., 1994) a k indukci časných genů. Charakteristickou odpovědí na krátkodobou hypoxii je alterace nitridergních systémů, jako např. zvýšení aktivity neuronální NO-syntázy (nNOS) a neenzymatická nitrace tyrosinových reziduí. Tyto změny byly opakovaně pozorovány např. u pyramidových buněk CA3 oblasti hipokampu (Castro-Blanco S. et al., 2003; Encinas J. et al., 2003). Strukturální a funkční postižení hipokampu hypobarickou hypoxií vysvětluje také kognitivní dysfunkci přítomnou jak u lidí, tak laboratorních zvířat vystavených nízkému barometrickému tlaku, přičemž tíže kognitivní dysfunkce koreluje s hloubkou a délkou hypoxie.

1.4.2. Globální ischemie

Modely globální ischemie (viz Tabulka 1.4.2.) simulují situaci úplného přerušení průtoku krve mozkiem - např. při srdeční zástavě. Při modelování globální ischemie je třeba vzít v potaz značné mezidruhové ale i interindividuální rozdíly v rezistenci vůči ischemii a kolaterální cirkulaci u jednotlivých laboratorních zvířat. Podle stupně přerušení průtoku lze rozlišovat modely kompletní a inkompletní globální ischemie.

Mezi modely kompletní globální ischemie patří srdeční zástava (Ekholm A. a Siesjö B.K., 1992), podvaz cévního svazku vystupujícího ze srdce (Pluta R. et al., 1994), dekapitace, a mechanická komprese krčním límcem (Ljunggren B. et al., 1974). V těchto modelech je průtok krve

Tabulka 1.4.2.: Modely kompletní a inkompletní globální ischemie *in vivo*

Model	Provedení	Autor	Poznámka
Srdeční zástava	—	Ekholm, 1992	CBF < 1% kontrol
Uzávěr všech tepen Ao oblouku	podvaz cévního svazku	Pluta, 1991	CBF < 1% kontrol
Mechanické stlačení límcem	—	Ljunggren, 1974	CBF < 1% kontrol
Dekapitace	—	—	—
Four-vessel occlusion (4-VO)	Koagulace obou VA a přechodné podvázání obou CCA	Pulsinelli, 1979	CBF v hipokampu, striatu i neokortexu < 3% kontrol; není anestezie
Two-vessel occlusion (2-VO) u potkana	Podvaz obou CCA a snížení sTK na cca 50 mmHg	Smith, 1984	CBF v hipokampu, striatu i neokortexu < 1%; anestezie
Two-vessel occlusion (2-VO) u pískomila	Přechodné podvázání obou CCA bez snížení TK	Kirino, 1982	pískomil nemá aa. comunicantes posteriores; není anestezie
Hypoxie/ischemie	kombinace hypoxické hypoxie s jednostrannou okluzí CCA	Levine, 1960	inhalace směsi s nižší koncentrací O ₂ , modifikace podle Ikonomidou et al. zahrnuje hypobarickou hypoxii, anestezie

Vysvětlivky: CBF = průtok krve mozkiem, CCA = a. carotis communis, ICA = a. carotis interna, TK = krevní tlak, VA = a. vertebralis

mozkiem omezen na méně než 1% výchozích hodnot. Zvířata je však třeba uvést do celkové anestezie.

Větší popularitu získaly modely inkompletní ischemie, kde se pokles průtoku pohybuje od 1 do 3 % výchozích hodnot. Mezi nejčastěji používané metody patří tzv. four vessel occlusion (4-VO) a two vessel occlusion (2-VO) u laboratorního potkana a dále two-vessel occlusion u pískomila (2-VOg). V prvním případě je po předchozí koagulaci vertebrálních arterií (VA) potkana proveden podvaz obou aa. carotides communes (CCA). Naložení sutury a koagulace VA probíhá v anestezii, uzavření CCA již probíhá u zvířat při vědomí. Tímto způsobem je dosaženo snížení průtoku krve mozkiem na cca 3% bazálních hodnot (Pulsinelli W.A. a Brierley J.B., 1979). V případě 2-VO je u potkanů kombinován podvaz obou CCA s řízenou hypotenzí (sTK 50 mmHg). V tomto případě probíhá pokus v celkové anestezii a pokles průtoku se pohybuje na úrovni cca 1% výchozích hodnot. Méně náročnou verzi podobné metody představuje 2-VO u pískomilů (2-VOg). Pískomil

nemá vyvinuté aa. communicantes posteriores a podvaz obou CCA se tudíž projeví prakticky úplným přerušением průtoku krve mozkem.

Pro všechny modely globální ischemie platí, že i krátkodobé ischemické inzulty (v řádu minut) mají rozsáhlé morfologické důsledky. Různé oblasti mozku jsou však k ischemii různě citlivé. Nejvýraznější změny (buněčnou ztrátu) lze pozorovat v oblastech CA1 a CA4 hipokampu, dále pak ve striatu a ve druhé a páté vrstvě neokortexu. Fylogeneticky mladší oblasti, např. cerebellum, jsou k ischemii též více citlivé. Gliové buňky vykazují obecně větší odolnost vůči ischemii než neurony.

Velmi charakteristickým jevem pro ischemickou buněčnou smrt je delší časový odstup mezi vlastním inzultem a rozvojem morfologických změn (12h až několik dní). Pro rozsáhlou oddálenou neuronální ztrátu přitom postačují (zejména ve vulnerabilních oblastech) velmi krátké inzulty. Např. pro smrt 75% neuronů CA1 postačuje 3,5 minutová expozice globální ischemii, po 5 minutové expozici již odumírá veškerá buněčná populace. Hlavním patofyziologickým mechanismem oddálené buněčné smrti je excitotoxicita a poškození volnými radikály.

1.4.3. Fokální ischemie

Experimentální modely fokální ischemie (viz Tabulka 1.4.3-4.) jsou nezastupitelné při studiu patofyziologie ischemických cévních mozkových příhod (CMP) nejrůznější etiologie. Oproti etiopatogeneticky heterogenním ischemickým CMP u lidí jsou léze v experimentálních modelech relativně uniformní, je možno odstupňovat tíži ischemie, lze dobře kvantifikovat patologické důsledky. Bohužel, korelace výsledků získaných na experimentálních modelech s výsledky klinických studií u lidí není vysoká (zejména při testování neuroprotektiv). Mezi příčiny tohoto neúspěchu patří jednak značné (a v současné době nemodelovatelné) rozdíly mezi jednotlivými pacienty s CMP jako jsou věk, komorbidity, léky, genetické faktory apod., ale na druhé straně i metodologické nedostatky experimentálních studií (malé skupiny zvířat, nedostatečné monitorování fyziologických funkcí, nedokonalá histologická analýza, či nevhodně zvolené end-points - např. příliš časně hodnocení rozsahu léze a výrazná mezidruhová i vnitrodruhová variabilita experimentálních zvířat (Krysl D., 2007)).

V modelech fokální ischemie není pokles průtoku krve mozkem tak výrazný, jako u ischemie globální. K vyvolání dostatečných patologických změn je proto obvykle třeba delší expozice. Jak již bylo zmíněno, dochází u fokální ischemie díky kolaterálnímu oběhu k odstupňování tíže ischemie od tzv. jádra (s poklesem průtoku cca na 15% a poklesem ATP přibližně

Tabulka 1.4.3.: Modely permanentní fokální ischemie *in vivo*

Model	Provedení	Autor	Poznámka
Permanentní chirurgická proximální okluze a. cerebri media (p-pMCAO)	podvaz MCA po odstupu z ICA a před odstupem aa. lenticulostriatae; nověji zavedení nylonového vlákna cestou ICA až k odstupu MCA, někdy též podvaz ipsi CCA a transekce ECA	Tamura, 1981, Koizumi, 1986	značná variabilita ve velikosti léze a míry snížení CBF, hypertermie jako projev ischemie hypothalamu, pozdní protrahovaná porucha HEB, anestezie
Permanentní chirurgická okluze distální a. cerebri media (p-dMCAO)	koagulace MCA za odstupem aa. lenticulostriatae s podvazem ipsi CCA	Buchan, 1992	bez současného podvazu CCA nedostatečný pokles CBF, anestezie
Fototrombotická okluze distální a. cerebri media (PT-dMCAO)	osvětlení distální MCA po podání Bengálské červení zeleným světlem	Nakayama, 1988	signifikantní snížení CBF po 1h, ischemie kortexu i striata, anestezie
Okluze distální a. cerebri media topickým podáním endothelinu-1 (ET-dMCAO)	aplikace 120 pmol ET-1 (ve 3 ul) kanylou stereotakticky umístěnou nad distální MCA	Sharkey, 1992	během 10 min pokles sTK o 20% a CBF o 93%, zvýšení CBF ve globus pallidus, SNR, thalamu a dorzálním hipokampu, stoupá glutamát, výsledek podobný jako u p-dMCAO, anestezie
Kortikální fototrombóza	i.v. aplikace fotodynamického generátoru (Bengálské červení) následované osvětlením mozku zeleným světlem	Watson, 1985	mikrovaskulární trombóza navozená poškozením endotelu ROS, akcelerovaná komprese kapilár při otoku Ac; porucha HEB (ne však TJs), anestezie
Intrastriální podání endothelinu-1	lokální injekce ET-1 do striata u potkana	Agnati, 1991	snížení CBF 30-50%, výrazná penumbra, intracelulární edém, není porucha HEB, nestoupá glutamát, anestezie
Aplikace endothelinu-1 na povrch mozku	jednostranná aplikace ET-1 na FP kortex potkana	Fuxe, 1997	snížení CBF závislé na dávce, výrazná penumbra, anestezie
Intrakortikální podání endothelinu-1	mikroinjekce 10 pmol ET-1 do zvolené oblasti	Hughes, 2003	redukce CBF do 1h po injekci, není porucha HEB

Vysvětlivky: viz Tabulka 1.4.4.

Tabulka 1.4.4.: Modely tranzitorní fokální ischemie *in vivo*

Model	Provedení	Autor	Poznámka
Tranzitorní proximální okluze a. cerebri media (t-pMCAO)	zavedení nylonového vlákna cestou ICA až k odstupu MCA, někdy též podvaz ipsi CCA a transekce ECA	Koizumi, 1986	též hypertermie z poškození hipokampu, poškození endotelu s akcentací poruchy HEB?
Tranzitorní chirurgická okluze distální a. cerebri media (t-dMCAO)	klip na MCA za odstupem aa. lenticulostriatae, někdy současně podvaz ipsi CCA	Buchan, 1992	při trvání 2 hodiny s následnou reperfúzí vedlo k větším lézím, při trvání 3 a více hodin již stejné postižení jako u permanentní ischemie
Fototrombotická okluze distální a. cerebri media s farmakologickou rekanalizací	osvícení distální MCA po podání Bengálské červeně, rekanalizace podáním nimodipinu	Nakayama, 1988	modifikace fotorobotické okluze dMCA, vede k víceméně selektivní ischemii striata
Fototrombotická okluze distální a. cerebri media s následnou fotochemicky facilitovanou rekanalizací	po podání Bengálské červeně osvícení distální MCA laserem 562 nm, rekanalizace osvícením UV laserem 355 nm	Watson, 2002	modifikace fotorobotické okluze dMCA

Vysvětlivky k Tabulkám 1.4.3–4: CBF = průtok krve mozkiem, CCA = a. carotis communis, dMCA = distální úsek a. cerebri media, ECA = a. carotis externa, ET-1 = endothelin-1, ICA = a. carotis interna, MCA = a. cerebri media, HEB = hematoencefalická bariéra, pMCA = proximální úsek a. cerebri media, ROS = volné kyslíkové radikály, SNR = substantia nigra pars reticulata, TJs = tight junctions, UV laser = ultrafialový laser

na 25% výchozích hodnot) přes oblast penumbry (s poklesem průtoku cca na 40% a poklesem ATP cca na 50-75% výchozích hodnot) k extrapenumbrálním oblastem, kde je průtok krve omezen, ale ne na více než 40% původního stavu (Ginsberg M.D. a Pulsinelli W.A., 1994). Podobně jako u globální ischemie dochází v ischemickém jádru k ireversibilní oddálené buněčné smrti. Osud ischemické penumbry závisí na řadě faktorů a její záchrana představuje hlavní cíl všech neuroprotektivních strategií. Je však třeba podotknout, že přeživší neurony ischemické penumbry (tzv. “sleeping beauties” - Siesjö) mohou být dlouhodobě funkčně alterovány, což se může projevit např. sníženou efektivitou mechanismů udržujících redoxní homeostázu či hladinu intracelulárního kalcia (DeLorenzo R.J. et al., 1998). Tyto změny byly v poslední době implikovány v dějích jako je sekundární epileptogeneze (DeLorenzo R.J. et al., 2005).

Klasickým modelem fokální ischemie je okluze arteria cerebri media (MCAO) u laboratorního potkana či pískomila. U tzv. permanentní proximální okluze MCA (p-pMCAO) (Tamura A. et al., 1981) se v celkové anestezii provádí podvaz MCA po jejím odstupu z ICA. Uzávěr MCA lze provést též endovaskulárně, a to zavedením nylonového vlákna cestou ICA až k odstupu MCA (Koizumi J. et al., 1986). Podobnou technikou lze zvíře exponovat pouze tranzitorní ischemii s následnou reperfúzí (t-pMCAO). Pro dosažení dostatečné tíže ischemie se současně někdy provádí podvaz stejnostranné CCA a transekce ECA. Rozsah lézí získaných touto technikou je poněkud variabilní (nejen mezidruhově), nicméně ischemické jádro bývá konzistentně umístěno v laterální části ncl. caudati a putamen spolu s přilehlým parietálním somatosenzorickým kortexem. Ostatní části neokortexu a mediální část bazálních ganglií představují penumbru. Zvláštností modelu proximální MCAO je častá přítomnost hypertermie, která je vysvětlována ischemizací hypothalamu. Dalším metodologickým problémem je potencionální poškození endotelu při endovaskulární okluzi MCA nylonovým vláknem. V tomto případě může následně docházet k arteficiálnímu zvýraznění poruchy HEB a zánětlivé infiltrace ložiska. U tzv. distální okluze MCA (chirurgicky její koagulací, či zaklipováním za odstupem aa. lenticulostriatae) již nedochází k hypertermii, nicméně pokles průtoku krve mozdem nemusí být dostatečný. Z tohoto důvodu bývá někdy nutný současný podvaz ipsilaterální CCA. Nověji lze uzávěr distální části MCA provádět lokální aplikací endothelinu-1 či fotochemicky.

Vazokonstrikčních účinků endothelinu-1 (ET-1) se v modelování fokální ischemie CNS využívá od 90. let minulého století (Agnati L.F. et al., 1991). Fyziologicky se ET-1 syntetizuje v endoteliálních buňkách a jeho biologický účinek je zprostředkován vazbou na specifické receptory spojené s G-proteiny (ET_A, ET_B). ET_A receptory aktivují fosfolipázu C, což vede ke tvorbě inositoltrifosfátu z fosfolipidů a následně k uvolnění kalcia ze zásob v endoplasmatickém retikulu. Kromě toho dochází při aktivaci ET_A k modifikaci membránových napětově řízených kalciových kanálů a ke zvýšení vtékání kalcia do buňky. Kalcium v komplexech s kalmodulinem aktivuje kinázy, např. proteinkinázu C (PKC), v hladkém svalu pak zejména kinázu lehkých řetězců myosinu (myosin light chain kinase – MLCK), což vede k fosforylaci myosinu a kontrakci hladkého svalu. Tento děj je antagonizován proteinkinázou G aktivovanou cGMP, jenž je produkován v důsledku působení NO. NO je produkován buď neuronální NO-syntázou (nNOS) v důsledku zvýšení intracelulární hladiny kalcia po aktivaci glutamátových NMDA receptorů, nebo endoteliální NO-syntázou (eNOS) vlivem humorálních působků. Při modelování fokální ischemie CNS se využívá injekční aplikace exogenního ET-1 do oblasti corpus striatum, na povrch mozku (Fuxe K. et al., 1997), případně do blízkosti distální porce MCA (eMCAO) (Sharkey J. a Butcher

S.P., 1995). Několik minut po intrakortikální aplikaci ET-1 dochází k rychlému snížení lokálního průtoku krve mozem (Macrae I.M. et al., 1993), které přetrvává několik hodin. Procento snížení CBF se pohybuje od 30 do 50 % (Biernaskie J. et al., 2001; Bogaert L. et al., 2000). Dochází ke vzniku poměrně uniformních lézí, s výrazným lemem ischemické penumbry (Fuxe K. et al., 1997), avšak bez přítomnosti poruchy hematoencefalické bariéry a vazogenního edému. Byl však pozorován výrazný edém intracelulární (Gartshore G. et al., 1997). V modelu eMCAO byl úspěšně testován neuroprotektivní účinek řady látek, např. NMDA antagonisty MK-801 (Dawson D.A. et al., 1994), inhibitoru nNOS L-NAME (Dawson D.A. et al., 1994), scavengeru ROS ebselenu (Dawson D.A. et al., 1995) a dalších. Kromě farmakoneuroprotektce byl v endotelinovém modelu testován neuroprotektivní vliv hypotermie (Van Hemelrijck A. et al., 2005). Pozitivní výsledky byly dány do souvislosti s inhibicí apoptózy v ischemické penumbře. Kromě hodnocení akutních biochemických změn v oblasti léze byly v endotelinovém modelu hodnoceny i některé pozdní funkční důsledky fokální ischemie, např. postižení prostorové kognice u aplikace ET-1 do oblasti hipokampu (Mateffyova A. et al., 2006) či obratnost v různých behaviorálních testech (Gilmour G. et al., 2004).

1.4.4. Fotochemicky vyvolaná fokální ischemie CNS

Fotochemicky vyvolanou fokální ischemii CNS u laboratorního potkana popsali Watson a Dietrich v roce 1985 (Watson B. et al., 1985). Metodika využívá schopnosti některých látek uvolňovat volné kyslíkové radikály při ozáření světlem o určité vlnové délce (fotodynamické generátory). Osvědčenou látkou je bengálská červeň (RB: 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein), která při ozáření zeleným světlem generuje singletový kyslík. Původně byla jako zdroj světla využívána xenonová oblouková lampa (vlnová délka 560 nm), v dnešní době je však již většinou nahrazena lasery a jen vzácněji se používá bílého světla (vzhledem k nutnosti použití výrazně vyšší intenzity záření). Po intravenózním podání Bengálské červeni je zeleným světlem ozařováno předem definované místo na kalvě, na povrchu mozku, v novějších modifikacích též magistrální céva (např. MCA) - viz Tabulka 1.4.3-4. Bengálská červeň přítomná v cévách v oblasti svícení uvolňuje singletový kyslík, který poškozují endotel, což vede k aktivaci a adhezii destiček s následnou tvorbou trombů. Přesný mechanismus, kterým singletový kyslík poškozují membrány endotelových buněk není znám. Bezprostředně po ozáření dochází k porušení charakteristické trilaminární struktury plasmatické membrány endoteliálních buněk, jejich edému a místy až ztrátě integrity. Endoteliální buňky obsahují dilatované mitochondrie se setřelou strukturou

krist, jsou přítomny známky edému endoplasmatického retikula (Dietrich W. et al., 1987b). V důsledku poškození endotelu dochází k adhezi destiček. Jedním z možných vysvětlení ztráty antiadhezivních vlastností endotelu je narušení tvorby prostacyklinu (PGI₂) z arachidonátu, resp. narušení rovnováhy PGI₂/TXA₂. Bylo zjištěno, že ačkoli při fototrombóze může dojít k odhalení subendoteliální matrix, není tento děj pro adhezi trombocytů nezbytný. Na počátku fototrombózy jsou elektromikroskopicky pozorovány kontrahované subpiální arterie. Intraparenchymové cévy (zejména venuly a kapiláry) jsou naplněny degranulujícími trombocyty, Inocími k poškozenému endotelu. Dochází také k výraznému otoku astrocytů, což akceleruje vývoj fokální ischemie mechanismem mikrovaskulární komprese. Recentně byl průtok krve v oblasti fototrombotické léze sledován mikroskopicky *in vivo* - do čtyř hodin po ozáření došlo k úplné zástavě průtoku v oblasti jádra léze, což bylo z velké části způsobeno mikrovaskulární kompresí (Hoff E.I. et al., 2005).

Postižení endotelu provází porucha hematoencefalické bariéry (HEB) s nápadným vazogenním edémem (Dietrich W. et al., 1987a). Překvapivým nálezem je zachování integrity tight junctions - přesun markerů porušené HEB (křenová peroxidáza, Evansova modř) se tak zřejmě děje hlavně transcelulární cestou (Dietrich W. et al., 1987a). V dalším vývoji fototrombotické léze dominují mechanismy zánětu. 1-2 dny po ozáření dochází k postupné infiltraci okrajů léze CD5+ T-lymfocyty a pravděpodobně NK buňkami (CD4+/CD8+), současně dochází ke zvýšené expresi ICAM-1 na endoteliálních buňkách. Od třetího dne jsou lymfocytární elementy následovány makrofágy. Jádro léze bývá infiltrováno 7.-14. den po ozáření (Schroeter M. et al., 1997). Důležitou roli v zánětlivých změnách v oblasti jádra léze pravděpodobně hrají rezidentní mikroglie, a to již od 1. dne po ozáření (Schroeter M. et al., 1997).

Zatímco oblast jádra fototrombotické léze odumírá převážně mechanismem nekrózy, v oblasti penumbry byla zjištěna přítomnost apoptózy. Přítomnost TUNEL+ neuronů v okrajích léze byla zaznamenána 12 hodin po ozáření, s maximem 6 dní po ozáření (Braun J. et al., 1996). U fototrombotické okluze MCA byla pozorována fragmentace DNA v neuronech penumbry dokonce již 3-6 hodin po okluzi (Yao H. et al., 2001). V důležité práci Kharlamova a spol. bylo popsáno snížení počtu TUNEL+ buněk a buněk s patrnou fragmentací DNA po farmakologické bloádě proteosyntézy, endonukleáz a zejména po podání NMDA antagonisty MK-801 (Kharlamov A. et al., 1996), což implikuje roli glutamátergní transmise v iniciaci apoptózy.

Během fototrombózy dochází ke zvýšení excitability (ověřeno různými stimulačními protokoly), a to jak ipsilaterálně, tak kontralaterálně. Na okraji léze a vzdáleně v obou hemisférách byla zjištěna up-regulace GABA_B receptorů, v oblasti jádra léze naopak zvýšení GABA_A. Dále byla pozorována up-regulace NMDA receptorů v obou hemisférách, v zrcadlové kontralaterální oblasti

již 4 hodiny po ozáření. Řada prací byla věnována problematice diaschízy ve fototrombotickém modelu (např. (Buchkremer-Ratzmann I. et al., 1996a)). Tyto změny mají jistě i dlouhodobé důsledky. Až u 50 % laboratorních zvířat se během delšího období po fototrombóze objeví epileptické záchvaty (Kharlamov E.A. et al., 2003).

V našich experimentech využíváme modifikaci originálního Watsonova postupu k vyvolání fototrombotické léze. Laboratorní potkani kmene Wistar jsou anestetizováni i.p. podáním směsi NMDA antagonisty ketaminu (90 mg/kg) s alfa2-adrenergním agonistou xylazinem (7 mg/kg). Po chirurgickém odhalení lebky a její případné trepanaci (dle konkrétního experimentálního protokolu) je zvíře umístěno do stereotaktického přístroje a na stereotaktické koordináty je nasměrován paprsek vysokovýkonného zeleného diodového laseru (LAGR50: vlnová délka = 532nm, výkon = 50 mw/mm², průměr paprsku <1mm, rozptyl<1.4mrad, pracovní teplota 20-30 °C). Před zahájením svícení je zvířeti během 5 minut i.v. aplikována Bengálská červeň (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein) v dávce 20 mg/kg. Dle konkrétní potřeby je k i.v. aplikaci Bengálské červeně využita ocasní žíla, či je předem provedena kanylace v. femoralis. Předem stereotakticky definovaná oblast mozku (většinou oblast pro zadní končetinu sensorimotorického kortexu) je následně ozařována laserovým paprskem (parametry ozařování se liší dle konkrétního experimentálního protokolu). Pomocí této techniky dosahujeme reliabilních výsledků co do velikosti a lokalizace ischemické léze, což umožňuje sledovat patofyziologické děje probíhající v jádru ischemie a její bezprostřední blízkosti.

1.5. Modely akutních epileptických záchvatů

Experimentální modely epileptických záchvatů a experimentální modely epilepsie hrají nezastupitelnou roli ve výzkumu neurobiologických mechanismů podmiňujících vznik, šíření a ukončení jednotlivých epileptických záchvatů (iktogeneze), pomáhají zkoumat krátkodobé a dlouhodobé důsledky záchvatů, ale také mechanismy způsobující vznik spontánních rekurentních záchvatů (epileptogeneze). Kromě toho jsou modely zásadní pro vývoj nových antiepileptik (AEDs), ať již jde o identifikaci nových molekul, odhad jejich možné efektivity vůči konkrétním typům záchvatů, odhad jejich účinnosti ve srovnání se stávajícími léčivy (modely refrakterních záchvatů), testování, zda se mění jejich účinnost při chronickém podávání (chronické modely), hodnocení výskytu nežádoucích účinků či odhad účinných plazmatických hladin. Experimentální modely slouží též k hledání látek s antiepileptogenním působením, tj. látek bránících rozvoji spontánních rekurentních záchvatů.

Modely epileptických záchvatů lze obecně rozdělit na 1) modely využívající zvířata s genetickou dispozicí k záchvatům 2) modely, ve kterých jsou záchvaty indukovány u zdravých (naivních) zvířat. Do první skupiny patří zvířata se spontánními rekurentními záchvaty (např. GAERS = genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg, “tottering mice”, “stargazer mice”, psi s vrozenou epilepsií aj.) či zvířata vykazující reflexní záchvaty (např. tzv. GEPR = genetically epilepsy-prone rats, myši DBA-2 aj.). U druhé skupiny se k indukci záchvatů u zdravých laboratorních zvířat využívá elektrická stimulace, či různé druhy konvulziv.

Podle elektroklinického typu záchvatů lze rozlišovat modely záchvatů generalizovaných a parciálních, podle iktální semiologie pak modely záchvatů konvulzivních a nekonvulzivních. Podle počtu indukovaných záchvatů lze modely dělit na akutní (izolované záchvaty) a chronické (opakované záchvaty), podle přítomnosti nebo nepřítomnosti spontánních rekurentních záchvatů na modely jednotlivých epileptických záchvatů a modely epilepsie. Zvláštním případem jsou modely status epilepticus (SE). Výskyt a charakter spontánních záchvatů lze též zkoumat v modelech jiných cerebrálních inzultů (hypoxie, ischemie, hemoragie, trauma, apod.).

Protože se experimentální část mé práce dotýká důsledků akutních konvulzivních epileptických záchvatů, doplňuji v této kapitole přehled experimentálních modelů, ve kterých je možné tuto otázku studovat. Jednotlivé modely jsou uvedeny v Tabulkách 1.5.1-2.

Klasickým modelem generalizovaných tonicko-klonických záchvatů (GTCS) je maximální elektrošok (MES) (Toman J.E.P. et al., 1946). Výhodou tohoto modelu je jeho technická

nenáročnost a přitom vysoká míra reproducibility výsledků. Model byl navržen již ve 30. letech minulého století a představuje nadále zásadní nástroj vyhledávání a testování nových molekul s antiepileptickým působením. V přelomové práci využili Putnam s Meritem elektrošok u koček k identifikaci antiepileptického působení fenytoinu (Putnam T.J. a Merritt H.H., 1937). Dnes rutinně

Tabulka 1.5.1.: Vybrané akutní modely generalizovaných konvulzivních záchvatů

Model	Provedení	Autor	Poznámka
Maximal electroshock (MES)	transkorneální či transaurikulární elektrická stimulace (trvání 0,2 s, 50mA u myši, 150 mA u potkanů, 50-60 Hz, šířka pulsu 0,6 ms)	Toman, 1946	testování účinnosti AEDs proti GTCS, sleduje se výskyt tonické křeče zadních končetin
Pentylentetrazol (PTZ, metrazol)*	pentylentetrazol s.c. ("low dose": 10-20 mg/kg, "high dose": >75 mg/kg)	Meduna, 1934	inciálně indukuje myoklonické (klonické) záchvaty, které později kulminují v GTCS; AEDs účinné v PTZ modelu vykazují účinnost proti absencím a myoklonickým záchvatům
Bikukulin	bikukulin i.v. (0,3mg/kg) či i.p. (load 2mg/kg a následně repetitivně 0,5mg/kg)	Meldrum, 1971	kompetitivní antagonist GABA _A receptorů, indukuje klonické záchvaty s hypermotorickými projevy (běhání, skoky)
Kainát	kainát s.c. (10mg/kg), i.p. (3-20mg/kg)	Olney, 1974	agonista glutamátových kainátových receptorů
Flurothyl (hexafluorether)	10% roztok flurothylu v ethanolu je konstatní rychlostí (0,103 ml/min) aplikován na filtrační papír ve víčku nádoby, ve které je umístěno zvíře	Truitt, 1960 (Krantz, 1958)	po 60-100s epizody zarázů, následně tremor, piloerекce, myoklonie, pak klonické záškuby nejprve předních končetin, pak pád a generalizovaný klonus (někdy i tonická komponenta)

Kromě pentylentetrazolu, bikukulinu a kainátu lze použít vysokých dávek dalších konvulziv, jako je pilokarpin (agonista muskarinových acetylcholinových receptorů), allylglycin (inhibitor glutamát dekarboxylázy), ouabain (inhibitor Na/K ATPázy), inhibitory cholinesteráz atd. Systémové injekce kainátu a pilokarpinu způsobují protražované záchvaty, které lze již spíše zařazovat mezi modely SE.

