

# KOROVÁ ELEKTRICKÁ STIMULACE A BOLEST

MUDr. Robert Rusina

Disertační doktorská práce v oboru neurověd

---

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

2010



# **Doktorské studijní programy v biomedicině**

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav normální, patologické a klinické fyziologie  
3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Ke Karlovu 4, Praha 2


Autor: MUDr. Robert Rusina

Školitel: prof. MUDr. Richard Rokyta, DrSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne.....

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



Si ce raisonnement est fondé, on ne devra pas comparer une douleur d'intensité croissante à une note de la gamme qui deviendrait de plus en plus sonore, mais plutôt à une symphonie, où un nombre croissant d'instruments se feraient entendre.

Henri Bergson, Essai sur les données immédiates de la conscience (1888)

# PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval **profesoru Richardu Rokytovi** za inspiraci, kritické myšlení a podporu během celého mého postgraduálního studia. Získal jsem jasnou představu o tom, co je to dlouhodobá tvůrčí vědecká činnost.

Děkuji **docentu Šimonu Vaculínovi** za přínosné diskuse a některé pronikavé postřehy.

Bez **doktora Stephana Bareka** by moje disertační práce nebyla úplná. Dlouho budu vzpomínat na naše dlouhé večerní a víkendové hodiny strávené ve společnosti (občas velmi mrštných) potkanů.

Poděkovat bych chtěl i **své manželce** za vytříbenou směs kritického zájmu a ohleduplného odstupu, s níž mě provázela etapami pokusů i sepsování článků a disertační práce.

V poslední řadě děkuji i **profesoru Zdeňku Hermanovi a jeho choti**, že mi připravili laskavé prostředí tak potřebné k závěrečnému sepsání tohoto rukopisu.

# OBSAH

<b>Souhrn</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>Seznam použitých zkratek</b> .....	<b>5</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>6</b>
<b>Hypotézy a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
Cíl studie .....	9
Hypotézy .....	9
<b>Materiál a metodika</b> .....	<b>11</b>
Behaviorální model .....	11
Neurofyziologický model A .....	14
Neurofyziologický model B .....	17
<b>Výsledky</b> .....	<b>20</b>
Behaviorální model .....	20
Účinek stimulace na zdravá zvířata .....	20
Účinek deaferentace na nocicepci .....	20
Účinek stimulace na deaferentované zvíře .....	21
Efekt opakované stimulace .....	22
Neurofyziologický model A .....	23
Analýza evokovaných potenciálů .....	23
Jednorázové stimulace .....	25
Stimulace s podmiňováním .....	27
Neurofyziologický model B .....	31
Evokované potenciály .....	31
Vliv korové stimulace na evokované potenciály .....	33
<b>Diskuse</b> .....	<b>37</b>
Behaviorální model .....	37
Korová stimulace u zdravých jedinců .....	37
Deaferentace a práh bolesti .....	37
Korová stimulace a práh bolesti po deaferentaci .....	38
Neurofyziologický model A .....	39
Reflex otvírání tlamy (JOR) .....	40
Somatosenzorické evokované potenciály .....	42

Neurofyzilogický model B . . . . .	44
Stimulace zubní dřeně a evokované potenciály . . . . .	45
Vliv korové stimulace na evokované potenciály . . . . .	45
Korová stimulace a reflex otvírání tlamy (JOR) . . . . .	46
Možné patofyzilogické podklady působení korové stimulace . . . . .	47
<b>Závěry . . . . .</b>	<b>48</b>
<b>Použitá literatura . . . . .</b>	<b>50</b>
<b>Seznam publikací autora . . . . .</b>	<b>57</b>
<b>Příloha: plně znění publikací, které jsou podkladem disertace . . . . .</b>	<b>59</b>

## Úvod

Cílem studie bylo zkoumání účinku stimulace sensorimotorické kůry na bolest u laboratorních zvířat. Behaviorální model sledoval prahy bolesti u deaferentovaných zvířat v závislost na korové stimulaci a dva neurofyziologické modely sledovaly různé složky reflexu otvírání tlamy a evokovaných potenciálů zubní dřeně (TPEP) po korové stimulaci.