* Molekulární podstata konvulzivního působení PTZ není přesně známa, nicméně předpokládá se antagonismus GABA_A receptorů.

Tabulka 1.5.2.: Vybrané akutní modely fokálních záchvatů (naivní zvířata)

Model	Provedení	Autor	Poznámka
Elektrická stimulace (následný výboj)	různé lokality (amygdala, hipokampus, perforující dráha, neokortex), různé stimulační protokoly	Adrian, 1936 (Fritsch a Hitzig, 1870)	šíření záchvatů po anatomických drahách, závislost zejména na intenzitě a frekvenci stimulace (méně na jejím trvání a polaritě a tvaru pulzů)
Topické podání konvulziv	např. penicilin, strychnin, bikukulin, pikrotoxin	PNC: Walker, 1945, Matsumoto, 1964; strychnin: Baglioni 1909; bikukulin: Meldrum 1971	antagonisté GABA receptorů, glycinových receptorů

Vysvětlivky: Mechanismy účinku konvulziv: penicilin: nekompetitivní antagonist GABA_A receptorů, strychnin: antagonist glycinových receptorů, bikukulin: kompetitivní antagonist GABA_A receptorů, pikrotoxin: blokátor chloridového kanálu sdruženého s GABA_A receptorem.

využívaný model MES u laboratorních myši či potkanů navrhl ve 40. letech Toman a kol.

Korneálními či aurikulárními elektrodami je aplikován krátký puls proudu o vysoké intenzitě (0,2 s, 50mA u myši, 150 mA u potkanů), což představuje stimulus cca 5-10x silnější, než je individuální práh zvířete pro elektricky indukovaný epileptický záchvat. V důsledku stimulace dochází k tonické křeči následované po cca 10-15 vteřinách klonickými záškuby. Za dalších 20-30 s se stav zvířete vrací k normě. Nevýhodou klasického MES je nedostatečná senzitivita - při testování nových AEDs neidentifikuje látky, které zvyšují práh pro vznik záchvatů, ale ne dostatečně pro podmínky MES (Castel-Branco M.M. et al., 2009). Alternativní metodou je tzv. test prahu pro MES (MEST), při kterém zůstává dávka AED stejná, ale je v postupných krocích upravována intenzita stimulace.

Akutní generalizované konvulzivní záchvaty či status epilepticus je možno navozovat též systémovým podáním různých druhů konvulziv. Mezi nejčastěji používané látky patří pentylentetrazol (6,7,8,9-Tetrahydro-5H-tetrazolo(1,5-a)azepin), kompetitivní antagonist GABA_A receptorů bikukulin ((6R)-6-[(5S)-6-methyl-5, 6, 7, 8-tetrahydro [1,3]dioxolo [4,5-g] isoquinolin-5-yl] furo[3,4-e] [1,3] benzodioxol-8(6H)-on), dále agonista ionotropních glutamátových kainátových receptorů kainát ((2S,3S,4S)-3-(karboxymethyl)-4-prop-1-en-2-ylpyrrolidine-2-karboxylová kyselina), inhalační chemokonvulzivum flurothyl (bis-(2,2,2 trifluorethyl) ether) a mnoho dalších. Pomocí titrace dávky je možné v těchto modelech indukovat širší spektrum záchvatových projevů (od myoklonických záchvatů přes generalizované tonické, tonicko-klonické záchvaty až po status epilepticus). Mezi hlavní nevýhody chemokonvulzivních modelů patří vedlejší účinky podaných

látek, a dále riziko ovlivnění experimentálních výsledků nikoli samotným záchvatem, ale spíše vyvolávající substancí, případně jejími metabolity.

Akutní fokální záchvaty se modelují buď pomocí rytmické fokální elektrické stimulace (modely následného výboje - SSAD - viz oddíl 1.1.3.), nebo pomocí topické aplikace konvulziv. Topické aplikace konvulziv se v modelování fokálních záchvatů používá od začátku 20. století. Pravděpodobně nejstarší je model s lokální aplikací strychninu na povrch mozku. Strychnin blokuje inhibiční postsynaptické potenciály antagonismem glycinových postsynaptických receptorů. Tohoto modelu bylo využíváno zejména ke studiu konektivity jednotlivých oblastí mozku. Elektrografické záchvaty indukované topickou aplikací penicilinu na povrch mozku jsou známy od 60. let minulého století (Matsumoto H. a Marsan C.A., 1964). Penicilin působí jako nekompetitivní antagonist GABA_A receptorů. Při aplikaci na povrch mozku (většinou v podobě celulóзовého proužku nasáklého roztokem penicilinu o koncentraci 100 000 UI/ul, či krystalku penicilinu) lze elektrodou umístěnou v blízkosti místa aplikace cca v řádu minut registrovat repetitivní hroty. Na buněčné úrovni jsou penicilinové hroty charakterizovány repetitivními paroxysmálními depolarizačními posuny (PDS) se superponovanými salvami akčních potenciálů. Penicilinového ložiska bylo využíváno zejména k výzkumu propagace epileptických záchvatů, včetně interhemisferické odpovědi (Mares J. a Mares P., 1978; Mares P. et al., 1978a; Mares P. et al., 1978b) a kolaterální inhibice.

1.5.1 Flurothylové křeče

V našich experimentálních podmínkách využíváme k navození izolovaných generalizovaných konvulzivních záchvatů u naivních zvířat inhalaci flurothylových par. Z tohoto důvodu jsou charakteristiky tohoto modelu pojednány na tomto místě podrobněji.

Prokonvulzivní účinky flurothylu (chemicky bis-(2,2,2 trifluorethyl) etheru) byly objeveny Johnem Krantzem v roce 1956 při studiu této látky jako potencionálního inhalačního anestetika (Esquibel A. et al., 1957; Krantz J.J. et al., 1958). Dostatečná koncentrace flurothylu vedla u laboratorních zvířat i u lidí ke generalizovaným tonicko-klonickým křečím. Této vlastnosti bylo zprvu využíváno v psychiatrii, kde byl flurothyl pod firemním názvem Indoklon využíván jako alternativa k elektrokonvulzivní terapii. Během 60. a 70. let však toto využití flurothylu ustoupilo do pozadí a molekula našla své místo v experimentální epileptologii.

Flurothyl je chemicky velmi stabilní, odolný vůči hydrolýze a oxidaci. Při pokojové teplotě je to rychle se odpařující kapalina, což jej předurčuje k inhalačnímu způsobu podání. Vzhledem ke

své značné rozpustnosti v tucích velmi dobře proniká skrze hematoencefalickou bariéru.

Koncentrace flurothylu potřebná k vzniku záchvatů se u potkanů pohybuje kolem 40 pmol/g mozkové tkáně. Flurothyl se v těle nemetabolizuje a je vylučován v nezměněné podobě, převážně plícemi. V klasickém modelu flurothylových křečí u laboratorního potkana je 10% roztok flurothylu v ethanolu konstantní rychlostí (0,103 ml/min) aplikován na filtrační papír ve víčku nádoby, ve které je umístěn laboratorní potkan. Doba k rozvoji generalizovaných konvulzí závisí na koncentraci par ve vdechovaném vzduchu a pohybuje se v řádu minut. V naší laboratoři je rychlost aplikace snížena na 30 μ l/min. Jakmile proběhne tonicko-klonický záchvat, je směs vzduchu a flurothylových par v nádobě odsáta a nahrazena čerstvým vzduchem.

Semiologie flurothylových záchvatů je u laboratorních potkanů poměrně uniformní. Po umístění do komory vykazují potkani běžné exploratorní chování. Po cca 60-100 s se objevují epizody zárazů v činnosti, 150-200 s po zahájení aplikace škubavé pohyby a tremor, někdy doprovázené piloerkcí a záškuby uší. První myoklonický záškub (obvykle prudké trhnutí hlavou nazad) je pozorován přibližně 250-300s od začátku. Tento příznak je následován sérií myoklonických záškubů celého těla s postupně se zkracujícím interiktálním intervalem. Následně se objevují klonické záškuby tlamy a předních končetin, a posléze pád s klonickými záškuby všech čtyř končetin. V úvodu může být vyjádřena i tonická fáze s propnutím předních končetin a ventroflexí hlavičky. V případě čistě klonického záchvatu je zvíře cca 10 minut po záchvatu hyperreaktivní vůči senzorickým stimulům s následnou krátkou fází postiktální deprese. V případě tonicko-klonických záchvatů může být záchvat následován stuporem přetrvávajícím až jednu hodinu. Při hodnocení prahu pro flurothylové křeče lze měřit latence k jednotlivým behaviorálním projevům, např. k prvnímu myoklonickému záškubu, k plnému rozvoji tonicko-klonického záchvatu apod. Doba potřebná k rozvoji generalizovaného flurothylového záchvatu závisí na věku zvířat (kompletní semiologie GTCS se objevuje nejdříve kolem 16 postnatálního dne) (Velisek L. et al., 1995), na konkrétním kmeni potkanů, okolních podmínkách (auditivní i optické podněty ovlivňují práh pro flurothylové záchvaty (Kramer M.S. a Adler M.W., 1974)), a pochopitelně též na objemu nádoby v níž inhalace flurothylu probíhá.

Mechanismus prokonvulzivního působení flurothylu není přesně znám, nicméně výsledky studií naznačují, že flurothyl ovlivňuje především GABAergní systém (Green A. et al., 1987a; Green A. et al., 1987b; Hashimoto Y. et al., 2006; Isaeva E. et al., 2006; Krasowski M., 2000; Sperber E. et al., 1989b; Velisek L. et al., 1995; Wakamori M. et al., 1991), konkrétně tlumí uvolňování a syntézu GABA a antagonizuje GABA_A receptory, zejména na úrovni mozkového kmene (substantia nigra) (Sperber E. et al., 1989a; Veliskova J. et al., 2005). Kromě GABAergní

inhibice jsou však pravděpodobně ovlivněny i další systémy, zejména cholinergní projekce (Appleyard M. et al., 1986).

Metabolické důsledky flurothylových křečí jsou srovnatelné s jinými modely generalizovaných záchvatů. Při protrahovaných záchvatech dochází k intracelulární acidóze (Siesjo B. et al., 1985), snížení koncentrace fosfokreatinu, zvýšení koncentrace cAMP, laktátu a pyruvátu. Zvyšuje se cytoplasmatický poměr NADH/NAD⁺ a dochází k poklesu poměru koncentrace glukózy v mozkové tkáni vůči koncentraci v plazmě (Folbergrova J. et al., 1985). Po ukončení záchvatu se hodnoty cAMP a fosfokreatinu normalizují během 5 minut, laktátová acidóza přetrvává déle. Zejména u protrahovaných flurothylových záchvatů dochází ke značnému intracelulárnímu edému (Zhong J. et al., 1995).

Flurothylové záchvaty způsobují zvýšení koncentrace intracelulárního kalcia a zvýšení koncentrace volného intracelulárního Hsp-72, který po translokaci do jádra ovlivňuje genovou transkripci (Lowenstein D. et al., 1990)(Jensen F. et al., 1993), posttranskripční úpravy mRNA a její transport do cytoplasmy (Wynter C.V. et al., 1975). Kromě toho dochází po repetitivních záchvatech k akutním plastickým změnám, např. u nezralých zvířat ke snížení exprese NR1 (GluN1), NR2A (GluN2A), NR2B (GluN2B) podjednotek NMDA receptoru v neokortexu, a imunoreaktivity alfa-1 podjednotky GABA_A receptoru v hipokampu.

Ačkoli míra neuronálních ztrát jistě závisí na tíži flurothylových záchvatů (délce trvání konvulzí), zdá se, že po jednotlivém záchvatu nedochází k výraznějším neuronálním ztrátám (Mares J. a Rokyta R., 2009). U nezralých zvířat byla po dvaceti flurothylových záchvatech pozorována v průměru o 6 % nižší váha mozku v porovnání s kontrolami. Sperber a kol. však nenalezli u nezralých zvířat vystavených flurothylovému SE histologické známky buněčné smrti (Sperber E. et al., 1999). U dospělých zvířat zjistil Holmes dokonce přítomnost neurogeneze v oblasti gyrus dentatus, u zvířat s rekurentními záchvaty pak známky sproutingu mechových vláken CA3 (Holmes G. et al., 1998). Přítomnost sproutingu mechových vláken u nezralých zvířat dosud nebyla potvrzena (Sperber E. et al., 1999). Nepřítomnost významné buněčné smrti po jednotlivých flurothylových záchvatech jsme pozorovali i v našich podmínkách. Přesto mají flurothylové záchvaty významné behaviorální důsledky - např. poruchu prostorového učení. Této problematice je věnována jedna z experimentálních částí této práce (viz Oddíl 2.2.).

1.5.2. Kortikální následný výboj (SSAD)

Vyvolání epileptických záchvatů pomocí fokální stimulace mozku elektrickým proudem patří mezi nejstarší modely v experimentální epileptologii. První práce na toto téma sahají až do druhé poloviny 19. století (Fritsch a Hitzig, 1870). Systematicky se této problematice začal věnovat ve 30. letech 20. století Adrian (Adrian E.D., 1936), který využil modelu následného výboje k mapování šíření epileptické aktivity. Fokální kortikální stimulace se dodnes s úspěchem využívá v epileptochirurgii - pomocí kortikální stimulace lze u pacientů s farmakorezistentní epilepsií (zvláště MRI nelezionálních) mapovat rozsah epileptogenní zóny (přesněji zónu počátku záchvatu, angl. seizure onset zone) a její vztah k elokventním oblastem. Experimentálně byl SSAD využit mj. ke sledování vývoje semiologie a šíření záchvatů během ontogeneze, k mezidruhovému (a vnitrodruhovému) porovnání šíření a projevů elektricky vyvolaných záchvatů, k výzkumu funkčních vztahů jednotlivých struktur CNS, k analýze elektrických a biochemických změn v průběhu záchvatu a po něm a ke sledování důsledků biochemických změn, změn vnitřního prostředí a medikace na charakter následného výboje (Mares J. et al., 1982).

Jako následný výboj (angl. self-sustained afterdischarge, SSAD) označujeme iktální vzorec vyvolaný rytmickou elektrickou stimulací určité oblasti CNS, který přetrvává i po ukončení elektrické stimulace, která jej vyvolala. Iktální vzorec bývá často doprovázen behaviorálními projevy záchvatu. Stimulovat lze prakticky kteroukoli oblast CNS. Vzhledem k příznivému anatomickému uspořádání a specifickému charakteru zapojení byl v této souvislosti nejlépe prozkoumán limbický systém, zejména oblast amygdaly a hipokampu, kde má SSAD zcela specifický charakter (Correll R.E. a Ingram W.R., 1956). Dále byly zkoumány struktury neokortikální (frontální, centrální, parietální a temporální kortex), subkortikální (thalamus, bazální ganglia) a cerebellum. Stimulace cerebella a kmenových struktur (narozdíl od subkortikálních oblastí) dle literatury nevede ke vzniku SSAD, stimulace mozečku má spíše inhibiční vliv na elektricky vyvolané záchvaty. Propagace následných výbojů využívá anatomicky definovaných drah: z oblasti frontálního neokortexu ipsilaterálně směrem centrálním, současně do putamen a kaudáta, a dále též do zrcadlové kontralaterální oblasti, z oblasti centrální dochází k propagaci ipsilaterálně parietálně, z oblasti temporální pak jednak do motorického kortexu, a jednak mediotemporálně do oblasti amygdaly a hipokampu (Poggio G.F. et al., 1956).

Pro vyvolání a charakter následného výboje jsou zcela zásadní parametry stimulace, jako je intenzita stimulace (obvykle 1-8 mA; nižší intenzity v řádech desítek a stovek μA byly použity ve studiích zkoumajících práh pro vznik SSAD v anatomicky ostře ohraničených strukturách), polarita

stimulace (ve většině případů bipolární pulsy), tvar a trvání pulsu (většinou od 0,5 do 10ms), trvání stimulace a zejména frekvence stimulace. Stimulace elektrickým proudem o dané frekvenci synchronizuje neuronální populaci v místě stimulace, což při dostatečném trvání a intenzitě stimulace následně vede k hypersynchronii, která má schopnost spontánního šíření do vzdálenějších oblastí. Obvykle se využívají frekvence od 25-60 Hz, narozdíl např. od kindlingu v oblasti amygdaly, kde jsou využívány krátké salvy pulsů o vysoké frekvenci 300-500Hz (Racine R.J., 1972). Úspěšně však byly využity i stimulace o nižší frekvenci (8Hz) (Mares J. et al., 1983). Frekvence < 6 Hz obvykle SSAD nevyvolávají. V některých situacích je využívána repetitivní stimulace, tj. opakovaná aplikace elektrického proudu v pravidelných intervalech. Při využití určitých stimulačních parametrů, zvláště, jsou-li interstimulační intervaly delší než 5 minut, je možno pozorovat prodloužení trvání následujícího SSAD (akutní kindling) (Mares J. et al., 1983). Pokus o vyvolání nového SSAD bezprostředně po ukončení předchozího výboje bývá většinou neúspěšný (postiktální inhibice).

SSAD je doprovázen řadou biochemických změn, např. zvýšením extracelulární koncentrace kalia (na hodnoty kolem 10 mmol/l) a snížením extracelulární koncentrace kalcia (na hodnoty kolem 0,7 mmol/l) (Heinemann U. et al., 1977). Zvýšení koncentrace kalia a snížení koncentrace kalcia je řádově během vteřin kompenzováno zejména aktivitou glie (spatial buffering) (Kofuji P. a Newman E.A., 2004). Elektronmikroskopická analýza v době bezprostředně po ukončení SSAD prokázala nárůst objemu presynaptických segmentů, nárůst objemu mitochondrií a snížené množství synaptických vezikul (Langmeier M. et al., 1983).

Při určitých parametrech stimulace (zejména při použití vysokých frekvencí a vysokých intenzit) je možné zaznamenat spontánní elektrografické záchvaty objevující se obvykle desítky vteřin po ukončení SSAD. Mareš a kol. popsali čtyři druhy těchto tzv. rekurentních záchvatů: 1) záchvat připomínající předcházející SSAD - salva hrotů o frekvenci kolem 10 Hz předcházená vysokým výbojem hrot-pomalá vlna, 2) nízkovoltážní repetitivní hroty o frekvenci 1-2 Hz, 3) komplexní hrot-pomalá vlna, s hrotovou komponentou někdy přecházející do polyspike morfologie, 4) repetitivní hroty vyjádřené jen v některých svodech (Mares J. et al., 1983). Rekurentní záchvaty se však nevyskytly v období bezprostředně po odeznění SSAD - v období postiktální inhibice.

Prolomení postiktální inhibice je však možné při použití vhodných stimulačních parametrů - touto otázkou se zabývám v první sekci experimentální části této práce (viz Oddíl 2.1.).

1.6. 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.

2. Vlastní pozorování

2.1. Prolomení postiktální inhibice krátkou salvou stimulačních pulzů

2.1.1. Metodika

Veškeré procedury byly prováděny v souladu s doporučeními Ministerstva zdravotnictví ČR a schváleny Etickou komisí 3. LF UK. Laboratorní zvířata byla aklimatizována nejméně tři dny před experimentem v podmínkách

dvanáctihodinového cyklu světlo/tma a

volným přístupem k vodě a potravě. Dospělí

samci laboratorního potkana kmene Wistar

(N=18) byli náhodně rozděleni do dvou

skupin (A, B) po devíti zvířatech. Po uvedení

zvířete do anestezie (pentobarbital - PB: 70

mg/kg i.p.) byla chirurgicky odhalena kalva a

na předem určených stereotaktických

koordinátách byly po provedení návrtů

implantovány stimulační a registrační

elektrody (viz Obr. 2.1.1.). 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

byla využita stimulační elektroda. 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. Elektrokortikogram byl snímán pomocí

diferenčního zesilovače CED 1401 (Cambridge Electronic Design Limited, UK). Pro záznam

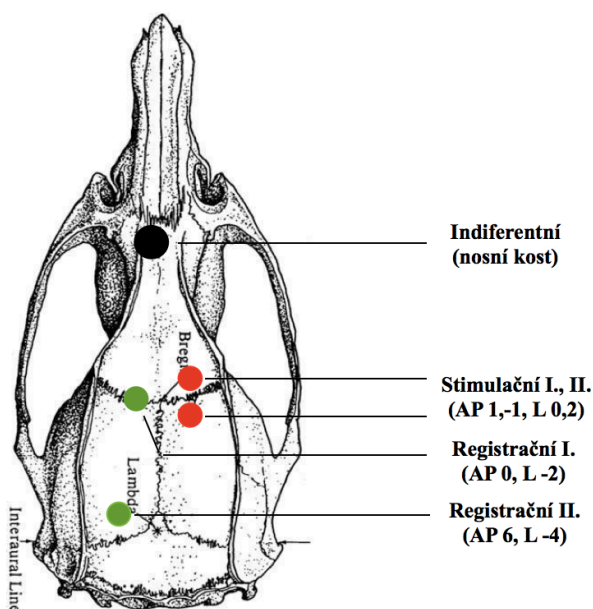
signálu jsme využívali firemní software Signal for Windows 1.80 utility (Cambridge Electronic

Design Limited, UK). Biosignál byl zaznamenáván v referenčním zapojení s taktovací frekvencí 1

kHz. Po nahrání pěti minut spontánního nativního elektrokortikogramu (ECoG) byl u každého

zvířete testován práh po transkalosální evokovaný potenciál (interhemisférickou odpověď). Tento

Obr. 2.1.1.: Umístění elektrod



Stereotaktické koordináty v závorkách:
AP = antero-posteriorní, L = laterální.

Obr. 2.1.2.: Schéma stimulace

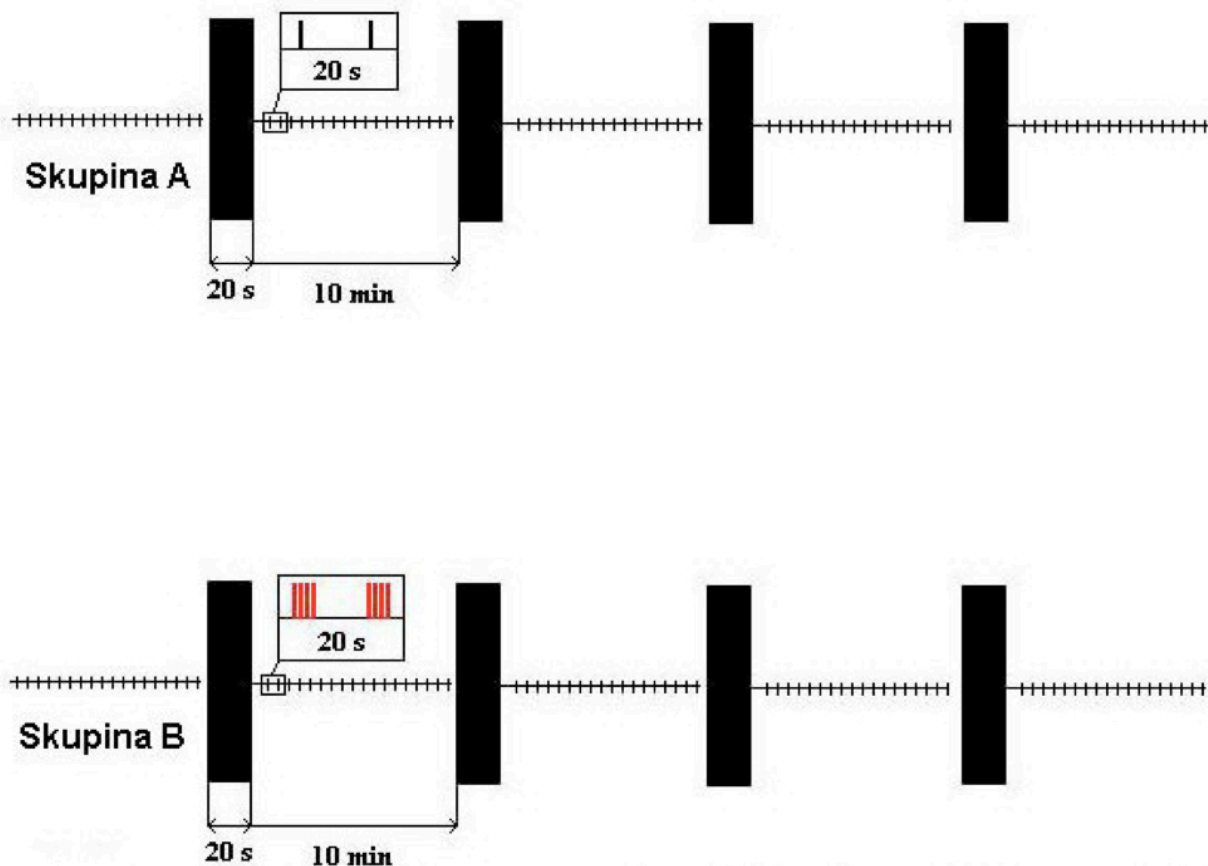
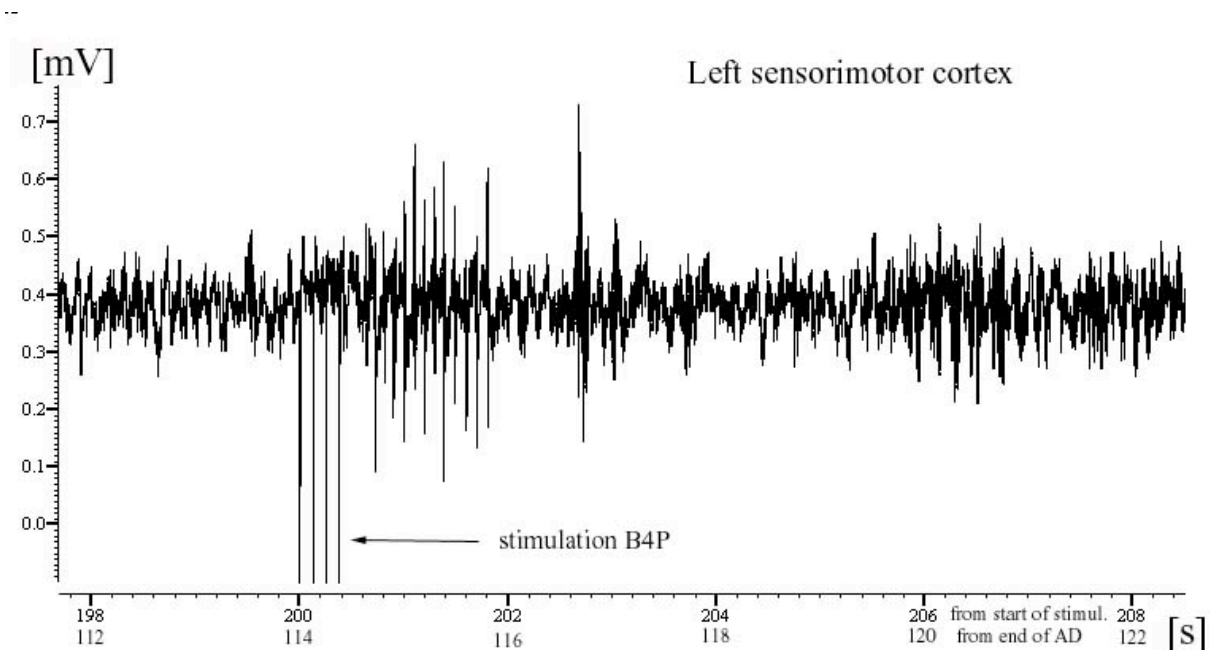


Schéma pokusu ve skupině A naznačuje horní část obrázku, ve skupině B dolní část obrázku. Černé obdélníky představují stimulaci vedoucí k vyvolání následných výbojů (trvání 20s, frekvence 8 Hz, intenzita 2,5x práh). Z obrázku je patrný rozdíl mezi oběma skupinami: ve skupině A byly v intervalech mezi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

práh byl stanoven pomocí zvyšování intenzity stimulace v postupných krocích ($10 \mu\text{A}$). Jakmile bylo při dané intenzitě zaznamenáno pět po sobě jdoucích interhemisferických odpovědí, předchozí intenzita stimulace byla označena jako prahová a byla využita jako referenční hodnota intenzity stimulace. V experimentu jsme použili dva druhy stimulace: jednotlivé bipolární pravoúhlé pulzy (intenzita stimulace 2,5x práh, trvání pulzu 1ms, interval mezi jednotlivými pulzy 20 s) a 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 interhemisferickou odpověď bylo ve skupině A aplikováno 20 jednotlivých pulzů a ve skupině B 20 4P (jako baseline stimulace). Následně 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

Obr. 2.1.3.: Ukázka elektrografického záchvatu při stimulaci 4P



Ukázka krátkého elektrografického záchvatu v návaznosti na krátkou salvu stimulačních pulzů. Záznam z levé SMA, šipkou je označen stimulační artefakt salvy.

10 minut. Během těchto 10 minut byly u zvířat aplikovány jednotlivé stimulační pulzy (skupina A) a 4P (skupina B) se stejnými parametry jako u baseline stimulace. Schéma pokusu viz Obr. 2.1.2.

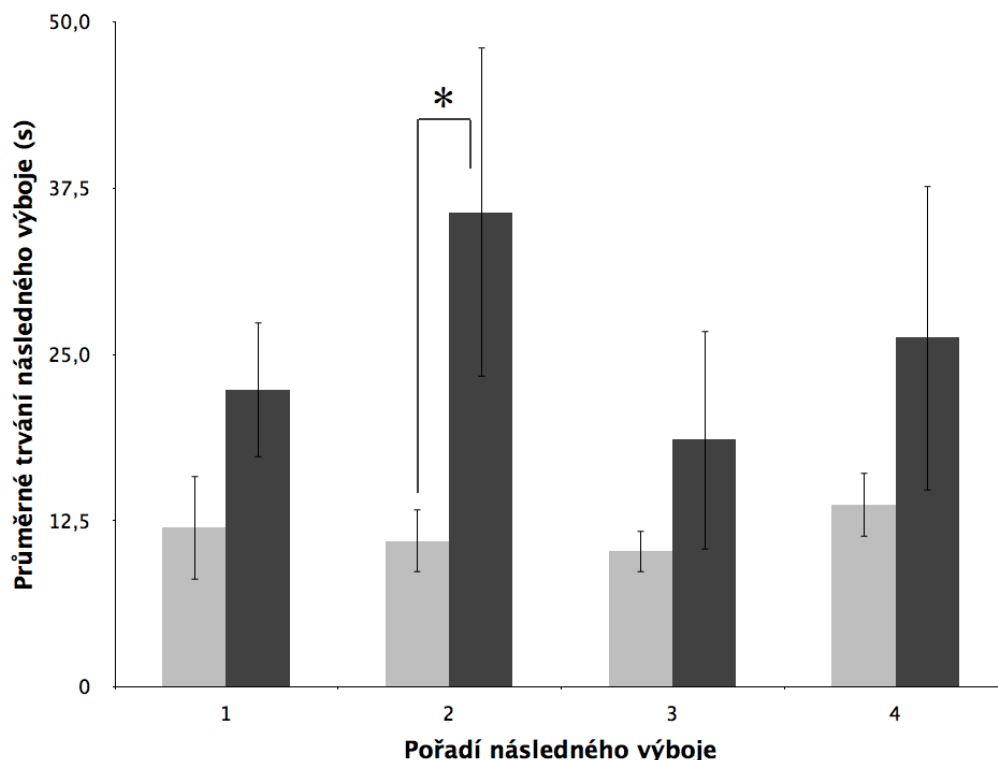
V experimentu bylo sledováno chování zvířat během následných výbojů. Přítomnost pádu během následného výboje byla využita jako ukazatel behaviorální tíže záchvatu. Dále bylo hodnoceno trvání jednotlivých následných výbojů a přítomnost elektrografických záchvatů v intervalu mezi následnými výboji.

Statistické zhodnocení: 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 Studentova t-testu. Pro srovnání počtu následných výbojů s pádem ve skupině A a B byl využit χ^2 test. Hladina významnosti byla vždy stanovena jako $p < 0,05$.

2.1.2. Výsledky

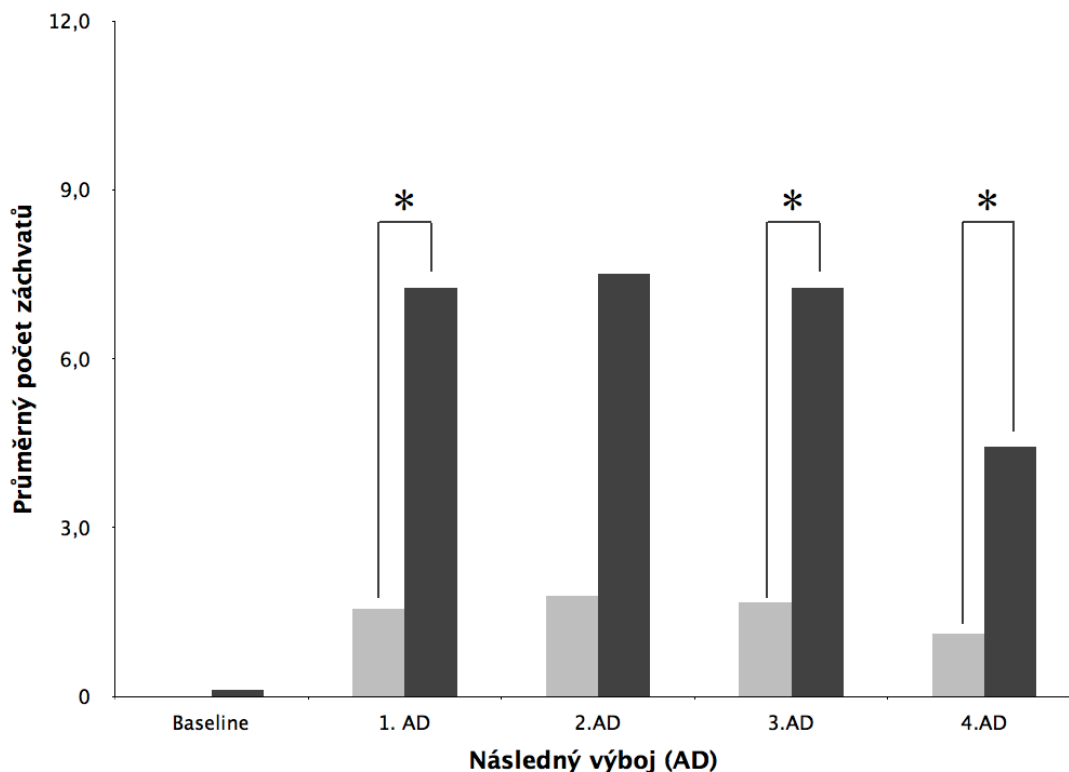
Baseline stimulace (tj. stimulace před indukcí 1. následného výboje) jednotlivými pulsy (skupina A) nevyvolala elektrografické záchvaty u žádného zvířete. Baseline stimulace salvou čtyř pulzů (skupina B) vedla u jednoho z devíti testovaných zvířat k atypické elektrokortikografické odpovědi. V intervalech mezi jednotlivými následnými výboji vyvolala stimulace jednotlivými pulsy (skupina A) jen několik krátkých elektrografických záchvatů (viz Obr. 2.1.3. a Graf 2.1.2.). Počet elektrografických záchvatů zaznamenaných ve skupině B (tj. při použití stimulace 4P) byl ve

Graf 2.1.1.: Průměrná délka následných výbojů.



Průměrné trvání jednotlivých následných výbojů ve skupinách A (světle šedá barva) a B (tmavě šedá barva). Statisticky signifikantní rozdíl byl zaznamenán pouze u druhého následného výboje. Chybové úsečky představují SEM (* = $p < 0,05$, Studentův t-test)

Graf 2.1.2.: Průměrný počet elektrografických záchvatů ve skupinách



Průměrný počet elektrografických záchvatů po jednotlivých následných výbojích ve skupinách A (světle šedá) a B (tmavě šedá). Ve skupině B byl zaznamenán signifikantně vyšší výskyt elektrografických záchvatů po všech následných výbojích s výjimkou druhého. (* $p < 0,05$, Mann-Whitney U test)

srovnání se skupinou A signifikantně vyšší po prvním, třetím a čtvrtém následném výboji ($p < 0,05$), nikoli však po druhém následném výboji (viz Graf 2.1.2.). 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 (viz Graf 2.1.1.). Průměrná délka prvního, druhého, třetího a čtvrtého následného výboje uvnitř skupin se statisticky významně nelišila. Ve skupině B bylo také statisticky významně více druhých následných výbojů sdruženo s pádem. Celkový počet následných výbojů s pádem se však mezi skupinami statisticky významně nelišil.

2.2. Ovlivění prahu pro flurothylový záchvat a jeho důsledků na prostorové učení

2.2.1. Metodika

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

Skupiny zvířat: Dospělí samci laboratorního potkana Wistar (200-250g; N=78) byli rozděleni do sedmi experimentálních skupin a jedné kontrolní skupiny (C: n=12). Kontrolní skupina byla testována pouze v Morrisově vodním bludišti. Zvířata v jednotlivých experimentálních skupinách byla vystavena hypobarické hypoxii a záchvatu indukovaném inhalací flurothylu v různých kombinacích, s časovým odstupem mezi inzulty buď 24 či 72 hodin. Přehled experimentálních skupin udává následující výčet:

1. "F" = pouze flurothylový záchvat (n=10). U zvířat v této skupině byl pomocí inhalace flurothylu navozen generalizovaný tonicko-klonický záchvat. 24 hodin po záchvatu bylo zahájeno učení v Morrisově vodním bludišti (MWM).
2. "H" = pouze hypoxie 9000 m n.m. (n=8). Zvířata v této skupině byla vystavena 1 hodinu trvající hypobarické hypoxii v simulované výšce 9000 m n.m. 24 hodin 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 hodinu trvající hypobarické hypoxii v simulované výšce 9000 m n.m. O jednu hodinu později byl u nich pomocí inhalace flurothylu navozen generalizovaný tonicko-klonický záchvat. 24 hodin 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 hodinu trvající hypobarické hypoxii v simulované výšce 9000 m n.m. O tři dny později byl u nich pomocí inhalace flurothylu navozen generalizovaný tonicko-klonický záchvat. 24 hodin 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. 24 hodin 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. 24 hodin 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 flurothylový záchvat. 24 hodin po záchvatu bylo zahájeno učení v MWM.

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 (ve skupinách po čtyřech) vystavena na jednu hodinu simulované výšce 9000 m n.m. (barometrický tlak cca 210 mm Hg; pO₂ = 44 mmHg; teplota = 24 ± 1 °C). Výstup a sestup trval 10 minut (tato doba byla zavzata v celkovém čase 1h). Parciální tlak CO₂ byl udržován na normálních hodnotách.

Prostorové učení: Prostorové učení v Morrisově vodním bludišti (MWM) bylo zahájeno vždy v intervalu 24h po poslední experimentální manipulaci. 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. Laboratorní 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 potkan 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.

Porucha hematoencefalické bariéry po flurothylovém záchvatu: Zvláštní skupina zvířat (n=3) byla použita k posouzení přítomnosti poruchy hematoencefalické bariéry po jednotlivém flurothylovém záchvatu. Před záchvatem byla potkanům i.v. aplikována Evansova modř (EB; 0.04 g/kg/2 ml). U kontrol (n=4) byla aplikována EB bez následného vyvolání záchvatu. Dvacetčtyři hodin po proběhlém záchvatu byla zvířata utracena, mozky perfundovány roztokem paroformaldehydu, fixovány a pomocí mikrotomu nařezány na 40 μm silné řezy. EB se v plasmě váže ochotně na

albumin. Komplex EB-albuminu emituje v zeleném světle fluorescenčního mikroskopu červený fluorescenční signál. Tímto způsobem bylo možné zkoumat případnou extravazaci komplexu EB-albuminu do mozkového parenchymu. Za standardních podmínek (zvětšení, expozice, ISO, rozlišení, formát) jsme pořídili u každého zvířete digitální mikrofotografie jednotlivých řezů. Dále jsme stejným způsobem pořídili mikrofotografie vybraných mozkových oblastí (CA1, CA2, CA3, thalamus, subthalamus, piriformní kůra) ve větším zvětšení. Digitální fotografie byly analyzovány pomocí volně dostupného programu ImageJ 1.37v. Kromě vizuálního hodnocení jsme u experimentálních i kontrolních zvířat kvantitativně hodnotili míru EB-fluorescence v různých oblastech mozku. K tomuto účelu jsme nad danou oblast umístili virtuální rámeček (1x2mm v oblasti kortexu, resp. 200x200 μm 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. *Statistické zhodnocení:* Všechny statistické výpočty byly prováděny v programu GraphPad Prism®. Pro zhodnocení rozdílů mezi skupinami co do průměrných latencí k nalezení ostrůvku v jednotlivých dnech jsme využili testu ANOVA s Bonferroniho post-testovým srovnáním skupin. Statisticky signifikantní rozdíly mezi skupinami byly následně potvrzeny pomocí nepárového (párového v případě porovnání konsekutivních dnů v rámci jedné skupiny) t-testu. Pro srovnání jednotlivých skupin co do prahu pro flurothylem indukovaný GTCS byl využit stejný postup (ANOVA + Bonferroni post-test a následně cílené porovnání t-testem). Vzhledem k neparametrickému rozložení hodnot signálové denzity EB-fluorescence byl k jejich porovnání mezi experimentální a kontrolní skupinou použit Mann-Whitneyho U-test.

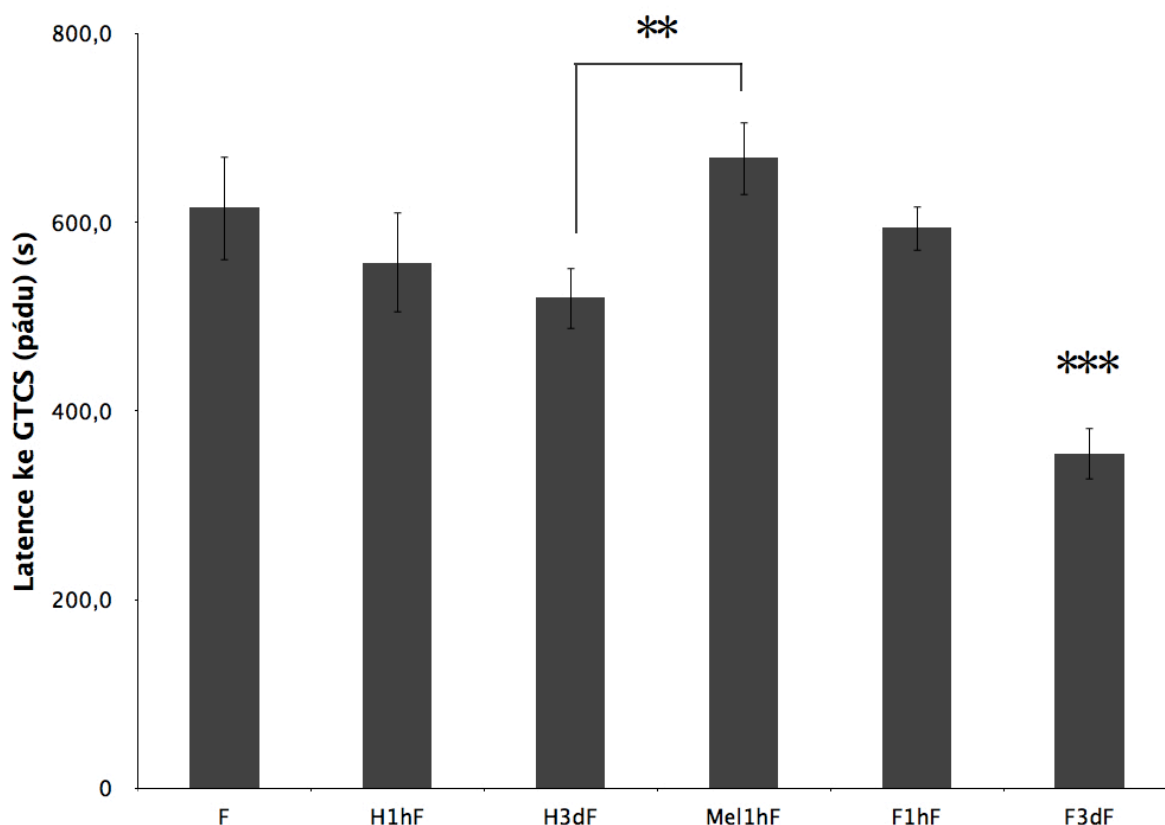
2.2.1. Výsledky

Průměrná doba od počátku inhalace flurothylu k rozvoji generalizovaného tonicko-klonického záchvatu s pádem pro jednotlivé skupiny je uvedena v Grafu 2.2.1. Ve skupině F3dF, tj. u zvířat, u kterých měřený (druhý) záchvat následoval 3 dny po prvním flurothylovém záchvatu, došlo u druhého záchvatu k signifikantnímu zkrácení latence ke GTCS ve srovnání se všemi ostatními skupinami (skupina F: průměrná latence $615,5 \pm 55,6$ s vs. skupina F3dF: průměrná latence $355,0 \pm 28,3$ s, $p=0,0007$, nepárový t-test). Tento rozdíl nebyl přítomen, pokud dva flurothylové záchvaty po sobě následovaly v intervalu 1 hodiny. Expozice hypobarické hypoxii tři dny před záchvatem ani expozice melatoninu 1 hodinu před záchvatem nevedla ve srovnání se skupinou zvířat exponovaných izolovanému flurothylovému záchvatu 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 generalizovaný tonicko-klonický záchvat vyvolaný inhalací flurothylu zhoršuje prostorové učení v Morrisově vodním bludišti (viz Graf 2.2.2.) Tento efekt přetrvává ještě 7 dní po záchvatu (F: průměrná latence 7. den $19,66 \pm 1,62$ s vs. kontroly: průměrná latence 7. den $10,44 \pm 0,49$ s, $p=0,0001$, nepárový t-test). Po jednotlivé expozici hypobarické hypoxie 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

Graf 2.2.1.: Latence k tonicko-klonickému záchvatu s pádem (práh pro GTCS) v jednotlivých skupinách



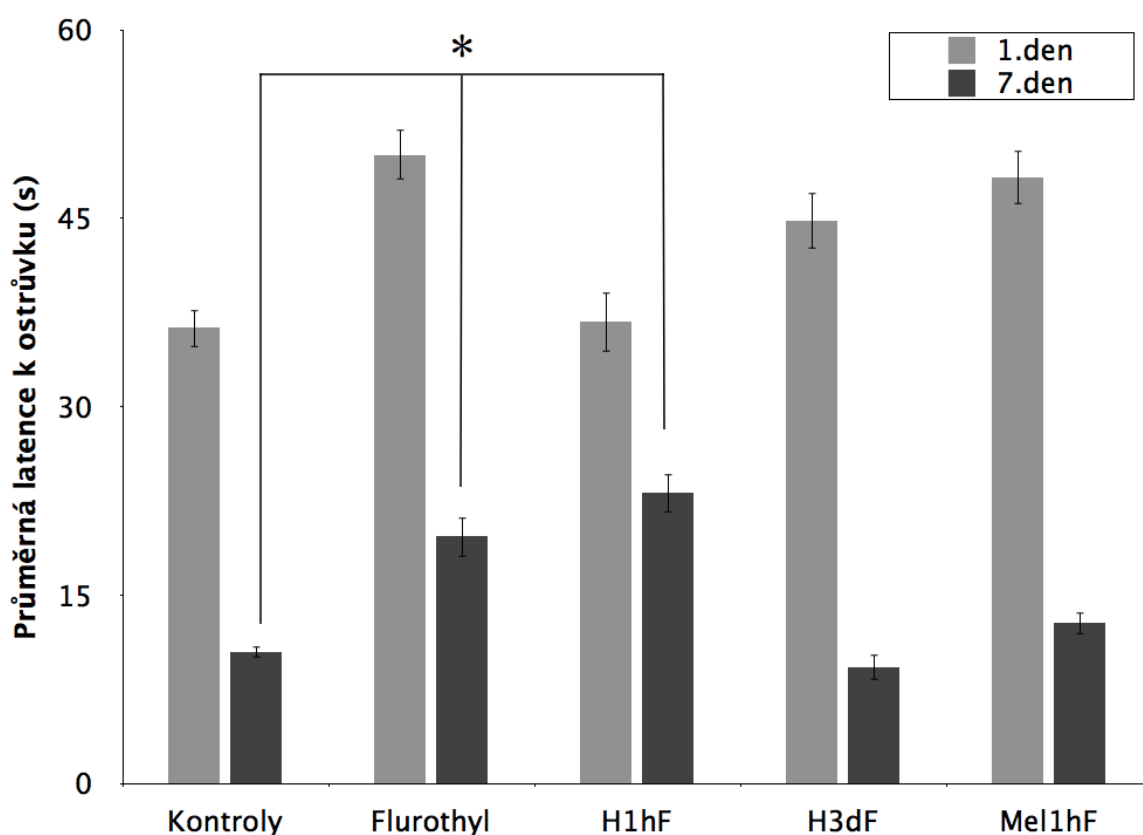
Práh pro tonicko-klonický záchvat s pádem v jednotlivých skupinách (latence v s). Z grafu je patrné, že zvířata vystavená dvěma flurothylovým záchvatům v odstupu tří dnů (F3dF) mají signifikantně snížen práh pro GTCS, a to ve srovnání se všemi ostatními skupinami, včetně skupiny, kdy byl druhý flurothylový záchvat aplikován za 1h po prvním (F1hF, $p<0,0001$, nepárový t-test). Nižší práh pro GTCS byl přítomen též u zvířat vystavených hypobarické hypoxii 3 dny před záchvatem (H3dF), ale pouze ve srovnání se zvířaty premedikovanými melatoninem 1h před záchvatem (Mel1hF, $p=0,0097$, nepárový t-test).

Skupiny: F = pouze flurothyl; H1hF = Hypoxie-1hodina-flurothyl; H3dF = hypoxie_3 dny-flurothyl; Mel1hF = Melatonin-1 hodina-flurothyl; F1hF = Flurothyl-1 hodina-flurothyl; F3dF = Flurothyl-3 dny-flurothyl. Chybové úsečky udávají SEM.

aplikovaná 3dny, 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 hematoencefalické bariéry během flurothylového záchvatu (viz Obr. 2.2.1).

Graf 2.2.2.: Protektivní vliv premedikace melatoninem a hypoxického preconditioningu na prostorové učení 7. den po flurothylovém záchvatu



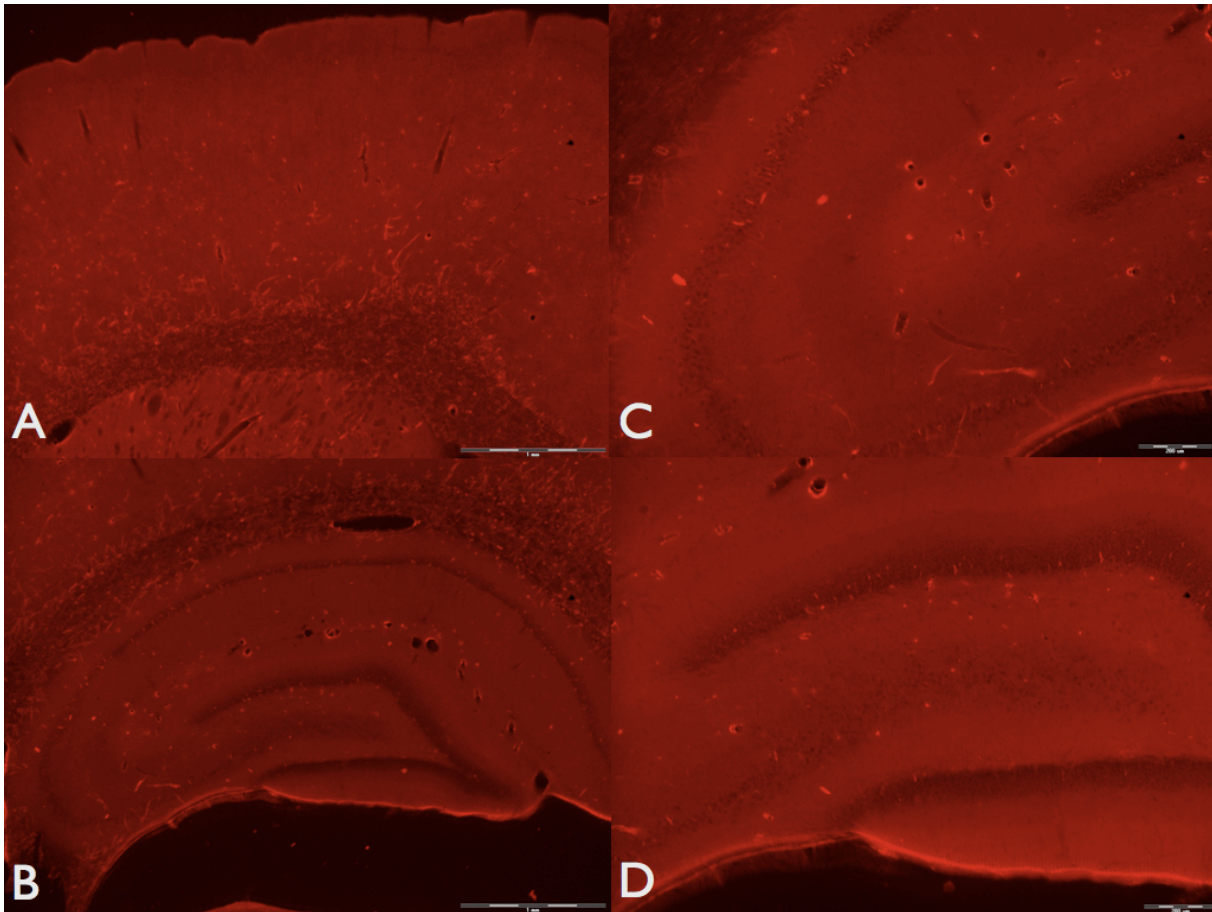
Ve všech skupinách došlo od 1. do 7. dne k postupnému signifikantnímu zkrácení průměrných latencí k nalezení ostrůvku (tyto zřejmé rozdíly nejsou z důvodů přehlednosti označeny hvězdičkou). Zvířata vystavená izolovanému flurothylovému záchvatu mají 7. den latence signifikantně delší než kontroly ($p=0,0429$, nepárový t-test). Hypobarická hypoxie (9000 m n.m.) aplikovaná pouhou 1 hodinu před záchvatem (skupina H1hF) nemá protektivní vliv ($p<0,0001$, nepárový t-test). Při vystavení zvířete hypobarické hypoxii (9000 m n.m.) 3 dny před flurothylovým záchvatem (skupina H3dF), nebo při podání melatoninu 100 mg/kg i.p. 1 hodinu před tímto záchvatem (skupina Mel1hF) dochází ke zrušení negativních důsledků flurothylového záchvatu na prostorové učení (hodnoty latencí ve skupinách H3dF a Mel1hF se neliší od kontrol).

Skupiny: F = pouze flurothyl; H1hF = Hypoxie-1hodina-flurothyl; H3dF = hypoxie-3 dny-flurothyl; Mel1hF = Melatonin-1 hodina-flurothyl;

Legenda v pravém horním rohu grafu.

Chybové úsečky udávají SEM.

Obr. 2.2.1.: Hodnocení poruchy hematoencefalické bariéry 24h po flurothylovém záchvatu



Mikrofotografie řezů mozkem v úrovni kortexu (A), hipokampu (B), CA2 regionu hipokampu (C) a CA3 regionu hipokampu (D). Zvířeti byla bezprostředně před zahájením inhalace flurothylu i.v. aplikována Evansova modř (EB: 0,04 g/kg). V případě poruchy hematoencefalické bariéry dochází k extravazaci komplexu albuminu s EB. Okrsky extravazace se následně v zeleném světle fluorescenčního mikroskopu zobrazují jako jasné červené plochy. Z obrázku je patrné, že k extravazaci EB v důsledku flurothylového záchvatu nedochází – komplexy EB a albuminu zůstávají v cévách.

2.3. Ovlivnění rozsahu ischemické léze hypoxickým preconditioningem a podáním melatoninu

2.3.1. Metodika

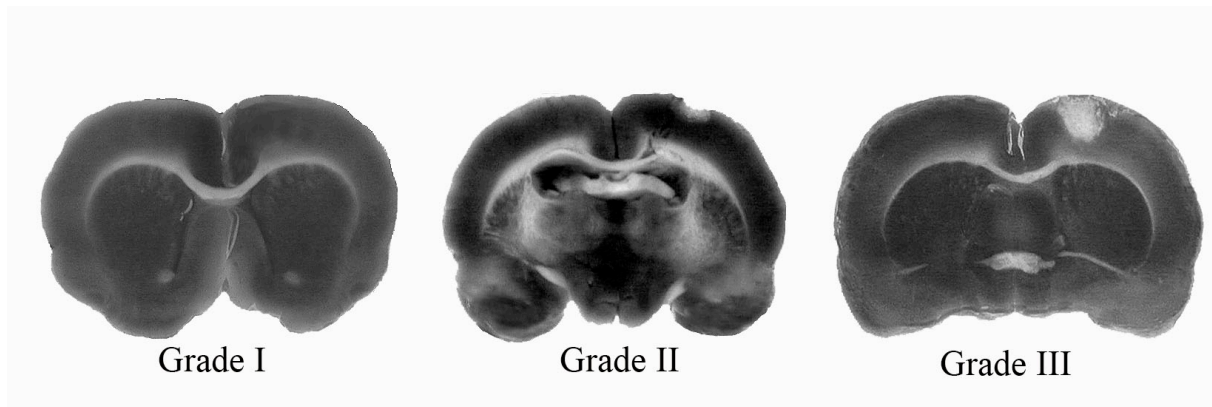
V experimentu byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar (N=49, váha 200-220g). Veškeré procedury byly prováděny v souladu s doporučeními Ministerstva zdravotnictví ČR a schváleny Etickou komisí 3. LF UK. Laboratorní zvířata byla aklimatizována nejméně tři dny před experimentem v podmínkách dvanáctihodinového cyklu světlo/tma a volným přístupem k vodě a potravě. Zvířata byla rozdělena do čtyř následujících 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 fotochemicky indukována ischemická léze v oblasti senzomotorické 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 fyziologickém roztoku).
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.

Hypobarická hypoxie: Zvířata byla v hypobarické komoře (ve skupinách po čtyřech) vystavena na jednu hodinu simulované výšce 9000 m n.m. (barometrický tlak cca 210 mm Hg; $pO_2 = 44$ mmHg; teplota = 24 ± 1 °C). Výstup a sestup trval 15 minut (tato doba byla zavzata v celkovém čase 1h). Parciální tlak CO_2 byl udržován na normálních hodnotách.