## Metodika

V behaviorálním modelu byly u 18 deaferentovaných (po dorsální rhizotomii) potkanů a 14 kontrol měřeny prahy bolesti před a po korové stimulaci technikou plantar test a tail-flick. V neurofyziologickém modelu byly zvířatům implantovány elektrody do zubní dřeně, nad mozkovou kůru a do m. digastricus. 15 zvířat bylo rozděleno do tří skupin – stimulace s frekvencí 60Hz, 40Hz a skupina bez stimulace. TPEP byly snímány před stimulací a po 1h, 3h a 5h kontinuální korové stimulace. U 10 dalších potkanů byly snímány TPEP po jednorázové stimulaci zubní dřeně a u 5 potkanů po stimulaci s podmiňováním. TPEP a EMG z m. digastricus byly snímány a analyzovány souběžně a byla použita multirezoluční technika na potlačení šumu.

## Výsledky

Behaviorální model: 1) Stimulace sensorimotorické kůry u zdravého zvířete způsobila hypestézii kontralaterální přední končetiny; 2) deaferentace zvýšila prahy bolesti; 3) stimulace sensorimotorické kůry vracela zvýšené latence zpět na hodnoty před deaferentací; 4) účinek korové stimulace u deaferentovaných zvířat odezněl do 24 hodin a byl kolísavý. Neurofyziologický model: 1) S rostoucí intenzitou stimulace zubní dřeně lze spolehlivě odlišit obě složky reflexu otvírání tlamy; 2) pomalá složka reflexu odpovídá aktivaci nociceptivních nemyelinizovaných C vláken zubní dřeně, rychlá složka reflexu (SL JOR), odpovídající aktivitě interneuronů zprostředkované myelinizovanými A vlákny z parodontu, má inhibiční dopad na nociceptivní aferenci ze zubní dřeně; 3) korelátem nocicepce v TPEP je vlna N27; 4) bolestivá stimulace zubní dřeně zvyšuje amplitudu a zkracuje latenci vlny N27; 5) korová stimulace snižuje amplitudu i integraci vlny N27.

## Závěr

Naše výsledky potvrzují obdobné účinky korové stimulace u zvířat a u člověka, i přes odlišnou stavbu mozkové kůry. Dále byly upřesněny vztahy mezi jednotlivými složkami reflexu otvírání tlamy a jejich korelace k TPEP. Pokles amplitudy TPEP po korové stimulaci dosvědčuje možný antinociceptivní účinek kontinuální stimulace mozkové kůry.

Klíčová slova: bolest – stimulace sensorimotorické kůry – deaferentace – plantar test – tail-flick – zubní dřev – evokované potenciály – potkani



# SUMMARY

## Background

The aim of the study was to examine effects of sensorimotor cortex stimulation on pain in animal. A behavioral model investigated pain thresholds in deafferentated rats depending on cortex stimulation and two neurophysiological models studied different components of the jaw opening reflex (JOR) and tooth pulp evoked potentials (TPEPs) following cortical stimulation.

## Material and Methods

The behavioral model used 18 deafferentated (dorsal root rhizotomy) rats and 14 controls. Pain thresholds were measured before and after cortical stimulation using plantar test and tail-flick latencies. In the neurophysiological model, rats were implanted with tooth pulp, cerebral cortex, and digastric muscle electrodes. 15 animals were divided into three groups, receiving 60 Hz, 40 Hz and no cortical stimulation, respectively. TPEPs were recorded before, one, three and five hours after continuous stimulation. 10 other rats were submitted to recordings after a single tooth pulp stimulation, while in 5 more rats we administrated conditioning and test stimulation. TPEPs and digastric EMG were simultaneously recorded. A multiresolution denoising method was used for signal processing.