Fototrombóza: Zvířata byla anestetizována i.p. podanou směsí ketaminu a xylazinu (ketamin 80 mg/kg + xylazine 7 mg/kg i.p.). Během celého experimentu zvířata nevykazovala známky selhávání vitálních funkcí. Po uvedení zvířete do hluboké anestezie byla incidována kůže na hlavě ve střední čáře a exponována kalva. Bezprostředně před zahájením svícení laserem byla zvířatům cestou ocasní žíly pomalu aplikována Bengálská červec (RB: 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein; 20 mg/kg/2ml ve fyziologickém roztoku). Po aplikaci traceru byla zvířata přemístěna do stereotaktického rámu, aby bylo zajištěno přesné zacílení laserového paprsku.

Obr. 2.3.1.: Tři stupně fototrombotické léze



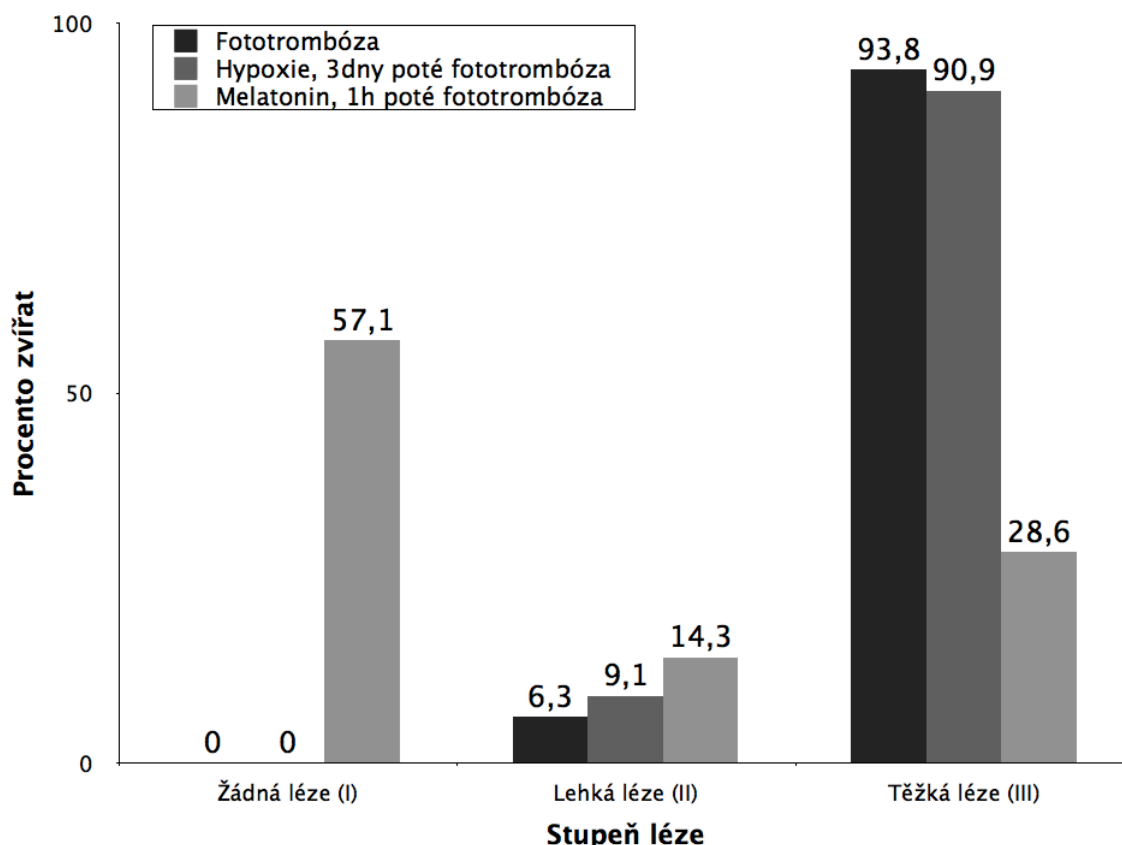
Stupně fototrombotické léze v barvení TTC (převedeno do odstínů šedi). Zleva žádná léze (stupeň I), lehká léze (stupeň II): léze postihující pouze kortex či jeho část, těžká léze (stupeň III): léze zasahující hluboko ke corpus callosum a subkortikálním strukturám.

Předem stereotakticky definovaná oblast levostranné senzomotorické kůry (AP 2, L 2 mm) byla následně 9 minut transkalvárně ozařována zeleným světlem diodového laseru (LAGR50: vlnová délka 532nm, hustota výkonu 50 mW/mm², ozářený povrch <1 mm², pracovní teplota 20-30 °C, odhadovaná hloubka průniku 333 um).

Morfologie: Tři dny po skončení fototrombózy 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-triphenyltetrazolium chloridem (TTC) (Khan S.H. et al., 2000). Řezy mozkiem 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. Po skončení inkubace byly řezy omyty fyziologickým roztokem. K zhodnocení morfologických změn byly pořízeny digitální mikrofotografie řezů.

Hodnocení lézí: Tetrazoliové soli jsou bezbarvé. V metabolicky aktivní tkáni jsou redukovány na barevné metabolity. Metabolicky neaktivní tkáň (ischemická léze) se proto ve srovnání s okolní tkání 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. 2.1.1.). Počet zvířat s daným stupněm léze byl zaznamenán pro každou skupinu. Ke srovnání jednotlivých experimentálních skupin vůči kontrolám a obou experimentálních skupin navzájem byl využit Fisherův exaktní test v kontingenční tabulce.

Graf 2.3.1.: Zastoupení jednotlivých stupňů léze v jednotlivých skupinách



Zastoupení jednotlivých stupňů léze v jednotlivých skupinách (vyjádřeno procentem zvířat s daným typem léze v dané skupině). U zvířat vystavených samotné fototrombóze (tmavě šedé sloupce), stejně jako u zvířat exponovaných hypobarické hypoxii tři dny před fototrombózou (sloupce střední šedi) jsme zaznamenali převážně hluboké léze stupně III. U zvířat předléčených melatoninem 1h před fototrombózou výrazně kleslo procento zvířat s těžkými lézemi, u více než 50% se léze nevyvinula vůbec.

2.3.2. Výsledky

U kontrolní skupiny (tj. u zvířat s iradiací laserem bez předchozí aplikace RB) nebyly ischemické léze pozorovány. Ve skupině PT (samotná fototrombóza) 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 zvířat vystavených hypobarické hypoxii 3 dny před fototrombózou (“H3dPT”) byly výsledky podobné (v 11 případech léze stupně III, v jednom případě stupně II). Ve skupině zvířat předléčených melatoninem 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). Porovnání skupin je uvedeno v Grafu 2.1.1. 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 ($p < 0,0005$).

2.4. Elektrofyziologické změny v hyperakutní fázi kortikální fototrombózy.

2.4.1. Metodika

V experimentu byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar (N=21, váha 300-400g; ANLAB, ČR). Veškeré procedury byly prováděny v souladu s doporučeními Ministerstva zdravotnictví ČR a schváleny Etickou komisí 3. LF UK. Laboratorní zvířata byla aklimatizována nejméně tři dny před experimentem v podmínkách dvanáctihodinového cyklu světlo/tma a volným přístupem k vodě a potravě.

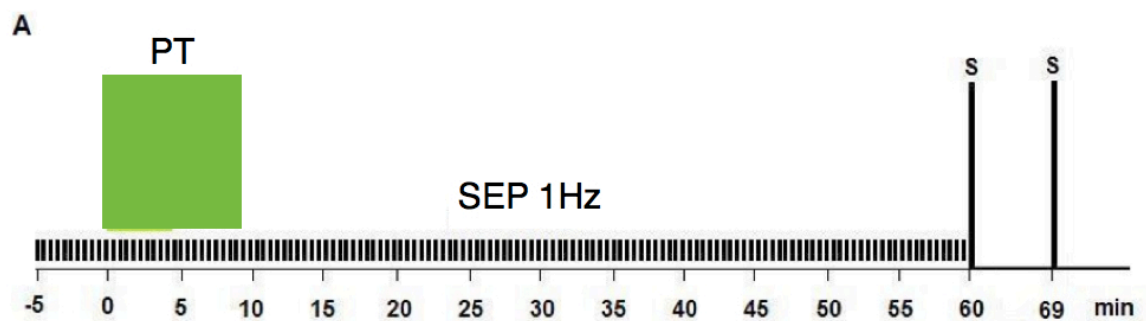
Skupiny: První skupina zvířat (PT; n=12) byla v průběhu experimentu podrobena kortikální fototrombóze v oblasti pro zadní končetinu senzomotorické kůry pravé hemisféry. U druhé skupiny (Las; n=9) byla stejná oblast exponována pouze laserovému světlu, bez současného podání fotodynamického generátoru (Bengálské červeně). 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 stížením 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: Operační přístup byl stejný v obou skupinách. 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 fyziologickém roztokem pravidelně svlažovaný nerv byla naložena bipolární stříbrná stimulační elektroda. Po této přípravě byla zvířata přemístěna do stereotaktického rámu, aby byla zajištěna přesná poloha registračních elektrod a zacílení laserového paprsku. Stereotaktický rám byl uložen v odstíněné kleci s cílem minimalizovat síťový artefakt.

Fototrombóza: Bezprostředně před zahájením svícení laserem byla zvířatům ze skupiny PT podána pomalu nitrožilně Bengálská červeň (RB: 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein; 20 mg/kg/2ml v 0.9 % FR). U zvířat ve druhé skupině (Las) byl podán stejný objem fyziologického roztoku. Následně byla předem stereotakticky definovaná oblast pravé senzomotorické kůry (koordináty vůči bregmatu: AP = -2 mm, L=2 mm) exponována zelenému světlu diodového laseru (LAGR50: vlnová délka 532nm, hustota výkonu 50 mW/mm², ozářený povrch <1 mm², pracovní

Obr. 2.4.1.: Schéma pokusu



Vysvětlivky: Přehled experimentu. Před zahájením svícení laserem byl u každého zvířete 5 minut zaznamenáván elektrokortikogram 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 vynesen čas v minutách, PT = fototrombóza (svícení), SEP = somatosenzorické evokované potenciály, S = přímá kortikální elektrická stimulace.**

teplota 20-30 °C, odhadovaná hloubka průniku 333 μ m). Expozice laserovému světlu trvala 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.

Elektrofyzilogie: Elektrofyzilogické změny v hyperakutní fázi fototrombózy jsme hodnotili jednak na základě kortikálních somatosenzorických evokovaných potenciálů (SEP) a dále na základě reakce na přímou kortikální stimulaci. Schéma pokusu zobrazuje Obr. 2.4.1. Dvě stříbrné elektrody o průměru $0,8 \pm 0,2$ mm byly v místě trepanačních otvorů opatrně umístěny na dura mater nad levou a pravou senzomotorickou oblast na výše uvedených stereotaktických koordinátách (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.

Elektrokortikogram byl snímán současně z obou registračních elektrod pomocí diferenčního zesilovače CED 1401 (Cambridge Electronic Design Limited, UK). Pro záznam signálu jsme využívali firemní software Signal for Windows 1.80 utility (Cambridge Electronic Design Limited, UK). Biosignál byl zaznamenáván v referenčním zapojení s taktovací frekvencí 1 kHz. V

záznamech odpovídá označní ADC 0 vždy pravé straně, ADC 1 levé straně. Laserový paprsek byl zacílen na kortex v těsném sousedství pravostranné registrační elektrody, kterou přímo neosvětloval.

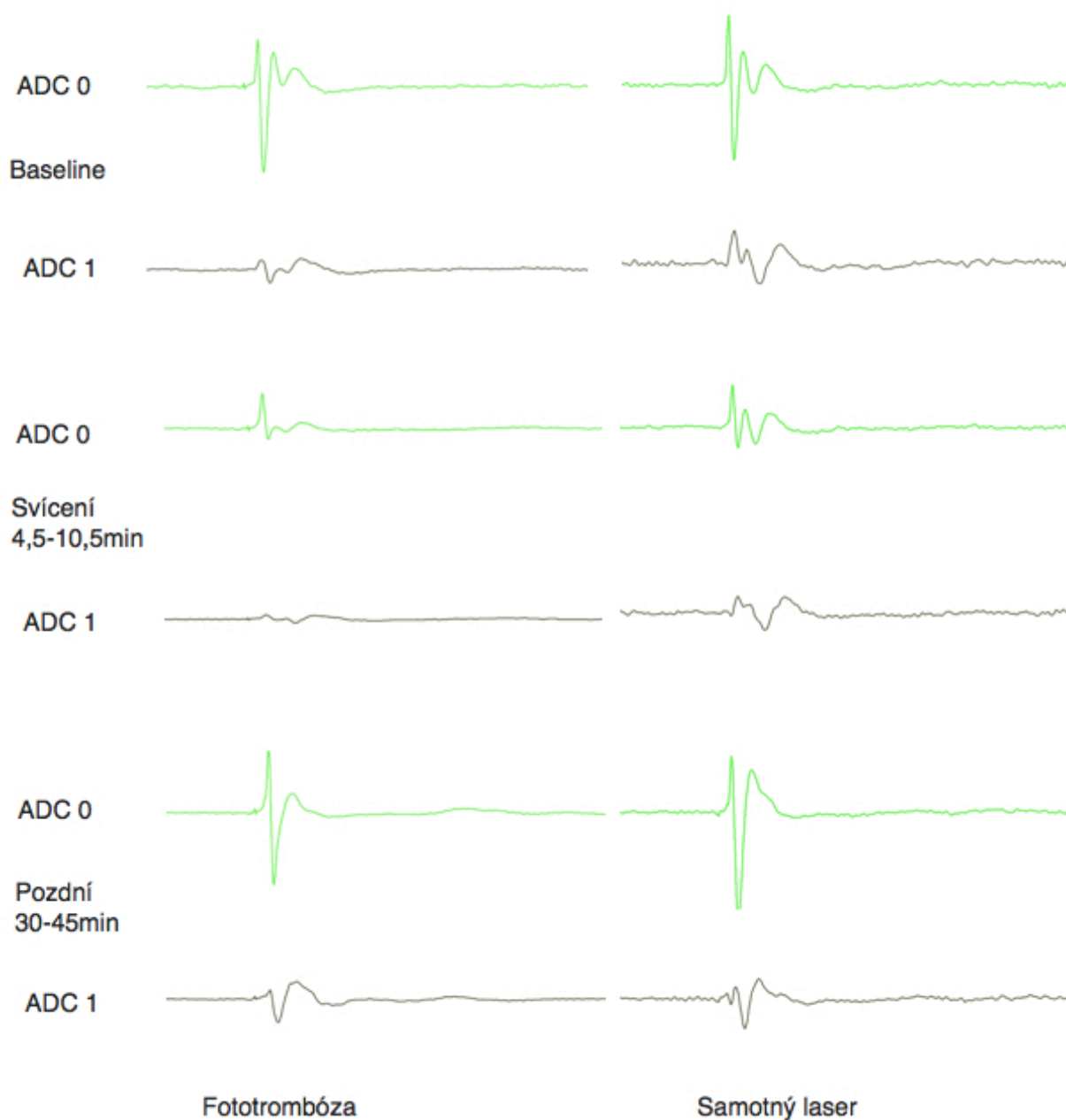
A. Somatosenzorické evokované potenciály n. ischiadicus (SEP). Pro stimulaci n. ischiadicus jsme využívali jednotlivé bipolární pravoúhlé pulzy v trvání 1 ms. U každého zvířete byl nejprve zjištěn práh pro SEP postupným zvyšováním intenzity stimulace (kroky po 10 μ A). Intenzita stimulace byla následně stanovena na 2,5 násobek prahu. Snímání SEP probíhalo v 1 s trvajících přebězích (frames), a to tak, že stimulační pulz byl automaticky dodán vždy 100 ms po začátku tohoto přeběhu. Stimulace n. ischiadicus byla zahájena 5 minut před začátkem svícení a pokračovala během následujících 60 minut (viz Obr. 2.4.1.). 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). Jednotlivé po sobě jdoucí SEP v dané epoše byly zprůměrovány pomocí Signal for Windows v1.80. Tyto zprůměrované SEP byly následně analyzovány z pohledu změn latencí a amplitud jejich hlavních komponent. Hodnotili jsme následující proměnné: 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. 2.4.1.) 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 elektrografickou 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.

Histologie: Tři dny po dokončení experimentu byla zvířata v hluboké anestezii urethanem transkardiálně perfundována fyziologickým roztokem (37°C) a dekapitována. Mozek daného zvířete byl ihned po dekapitaci vypreparován a nařezán na 500 μ m silné koronární řezy v úrovni

Obr. 2.4.2.: Ukázka SEP n. ischiadicus v hyperakutní fázi fototrombózy



Vysvětlivky: 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 červeně. 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.

předpokládané fototrombotické léze. K detekci ischemické léze jsme využili redukční test 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridem (TTC) (Khan S.H. et al., 2000). Řezy mozkiem 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. Po skončení inkubace byly řezy omyty fyziologickým roztokem. K zhodnocení morfologických změn byly pořízeny digitální mikrofotografie řezů.

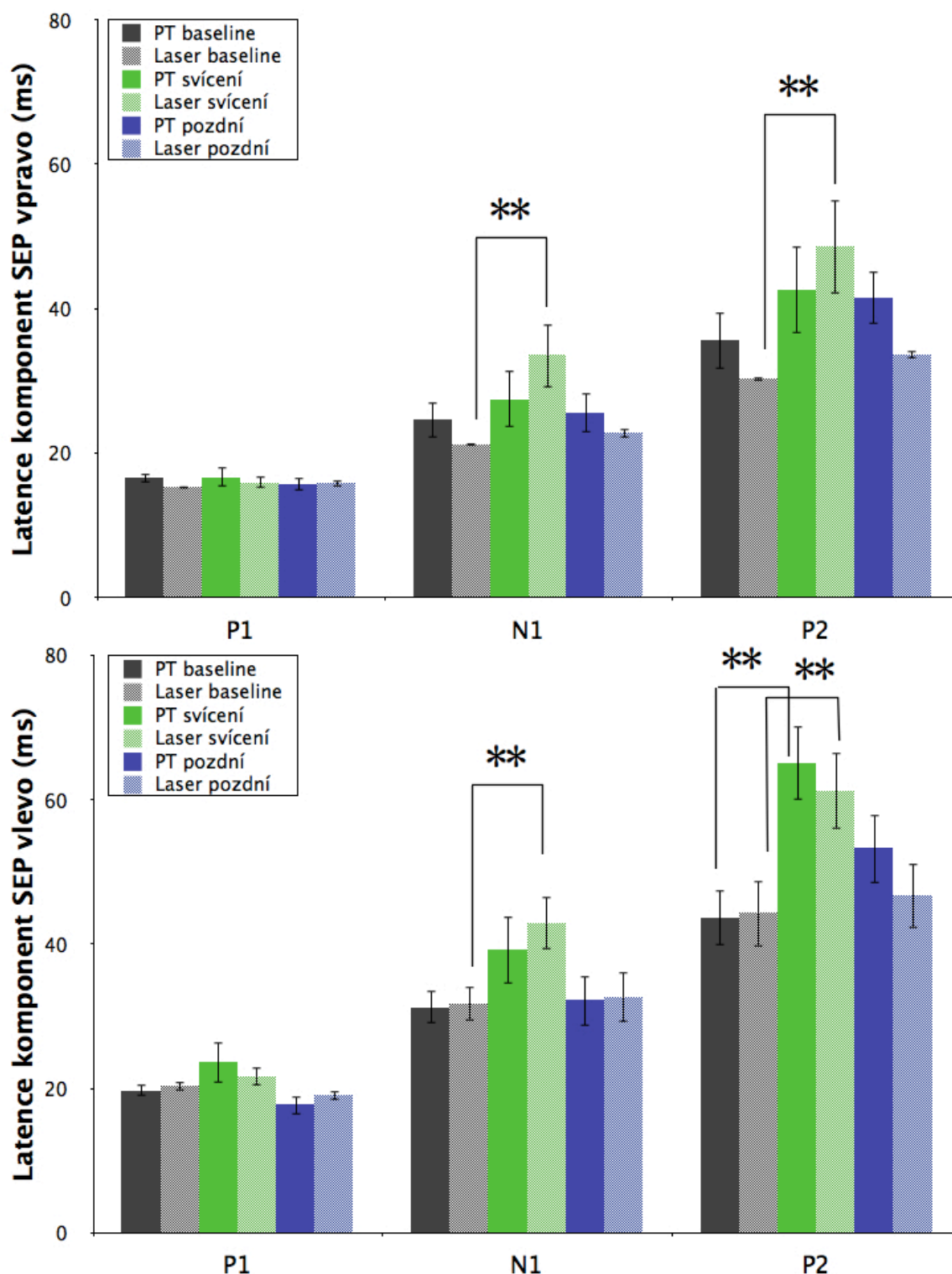
Statistické zpracování. Pro statistické zhodnocení byl využit software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Pro hodnocení párových pozorování s parametrickým rozložením (např. rozdílů v latencích či amplitudách SEP v rámci dané skupiny a dané strany během různých fází experimentu) jsme použili analýzu rozptylu pro mnohonásobná porovnání (repeated measures ANOVA), dle potřeby s Tukeyho post-testovým porovnáním skupin. U neparametricky rozložených párových dat jsme použili Friedmannův test, případně s post-testovým porovnáním podle Dunnse. Pro párové porovnání dvou skupin jsme použili buď párový t-test (parametrická data), či Wilcoxonův test (neparametrická data). U nepárových pozorování s parametrickým rozložením dat (např. srovnání mezi skupinami, či levá vs. pravá strana) jsme použili analýzu rozptylu (one-way ANOVA) dle potřeby s Tukeyho post-testovým porovnáním skupin. U neparametricky rozložených

Tabulka 2.4.1.: Průměrné latence SEP

Latence vpravo (primární projekce, oblast svícení)						
P1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Mean	16,54	15,28	16,59	15,92	15,67	15,76
SD	2,021	0,454	4,136	2,522	2,731	1,451
SEM	0,6736	0,1513	1,379	0,8407	0,9656	0,4836
N1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Mean	24,69	21,11	27,44	33,53	25,61	22,8
SD	7,572	0,5821	11,88	13,22	7,8	1,952
SEM	2,524	0,194	3,961	4,408	2,758	0,6507
P2	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Mean	35,57	30,33	42,66	48,58	41,56	33,6
SD	11,96	0,942	18,28	19,75	10,55	1,762
SEM	3,987	0,314	6,093	6,583	3,731	0,5875
Latence vlevo (kontralaterálně k oblasti svícení)						
P1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Mean	19,69	20,35	23,65	21,73	17,75	19,03
SD	2,552	2,062	8,641	3,929	3,863	1,984
SEM	0,8506	0,6873	2,88	1,31	1,366	0,6613
N1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Mean	31,23	31,68	39,15	42,87	32,2	32,7
SD	6,904	7,182	14,2	11	10,04	10,64
SEM	2,301	2,394	4,734	3,668	3,551	3,547
P2	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Mean	43,68	44,32	65,1	61,24	53,24	46,76
SD	11,62	13,93	15,48	15,99	13,69	13,69
SEM	3,874	4,642	5,16	5,329	4,841	4,562

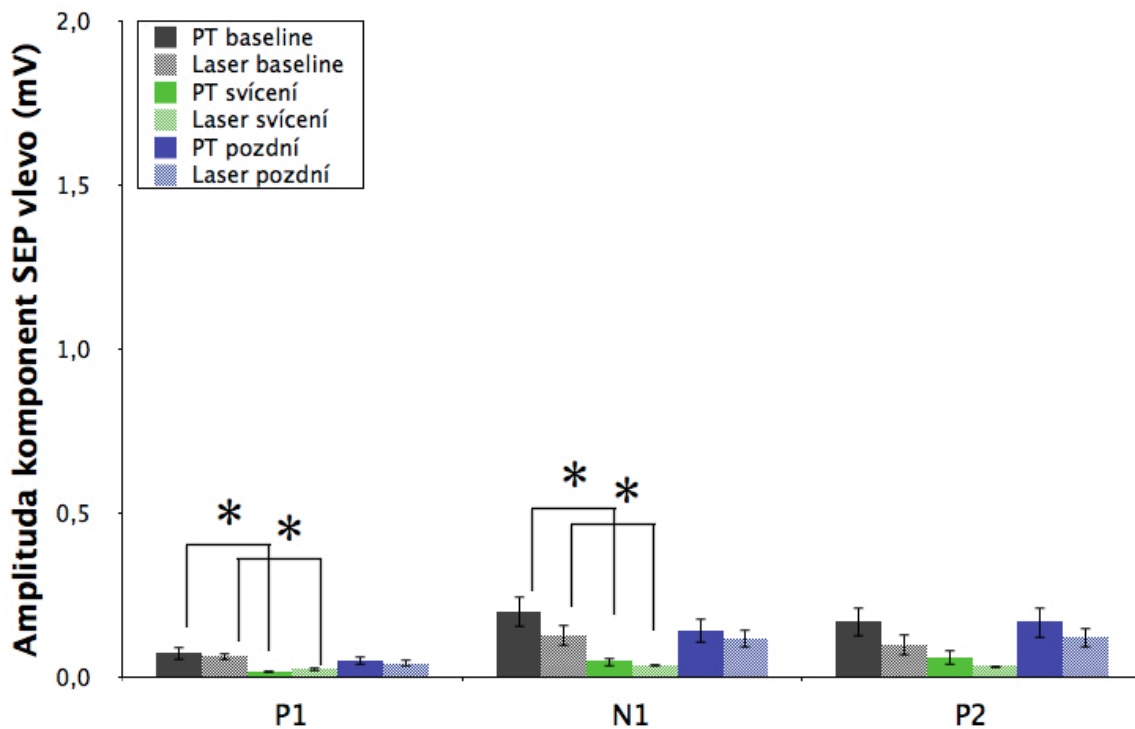
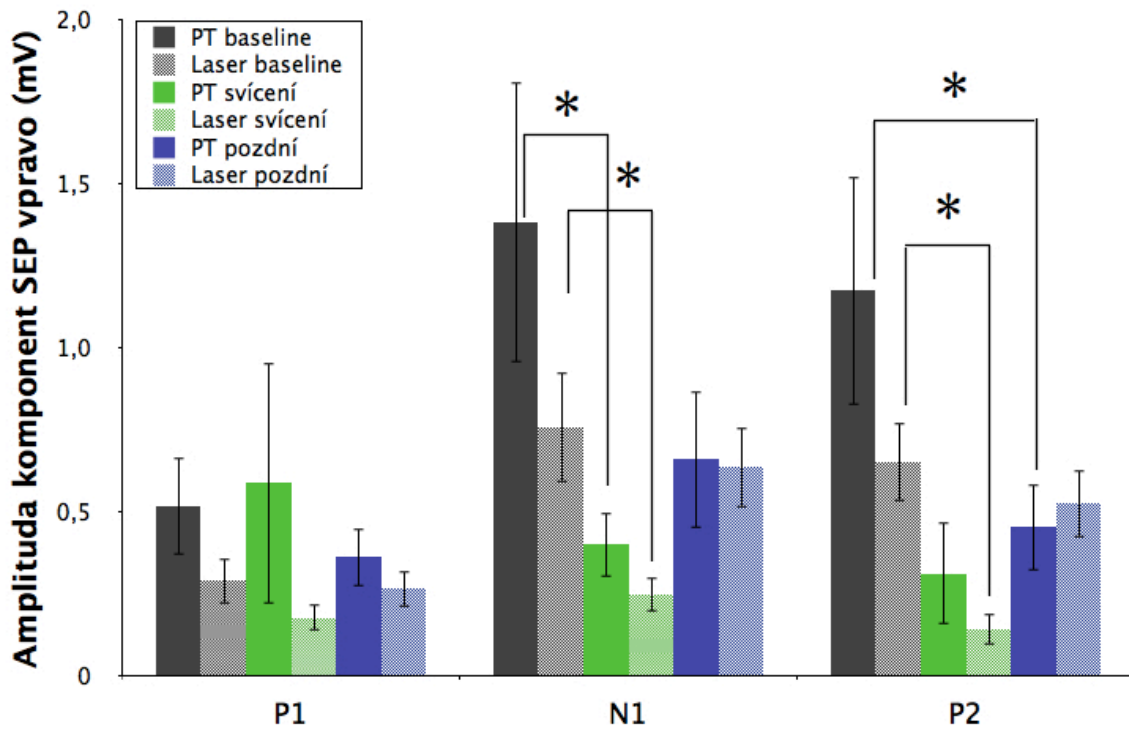
Vysvětlivky: Tabulka udává průměrné latence SEP (ms) v jednotlivých skupinách, v různých částech experimentu. Pro každou průměrnou hodnotu je uvedena SD a SEM. Signifikantní rozdíly viz text a Graf 2.4.1.