## Results

Behavioral model: 1) Brain cortex stimulation in intact animals evoked hypoesthesia in the contralateral forelimb; 2) deafferentation increased pain thresholds in unaffected limbs; 3) cortical stimulation returned pain thresholds in deafferentated rats to pre-deafferentation values; 4) the effect of cortical stimulation disappeared in 24 hours and oscillated.

Neurophysiological model: 1) With increasing tooth pulp stimulation intensity two components of the jaw opening reflex become distinguishable; 2) the long latency component corresponds to nonmyelinated nociceptive C fibers from the tooth pulp, the short latency component to interneurons activated via myelinated A fibers from the parodont, exerting inhibitory inputs on nociceptive tooth pulp afferents; 3) the correlate of nociception in TPEP is the N 27 wave; 4) painful tooth pulp stimulation intensity raises the N 27 ampli-

tude and shortens its latency; 5) cortical stimulation decreases both amplitude and integration of N 27.

## **Conclusion**

Our results show a similar effect of the stimulation in man and experimental animals despite the differences in the organization of the cerebral cortex. Our results identify the interaction between the different components of the jaw opening reflex and the correlation to the cortical evoked response. The decrease in amplitude of TPEPs after cortical stimulation may reflect its anti-nociceptive effect

Key words: pain – sensorimotor cortex stimulation – deafferentation – plantar test – tail-flick – tooth pulp – evoked potentials – rats

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

EMG – elektromyografie

EP – evokované potenciály

ISI – interval mezi stimulemi (inter stimulus interval)

JOR – reflex otevření tlamy (jaw opening reflex)

LL JOR – pomalá složka reflexu otevření tlamy (long latency component of the jaw opening reflex) – zprostředkováno nemyelinizovanými vlákny zubní dřeně

SL JOR – rychlá složka reflexu otevření tlamy (short latency component of the jaw opening reflex) – zprostředkováno myelinizovanými vlákny parodontu

SEP – somatosenzorické evokované potenciály

TPEPs – evokované potenciály zubní dřeně (tooth pulp evoked potentials)

TPS – stimulace zubní dřeně (tooth pulp stimulation)

Chronická bolest je předmětem výzkumu a vývoje nových terapeutických postupů po celá desetiletí. Farmakoterapie nebývá vždy účinná, a proto se hledají nefarmakologické postupy ve snaze ulevit pacientům trpícím chronickou bolestí.

Důležitou součástí léčby rezistentní a úporné bolesti, nejčastěji neurogenního původu, se v posledních letech stává stimulace motorické mozkové kůry. Účinek korové stimulace na bolest byl prokázán v několika studiích (*Canavero et al. 1995, Ebel et al. 1996, Katayama et al. 1994, Masopust et al. 2001, Migita et al. 1995*).

Klinický výzkum potvrzuje účinnost dlouhodobé stimulace motorické mozkové kůry v léčbě trigeminální neuropatické bolesti (*Boucher et al. 1993, Lefaucheur et al. 2004, Meyerson et al. 1993, Nguyen et al. 1997*), deaferentační bolesti (*Tsubokawa et al. 1991*) a talamické, post-herpetické a fantomové bolesti (*Meyerson et al. 1993, Nguyen et al. 1999*). Ačkoliv je terapeutický přínos stimulace motorické kůry široce uznáván, fyziologické podklady, mechanismy působení a determinanty analgetického působení korové stimulace jsou zatím prozkoumány málo.

U člověka se stimulační elektrody umísťují zpravidla nad motorický precentrální kortex. Lokalizace elektrod respektuje somatotopické uspořádání mozkové kůry a odpovídá bolestivé oblasti v kontralaterální části těla. Perioperační ověření správného umístění elektrod využívá somatosenzorických evokovaných potenciálů, kde centrální rolandická brázda (*sulcus centralis Rolandi*) odpovídá zvratu fáze při N20. Nověji se používá daleko přesnější neuronavigace na bázi funkční magnetické rezonance (*Masopust et al. 2001*).