Graf 2.4.1.: Průměrné latence jednotlivých komponent SEP n. ischiadicus



Vysvětlivky: Grafy udávají průměrné latence jednotlivých komponent SEP. **Nahore:** latence v oblasti primární projekční kůry, tj. vpravo (v místě svícení). **Dole:** latence vlevo (kontralaterálně ke svícení). Latence SEP vpravo byly obvykle signifikantně kratší než vlevo. Mezi skupinami (PT vs. Las) se latence signifikantně nelišily. Ve skupině PT byly oproti baseline prodlouženy latence P2 vlevo při svícení. Ve skupině Las bylo pozorováno oboustranné prodloužení latencí N1 a P2 při svícení oproti baseline. * $p < 0,05$

Graf 2.4.2.: Průměrné amplitudy jednotlivých komponent SEP n. ischiadicus



Vysvětlivky: Průměrné amplitudy jednotlivých komponent SEP. **Nahoře:** amplitudy v oblasti primární projekční kůry, tj. vpravo (v místě svícení). **Dole:** latence vlevo (kontralaterálně ke svícení). Je patrné, že amplitudy vlevo byly v obou skupinách vždy zřetelně nižší než vpravo. Pro názornost je u obou grafů použito stejné měřítko osy y. Při srovnání zvířat s fototrombózou (PT) se zvířaty vystavenými samotnému laseru nebyly zjištěny signifikantní rozdíly. V obou skupinách (PT i Las) došlo při svícení k signifikantnímu poklesu amplitudy N1 vpravo a P1 a N1 vlevo. Dále byl v obou skupinách při svícení zaznamenán pokles amplitudy P2 vpravo, ale jen u skupiny Las byl statisticky signifikantní. V pozdní fázi se však amplituda P2 ve skupině PT (narozdíl od Las) již nevrátila k původním hodnotám. * $p < 0,05$

dat Kruskal-Wallisův test s post-testovým porovnáním podle Dunnse. Pro nepárové porovnání dvou skupin jsme využili buď nepárový t-test, či Mann-Whitneyho U test (neparametrická data). Výskyt následných výbojů u obou skupin byl porovnán Fisherovým exaktním testem. Medián trvání následných výbojů u obou skupin byl porovnán Mann-Whitneyho U testem.

2.4.2. Výsledky

Somatosenzorické evokované potenciály n. ischiadicus (SEP).

Stimulace levého n. ischiadicus vyvolala v obou skupinách (PT, Las) reprodukovatelné evokované odpovědi 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

Tabulka 2.4.2.: Průměrné amplitudy SEP

Amplitudy vpravo (primární projekce, oblast svícení)						
P1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Průměr	0,5155	0,2886	0,5902	0,1772	0,3602	0,2657
SD	0,4494	0,2125	1,1100	0,1283	0,2552	0,1677
SEM	0,1498	0,0709	0,3701	0,0428	0,0902	0,0559
N1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Průměr	1,3820	0,7565	0,4022	0,2450	0,6602	0,6365
SD	1,2840	0,5071	0,3028	0,1592	0,5920	0,3703
SEM	0,4281	0,1690	0,1009	0,0531	0,2093	0,1234
P2	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Průměr	1,1750	0,6500	0,3118	0,1415	0,4546	0,5240
SD	1,0490	0,3632	0,4744	0,1472	0,3795	0,3132
SEM	0,3497	0,1211	0,1581	0,0491	0,1342	0,1044
Amplitudy vlevo (kontralaterálně k oblastí svícení)						
P1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Průměr	0,0926	0,0843	0,0380	0,0461	0,0701	0,0607
SD	0,0656	0,0412	0,0158	0,0255	0,0444	0,0370
SEM	0,0219	0,0137	0,0053	0,0085	0,0157	0,0123
N1	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Průměr	0,2185	0,1454	0,0669	0,0553	0,1598	0,1368
SD	0,1451	0,1065	0,0454	0,0202	0,1097	0,0911
SEM	0,0484	0,0355	0,0151	0,0067	0,0388	0,0304
P2	PT baseline	Las baseline	PT svícení	Las svícení	PT pozdní	Las pozdní
Průměr	0,1888	0,1174	0,0788	0,0528	0,1877	0,1413
SD	0,1401	0,1021	0,0737	0,0180	0,1413	0,0950
SEM	0,0467	0,0340	0,0246	0,0060	0,0500	0,0317

Vysvětlivky: Tabulka udává průměrné amplitudy SEP (mV) v jednotlivých skupinách, v různých částech experimentu. Pro každou průměrnou hodnotu je uvedena SD a SEM. Signifikantní rozdíly viz text a Graf 2.4.2.

pozitivitou (P2) viz Obr. 2.4.2. 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 (PT i Las) kratší než vlevo: baseline PT_P1dx: $16,54 \pm 0,67$ SEM vs. baseline PT_P1sin $19,69 \pm 0,85$ SEM ($p=0,0163$, nepárový t-test); baseline Las_P1dx $15,28 \pm 0,15$ SEM vs. baseline Las_P1sin $20,35 \pm 0,69$ SEM ($p<0,0001$, nepárový t-test); svícení PT_P1dx $16,59 \pm 1,38$ SEM vs. svícení PT_P1sin $23,65 \pm 2,88$ SEM ($p=0,0436$, nepárový t-test); svícení Las_P1dx $15,92 \pm 0,84$ vs. svícení Las_P1sin $21,73 \pm 1,31$ SEM ($p=0,0004$, nepárový t-test); pozdní PT_P1dx $15,67 \pm 0,97$ SEM vs. pozdní PT_P1sin $17,75 \pm 1,37$ SEM (ns, nepárový t-test); pozdní Las_P1dx $15,76 \pm 0,48$ vs. pozdní Las_P1sin $19,3 \pm 0,66$ SEM ($p=0,001$, nepárový t-test). Amplitudy všech komponent SEP vlevo byly signifikantně nižší než vpravo (viz Tab. 2.4.1-2. a Grafy 2.4.1-2.).

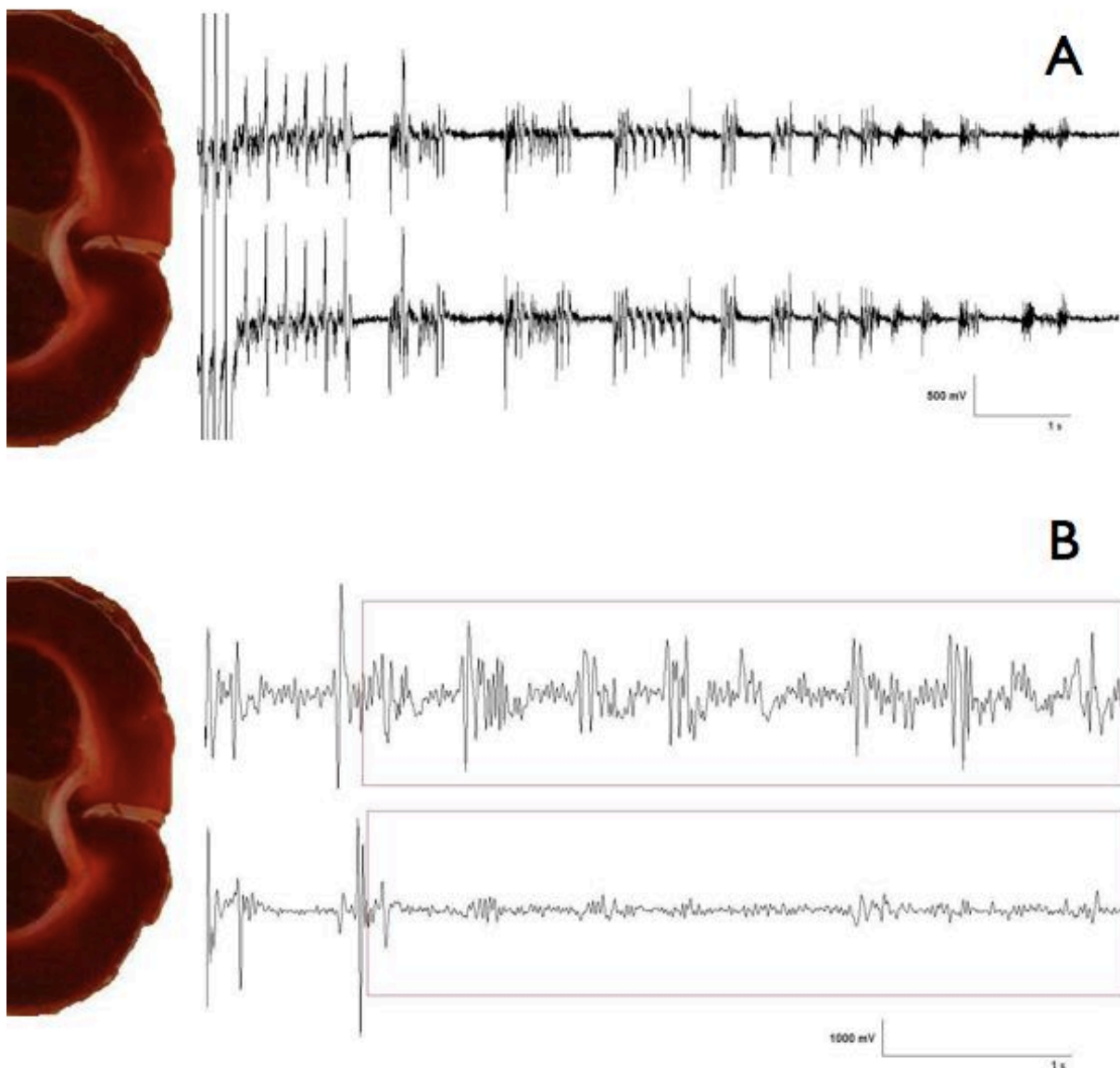
Mezi skupinami (PT vs. Las) se latence ani amplitudy jednotlivých komponent SEP v jednotlivých fázích pokusu a na jednotlivých stranách signifikantně nelišily. Významné rozdíly však byly zachyceny uvnitř obou skupin během svícení laserem (viz Tab. 2.4.1-2. a Grafy 2.4.1-2.).

Během svícení laserem došlo v obou skupinách (PT i Las) k významnému prodloužení latence P2 vlevo oproti baseline (hodnoty v ms): PT_P2sin baseline $43,68 \pm 3,87$ SEM vs. PT_P2sin svícení $65,10 \pm 5,16$ SEM ($p=0,006$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test); Las_P2sin baseline $44,32 \pm 4,64$ SEM vs. Las_P2sin svícení $61,24 \pm 5,33$ SEM ($p=0,0189$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test). Ve skupině vystavené pouze laseru (Las) bylo kromě toho při svícení zaznamenáno signifikantní prodloužení latence P2 i v primární projekční oblasti (vpravo): Las_P2dx baseline $30,33 \pm 0,31$ SEM vs. Las_P2dx svícení $48,60 \pm 6,58$ SEM ($p=0,0084$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test), a dále signifikantní prodloužení latence N1 oboustranně: Las_N1dx baseline $21,11 \pm 0,19$ SEM vs. Las_N1dx svícení $33,53 \pm 4,41$ SEM ($p=0,0051$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test), Las_N1sin baseline $31,68 \pm 2,39$ SEM vs. Las_N1sin svícení $42,87 \pm 3,67$ SEM ($p=0,0195$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test).

Kromě prodloužení latencí došlo během svícení v obou skupinách (PT i Las) též ke snížení amplitud oproti baseline, konkrétně u komponent N1 vpravo a P1 i N1 vlevo (kontralaterálně ke svícení): PT_N1dx baseline $1,38 \pm 0,43$ SEM vs. PT_N1dx svícení $0,40 \pm 0,10$ SEM ($p=0,0220$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test); PT_P1sin baseline $0,09 \pm 0,02$ SEM vs. PT_P1sin svícení $0,03 \pm 0,005$ SEM ($p=0,0472$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test); PT_N1sin baseline $0,22 \pm 0,05$ SEM vs. PT_N1sin svícení $0,07 \pm 0,02$ SEM ($p=0,0443$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test); Las_N1dx baseline $0,76 \pm 0,17$ SEM vs. Las_N1dx svícení $0,25 \pm 0,05$

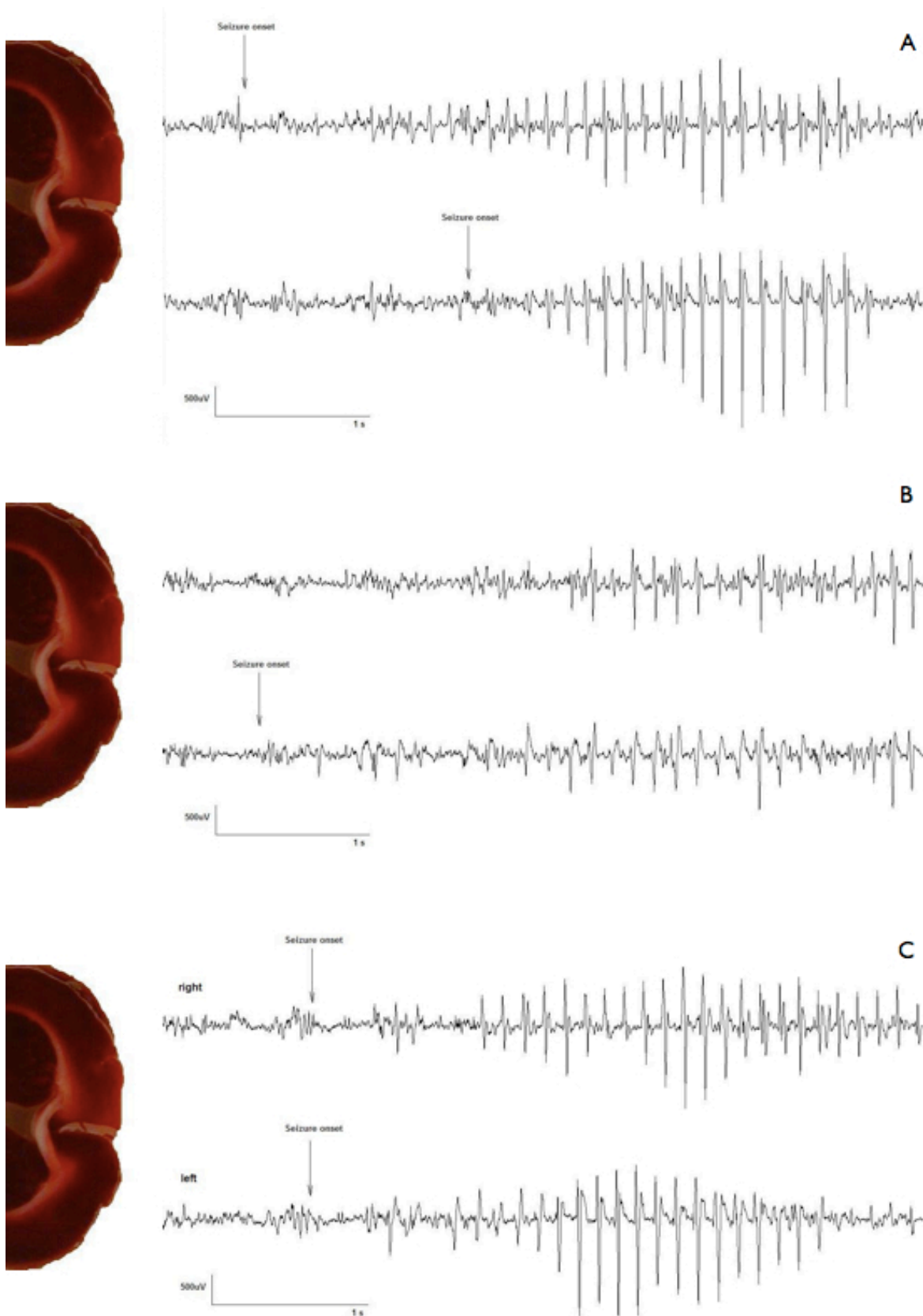
SEM ($p=0,0027$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test); Las_P1sin baseline $0,08\pm 0,01$ SEM vs Las_P1sin svícení $0,04\pm 0,008$ SEM ($p=0,0274$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test); Las_N1sin baseline $0,15\pm 0,04$ SEM vs Las_N1dx svícení $0,06\pm 0,007$ SEM ($p=0,0193$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test).

Obr. 2.4.3.: Ukázka následných výbojů



A: typický následný výboj po ukončení elektrické stimulace. Elektrokortiko–grafický záznam není filtrován a je uspořádán shodně jako řez mozku v levé části obrázku (pravá hemisféra nahoře, levá dole). Na řezech je možné pozorovat mírný výbled v mediální části kortexu pravé hemisféry, odpovídající subakutní ischemii v barvení TTC. B: U jednoho ze zvířat se AD rozvinul do dlouho trávajícího spontánního rekurentního záchvatu – záznam bylo možno hodnotit jako incipientní SE. Hornofrekvenční filtr v tomto případě nastaven na 35 Hz. Záznam je uspořádán v souladu s řezem mozku umístěným vlevo (tj. pravá hemisféra nahoře, levá dole).

Obr. 2.4.4.: Ukázka spontánních záchvatů po stimulaci



Ukázka spontánních záchvatů po stimulaci. Uspořádání záznamů je stejné jako u Obr. 2.4.3. Počátek záchvatu označuje vždy šipka. A: záchvat s pravostranným začátkem, B: záchvat s levostranným začátkem, C: záchvat s bilaterálním začátkem.

Ve skupině Las došlo během svícení navíc k signifikantnímu snížení amplitudy komponenty P2 vpravo: Las_P2dx baseline $0,65 \pm 0,12$ SEM vs Las_P2dx svícení $0,14 \pm 0,05$ SEM ($p=0,0005$, repeated measures ANOVA, Tukey post-test).

Ve skupině Las se latence a amplitudy v pozdním postiradiačním období 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 $1929 \text{ s} \pm 525,4$ SEM vs. Las $482,9 \text{ s} \pm 68,35$ 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). Ukázka následného výboje viz Obr. 2.4.3. V obou skupinách bylo trvání AD shodné v pravé a levé hemisféře, nezaznamenali jsme elektrograficky asymetrické ukončení výboje. Trvání AD u jednotlivých zvířat bylo velmi rozdílné, průměrné délky AD se však významně nelišily, ať už při porovnání mezi skupinami, tak při porovnání 1. a 2. stimulace uvnitř každé skupiny (viz Graf 2.4.3.).

Spontánní záchvaty po stimulaci se vyskytly pouze 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). Ukázka záchvatů viz Obr. 2.4.4.

Histologické zpracování.

Fotorobotická ischemická léze se v barvení TTC zobrazovala jako lokalizované vyblednutí (viz Obr. 2.4.3-4. vlevo). Laterolaterární a anteroposteriorní rozsah lézí byl variabilní, léze však vždy zasahovaly do značné hloubky, mnohdy do oblasti corpus callosum. U kontrolních zvířat nebyly morfologické změny v barvení TTC pozorovány.

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

2.5.1. Metodika

V experimentu byli použiti dospělí samci potkana kmene Wistar (N=20, váha 200-220g). Veškeré procedury byly prováděny v souladu s doporučeními Ministerstva zdravotnictví ČR a schváleny Etickou komisí 3. LF UK. Laboratorní zvířata byla aklimatizována nejméně tři dny před experimentem v podmínkách dvanáctihodinového cyklu světlo/tma a volným přístupem k vodě a potravě.

Skupiny: Zvířata v experimentální skupině (n=16) byla rozdělena na dvě podskupiny. V první podskupině ("PB", n=8) byl k anestezii využit pentobarbital (20 mg/kg i.p.), ve druhé podskupině ("KX", n=8) směs ketaminu s xylazinem (ketamin 80 mg/kg + xylazine 7 mg/kg i.p.). Kontrolní skupina (n=4) nebyla vystavena ischemii. Hloubka anestezie byla testována v pětiminutových intervalech stisknutím kůže zvířete na ploše zadní nohy anatomickou pinzetou. V případě flexe zadní končetiny byl aplikován i.p. bolus anestetika v dávce odpovídající 1/2 vypočtené dávky použité k úvodu do anestezie. Obvykle bylo bolusové podání anestetika nutné cca 20 minut po začátku, před fixací zvířete do stereotaktického rámu. Během celého experimentu zvířata nevykazovala známky selhávání vitálních funkcí.

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

Fototrombóza: 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 % FR), následovaná bolusem Evansovy modři ("EB": 6,6'-[(3,3'-dimethyl-[1,1'-bifenylyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxy-1,3-naftalendisulfonová kyselina] tetrasodná sůl; 0.04 g/kg/2ml; rozpuštěna v 0.9 % NaCl). Evansova modř je (narozdíl od jiných fluorescenčních tracerů, např. od natrium fluoresceinu) v plasmě velmi rychle navázána na sérový albumin.

Extravazace EB je tedy velmi spolehlivým markerem extravazace albuminu. EB byla podána ještě před zahájením svícení s cílem postihnout jakékoli narušení hematoencefalické bariéry (HEB) v prvních 24 hodinách, byť by nastalo v samém počátku fototrombózy. Po aplikaci tracerů byla zvířata přemístěna do stereotaktického rámu, aby bylo zajištěno přesné zacílení laserového paprsku. Následně byly tři předem stereotakticky definované koordináty nad pravou senzomotorickou kůrou (AP 1, L 0,5, AP 0, L-1, AP-1, L 0,5) postupně ozařovány zeleným světlem diodového laseru

(LAGR50: vlnová délka 532nm, hustota výkonu 50 mW/mm², ozářený povrch <1 mm², pracovní teplota 20-30 °C, odhadovaná hloubka průniku 333 um). Expozice laserovému světlu trvala na každé koordinátě 6 minut (tj. celková doba ozáření pro dané zvíře byla 18 minut). U kontrolních zvířat jsme postupovali stejně, nebyla však vystavena laserovému světlu.

Morfologie: Dvacetčtyři hodin po skončení fototrombózy byla zvířata v hluboké anestezii urethanem transkardiálně perfundována roztokem paraformaldehydu a dekapitována.

Vypreparované mozky byly fixovány v roztoku paraformaldehydu a následně na mikrotomu nakrájeny v koronární rovině na 40 µm silné řezy. Rozsah ischemické léze a přítomnost extravazace komplexu EB-albumin byla následně studována ve fluorescenčním mikroskopu (OlympusTM). Komplex EB-albuminu emituje v zeleném světle fluorescenčního mikroskopu červený fluorescenční signál. Za standardních podmínek (zvětšení, expozice, ISO, rozlišení, formát) jsme pořídili digitální mikrofotografie levé a pravé hemisféry u všech jednotlivých řezů mozku od daného zvířete. Kde bylo třeba, byly pořízeny dodatečné fotografie ve větším zvětšení. Takto získané digitální fotografie byly následně analyzovány pomocí volně dostupného programu ImageJ 1.37v (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

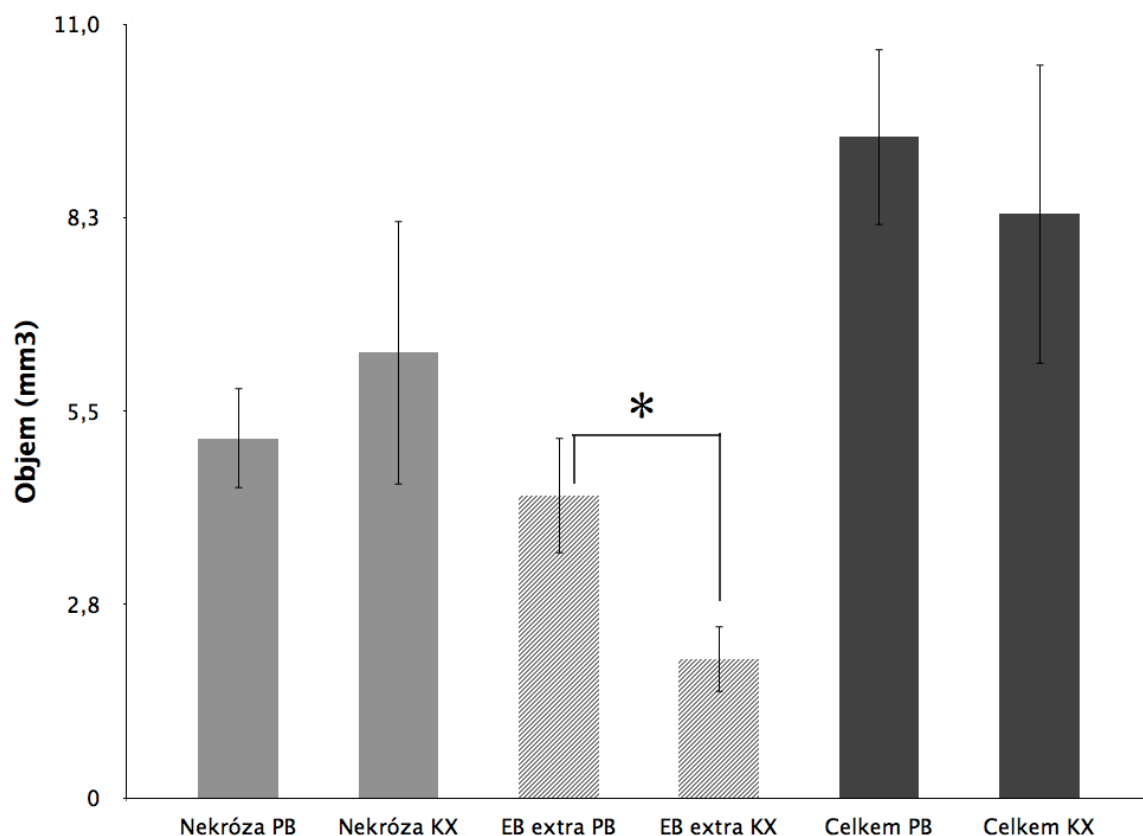
Hodnocení ischemické léze a perifokální poruchy hematoencefalické bariéry: Oblast nekrózy byla na každém řezu ostře ohraničená (viz Obr. 2.5.1.). Pomocí nástrojů programu ImageJ byl rozsah oblasti nekrózy na každém řezu změřen a vynásoben tloušťkou řezu (40 µm). Součet takto získaných hodnot udával objem 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 (viz Obr. 2.5.1.). 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 mozku nad zrcadlovou oblast kortexu v místě léze umístili virtuální rámeček (1x2mm). V tomto rámečku byla pomocí nástrojů ImageJ změřena

průměrná desita signálu. K měření denzity signálu využívá ImageJ měření průměrné hodnoty šedi (mean grey value = součet hodnot šedi každého pixelu v selektované oblasti vydělený počtem pixelů). U obrázků typu RGB je každý pixel konvertován do stupňů šedi pomocí vzorce (stupeň šedi = (stupeň červené + stupeň zelené + stupeň modré)/3). Tímto způsobem jsme získali od každého zvířete v dané skupině průměrnou signálovou denzitu vybrané oblasti kontralaterální kůry. Rozdíly těchto denzit mezi skupinami byly statisticky porovnány.

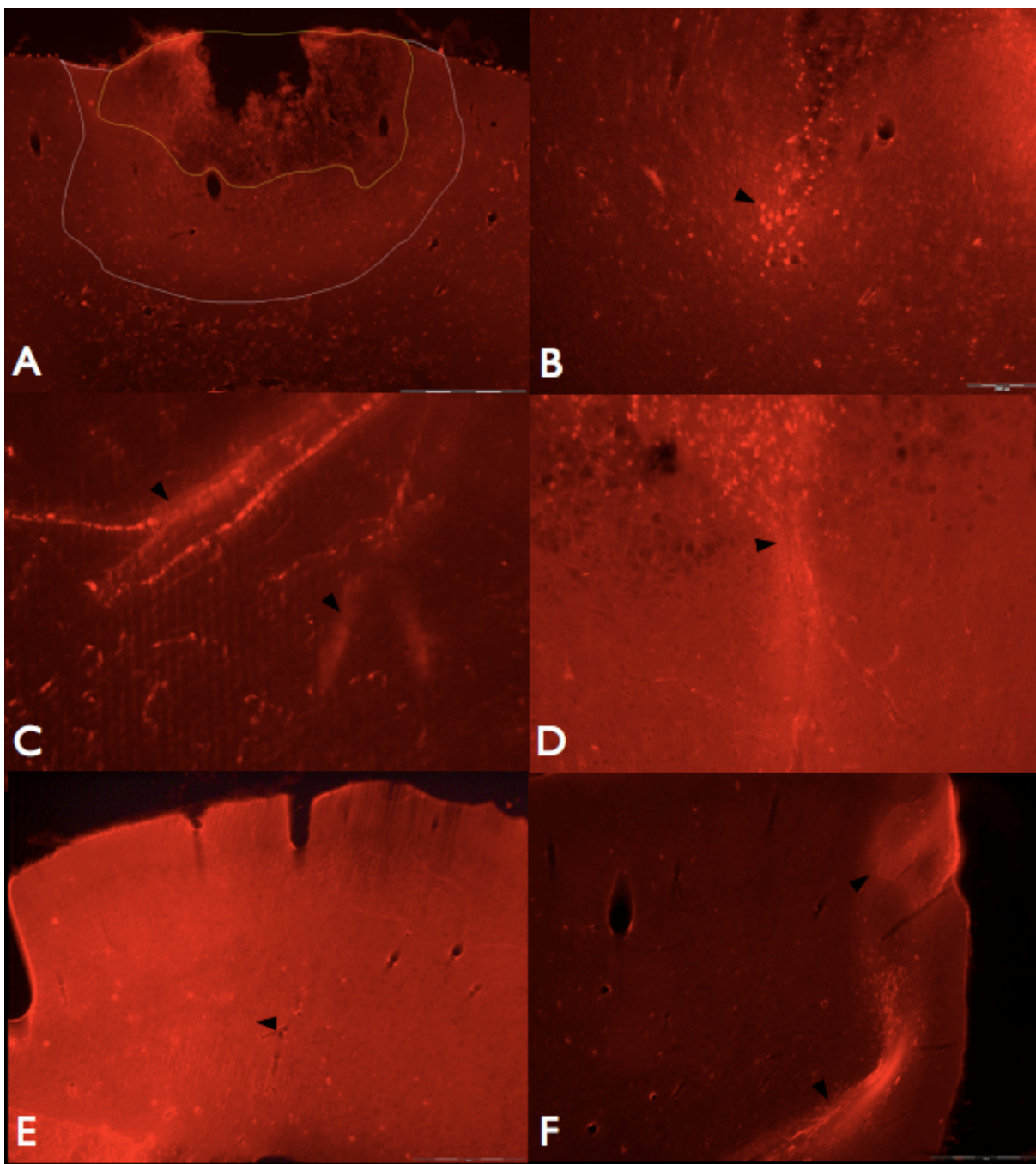
Statistické hodnocení: Pro statistické zhodnocení byl využit software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Parametrická data (rozdíly objemů léze ve skupině PB a KX) byla porovnána pomocí nepárového t-testu. Neparametrická data (průměrné hodnoty signálové denzity kortexu kontralaterálně k lézi) byla porovnána pomocí Kruskal-Wallisova testu a Mann-Whitneyho U testu.