K upřesnění lokalizace elektrod jsou kontaktní místa stimulována poměrně vysokou intenzitou tak, aby vznikly svalové stahy v bolestivé oblasti. Vlastní korová stimulace je intermitentní, protože stimulace motorické kůry nevyvolá pouze akutní okamžitý analgetický efekt, ale i poststimulační přetrvávání analgezie (tedy i po vysazení stimulace), a to po dobu mnoha hodin až dnů (*Nguyen et al. 1999*).

Literatura týkající se účinku korové stimulace na bolest u potkana je velmi chudá. V jedné studii byly umístěny elektrody nad somatosenzorickou korovou oblast a stimulace této krajiny způsobila jen mírnou antinocicepci v rámci formalinového testu (*Kuroda et al. 2000*), a tato antinocicepce byla v jiné studii antagonistována intratekálním podáním inhibitorů NO syntetázy (*Kuroda et al. 2001*).

Antinociceptivní mechanismy působení korové stimulace byly studovány na experimentálních modelech bolesti, nejvíce na úrovni míšních kořenů a zadních rohů míšních. Korová stimulace u potkanů snižuje nadměrnou expresi proteinu c-Fos, bílkoviny časně fáze s rychlým uvolňováním na úrovni zadních rohů míšních po bolestivé stimulaci (*Gojyo et al. 2002*).

Model kauzalgie, založený na podvázání n. ischiadici s následným rozvojem chronické bolesti ukázal, že se může dlouhodobě změnit práh bolesti. Po elektrické korové stimulaci se

u těchto pokusných zvířat vrací práh bolesti k normálním hodnotám (*Vaculín et al. 2008*). V jiné studii korová stimulace přechodně inhibuje odezvu neuronů zadních rohů míšních na bolestivé podněty (*Senapati et al. 2005*).

Rozsáhlá dorzální rhizotomie na cervikotorakální úrovni (C5-Th1) u potkana je často používaným modelem centrálního typu bolesti (*Albe-Fessard et al. 1979, Albe-Fessard et al. 1987, Basbaum 1974*), který se u člověka mnohdy dostaví po avulzi brachiálního plexu (*Ali et al. 2002, Berman et al. 1998, Lefaucheur et al. 2001, Nashold et al. 1991, Pagni et al. 1993*).

Fyziologické změny po rhizotomii u potkana jsou podkladem rozvoje chronické bolesti v ipsilaterální končetině. Model dorzální rhizotomie se liší od ostatních modelů chronické bolesti v tom, že léze se nachází proximálně od těla neuronu (uloženém ve spinálním gangliu). Z tohoto důvodu nemůže pokračovat další aferentace na míšní úrovni, jako je tomu u dalších modelů – např. ligatury či přetětí n.ischiadici (*Bennett et al. 1988, Kim et al. 1992, Lee et al. 2000, Wall et al. 1979*) – kde se léze nachází v distální části axonu (jenž zůstává v kontaktu s tělem neuronu). V modelu rhizotomie by proto všechny pozorované změny měly být centrálního původu. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli použít rhizotomii jako experimentální model chronické bolesti v první části naší studii („behaviorální model“).

Dalším často používaným modelem bolesti u potkana je elektrická stimulace zubní dřeně (tooth pulp stimulation, TPS) (*Alantar 1997 et al., Morita et al. 1977, Sugimoto et al. 1988, Toda et al. 1980*), považovaná některými autory i za model trigeminální bolesti (*Chapman et al. 1986*). Další autoři prokázali vzájemný vztah mezi bolestí a behaviorální aktivitou (*Rehning et al. 1984*). I u člověka bylo sledování korových odpovědí po stimulaci zubní dřeně užito pro výzkum na poli bolesti (*Mumford et al. 1981*).