Graf 2.5.1.: Objem léze a oblasti porušené hematoencefalické bariéry ve skupinách



Průměrný objem lézí v podskupinách s různými druhy anestezie. Průměrný objem oblasti nekrózy je uveden v prvních dvou sloupcích (světle šedá), průměrný objem oblasti extravazace EB-albuminu (oblasti s porušenou HEB) v prostředních dvou sloupcích (šedé tečky) a celkový objem léze v posledních dvou sloupcích (tmavě šedá). Ve skupině anestetizované pentobarbitalem byla oblast poruchy HEB signifikantně rozsáhlejší ve srovnání se zvířaty anestetizovanými ketaminem-xylazinem. * $p < 0,05$. Chybové úsečky = SEM.

Obr. 2.5.1.: Léze a porucha hematoencefalické bariéry ve fluorescenčním mikroskopu

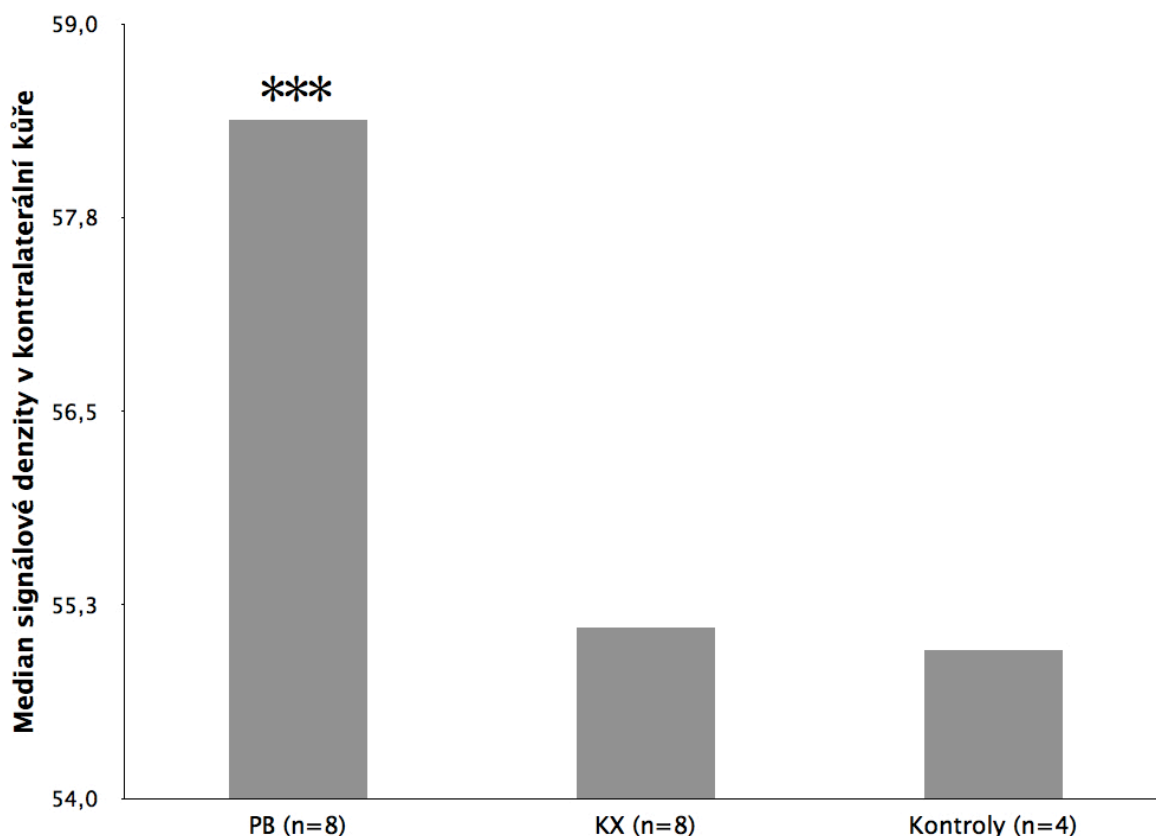


Ukázky mikrofotografií pořízených fluorescenčním mikroskopem. **A:** Typický obraz fototrombotické ischemické léze. Nekrotické jádro je obklopeno jasně červenou oblastí extravazace komplexu EB-albumin. Hranice oblasti nekrózy a oblasti porušené HEB jsou vyznačeny tenkou čarou. V dolní polovině obrázku je možné pozorovat přítomnost fluorescence v cévách. **B:** Rozhraní nekrózy a oblasti s porušenou HEB v detailu. Buňky akumulující EB-albumin jsou patrné jako jasně červené tečky obklopené oblastí porušené HEB (označeno černým trojúhelníkem). **C:** Větší perforující céva s EB-albuminem adherujícím k cévní stěně a unikajícím do intersticia (viz černé trojúhelníky). **D:** Pohled na rozhraní nekrotického jádra a oblast porušené HEB ve větším zvětšení. Opět jsou patrné buňky akumulující EB-albumin, tentokrát v blízké souvislosti se zřetelnou extravazací EB-albuminu z větší cévy (viz černý trojúhelník). **E:** Pohled na kontralaterální hemisféru u zvířete anestetizovaného pentobarbitalem v přehledném zvětšení. V levé polovině hemisféry je patrné zvýšení fluorescence EB-albuminu (tj. přítomnost poruchy HEB). Přibližná hranice změny je naznačena černým trojúhelníkem. **F:** Signálové změny v mediální části hemisféry kontralaterální k ischemické lézi u zvířete anestetizovaného pentobarbitalem (viz černé trojúhelníky).

2.5.2. 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 (viz Obr. 2.5.1A). Na některých řezech byly na rozhraní nekrózy a oblasti s porušenou HEB pozorovány shluky jasně červeně nabarvených buněk, tj. buněk akumulujících komplex EB-albumin (viz Obr. 2.5.1B,D). EB-albumin byl dále přítomen v cévách kortikálně i subkortikálně v obou hemisférách (viz Obr. 2.5.1C,D). 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 (viz Obr. 2.5.1C,D).

Graf 2.5.2.: Medián signálové denzity v kontralaterální hemisféře (zrcadlová oblast vůči lézi)



Medián signálové denzity fluorescence EB-albuminu v selektované části kontralaterální kůry (rámeček 1x2mm v oblasti zrcadlové vůči ischemické lézi). Ve skupině zvířat anestetizovaných pentobarbitalem byla tato hodnota signifikantně vyšší než u zvířat anestetizovaných ketaminem-xylazinem a u kontrol (pro srovnání použit Kruskal-Wallisův test s posttestovým porovnáním podle Dunna). *** $p < 0,0001$, chybové úsečky neuvedeny (neparametrická data).

Celkový objem léze ($TLV = NV + EBEV$) se v obou experimentálních podskupinách významně nelišil ($TLV_PB = 9.4 \pm 1.3 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$ vs. $TLV_KX = 8.3 \pm 2.1 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$). Objem nekrózy (NV) byl v podskupině anestezevané ketaminem-xylozinem poněkud vyšší, rozdíl však nebyl statisticky signifikantní ($NV_PB = 5.1 \pm 0.7 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$ vs. $NV_KX = 6.3 \pm 1.9 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$). Objem extravazace komplexu EB-albuminu (EBEV), tj. objem tkáně s poruchou HEB byl ve skupině anestezevané ketaminem-xylozinem signifikantně nižší ($EBEV_PB = 4.3 \pm 0.8 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$ vs. $EBEV_KX = 2.0 \pm 0.5 \text{ mm}^3 \text{ SEM}$, $p=0.0293$, nepárový t-test) (viz Graf 2.5.1.).

Ve skupině anestezevané 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 anestezevané ketaminem-xylozinem byl medián signálové denzity EB-fluorescence v kontralaterální hemisféře srovnatelný s kontrolami (Graf 2.5.2.).

U dvou zvířat ze skupiny anestezevané pentobarbitalem bylo při vizuálním hodnocení pozorováno difuzní zvýšení fluorescence ve vzdálených oblastech kontralaterální hemisféry (Obr. 2.5.1.E, F). Buňky akumulující EB-albumin však v kontralaterální kůře nalezeny nebyly.

3. Souhrnná diskuse

V první polovině experimentální části své práce se zabývám důsledky jednotlivých akutních generalizovaných tonicko-klonických epileptických záchvatů (GTCS) a možností jejich ovlivnění.

Hypotéza 1:

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

Časné období po skončení GTCS je v klinické praxi někdy označováno jako fáze postiktální deprese. Klinicky je charakterizováno behaviorálním útlumem: v první fázi je přítomno kóma s generalizovanou hypotonií, současně se dostavují projevy autonomní nestability (mydriáza, tachykardie, někdy arytmie, tachypnoe). Tato fáze trvá u lidí několik minut (obvykle 3-4 minuty) a je následována pozdní postiktální fází (2-10 minut), během které se postupně funkce CNS vrací k normě, pacient však může být iniciálně výrazně zmatený a mohou se dostavit behaviorální automatismy. Po skončení této fáze pacient obvykle usíná (Gastaut H. a Broughton R., 1972; Panayiotopoulos C.P., 2007). Období postiktální deprese je doprovázeno řadou neurofyziologických a metabolických změn. Na úrovni jednotlivých neuronů a gliových buněk jde zejména o energetické vyčerpání s poklesem ATP, dysfunkci mitochondrií, acidózu, intracelulární edém, zvýšení extracelulární koncentrace draselných iontů a pokles extracelulární koncentrace kalciových iontů. Na úrovni synapsí např. o vyčerpání synaptických zásob neurotransmiterů a negativní ovlivnění jejich uvolňování (mj. v důsledku snížené koncentrace kalcia), produkci adenosinu, endogenních opioidů a dalších neuromodulátorů. Na úrovni glioneurálních jednotek zejména o tzv. spatial buffering zvýšené koncentrace extracelulárního kalia a zpětný uptake glutamátu. Z pohledu neurovaskulárních jednotek dochází k lokálním i globálním změnám prokrvení (Engel J., Jr., 1984; Wiest R. et al., 2006), navíc může být ovlivněna propustnost hematoencefalické bariéry. Konečně na úrovni lokálních a vzdálených neuronálních sítí lze pozorovat zvýšenou aktivitu inhibičních interneuronů či zvýšenou aktivitu inhibičních podkorových okruhů. Vynikající souhrn patofyziologických změn dostavujících se na konci záchvatu přehledně uvádějí Lado a Moshé (Lado F.A. a Moshe S.L., 2008). Postiktální deprese se výrazně odráží ve změnách EEG, evokovaných potenciálů a funkčních zobrazovacích metod (Koepp M.J. et al., 2010). Mechanismy vedoucí k postiktální depresi jsou pravděpodobně aktivovány již během záchvatu a zřejmě

přispívají k jeho ukončení. Oproti faktorům vyvolávajícím záchvaty jsou však mechanismy postiktální deprese podstatně méně prozkoumány. Přitom jejich pochopení má zásadní význam například pro porozumění patogeneze status epilepticus (SE).

Při hodnocení elektrofyziologických důsledků epileptických záchvatů v experimentálních podmínkách je namísto termínu postiktální deprese vhodnější používat termín postiktální inhibice. Postiktální inhibice je definována jako stav (období) po záchvatu, během kterého je velmi obtížné vyvolání nového záchvatu stejným druhem stimulace. 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 SSAD méně pravděpodobné během prvních 3-5 minut od ukončení předchozího záchvatu. Vyvolané SSAD mají navíc signifikantně kratší trvání. Při stimulaci v intervalu nad 10 minut od ukončení předchozího záchvatu lze někdy naopak 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 jsme si proto kladli otázku, zda lze vhodnými parametry stimulace postiktální inhibici po generalizovaném tonicko-klonickém epileptickém záchvatu prolomit. Pomocí stimulace se stejnou frekvencí, jakou měla stimulace aplikovaná k vyvolání SSAD (8 Hz), ale s poloviční intenzitou (2,5x práh) a krátkým trváním (0,5 s) se nám selhání postiktální inhibice skutečně podařilo navodit. Tuto stimulaci jsme označili jako krátké salvy čtyř pulsů (tzv. 4P). Aplikace 4P vedla významně častěji k vyvolání záchvatů (tzv. spontánní rekurentní záchvaty) a to i v období bezprostředně po odeznění SSAD (viz Graf 2.1.2). Ukázka záchvatu je uvedena v experimentální sekci (viz Obr. 2.1.3.). Přítomnost rekurentních záchvatů i v období bezprostředně po ukončení SSAD svědčí proti úvaze, že postiktální inhibice je výlučně pasivním dějem, vyplývajícím z vyčerpání synaptických mechanismů. Přestože bylo elektromikroskopickými studiemi dokumentováno výrazné snížení presynaptických vezikul bezprostředně po SSAD (Langmeier M. a Mares J., 1984), neuronální síť je i v této fázi zjevně stále schopna generovat záchvaty. Postiktální inhibici je proto třeba vnímat též jako aktivní děj. Krátké salvy čtyř pulzů buď oslabují inhibiční mechanismy (tj. inhibují inhibici), nebo naopak potencují přetrvávající excitační mechanismy v neuronální síti tak, že nad aktivní postiktální inhibicí převáží. Je možné, že oba tyto mechanismy jsou zprostředkovány současně. Tyto změny jsou pravděpodobně výlučně funkčního charakteru, neboť je málo pravděpodobné, že by tak časně a při zvolených parametrech stimulace docházelo k významné buněčné ztrátě.

Ve svých experimentech z 80. let popisují Mareš a kol. postupné prodloužování SSAD při stejných stimulačních parametech jako v naší práci (tj. trvání 20s, frekvence 8Hz, intenzita 5x práh, interstimulační interval 10 minut) (Mares J. et al., 1983). Prodloužování (akutní kindling) lze vysvětlit např. zrychlením obratu synaptických vezikul (rychlejšímu přísunem neuromediátoru) (Langmeier M. et al., 1983) či změnami v iontovém složení intersticiální tekutiny (zejména snížení extracelulární koncentrace kalcia) (Heinemann U. et al., 1977). Změny koncentrace iontů by však měly být velmi rychle (řádově během sekund) kompenzovány, i když případná dysfunkce glie by mohla tuto kompenzaci narušit.

Narozdíl od starších experimentů jsme prodloužování SSAD nereprodukovali. Nicméně oproti jiným pracím byl náš pokus rozdílný pro přítomnost další stimulace během desetiminutových interstimulačních intervalů (jednotlivé pulsy či salvy 4P každých 20s). Nepřítomnost akutního kindlingu jsme pozorovali i u zvířat, u nichž byly aplikovány jednotlivé pulsy. Ve skupině s aplikací salv 4P byly SSAD ve všech případech delší, než ve skupině se stimulací jednotlivými pulsy, přestože statisticky významný rozdíl byl v tomto smyslu pozorován jen u druhého SSAD (viz Graf 2.1.1.). Tyto výsledky dále dokumentují výrazné narušení inhibice ve skupině s aplikací 4P. Zdá se, že zatímco samotná přítomnost elektrické stimulace v intervalu mezi jednotlivými SSAD blokuje akutní kindling, salvy 4P interferují s inhibičními mechanismy aktivními bezprostředně po odeznění SSAD, což vede k častějším spontánním záchvatům.

O konkrétních mechanismech vysvětlujících zvýšení excitability při stimulaci 4P můžeme pouze spekulovat. V důsledku stimulace salvami 4P může docházet k ovlivnění inhibičních GABAergních interneuronů či excitačně zapojených interneuronů typu mechových buněk (Ratzliff A. et al., 2002). Akutní plastické změny na úrovni synapsí 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 i pro další neurotransmitery a neuromodulátory (např. neuropeptidy, opioidy) (Velisek L. a Mares P., 1992). Stimulace krátkými salvami 4P by také mohla vést k akutním plastickým změnám na úrovni synapse, ať už ve smyslu snížení aktivity GABAergních, či zvýšení aktivity glutamatergních synapsí. Příčiny zvýšené excitability při stimulaci 4P však mohou být podmíněny řadou dalších metabolických či biochemických změn.

Hypotéza 2:

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

Akutní plastické změny byly kromě SSAD popsány též v jiných modelech akutních generalizovaných záchvatů, např. v modelu flurothylových křečí. Ni a kol. popsali u mláďat potkanů po izolovaném flurothylovém záchvatu snížení exprese alfa1-podjednotky GABA_A receptoru (Ni H. et al., 2005), Bo a spolupracovníci naopak zvýšení exprese podjednotek glutamátových NMDA receptorů (Bo T. et al., 2003). I v modelu flurothylových křečí byl zaznamenán fenomén “akutního” kindlingu, byť v osamoceně práci Samoriskihho a kol. (Samoriski G. a Applegate C., 1997). Ve své práci dokumentovali postupné snížení prahu (latence) pro generalizované záchvaty a prahu (latence) pro myoklonické záškuby, a to u zvířat, kterým byly flurothylové záchvaty indukovány každý den. Snížení prahu bylo vyjádřeno již u druhého záchvatu, maxima dosahovalo po pátém záchvatu (dni).

Předpoklad, že expozice generalizovanému tonicko-klonickému záchvatu ovlivňuje práh pro záchvat následující jsme potvrdili i v našich experimentech. Zaznamenali jsme zkrácení latence ke GTCS u následujícího (druhého) flurothylového záchvatu. 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 s pádem jsme však nezaznamenali (viz Graf 2.2.1.).

Na základě našich výsledků lze spekulovat, že fenomén akutního kindlingu pozorovaný 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. Kromě výše uvedených plastických změn na úrovni synapse byla i po izolovaném flurothylovém záchvatu prokázána u C57BL/6J myši zvýšená mitotická aktivita a neurogeneze v oblasti hipokampu (Ferland R. et al., 2002) detekovatelná ještě 3. den po záchvatu, a dále (po opakovaných záchvatech) u mláďat potkanů též sprouting mechových vláken CA3 sektoru hipokampu (Holmes G. et al., 1998; Huang L. et al., 1999; Liu Z. et al., 1999; Sogawa Y. et al., 2001) a tvorba rekurentních excitačních kolaterál. Neurogeneze i plastické změny, které mohou přispívat k pozorované hyperexcitabilitě, vyžadují syntézu řady proteinů. Proteosyntéza může být stimulována i v důsledku zvýšení transkripce časných genů a po izolovaném flurothylovém

záchvatu bylo zvýšení transkripce Hsp-72, s-fos a c-jun skutečně pozorováno (Jensen F. et al., 1993; Lowenstein D. et al., 1990). 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 v našich podmínkách jsme přítomnost významné neuronální ztráty po flurothylovém záchvatu nezaznamenali.

Hypotéza 3:

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

I výlučně funkční změny po proběhlém záchvatu mohou přetrvávat relativně dlouhou dobu. V našich dřívějších 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 (v dalších experimentech se prokázal podobný vliv expozice hypoxií 8 000 m n.m.). Jedná se tedy 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 (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), byla však většinou vysvětlována extenzivní neuronální ztrátou v těchto modelech.

Testovali jsme ještě další možný mechanismus negativního ovlivnění učení po flurothylovém záchvatu. V poslední době je zdůrazňován vztah epileptických záchvatů a poruchy hematoencefalické bariéry (HEB). HEB je v souvislosti s epilepsií a epileptickými záchvaty diskutována jednak z pohledu příčin farmakorezistence (expresí tzv. multi-drug resistance proteinů, které brání přestupu antiepileptik do mozku) a dále z pohledu samotné patofyziologie záchvatů a epilepsie. V resektách 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 přes velmi podrobné hodnocení jednotlivých oblastí mozku, nepotvrdili.

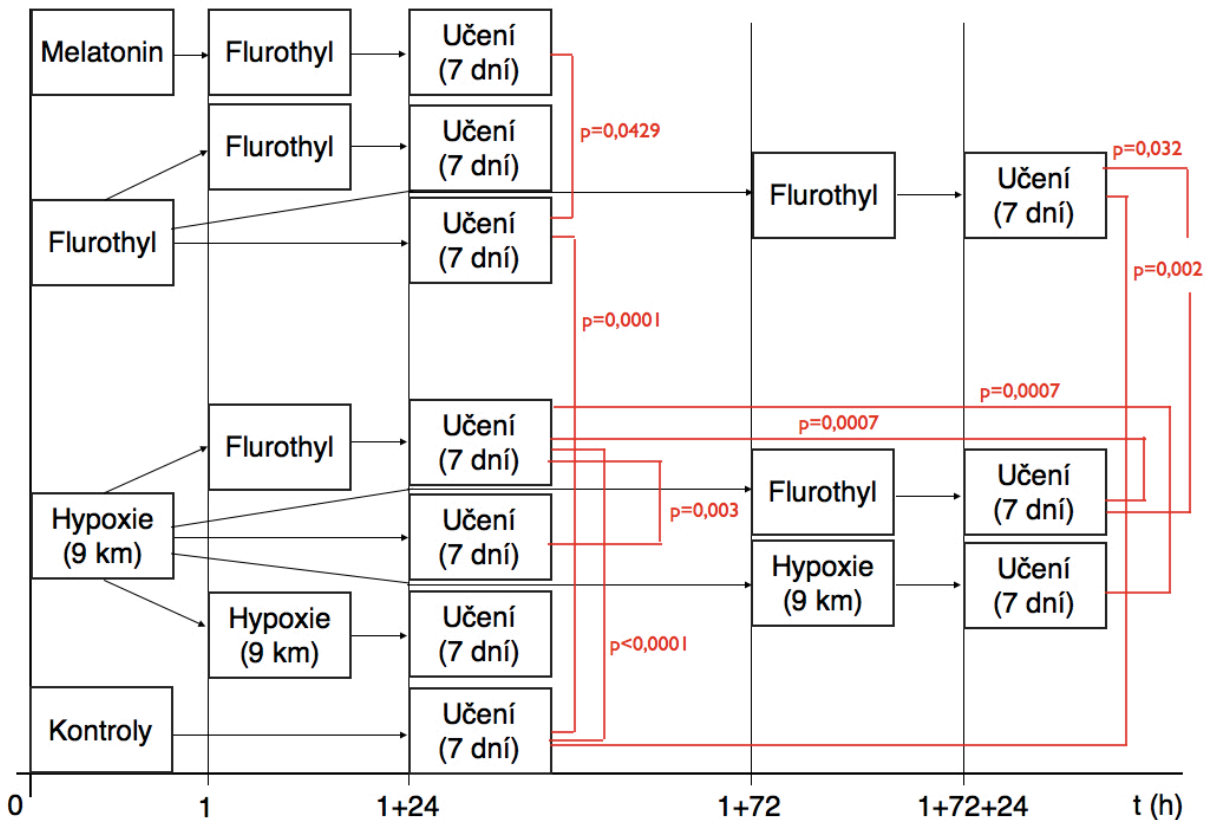
Hypotéza 4:

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

Souhrn výsledků experimentů testujících možné ovlivnění poruchy procesu učení po flurothylovém záchvatu ukazuje Obr. 3.1. 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). Jeho antioxidační funkce byly objeveny v roce 1993. Jde o molekulu rozpustnou ve vodě i v tucích, a kromě toho, že je 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 superoxiddismutázy (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). Role volných radikálů v mechanismech hypoxického preconditioningu je diskutována v teoretické části této práce. Vzhledem k tomu, že hypoxie a melatonin zmírňují negativní důsledky

Obr. 3.1.: Přehled experimentálních skupin a statisticky významné rozdíly mezi skupinami (průměrné latence v Morrisově vodním bludišti 7. den učení po flurothylovém záchvatu)



Obrázek schematicky znázorňuje experimentální manipulace v jednotlivých skupinách zvířat v čase (osa x). Jednotlivé manipulace jsou zobrazeny v obdélnících, skupiny jsou znázorněny nad sebou (je nutné sledovat šipky zleva doprava). Poslední manipulací ve všech skupinách bylo vždy učení v Morrisově vodním bludišti. Červeně jsou zobrazeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami pro 7. den učení (přímky propojují srovnávané skupiny, uvedena je p hodnota pro nepárový t-test). Zvířata vystavená jednotlivému flurothylovému záchvatu měla signifikantně horší výsledky než kontroly ($p=0,0001$), stejně jako zvířata vystavená hodinu před záchvatem hypobarické hypoxii ($p<0,0001$) a zvířata po dvou flurothylových záchvatech v odstupu 72 hodin ($p=0,002$). Při aplikaci hypobarické hypoxie 72h před záchvatem se výkon zvířat v MWM blížil kontrolám, stejně jako u zvířat vystavených samotné hypoxii. Podobný protektivní vliv mělo i podání melatoninu 1h před záchvatem.

Legenda: Hypoxie 9km: 1 hodinu trvající hypobarická hypoxie (9 km n.m.); Flurothyl: generalizovaný tonicko-klonický záchvat indukovaný inhalací flurothylu; MWM: Morrisovo vodní bludiště; Učení (7dní): V sedmi po sobě jdoucích dnech měla zvířata za úkol hledat 8x po sobě ostrůvek skrytý pod vodní hladinou. Pro každý den a danou skupinu byla spočtena průměrná hodnota k dalšímu srovnání. Upraveno podle (Mares J. et al., 2005) se svolením.

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.

Kognitivní důsledky jednotlivého generalizovaného tonicko-klonického záchvatu u lidí nebyly dosud výrazněji testovány, tím méně jeho vliv na prostorovou kognici. U pacientů s refrakterní epilepsií temporálního laloku se přesto hodnocení prostorové paměti využívá a jakožto citlivý test hipokampálních funkcí může výrazně přispět v přípravě na epileptochirurgický výkon (Amlerova J. et al., 2013). Případná ztráta schopnosti prostorového učení po operaci může totiž

výrazně zhoršit kvalitu života nemocných. Vzhledem k tomu, že lidské modifikace testů v Morrisově vodním bludišti jsou již velmi pokročilé, bylo by vhodné, i s ohledem na výše uvedené výsledky, využít tyto metody též pro hodnocení důsledků jednotlivých záchvatů a možností jejich ovlivnění.

Hypotéza 5:

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

V druhé polovině experimentální části této dizertační práce se zabývám změnami v hyperakutní části fokální ischemie. Logickým vyústěním zjištění, že hypoxický preconditioning příznivě ovlivňuje důsledky generalizovaných záchvatů, je testování vlivu preconditioningu na jiný typ inzultu. Proto jsme si v další fázi výzkumu kladli otázku, zda předtrénováním (hypoxií) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin) lze ovlivnit též tíži fokální ischemie. Pro tento účel jsme využili fototrombotický model fokální kortikální ischemie, podrobně popsany v teoretické části této práce. 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 antioxidační 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 reperfüze dané oblasti jsou v takovém případě velmi malé, narozdíl od okluze a. cerebri media, 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 této práce je diskutována problematika vzdálených důsledků fokální ischemie CNS: problematika diaschízy. Zajímalo nás, zda lze takové vzdálené ovlivnění pozorovat také ve fototrombotickém modelu a zda nastává již v její hyperakutní fázi. V první části jsme se zaměřili na změny elektrofyziologické. Testovali jsme ovlivnění somatosenzorických evokovaných potenciálů n. ischiadicus (SEP) v ipsilaterální a kontralaterální senzomotorické kůře (oblasti pro zadní končetinu) během indukce fotochemicky navozené ischemie v této oblasti. Kromě toho jsme hodnotili excitabilitu kortexu pomocí reakce na fokální kortikální stimulaci a sledování výskytu spontánních záchvatů. V druhé části jsme testovali, zda při fototrombóze dochází ke vzdáleným změnám propustnosti hematoencefalické bariéry.

Při elektrické stimulaci n. ischiadicus byly registrovány reprodukovatelné evokované odpovědi jak z pravého somatomotorického kortexu (primární projekční oblasti), tak z levé strany (ipsilaterální ke stimulaci). Odpovědi z levé hemisféry měly podobnou morfologii jako vpravo, charakteristicky iniciální pozitivitu (korový komplex), následovaný negativním a sekundárním pozitivním peakem. Latence SEP byly v našem pokusu srovnatelné s publikovanými srovnávacími studiemi (Oguzhanoglu A. a Kurt T., 2001; Oguzhanoglu A. et al., 2003) (viz též Obr. 2.4.2, Grafy 2.4.1, 2.4.2 a Tabulky 2.4.1 a 2.4.2).

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). Podobně jako ve srovnatelných pracích měly v našem případě odpovědi z levé hemisféry (ipsilaterální vůči stimulaci) nižší amplitudu (Angel A. a Lemon R.N., 1975; Sakatani K. et al., 1990). Při stimulaci n. ischiadicus přechází signál cestou zadních provazců míšních, je přepojen na úrovni jader zadních provazců a následně je veden cestou lemniscus medialis do thalamu (především jeho ventrálního posterolaterálního jádra - VPL). Ve velmi podrobné studii mapující projekci senzitivních informací do VPL jádra thalamu bylo zjištěno, že VPL jádro je funkčně dále členěno na rostrální, kaudální a mediální skupinu buněk. Proprioceptivní reprezentace zadní končetiny a zejména proximální skupina svalů je uložena v nejlaterálnější části thalamického VPL jádra (sterotaktické koordináty AP: 2,3-2,7 mm dorzálně od bregmatu, laterálně cca 2,8-3,6 mm dle úrovně řezu v koronární rovině) (Francis J.T. et al., 2008). Není zcela jisté, zda oboustranná kortikální reprezentace SEP má podklad již v bilaterální reprezentaci na úrovni thalamu, nebo zda vzniká v důsledku oboustranné

projekce thalamo-kortikální, či sekundární aktivací zrcadlové oblasti kůry z primární projekční oblasti cestou interhemisférického vedení. Již na úrovni baseline měření (a dále v průběhu celého pokusu) jsme však pozorovali mírné systematické prodloužení latencí pro odpovědi z levé hemisféry (v průměru přibližně o 4 ms). Jinými autory toto zpomalení nebylo publikováno. Ve srovnatelných studiích Sakataniho a kol. a Angela a kol. byly latence k první iniciální pozitivitě (P1) oboustranně shodné (Angel A. a Lemon R.N., 1975; Sakatani K. et al., 1990). Naše práce se od těchto autorů lišila tím, že stimulovala n. ischiadicus přímo po jeho anatomické preparaci, narozdíl od transkutánní stimulace. Jelikož bylo prodloužení latencí přítomno již při baseline měřeních, musí být důsledkem anatomického uspořádání projekce SEP u našich zvířat. Při přímé stimulaci vláken levého n. ischiadicus může být projekce do thalamu převážně lateralizovaná (vpravo) a zpoždění by tak mohlo být způsobeno nutností přepojení do druhostranného thalamu a teprve následně do levostranné somatosenzorické kůry. Druhou možností by bylo zpomalení v rámci interhemisférické kondukce (tj. zdržení via corpus callosum). Naše další výsledky však naznačují spíše subkortikální ovlivnění odpovědi.

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. V jiných modelech fokální ischemie - např. permanentní okluze a. cerebri media u potkana - byla publikována dokonce úplná restituce SEP (Sakatani K. et al., 1990). Autoři této práce spekulují, že oblast senzomotorické kůry pro zadní končetinu se u potkana nachází na hranici povodí a má značné kolaterální cévní zásobení. SEP n. trigeminus a n. medianus podobnou restituci nevykazuje. 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.

Velmi zajímavým a nečekaným zjištěním je funkční ovlivnění SEP v důsledku samotného laserového záření. Během svícení laserem 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 hlemýžďe zahradního (*Helix aspersa*) a to zvýšením kondukce pro chloridové ionty (Reece P.J. et al., 2008). Olson dále dokumentoval snížení

excitability neuronů mozečku novorozeneých krys v důsledku stejného laserového světla a koreloval ho s morfologickými atypiiemi 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). Stejný tým pozoroval též inhibici funkce Na⁺/K⁺ ATPázy v erythrocytech (Kassak P. et al., 2006). 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 jak ovlivnění kortexu, tak subkortikálních struktur. Vzhledem k daným stereotaktickým koordinátám reprezentace zadní končetiny ve VPL jádru thalamu nelze zcela vyloučit ovlivnění i 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).

Narozdíl od jiných autorů jsme nepozorovali pozdní zvýšení amplitud sekundárních komponent SEP kontralaterálně (Andrews R.J., 1991; Sakatani K. et al., 1990). Tento náález (interpretovaný jako kontralaterální hyperexcitabilita) byl však pozorován většinou v řádu několika hodin po zahájení ischemie. Je tedy možné, že v našich podmínkách nebyl čas k rozvoji těchto změn dostatečný.

Podobně jako u našich experimentů testující postiktální inhibici jsme ani u zvířat vystavených fotochemicky navozené ischemii po první hodině nezaznamenali akutní kindling (prodloužení následných výbojů při opakované kortikální stimulaci). Zaznamenali jsme však spontánní záchvaty. Počet záchvatů jednoznačně převažoval ve skupině vystavené fototrombóze oproti kontrolám. 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 (viz Obr. 2.4.4.). Podobně jako u ovlivnění kontralaterálních amplitud SEP lze i zde hovořit o vzdálených důsledcích fokální léze, v případě spontánních záchvatů zleva o vzdáleném zvýšení excitability. 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., 1996b; Schiene K. et al., 1996). V subakutním stádiu fototrombózy byly zaznamenány lokální a vzdálené změny exprese GABA_B receptorů (Que M. et al., 1999b). Jediná studie zkoumající změny excitability v akutním stádiu fototrombózy *in vivo* je studie Fujioky a kol., kde nejdřívější čas

hodnocení činil jednu hodinu po zahájení fototrombózy (Fujioka H. et al., 2004). V této práci byla pomocí stimulace párovými pulzy dokumentována hyperexcitabilita v místě léze již 1 hodinu po zahájení svícení. V této souvislosti je velmi zajímavé srovnání modelu okluze a. cerebri media (MCAO) a fototrombotického modelu z pohledu výskytu záchvatů. Zatímco u MCAO dochází především k akutním záchvatům (85% v prvních 24 hodinách) a chronická epilepsie je u zvířat méně častá, u zvířat s fototrombózou jsou akutní záchvaty vzácné, naopak je častý rozvoj chronické epilepsie (až u 50% zvířat) (Karhunen H. et al., 2005; Kharlamov E.A. et al., 2003). Klinická situace u lidských ischemických iktů představuje určitý průnik těchto extrémů. Záchvaty se u lidských ischemických CMP dostávají dle různých studií u 6,4-8,6% pacientů. Většina (4,8%) je tzv. časných, tedy do 14 dnů od iktu. Z nich asi polovina vzniká v prvních 24 hodinách. Chronická epilepsie se rozvíjí u 2,1-3,1% pacientů (Bladin C.F. et al., 2000; Lossius M.I. et al., 2005). Větší riziko záchvatů je přítomno u převážně kortikálně lokalizovaných lézí a lézí s hemoragickým podílem.

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

O mechanismech vedoucích ke zvýšené excitabilitě v akutní fázi fokální ischemie lze pouze spekulovat. Kromě výše zmíněných plastických změn (např. exprese GABA_B a NMDA receptorů) 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 jak bylo již uvedeno, má k iktogenezi a epileptogenezi úzký vztah (Marchi N. et al., 2007; Westergaard E. et al., 1978; Zappulla R.A. et al., 1985b). V posledním z experimentů diskutovaných v této práci jsme si proto kladli otázku zda ve fototrombotickém modelu dochází k významné poruše HEB a zda je tato porucha přítomna i ve vzdálených oblastech mozku. Vzhledem k tomu, že běžně používané anestetikum ketamin má, jakožto antagonistu NMDA receptorů, úzký vztah k regulaci krevního průtoku a případně integritě HEB, 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. Porucha HEB byla v našich podmínkách zobrazena jako extravazace Evansovy modři (EB), která je v plazmě vázána na albumin. Oblasti zvýšené fluorescence komplexu EB-albumin zasahovaly hluboko do bílé hmoty, mnohdy až ke corpus callosum. V těchto oblastech

jsme pozorovali adherenci fluorescenčního materiálu k cévní stěně a jeho únik extravazálně. Kromě difuzně zvýšené fluorescence kortexu v okolí nekrotické léze jsme zaznamenali též akumulaci EB-albuminu v jednotlivých buňkách (viz Obr. 2.5.1.). 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). Jak již bylo uvedeno, 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). Kromě poruchy HEB v perilezionální oblasti jsme (byť ve výrazně menší míře) pozorovali též změnu propustnosti HEB kontralaterálně, avšak pouze ve skupině zvířat anestetizovaných pentobarbitalem.

Naše výsledky dokládají, že poruchu HEB ve fototrombotickém modelu lze výrazně ovlivnit výběrem anestezie. 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 literární studie zkoumající tento vztah. Jediná studie na podobné téma prokázala naopak snížení permeability HEB po podání α_2 -adrenergního agonisty klonidinu (Borisenko S.A., 1990). Naproti tomu, snížení rozsahu perifokální poruchy HEB po předchozím podání antagonisty NMDA receptorů (MK-801) bylo dokumentováno též v modelu tranzitorní okluze a. cerebri media (Yang G. et al., 1994) a 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). Ve fototrombotickém modelu podání antagonisty NMDA receptorů Hu-211 zmírnilo rozsah poruchy HEB (Belayev L. et al., 1995). Je však nutné zmínit, že existují studie, které vztah glutamátových NMDA receptorů k regulaci HEB nepotvrzují (Preston E. et al., 1998).

Naše výsledky lze však 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.

4. Závěry

Hypotéza 1: Vhodnými parametry stimulace lze prolomit postiktální inhibici po generalizovaném tonicko-klonickém epileptickém záchvatu. Tato hypotéza byla potvrzena zjištěním, že postiktální inhibici po elektricky vyvolaném generalizovaném tonicko-klonickém záchvatu (SSAD) lze prolomit salvou čtyř pulzů o frekvenci 8 Hz.

Hypotéza 2: Předchozí expozice generalizovanému tonicko-klonickému záchvatu ovlivňuje práh pro záchvat následující. Tato hypotéza byla potvrzena zjištěním, že při opakování flurothylových generalizovaných tonicko-klonických záchvatů 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.

Hypotéza 3: Izolovaný epileptický záchvat má přetrvávající behaviorální důsledky, jejichž příčinou je porucha hematoencefalické bariéry. Přetrvávající narušení procesu učení v MWM po izolovaném flurothylovém záchvatu bylo prokázáno, nepotvrdili jsme však domněnku, že po flurothylovém záchvatu dochází k přetrvávající poruše hematoencefalické bariéry.

Hypotéza 4: Přítomnost a charakter behaviorálních důsledků expozice izolovanému flurothylovému záchvatu lze ovlivnit předtrénováním (hypoxií, záchvaty) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin). Tato hypotéza byla potvrzena. Ukázali jsme také, že i jednotlivý generalizovaný tonicko-klonický záchvat (navozený inhalací flurothylu) dokáže dlouhodobě (nejméně po dobu sedmi následujících dní) negativně ovlivnit prostorové učení, a že tomuto negativnímu efektu lze předejít vystavením zvířat hypobarické hypoxii tři dny před záchvatem či podáním melatoninu jednu hodinu před záchvatem (nikoli po záchvatu). Z předchozích experimentů bylo známo, že zhoršení prostorového učení není možné připisovat neuronálním ztrátám, ani rekurentním spontánním záchvatům.

Hypotéza 5: Předtrénováním (hypoxií) či podáním látek ovlivňujících redoxní homeostázu (melatonin) lze ovlivnit též rozsah fokální ischemie. V podmínkách fotochemicky vyvolané fokální ischemie jsme protektivní efekt hypoxického preconditioningu neprokázali, potvrdili jsme však výraznou schopnost melatoninu jakožto scavengeru volných radikálů, neboť výrazně pozitivně

ovlivnil výsledky fototrombózy (jejíž princip je založen na produkci singletového kyslíku z Bengálské červeně po ozáření zeleným světlem).

Hypotéza 6: V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným elektrofyziologickým změnám. Tato hypotéza byla potvrzena - během akutní fáze fotochemicky vyvolané ischemie 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. Při těchto experimentech jsme rovněž zjistili, že laserové světlo (532 nm) používané ve fototrombotickém modelu má samo o sobě elektrofyziologické (v našem případě inhibiční) důsledky. Toto zjištění se stalo východiskem dalšího výzkumu na toto téma.

Hypotéza 7: V hyperakutní fázi fokální ischemie dochází ke vzdáleným změnám excitability. Tato hypotéza byla potvrzena výskytem spontánních elektrografických záchvatů se začátkem nejen v místa léze (zprava) a bilaterálně, ale též nezávisle zleva.

Hypotéza 8: Vzdálené důsledky fokální ischemie zahrnují též vzdálenou změnu propustnosti hematoencefalické bariéry. Naše nálezy podporují tuto hypotézu, avšak přítomnost těchto změn výrazně ovlivňuje druh použité anestezie.

Publikace autora

1. Publikace s impakt faktorem vztahující se k dizertační práci

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)

2. Publikace bez impakt faktoru vztahující se k dizertační práci

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.

3. Ostatní 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)

4. Ostatní publikace bez impakt faktorů

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

5. Kapitoly v monografiích:

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

Literatura

- ADRIAN, E.D. The spread of activity in the cerebral cortex. *J Physiol.* 1936, vol. 88, no. s. 127-161.
- AGNATI, L.F., ZOLI, M., KUROSAWA, M., BENFENATI, F., BIAGINI, G., ZINI, I., HALLSTROM, A., UNGERSTEDT, U., TOFFANO, G. a FUXE, K. A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. *Ital J Neurol Sci.* 1991, vol. 12, no. 3 Suppl 11, s. 49-53.
- AKINS, P.T., LIU, P.K. a HSU, C.Y. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. Friend or foe? *Stroke.* 1996, vol. 27, no. 9, s. 1682-1687.
- AMLEROVA, J., LACZO, J., VLCEK, K., JAVURKOVA, A., ANDEL, R. a MARUSIC, P. Risk factors for spatial memory impairment in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2013, vol. 26, no. 1, s. 57-60. 10.1016/j.yebeh.2012.10.025.
- ANDREWS, R.J. Transhemispheric diaschisis. A review and comment. *Stroke.* 1991, vol. 22, no. 7, s. 943-949.
- ANDREWS, R.J., BRINGAS, J.R., ALONZO, G., SALAMAT, M.S., KHOSHYOMN, S. a GLUCK, D.S. Corpus callosotomy effects on cerebral blood flow and evoked potentials (transcallosal diaschisis). *Neurosci Lett.* 1993, vol. 154, no. 1-2, s. 9-12.
- 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.
- APPLEYARD, M., GREEN, A. a SMITH, A. Acetylcholinesterase activity in regions of the rat brain following a convulsion. *J Neurochem.* 1986, vol. 46, no. 6, s. 1789-1793.
- ASTRUP, J., SIESJO, P. a SYMON, L. Thresholds in cerebral ischemia. The ischemic penumbra. *Stroke.* 1981, vol. no. 12, s. 723-725.
- ATTWELL, D. a IADECOLA, C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* 2002, vol. 25, no. 12, s. 621-625.
- BAKER, J.E. Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. *Vascul Pharmacol.* 2005, vol. 42, no. 5-6, s. 233-241.
- BANG, O.Y. Multimodal MRI for ischemic stroke: from acute therapy to preventive strategies. *J Clin Neurol.* 2009, vol. 5, no. 3, s. 107-119. 10.3988/jcn.2009.5.3.107.
- BARON, J.C. Crossed cerebellar diaschisis related to recurrent focal seizures. *Epilepsia.* 1996, vol. 37, no. 4, s. 417-418.
- BARONE, F.C., WHITE, R.F., SPERA, P.A., ELLISON, J., CURRIE, R.W., WANG, X. a FEUERSTEIN, G.Z. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke.* 1998, vol. 29, no. 9, s. 1937-1950; discussion 1950-1931.
- BELAYEV, L., BUSTO, R., WATSON, B.D. a GINSBERG, M.D. Post-ischemic administration of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, protects against blood-brain barrier disruption in photochemical cortical infarction in rats: a quantitative study. *Brain Res.* 1995, vol. 702, no. 1-2, s. 266-270.
- BIDMON, H.J., OERMANN, E., SCHLEICHER, A., KATO, K., KINSCHERF, R., BUCHKREMER-RATZMANN, I., WITTE, O.W. a ZILLES, K. Copper-zinc superoxide dismutase and isolectin B4 binding are markers for associative and transhemispheric diaschisis induced by focal ischemia in rat cortex. *Neurosci Lett.* 1997, vol. 228, no. 3, s. 163-166.
- BIERNASKIE, J., CORBETT, D., PEELING, J., WELLS, J. a LEI, H. A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats. *Magn Reson Med.* 2001, vol. 46, no. 4, s. 827-830.
- BIERSACK, H.J., GRUNWALD, F. a LINKE, D.B. Transient cerebellar diaschisis. *Lancet.* 1988, vol. 1, no. 8589, s. 825.
- BLADIN, C.F., ALEXANDROV, A.V., BELLAVANCE, A., BORNSTEIN, N., CHAMBERS, B., COTE, R., LEBRUN, L., PIRISI, A. a NORRIS, J.W. Seizures after stroke: a prospective multicenter study. *Arch Neurol.* 2000, vol. 57, no. 11, s. 1617-1622.
- BLANCK, T.J., HAILE, M., XU, F., ZHANG, J., HEERDT, P., VESELIS, R.A., BECKMAN, J., KANG, R., ADAMO, A. a HEMMINGS, H. Isoflurane pretreatment ameliorates postischemic neurologic dysfunction and preserves hippocampal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in a canine cardiac arrest model. *Anesthesiology.* 2000, vol. 93, no. 5, s. 1285-1293.
- 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.

- BOGAERT, L., SCHELLER, D., MOONEN, J., SARRE, S., SMOLDERS, I., EBINGER, G. a MICHOTTE, Y. Neurochemical changes and laser Doppler flowmetry in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2000, vol. 887, no. 2, s. 266-275.
- 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.
- BORISENKO, S.A. Effects of drugs on blood-brain barrier permeability in rats chronically intoxicated by ethanol. *Ann Ist Super Sanita.* 1990, vol. 26, no. 1, s. 39-42.
- BRAUN, J., JANDER, S., SCHROETER, M., WITTE, O. a STOLL, G. Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol (Berl).* 1996, vol. 92, no. 3, s. 255-263.
- BROICH, K., HARTMANN, A., BIRSACK, H.J. a HORN, R. Crossed cerebello-cerebral diaschisis in a patient with cerebellar infarction. *Neurosci Lett.* 1987, vol. 83, no. 1-2, s. 7-12.
- BUCHKREMER-RATZMANN, I., AUGUST, M., HAGEMANN, G. a WITTE, O. Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke.* 1996a, vol. 27, no. 6, s. 1105-1109; discussion 1109-1111.
- BUCHKREMER-RATZMANN, I., AUGUST, M., HAGEMANN, G. a WITTE, O.W. Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke.* 1996b, vol. 27, no. 6, s. 1105-1109; discussion 1109-1111.
- BUCHKREMER-RATZMANN, I., AUGUST, M., HAGEMANN, G. a WITTE, O.W. Epileptiform discharges to extracellular stimuli in rat neocortical slices after photothrombotic infarction. *J Neurol Sci.* 1998, vol. 156, no. 2, s. 133-137.
- CASTEL-BRANCO, M.M., ALVES, G.L., FIGUEIREDO, I.V., FALCAO, A.C. a CARAMONA, M.M. The maximal electroshock seizure (MES) model in the preclinical assessment of potential new antiepileptic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2009, vol. 31, no. 2, s. 101-106. 10.1358/mf.2009.31.2.1338414.
- CASTRO-BLANCO, S., ENCINAS, J., SERRANO, J., ALONSO, D., GOMEZ, M., SANCHEZ, J., RIOS-TEJADA, F., FERNANDEZ-VIZARRA, P., FERNANDEZ, A., MARTINEZ-MURILLO, R. a RODRIGO, J. Expression of nitrenergic system and protein nitration in adult rat brains submitted to acute hypobaric hypoxia. *Nitric Oxide.* 2003, vol. 8, no. 3, s. 182-201.
- 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.
- COLLACO-MORAES, Y., ASPEY, B.S., DE BELLEROCHE, J.S. a HARRISON, M.J. Focal ischemia causes an extensive induction of immediate early genes that are sensitive to MK-801. *Stroke.* 1994, vol. 25, no. 9, s. 1855-1860; discussion 1861.
- CORRELL, R.E. a INGRAM, W.R. Variations in after-discharge from the hippocampus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956, vol. 93, no. 2, s. 240-245.
- D'ANTONA, R., BARON, J.C., PANTANO, P., SERDARU, M., BOUSSER, M.G. a SAMSON, Y. Effects of thalamic lesions on cerebral cortex metabolism in humans. *J Cereb Blood Flow and Metabol.* 1985, vol. 5 (Suppl 1), no. s. S457-S458.
- DAWSON, D.A., GRAHAM, D.I., MCCULLOCH, J. a MACRAE, I.M. Anti-ischaemic efficacy of a nitric oxide synthase inhibitor and a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in models of transient and permanent focal cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol.* 1994, vol. 113, no. 1, s. 247-253.
- DAWSON, D.A., MASAYASU, H., GRAHAM, D.I. a MACRAE, I.M. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. *Neurosci Lett.* 1995, vol. 185, no. 1, s. 65-69.
- DELORENZO, R.J., PAL, S. a SOMBATI, S. Prolonged activation of the N-methyl-D-aspartate receptor-Ca²⁺ transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998, vol. 95, no. 24, s. 14482-14487.
- DELORENZO, R.J., SUN, D.A. a DESHPANDE, L.S. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintainance of epilepsy. *Pharmacol Ther.* 2005, vol. 105, no. 3, s. 229-266. 10.1016/j.pharmthera.2004.10.004.
- DIETRICH, W., BUSTO, R., WATSON, B., SCHEINBERG, P. a GINSBERG, M. Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol (Berl).* 1987a, vol. 72, no. s. 326-334.
- DIETRICH, W., WATSON, B., BUSTO, R., GINSBERG, M. a BETHEA, J. Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol (Berl).* 1987b, vol. 72, no. 4, s. 315-325.

- 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.
- DOMANN, R., HAGEMANN, G., KRAEMER, M., FREUND, H.-J. a WITTE, O.W. Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci Lett*. 1993, vol. no. 155, s. 69-72.
- DREIER, J.P., KLEEBERG, J., PETZOLD, G., PRILLER, J., WINDMULLER, O., ORZECZOWSKI, H.D., LINDAUER, U., HEINEMANN, U., EINHAUPL, K.M. a DIRNAGL, U. Endothelin-1 potently induces Leao's cortical spreading depression in vivo in the rat: a model for an endothelial trigger of migrainous aura? *Brain*. 2002, vol. 125, no. Pt 1, s. 102-112.
- DUVEAU, V., ARTHAUD, S., SERRE, H., ROUGIER, A. a LE GAL LA SALLE, G. Transient hyperthermia protects against subsequent seizures and epilepsy-induced cell damage in the rat. *Neurobiol Dis*. 2005, vol. 19, no. 1-2, s. 142-149.
- EKHOLM, A. a SIESJO, B.K. A technique for brain temperature control during ischemia, suitable for measurements with ion-sensitive microelectrodes. *J Neurosurg Anesthesiol*. 1992, vol. 4, no. 4, s. 272-277.
- 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.
- ENCINAS, J., SERRANO, J., BENTURA, M., CASTRO-BLANCO, S., FERNANDEZ, A. a RODRIGO, J. Nitric oxide system and protein nitration are modified by an acute hypobaric hypoxia in the adult rat hippocampus. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003, vol. 62, no. 8, s. 863-877.
- ENGEL, J., JR. The use of positron emission tomographic scanning in epilepsy. *Ann Neurol*. 1984, vol. 15 Suppl, no. s. S180-191.
- ESQUIBEL, A., KRANTZ, J.J., TRUITT, E. a KURLAND, A. The Use of Hexafluorodiethyl ether (Indoklon) as an inhalant convulsant. *Am J Psychiatry*. 1957, vol. 114, no. 5, s. 461-.
- FEENEY, D.M. a BARON, J.C. Diaschisis. *Stroke*. 1986, vol. 17, no. 5, s. 817-830.
- FEINSTEIN, D.L., GALEA, E., AQUINO, D.A., LI, G.C., XU, H. a REIS, D.J. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation. *J Biol Chem*. 1996, vol. 271, no. 30, s. 17724-17732.
- FERLAND, R., GROSS, R. a APPLGATE, 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.
- FIGLIOLI, M., BLIN, J., BAKCHINE, S., LAPLANE, D. a BARON, J.C. PET studies of cortical diaschisis in patients with motor hemi-neglect. *J Neurol Sci*. 1991, vol. 104, no. 2, s. 135-142.
- 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.
- FOLBERGROVA, J., INGVAR, M., NEVANDER, G. a SIESJO, B. Cerebral metabolic changes during and following fluorothyl-induced seizures in ventilated rats. *J Neurochem*. 1985, vol. 44, no. 5, s. 1419-1426.
- FRAHM, C., HAUPT, C. a WITTE, O.W. GABA neurons survive focal ischemic injury. *Neuroscience*. 2004, vol. 127, no. 2, s. 341-346.
- FRANCIS, J.T., XU, S. a CHAPIN, J.K. Proprioceptive and cutaneous representations in the rat ventral posterolateral thalamus. *J Neurophysiol*. 2008, vol. 99, no. 5, s. 2291-2304. 10.1152/jn.01206.2007.
- 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.
- FUXE, K., BJELKE, B., ANDBJER, B., GRAHN, H., RIMONDINI, R. a AGNATI, L.F. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport*. 1997, vol. 8, no. 11, s. 2623-2629.
- GARTSHORE, G., PATTERSON, J. a MACRAE, I.M. Influence of ischemia and reperfusion on the course of brain tissue swelling and blood-brain barrier permeability in a rodent model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 1997, vol. 147, no. 2, s. 353-360.
- GASTAUT, H. a BROUGHTON, R. *Epileptic seizures. Clinical and electrographic features, diagnosis and treatment*. Springfield, IL: Charles C Thomas, 1972. 286 s.
- 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.
- GILMOUR, G., IVERSEN, S.D., O'NEILL, M.F. a BANNERMAN, D.M. The effects of intracortical endothelin-1 injections on skilled forelimb use: implications for modelling recovery of function after stroke. *Behav Brain Res*. 2004, vol. 150, no. 1-2, s. 171-183.
- GINSBERG, M.D. a PULSINELLI, W.A. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol*. 1994, vol. 36, no. 4, s. 553-554. 10.1002/ana.410360402.
- GINSBERG, M.D., REIVICH, M., GIANDOMENICO, A. a GREENBERG, J.H. Local glucose utilization in acute focal cerebral ischemia: local dysmetabolism and diaschisis. *Neurology*. 1977, vol. 27, no. 11, s. 1042-1048.
- GLANTZ, L., AVRAMOVICH, A., TREMBOVLER, V., GURVITZ, V., KOHEN, R., EIDELMAN, L.A. a SHOHAMI, E. Ischemic preconditioning increases antioxidants in the brain and peripheral organs after cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2005, vol. 192, no. 1, s. 117-124.
- GLOOR, P., BALL, G. a SCHAUL, N. Brain lesions that produce delta waves in the eeg. *Neurology*. 1977, vol. no. 27, s. 326-333.
- GOZAL, D., ROW, B., GOZAL, E., KHEIRANDISH, L., NEVILLE, J., BRITTIAN, K., SACHLEBEN, L. a GUO, S. Temporal aspects of spatial task performance during intermittent hypoxia in the rat: evidence for neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2003, vol. 18, no. 8, s. 2335-2342.
- GRANZIERA, C., THEVENET, J., PRICE, M., WIEGLER, K., MAGISTRETTI, P.J., BADAUT, J. a HIRT, L. Thrombin-induced ischemic tolerance is prevented by inhibiting c-jun N-terminal kinase. *Brain Res*. 2007, vol. 1148, no. s. 217-225.
- GREEN, A., METZ, A., MINCHIN, M. a VINCENT, N. Inhibition of the rate of GABA synthesis in regions of rat brain following a convulsion. *Br J Pharmacol*. 1987a, vol. 92, no. 1, s. 5-11.
- GREEN, A., MINCHIN, M. a VINCENT, N. Inhibition of GABA release from slices prepared from several brain regions of rats at various times following a convulsion. *Br J Pharmacol*. 1987b, vol. 92, no. 1, s. 13-18.
- HASHIMOTO, Y., ARAKI, H., SUEMARU, K. a GOMITA, Y. Effects of drugs acting on the GABA-benzodiazepine receptor complex on flurothyl-induced seizures in Mongolian gerbils. *Eur J Pharmacol*. 2006, vol. 536, no. 3, s. 241-247. 10.1016/j.ejphar.2006.02.036.
- HEINEMANN, U., LUX, H.D. a GUTNICK, M.J. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp Brain Res*. 1977, vol. 27, no. 3-4, s. 237-243.
- HERRMANN, M., STERN, M., VOLLENWEIDER, F. a NITSCH, C. Effect of inherent epileptic seizures on brain injury after transient cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Exp Brain Res*. 2004, vol. 154, no. 2, s. 176-182.
- HEURTEAUX, C., LAURITZEN, I., WIDMANN, C. a LAZDUNSKI, M. Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, vol. 92, no. 10, s. 4666-4670.
- 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.
- HONKANIEMI, J., STATES, B.A., WEINSTEIN, P.R., ESPINOZA, J. a SHARP, F.R. Expression of zinc finger immediate early genes in rat brain after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997, vol. 17, no. 6, s. 636-646. 10.1097/00004647-199706000-00005.
- 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.
- HOSSMANN, K.A. a SCHUIER, F.J. Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke*. 1980, vol. 11, no. 6, s. 583-592.
- 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.
- INOUE, M., KOJIMA, Y., MIMA, T., SAWAMOTO, N., MATSUHASHI, M., FUMURO, T., KINBOSHI, M., KOGANEMARU, S., KANDA, M. a SHIBASAKI, H. Pathophysiology of unilateral asterixis due to thalamic lesion. *Clin Neurophysiol.* 2012, vol. 123, no. 9, s. 1858-1864. 10.1016/j.clinph.2012.01.021.
- ISAEVA, E., ISAEV, D., KHAZIPOV, R. a HOLMES, G.L. Selective impairment of GABAergic synaptic transmission in the flurothyl model of neonatal seizures. *Eur J Neurosci.* 2006, vol. 23, no. 6, s. 1559-1566. 10.1111/j.1460-9568.2006.04693.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.
- JENSEN, F., FIRKUSNY, I. a MOWER, G. Differences in c-fos immunoreactivity due to age and mode of seizure induction. *Brain Res Mol Brain Res.* 1993, vol. 17, no. 3-4, s. 185-193.
- JIANG, X., ZHU, D., OKAGAKI, P., LIPSKY, R., WU, X., BANAUDHA, K., MEAROW, K., STRAUSS, K.I. a MARINI, A.M. N-methyl-D-aspartate and TrkB receptor activation in cerebellar granule cells: an in vitro model of preconditioning to stimulate intrinsic survival pathways in neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 2003, vol. 993, no. s. 134-145; discussion 159-160.
- JILEK, L. a MYSLIVECEK, J. [Development of resistance to high altitude anoxia in ontogenesis]. *Chekh Fiziol.* 1953, vol. 2, no. 3, s. 303-306.
- KANAYA, H., ENDO, H., SUGIYAMA, T. a KURODA, K. "Crossed cerebellar diaschisis", in patients with putaminal hemorrhage. *Journal of Cereb Blood Flow Metabol.* 1983, vol. 3 (Suppl 1):, no. 27-28, s.
- KAPINYA, K.J., LOWL, D., FUTTERER, C., MAURER, M., WASCHKE, K.F., ISAEV, N.K. a DIRNAGL, U. Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke.* 2002, vol. 33, no. 7, s. 1889-1898.
- KARHUNEN, H., JOLKKONEN, J., SIVENIUS, J. a PITKANEN, A. Epileptogenesis after experimental focal cerebral ischemia. *Neurochem Res.* 2005, vol. 30, no. 12, s. 1529-1542.
- 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.
- KASSAK, P., SIKUROVA, L., KVASNICKA, P. a BRYSZEWSKA, M. The response of Na⁺/K⁺ -ATPase of human erythrocytes to green laser light treatment. *Physiol Res.* 2006, vol. 55, no. 2, s. 189-194.
- KATAOKA, K., HAYAKAWA, T., YAMADA, K., MUSHIROI, T., KURODA, R. a MOGAMI, H. Neuronal network disturbance after focal ischemia in rats. *Stroke.* 1989, vol. 20, no. 9, s. 1226-1235.
- KELLY, P.A.T., GRAHAM, D.I. a MCCULLOCH, J. Specific alterations in local cerebral glucose utilisation following striatal lesions. *Brain Research.* 1982, vol. no. 233, s. 157-172.
- KEMPINSKY, W.H. Spatially remote effects of focal brain injury; relation to diaschisis. *Trans Am Neurol Assoc.* 1956, vol. no. 81st Meeting, s. 79-82.
- KEMPINSKY, W.H. Experimental study of distant effects of acute focal brain injury; a study of diaschisis. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1958, vol. 79, no. 4, s. 376-389.
- KEMPINSKY, W.H. Vascular and neuronal factors in diaschisis with focal cerebral ischemia. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1966, vol. 41, no. s. 92-115.
- KHAN, S.H., BAZIANY, A., BANIGESH, A., HEMMING, S.J. a SHUAIB, A. Evaluation of an optimal temperature for brain storage in delayed 2, 3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. *J Neurosci Methods.* 2000, vol. 98, no. 1, s. 43-47.
- KHARLAMOV, A., UZ, T., JOO, J.Y. a MANEV, H. Pharmacological characterization of apoptotic cell death in a model of photothrombotic brain injury in rats. *Brain Res.* 1996, vol. 734, no. 1-2, s. 1-9.
- KHARLAMOV, E.A., JUKKOLA, P.I., SCHMITT, K.L. a KELLY, K.M. Electrobehavioral characteristics of epileptic rats following photothrombotic brain infarction. *Epilepsy Res.* 2003, vol. 56, no. 2-3, s. 185-203.
- KINOUCI, H., SHARP, F.R., HILL, M.P., KOISTINAHO, J., SAGAR, S.M. a CHAN, P.H. Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993, vol. 13, no. 1, s. 105-115. 10.1038/jcbfm.1993.13.
- 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.
- KNOTT, J.R., DOGRAM, W.R. a CHILES, W.D. Effect of subcortical lesions on cortical electroencephalogram in cats. *Arch Neurol Psychiat.* 1985, vol. no. 73, s. 203-215.