Elektrická stimulace zubní dřeně aktivuje vysokoprahové receptory s vazbou na A-delta a C vlákna a tím spustí orofaciální protektivní reflex otvírání tlamy (jaw opening reflex, JOR), který lze snadno zaznamenat elektrodou na m. digastricus. Tato metoda je častým modelem ke studiu mechanismů bolesti (*Shigenaga et al. 1974*).

Řezák je u potkana typický svým neustálým dorůstáním a jeho dřeň je téměř kompletně inervována nemyelinizovanými axony (*Bishop 1981, Limoge-Lendais et al. 1994, Naftel et al. 1999, Rehning et al. 1987, Sato et al. 1988*). Rychlost vedení těmito vlákny kolísá mezi 0,6 a 2,9 ms (*Toda et al. 1981*), některá z nich mohou mít myelinizovaný úsek mimo zubní dřeň s vedením rychlejším – až 25 ms. Proto je doba vedení vzruchu mezi korunkou a apexem kořene v dolním řezáku u potkana 12–25 ms, pokud je stimulace aplikována na skusnou hranu zubu.

Reflex otvírání tlamy (nepřítomný u člověka) je integrován na úrovni mozkového kmene, ale může být spuštěn také stimulací nízkoprahových mechanoreceptorů, uložených ve sliznici ústní dutiny a ve vazivové tkáni parodontu.

Reflex má dvě složky, které se liší svou latencí a intenzitou stimulace, při níž se objevují. Nízká intenzita stimulace (TPS) vyvolává s odstupem 10–25 ms pomalou složku reflexu (long latency, LL JOR), která odpovídá aktivaci nemyelinizovaných C vláken zubní dřeně (*Carter et al. 1989, Chapman et al. 1986, Myslinski et al. 1987*). S rostoucí intenzitou stimulace se mění amplituda pomalé složky reflexu (LL JOR) – nejprve narůstá, pak začne klesat, až se nakonec vytratí.

Zároveň s tím se začne objevovat rychlá složka reflexu (short latency, SL JOR) do 6 ms od okamžiku stimulace. V tomto případě se jedná o důsledek šíření elektrického pole až do parodontu, s následnou aktivací rychle vedoucích myelinizovaných A vláken (*Azerad et al. 1988, Kowler et al. 1990*).

Lze tedy shrnout, že pokud je stimulována pouze zubní dřeň, objeví se jen pomalá složka reflexu (LL JOR), aniž by současně byla zaznamenána složka rychlá (SL JOR) (*Boucher et al. 1993, Carter et al. 1989*). Následné vymizení pomalé složky (LL JOR) při vyšších intenzitách stimulace je pak důsledkem inhibičního působení parodontálních aferentací na motoneuron m. digastricus (*Carter et al. 1989*).

Stimulace zubní dřeně (TPS) vyvolává – vedle reflexu otvírání tlamy – i měřitelnou odpověď na úrovni mozkové kůry. Aferentní spoje vycházejí ze zubní dřeně a parodontu, a cestou senzitivních drah dorazí do sensorimotorické kůry. Analýza těchto evokovaných potenciálů (tooth pulp evoked potentials, TPEP) umožňuje vystopovat projekci primární senzitivní aferentace do somatosenzorické kůry. Studie proběhly v tomto směru na potkanech (*Engstrand et al. 1983, Morita et al. 1977, Rehnig et al. 1984, Shigenaga et al. 1974, Toda et al. 1981*), kočkách (*Anderson et al. 1970, Keller et al. 1981*), opicích (*Chudler et al. 1985, Hassel et al. 1972*) i u člověka (*Chapman et al. 1986, Chatrian et al. 1974*).

U potkana byla centrální reprezentace projekcí ze zubní dřeně identifikována díky technice transganglionálního přenosu křenové peroxidázy (*Azerad et al. 1986, Marfurt et al. 1984*). Centrální dráhy a zapojení spojů reflexu otvírání tlamy však stále nejsou zcela prozkoumány.