- 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.
- KOEPP, M.J., DIEHL, B. a WOERMANN, F.G. Functional neuroimaging in the postictal state. *Epilepsy Behav.* 2010, vol. 19, no. 2, s. 127-130. 10.1016/j.yebeh.2010.06.036.
- KOFUJI, P. a NEWMAN, E.A. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 2004, vol. 129, no. 4, s. 1045-1056. 10.1016/j.neuroscience.2004.06.008.
- KOIZUMI, J., YOSHIDA, Y., NAKAZAWA, T. a OONEDA, G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.* 1986, vol. 8, no. s. 1-8.
- KOUDELOVA, J. a MOUREK, J. The lipid peroxidation in various parts of the rat brain: effect of age, hypoxia and hyperoxia. *Physiol Res.* 1994, vol. 43, no. 3, s. 169-173.
- KRAMER, M.S. a ADLER, M.W. Intermodal interaction: effect of sensory stimulation on flurothyl seizure threshold in normal and brain-damaged rats. *Life Sci.* 1974, vol. 15, no. 6, s. 1153-1160.
- KRANTZ, J.J., ESQUIBEL, A., TRUITT, E., LING, A. a KURLAND, A. Hexafluorodiethyl ether (Indoklon) - An Inhalant Convulsant. Its Use in Psychiatric Treatment. *JAMA.* 1958, vol. 166, no. 13, s. 1555-1562.
- KRASOWSKI, M. Differential modulatory actions of the volatile convulsant flurothyl and its anesthetic isomer at inhibitory ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology.* 2000, vol. 39, no. s. 1168-1183.
- KRYSL, D. [Contemporary models of experimental cerebral ischemia: photothrombosis and intracerebral application of endothelin-1]. *Cesk Fysiol.* 2007, vol. 56, no. 1, s. 4-9.
- LADO, F.A. a MOSHE, S.L. How do seizures stop? *Epilepsia.* 2008, vol. 49, no. 10, s. 1651-1664. 10.1111/j.1528-1167.2008.01669.x.
- LANGMEIER, M. a MARES, J. Changes in some ultrastructural parameters of cortical synapses in the initial phases of kindling. *Physiol Bohemoslov.* 1984, vol. 33, no. 4, s. 367-375.
- LANGMEIER, M., MARES, J. a FISCHER, J. Number of synaptic vesicles in rat cortex immediately after cessation of the self-sustained afterdischarge during kindling. *Epilepsia.* 1983, vol. 24, no. 5, s. 616-627.
- LANGMEIER, M., POKORNY, J., MARES, J., MARES, P. a TROJAN, S. Changes of the neuronal structure produced by prolonged hypobaric hypoxia in infant rats. *Biomed Biochim Acta.* 1989, vol. 48, no. 2-3, s. S204-207.
- LASSEN, N.A. Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev.* 1959, vol. no. 39, s. 183-238.
- LEAO, A.A. Spreading depression. *Funct Neurol.* 1986, vol. 1, no. 4, s. 363-366.
- LENZI, G.L., FRACKOWIAK, R.S. a JONES, T. Cerebral oxygen metabolism and blood flow in human cerebral ischemic infarction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1982, vol. 2, no. 3, s. 321-335.
- 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.
- LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960, vol. 36, no. s. 1-17.
- LIEPERT, J., RESTEMEYER, C., MUNCHAU, A. a WEILLER, C. Motor cortex excitability after thalamic infarction. *Clin Neurophysiol.* 2005, vol. 116, no. 7, s. 1621-1627. 10.1016/j.clinph.2005.03.002.
- LINDSLEY, B.D., BOWDEN, J.G. a MAGOUN, H.W. Effect upon the EEG of acute injury of the brainstem activating system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1949, vol. no. 1, s. 475-486.
- LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999, vol. 79, no. 4, s. 1431-1568.
- 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.
- LJUNGGREN, B., RATCHESON, R.A. a SIESJO, B.K. Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res.* 1974, vol. 73, no. 2, s. 291-307.
- 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.

- LOSSIUS, M.I., RONNING, O.M., SLAPO, G.D., MOWINCKEL, P. a GJERSTAD, L. Poststroke epilepsy: occurrence and predictors--a long-term prospective controlled study (Akershus Stroke Study). *Epilepsia*. 2005, vol. 46, no. 8, s. 1246-1251.
- LOWENSTEIN, D., SIMON, R. a SHARP, F. The pattern of 72-kDa heat shock protein-like immunoreactivity in the rat brain following flurothyl-induced status epilepticus. *Brain Res*. 1990, vol. 531, no. 1-2, s. 173-182.
- MACRAE, I.M., ROBINSON, M.J., GRAHAM, D.I., REID, J.L. a MCCULLOCH, J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993, vol. 13, no. 2, s. 276-284.
- MAITI, P., SINGH, S.B., MALLICK, B., MUTHURAJU, S. a ILAVAZHAGAN, G. High altitude memory impairment is due to neuronal apoptosis in hippocampus, cortex and striatum. *J Chem Neuroanat*. 2008, vol. 36, no. 3-4, s. 227-238. 10.1016/j.jchemneu.2008.07.003.
- 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.
- MARCHAL, G., YOUNG, A.R. a BARON, J.C. Early postischemic hyperperfusion: pathophysiological insights from positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999, vol. 19, no. 5, s. 467-482. 10.1097/00004647-199905000-00001.
- 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., BENES, P., MARES, P. a TROJAN, S. Influence of certain stimulation parameters on the character of the cortical self-sustained after-discharge. *Physiol Bohemoslov*. 1983, vol. 32, no. 1, s. 30-37.
- MARES, J. a MARES, P. Triggering of discharges from an epileptogenic focus in the rat by stimulation of the contralateral hemisphere. an ontogenetic study. *Physiol Bohemoslov*. 1978, vol. 27, no. 1, s. 15-22.
- 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, J. a ROKYTA, R. Algesia after epileptic seizure. *Physiol Res*. 2009, vol. 58, no. 2, s. 279-285.
- MARES, P., FILIP, J. a MARES, J. The role of the corpus callosum in the interhemispheric transmission of epileptic electrical activity. *Physiol Bohemoslov*. 1978a, vol. 27, no. 1, s. 23-29.
- MARES, P., MARES, J., REMES, P., HESSLER, M. a FISCHER, J. The influence of GABA on discharges of cortical epileptogenic focus. *Experientia*. 1978b, vol. 34, no. 10, s. 1308-1310.
- MARES, P. a MARESOVA, D. Excitability cycles of epileptic after-discharges in rats. *Physiol Bohemoslov*. 1989, vol. 38, no. 1, s. 55-61.
- MASADA, T., HUA, Y., XI, G., ENNIS, S.R. a KEEP, R.F. Effect of ischemic preconditioning on edema formation and cerebrovascular injury following focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl*. 2002, vol. 81, no. s. 265-268.
- MASADA, T., XI, G., HUA, Y. a KEEP, R.F. The effects of thrombin preconditioning on focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2000, vol. 867, no. 1-2, s. 173-179.
- MATEFFYOVA, A., OTAHAL, J., TSENOV, G., MARES, P. a KUBOVA, H. Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death, development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life. *Eur J Neurosci*. 2006, vol. 24, no. 2, s. 351-360.
- MATHEWS, M.S., SMITH, W.S., WINTERMARK, M., DILLON, W.P. a BINDER, D.K. Local cortical hypoperfusion imaged with CT perfusion during postictal Todd's paresis. *Neuroradiology*. 2008, vol. 50, no. 5, s. 397-401. 10.1007/s00234-008-0362-1.
- MATSUMOTO, H. a MARSAN, C.A. Cortical Cellular Phenomena in Experimental Epilepsy: Interictal Manifestations. *Exp Neurol*. 1964, vol. 9, no. s. 286-304.
- 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.
- MATSUSHIMA, K., HOGAN, M.J. a HAKIM, A.M. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996, vol. 16, no. 2, s. 221-226.

- 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.
- MCCULLOCH, J. a EDVINSSON, L. Cerebrovascular smooth muscle reactivity: a critical appraisal of in vitro and in situ techniques. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1984, vol. 4, no. 2, s. 129-139. 10.1038/jcbfm.1984.21.
- METZGER, H. Effects of direct stimulation on cerebral cortex oxygen tension level. *Microvasc Res.* 1979, vol. 17, no. 1, s. 80-89.
- MEYER, J.S., NARITOMI, H., SAKAI, F., ISHIHARA, N. a GRANT, P. Regional cerebral blood flow, diaschisis, and steal after stroke. *Neurol Res.* 1979, vol. 1, no. 2, s. 101-109.
- MEYER, J.S., OBARA, K. a MURAMATSU, K. Diaschisis. *Neurol Res.* 1993, vol. 15, no. 6, s. 362-366.
- 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.
- MISHIMA, Y., HARADA, H., SUGIYAMA, K., MIYAGAWA, Y., UEHARA, N. a KANO, T. Induction of neuronal tolerance by electroconvulsive shock in rats subjected to forebrain ischemia. *Kurume Med J.* 2005, vol. 52, no. 4, s. 153-160.
- 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.
- NAGARAJA, T.N., KEENAN, K.A., FENSTERMACHER, J.D. a KNIGHT, R.A. Acute leakage patterns of fluorescent plasma flow markers after transient focal cerebral ischemia suggest large openings in blood-brain barrier. *Microcirculation.* 2008, vol. 15, no. 1, s. 1-14.
- NAKATSUKA, H., OHTA, S., TANAKA, J., TOKU, K., KUMON, Y., MAEDA, N., SAKANAKA, M. a SAKAKI, S. Cytochrome c release from mitochondria to the cytosol was suppressed in the ischemia-tolerance-induced hippocampal CA1 region after 5-min forebrain ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.* 2000, vol. 278, no. 1-2, s. 53-56.
- NATAH, S.S., SRINIVASAN, S., PITTMAN, Q., ZHAO, Z. a DUNN, J.F. Effects of acute hypoxia and hyperthermia on the permeability of the blood-brain barrier in adult rats. *J Appl Physiol.* 2009, vol. 107, no. 4, s. 1348-1356. 10.1152/jappphysiol.91484.2008.
- NAWASHIRO, H., TASAKI, K., RUETZLER, C.A. a HALLENBECK, J.M. TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997, vol. 17, no. 5, s. 483-490.
- NELISSEN, N., VAN PAESSCHEN, W., BAETE, K., VAN LAERE, K., PALMINI, A., VAN BILLOEN, H. a DUPONT, P. Correlations of interictal FDG-PET metabolism and ictal SPECT perfusion changes in human temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neuroimage.* 2006, vol. 32, no. 2, s. 684-695.
- 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.
- NISHIO, S., CHEN, Z.F., YUNOKI, M., TOYODA, T., ANZIVINO, M. a LEE, K.S. Hypothermia-induced ischemic tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 1999, vol. 890, no. s. 26-41.
- 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.

- OŠŤÁDALOVÁ, I., OŠŤÁDAL, B., KOLÁŘ, F., PARRATT, J.R. a WILSON, S. Tolerance to ischaemia and ischaemic preconditioning in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1998, vol. 30, no. 4, s. 857-865. 10.1006/jmcc.1998.0653.
- PANAYIOTOPOULOS, C.P. *A clinical guide to epileptic syndromes and their treatment.* 2nd edition, London: Springer Verlag, 2007. 550 s. 978-1-84628-643-8.
- PATRONAS, N.J., DI CHIRO, G., SMITH, B.H., DELA PAZ, R., BROOKS, R.A., MILAM, H.L., KOMBLITH, P.L., BAIRAMIAN, D. a MANSI, L. Depressed cerebellar glucose metabolism in supratentorial tumors. *Brain Research.* 1984, vol. no. 291, s. 93-101.
- PELLERIN, L. a MAGISTRETTI, P.J. Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist.* 2004, vol. 10, no. 1, s. 53-62. 10.1177/1073858403260159.
- PERA, J., ZAWADZKA, M., KAMINSKA, B. a SZCZUDLIK, A. Neurotrophic factor expression after focal brain ischemia preceded by different preconditioning strategies. *Cerebrovasc Dis.* 2005, vol. 19, no. 4, s. 247-252.
- PEREZ-PINZON, M.A., DAVE, K.R. a RAVAL, A.P. Role of reactive oxygen species and protein kinase C in ischemic tolerance in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 2005, vol. 7, no. 9-10, s. 1150-1157.
- 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.
- PLUTA, R., LOSSINSKY, A.S., WISNIEWSKI, H.M. a MOSSAKOWSKI, M.J. Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Res.* 1994, vol. 633, no. 1-2, s. 41-52.
- POGGIO, G.F., WALKER, A.E. a ANDY, O.J. The propagation of cortical after-discharge through subcortical structures. *AMA Arch Neurol Psychiatry.* 1956, vol. 75, no. 4, s. 350-361.
- PONT, F., COLLET, A. a LALLEMENT, G. Early and transient increase of rat hippocampal blood-brain barrier permeability to amino acids during kainic acid-induced seizures. *Neurosci Lett.* 1995, vol. 184, no. 1, s. 52-54.
- PRASS, K., RUSCHER, K., KARSCH, M., ISAEV, N., MEGOW, D., PRILLER, J., SCHARFF, A., DIRNAGL, U. a MEISEL, A. Desferrioxamine induces delayed tolerance against cerebral ischemia in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002, vol. 22, no. 5, s. 520-525.
- 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.
- PUISIEUX, F., DEPLANQUE, D., BULCKAEN, H., MABOUDOU, P., GELE, P., LHERMITTE, M., LEBUFFE, G. a BORDET, R. Brain ischemic preconditioning is abolished by antioxidant drugs but does not up-regulate superoxide dismutase and glutathion peroxidase. *Brain Res.* 2004, vol. 1027, no. 1-2, s. 30-37.
- PULSINELLI, W.A. a BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979, vol. 10, no. 3, s. 267-272.
- PUTNAM, T.J. a MERRITT, H.H. Experimental Determination of the Anticonvulsant Properties of Some Phenyl Derivatives. *Science.* 1937, vol. 85, no. 2213, s. 525-526. 10.1126/science.85.2213.525.
- QUE, M., WITTE, O.W., NEUMANN-HAEFELIN, T., SCHIENE, K., SCHROETER, M. a ZILLES, K. Changes in GABA(A) and GABA(B) receptor binding following cortical photothrombosis: a quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience.* 1999a, vol. 93, no. 4, s. 1233-1240.
- QUE, M., WITTE, O.W., NEUMANN-HAEFELIN, T., SCHIENE, K., SCHROETER, M. a ZILLES, K. Changes in GABAA and GABAB receptor binding following cortical photothrombosis: A quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience.* 1999b, vol. 93, no. 4, s. 1233-1240.
- QUE, M., WITTE, O.W. a ZILLES, K. Transient up-regulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor binding by lubeluzole after neocortical specify lesion in rats. *Neurosci Lett.* 2000, vol. 296, no. 2-3, s. 125-128.
- 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.
- REINECKE, S., LUTZENBURG, M., HAGEMANN, G., BRUEHL, C., NEUMANN-HAEFELIN, T. a WITTE, O.W. Electrophysiological transcortical diaschisis after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. *Neurosci Lett.* 1999, vol. 261, no. 1-2, s. 85-88.

- REITER, R.J. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol.* 1997, vol. 38, no. s. 103-117.
- REIVICH, M., GINSBERG, M., SLATER, R., JONES, S., KOVACH, A., GREENBERG, J. a GOLDBERG, H. Alterations in regional cerebral hemodynamics and metabolism produced by focal cerebral ischemia. *Eur Neurol.* 1978, vol. 17 Suppl 1, no. s. 9-16.
- REIVICH, M., JONES, S., GINSBERG, M., SLATER, R. a GREENBERG, J. Regional hemodynamic and metabolic alterations in focal cerebral ischemia: studies of diaschisis. *Adv Exp Med Biol.* 1977, vol. 94, no. s. 617-622.
- 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.
- ROW, B., LIU, R., XU, W., KHEIRANDISH, L. a GOZAL, D. Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, vol. 167, no. 11, s. 1548-1553.
- 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 APPLIGATE, 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.
- SCHROETER, M., JANDER, S., HUITINGA, I., WITTE, O.W. a STOLL, G. Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke.* 1997, vol. 28, no. 2, s. 382-386.
- 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.
- SHARKEY, J. a BUTCHER, S.P. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods.* 1995, vol. 60, no. 1-2, s. 125-131.
- SHIMAZAKI, K., ISHIDA, A. a KAWAI, N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci Res.* 1994, vol. 20, no. 1, s. 95-99.
- SHIMIZU, S., NAGAYAMA, T., JIN, K.L., ZHU, L., LOEFFERT, J.E., WATKINS, S.C., GRAHAM, S.H. a SIMON, R.P. bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001, vol. 21, no. 3, s. 233-243.
- SIESJO, B., VON, H.R., NERGELIUS, G., NEVANDER, G. a INGVAR, M. Extra- and intracellular pH in the brain during seizures and in the recovery period following the arrest of seizure activity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1985, vol. 5, no. 1, s. 47-57.
- SIMON, R.P., CHO, H., GWINN, R. a LOWENSTEIN, D.H. The temporal profile of 72-kDa heat-shock protein expression following global ischemia. *J Neurosci.* 1991, vol. 11, no. 3, s. 881-889.
- SINGER, W. Central core control of developmental plasticity in the kitten visual cortex: I. Diencephalic lesions. *Exp Brain Res.* 1982, vol. 47, no. 2, s. 209-222.
- SLATER, R., REIVICH, M., GOLDBERG, H., BANKA, R. a GREENBERG, J. Diaschisis with cerebral infarction. *Stroke.* 1977, vol. 8, no. 6, s. 684-690.
- 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.
- SPERBER, E., WURPEL, J. a MOSHE, S. Evidence for the involvement of nigral GABAB receptors in seizures of rat pups. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989a, vol. 47, no. 1, s. 143-146.
- SPERBER, E., WURPEL, J., ZHAO, D. a MOSHE, S. Evidence for the involvement of nigral GABAA receptors in seizures of adult rats. *Brain Res.* 1989b, vol. 480, no. 1-2, s. 378-382.
- STUBGEN, J.P. Crossed cerebellar diaschisis related to recurrent focal seizures. *Epilepsia.* 1995, vol. 36, no. 3, s. 316-318.

- TAKAHASHI, A., PARK, H.K., MELGAR, M.A., ALCOGER, L., PINTO, J., LENZI, T., DIAZ, F.G. a RAFOLS, J.A. Cerebral cortex blood flow and vascular smooth muscle contractility in a rat model of ischemia: a correlative laser Doppler flowmetric and scanning electron microscopic study. *Acta Neuropathol.* 1997, vol. 93, no. 4, s. 354-368.
- TAMURA, A., GRAHAM, D.I., MCCULLOCH, J. a TEASDALE, G.M. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1981, vol. 1, no. 1, s. 53-60. 10.1038/jcbfm.1981.6.
- TENGVAR, C. a OLSSON, Y. Uptake of macromolecules into neurons from a focal vasogenic cerebral edema and subsequent axonal spread to other brain regions. A preliminary study in the mouse with horseradish peroxidase as a tracer. *Acta Neuropathol (Berl).* 1982, vol. 57, no. 2-3, s. 233-235.
- TITUS, A.D., SHANKARANARAYANA RAO, B.S., HARSHA, H.N., RAMKUMAR, K., SRIKUMAR, B.N., SINGH, S.B., CHATTARJI, S. a RAJU, T.R. Hypobaric hypoxia-induced dendritic atrophy of hippocampal neurons is associated with cognitive impairment in adult rats. *Neuroscience.* 2007, vol. 145, no. 1, s. 265-278. 10.1016/j.neuroscience.2006.11.037.
- TOLIAS, A.S., SULTAN, F., AUGATH, M., OELTERMANN, A., TEHOVNIK, E.J., SCHILLER, P.H. a LOGOTHETIS, N.K. Mapping cortical activity elicited with electrical microstimulation using fMRI in the macaque. *Neuron.* 2005, vol. 48, no. 6, s. 901-911. 10.1016/j.neuron.2005.11.034.
- TOMAN, J.E.P., SWINYARD, E.A. a GOODMAN, L.S. Properties of maximal seizures, and their alteration by anticonvulsant drugs and other agents. *J Neurophysiol.* 1946, vol. 9, no. 3, s. 231-239.
- TOWFIGHI, J., HOUSMAN, C., MAUGER, D. a VANNUCCI, R. Effect of seizures on cerebral hypoxic-ischemic lesions in immature rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999, vol. 113, no. 1-2, s. 83-95.
- TRAN DINH, Y.R., ILLE, O., GUICHARD, J.P., HAGUENAU, M. a SEYLAZ, J. Cerebral postischemic hyperperfusion assessed by Xenon-133 SPECT. *J Nucl Med.* 1997, vol. 38, no. 4, s. 602-607.
- TROJAN, S. a JILEK, L. [Differences in influencing the course of anoxia and hypoxia of the central nervous system in ontogenesis]. *Sb Lek.* 1962, vol. 64, no. s. 304-310.
- TSURU, N. Phylogenesis and kindling. *Folia Psychiatr Neurol Jpn.* 1981, vol. 35, no. 3, s. 245-252.
- VAN HEMELRIJCK, A., HACHIMI-IDRISSI, S., SARRE, S., EBINGER, G. a MICHOTTE, Y. Post-ischaemic mild hypothermia inhibits apoptosis in the penumbral region by reducing neuronal nitric oxide synthase activity and thereby preventing endothelin-1-induced hydroxyl radical formation. *Eur J Neurosci.* 2005, vol. 22, no. 6, s. 1327-1337.
- 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.
- VELISEK, L., VELISKOVA, J., PTACHEWICH, Y., ORTIZ, J., SHINNAR, S. a MOSHE, S. Age-dependent effects of gamma-aminobutyric acid agents on flurothyl seizures. *Epilepsia.* 1995, vol. 36, no. 7, s. 636-643.
- WAKAMORI, M., IKEMOTO, Y. a AKAIKE, N. Effects of two volatile anesthetics and a volatile convulsant on the excitatory and inhibitory amino acid responses in dissociated CNS neurons of the rat. *J Neurophysiol.* 1991, vol. 66, no. 6, s. 2014-2021.
- WANG, C.H., CHANG, A., TSAI, M.J., CHENG, H., LIAO, L.P. a LIN, A.M. Kainic acid-induced oxidative injury is attenuated by hypoxic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci.* 2005, vol. 1042, no. s. 314-324.
- 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.
- WIEGAND, F., LIAO, W., BUSCH, C., CASTELL, S., KNAPP, F., LINDAUER, U., MEGOW, D., MEISEL, A., REDETZKY, A., RUSCHER, K., TRENDELENBURG, G., VICTOROV, I., RIEPE, M., DIENER, H.C. a DIRNAGL, U. Respiratory chain inhibition induces tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999, vol. 19, no. 11, s. 1229-1237.
- WIEST, R., VON BREDOW, F., SCHINDLER, K., SCHAUBLE, B., SLOTBOOM, J., BREKENFELD, C., REMONDA, L., SCHROTH, G. a OZDOBA, C. Detection of regional blood perfusion changes in epileptic seizures with dynamic brain perfusion CT--a pilot study. *Epilepsy Res.* 2006, vol. 72, no. 2-3, s. 102-110. 10.1016/j.eplepsyres.2006.07.017.
- 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.

- WUSTMANN, C., PETZOLD, D., KUNZ, W. a FISCHER, H.D. Respiratory function of rat brain mitochondria after hypobaric hypoxia and piracetam treatment. *Biomed Biochim Acta*. 1987, vol. 46, no. 7, s. 635-638.
- WYNTER, C.V., IOANNOU, P. a MATHIAS, A.P. The effect of convulsions induced by flurothyl on ribonucleic acid synthesis in rat cerebral cortex during the recovery phase. *Biochem J*. 1975, vol. 152, no. 3, s. 449-467.
- 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.
- YANG, G.Y. a BETZ, A.L. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1994, vol. 25, no. 8, s. 1658-1664; discussion 1664-1655.
- YANG, J., HUANG, Y., YU, X., SUN, H., LI, Y. a DENG, Y. Erythropoietin preconditioning suppresses neuronal death following status epilepticus in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2007, vol. 67, no. 2, s. 141-148.
- YAO, H., TAKASAWA, R., FUKUDA, K., SHIOKAWA, D., SADANAGA-AKIYOSHI, F., IBAYASHI, S., TANUMA, S. a UCHIMURA, H. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001, vol. 91, no. 1-2, s. 112-118.
- YARNELL, P.R. Todd's paralysis: A cerebrovascular phenomenon? *Stroke*. 1975, vol. 6, no. 3, s. 301-303.
- 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.
- ZHANG, F.Y., CHEN, X.C., REN, H.M. a BAO, W.M. Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. *Neurol Res*. 2006, vol. 28, no. 1, s. 21-24.
- ZHONG, J., PETROFF, O., PRICHARD, J. a GORE, J. Barbiturate-reversible reduction of water diffusion coefficient in flurothyl-induced status epilepticus in rats. *Magn Reson Med*. 1995, vol. 33, no. 2, s. 253-256.
- ZIMMERMANN, C., GINIS, I., FURUYA, K., KLIMANIS, D., RUETZLER, C., SPATZ, M. a HALLENBECK, J.M. Lipopolysaccharide-induced ischemic tolerance is associated with increased levels of ceramide in brain and in plasma. *Brain Res*. 2001, vol. 895, no. 1-2, s. 59-65.
- 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.