Interakce mezi jednotlivými složkami reflexu otvírání tlamy (JOR) a jejich vztah ke korovým evokovaným potenciálům v odezvě na stimulaci zubní dřeně (TPS) nebyly v literatuře zatím detailněji popsány. Proto jsme zvolili TPS jako experimentální model chronické bolesti v druhé části naší studie („neurofyzilogický model“).

# HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Předložená práce si klade za cíl přispět k pochopení mechanismu působení mozkové korové stimulace na bolest. Ačkoliv bylo publikováno více studií prokazujících útlum bolestivého vnímání po korové stimulaci u člověka, není v současné době k dispozici jednoduchý animální model, který by umožnil toto pozorování ověřit.

V současné době jsou předmětem výzkumu patofyziologické mechanismy toho, jak by stimulace mohla ovlivňovat vnímání bolesti. Nabízí se několik možností, například útlum korové aktivity, inhibice talamo-kortikálních smyček, sekrece endorfinů či enkefalinů, desensitizace opioidních receptorů nebo reverberační aktivita v oblasti kortiko-subkortikálních okruhů.

Nutnost pokusu na zvířatech vychází i z toho, že existuje značná opatrnost a nedůvěra k plošnému používání těchto technik u člověka, protože panují obavy z generování epileptického ložiska (kindling), a rovněž není zřejmé, jak dlouhá stimulace zajistí dostatečný analgetický efekt. Je také otázkou, zda trvalé ovlivnění mozkové kůry nebude mít negativní dopad na kognitivní funkce.

Proto jsme se při plánování naší práce snažili přispět k vytvoření experimentálního zvířecího modelu, dokládajícího účinnost a dobrou toleranci tohoto nefarmakologického přístupu k léčbě bolesti.

## Cíl studie

**Cílem naší studie bylo vytvoření zvířecího modelu pro studium vlivu korové elektrické stimulace na vnímání bolesti. Tento model se může stát východiskem pro další výzkum diskutovaných patofyziologických mechanismů.**

## Hypotézy

- 1) U laboratorního zvířete je možné prokázat vnímání bolesti.
- 2) Chronická bolest ovlivňuje práh bolesti a mění chování laboratorního zvířete.
- 3) Chronickou bolest a její ovlivnění je možné se srovnatelnými výsledky měřit dvěma na sobě nezávislými způsoby, a to sledováním chování zvířete a měřením neurofyziologických parametrů (např. evokovaných potenciálů).
- 4) Zvířecí model umožní ověřit publikovaná zjištění prokazující, že u člověka elektrická korová stimulace tlumí chronickou bolest.

- 5) Lze prokázat, že antinociceptivní působení elektrické korové stimulace je reprodukovatelné a statisticky významné.
- 6) Antinociceptivní působení elektrické korové stimulace je reverzibilní.
- 7) U zdravých kontrol nemá elektrická korová stimulace prokazatelný vliv na vnímání bolesti (tedy nemění práh bolesti, chování zvířat ani evokované potenciály).
- 8) Elektrická korová stimulace je dobře tolerována a nezpůsobuje trvalé následky (ochrnutí, rozvoj sekundárního epileptického syndromu aj.).



# MATERIÁL A METODIKA

Naše studie má dvě části, které se od sebe zásadním způsobem liší.

První část, nazvaná „behaviorální model“, vychází z rhizotomie a sleduje technikami tail-flick a plantar test u zvířete s modelem kauzalgie (po rhizotomii, způsobující míšní deafferentaci) jeho reakce na bolestivé podněty před a po korové elektrické stimulaci.

Druhá část studie vychází z principu stimulace zubní dřeně (jako modelu trigeminové bolesti) s následným sledováním korových evokovaných potenciálů v závislosti na elektrické stimulaci mozkové kůry. Tato část se skládá ze dvou oddělených experimentů („neurofyziologický model A a B“), které mají některé shodné rysy (stimulace zubní dřeně, hodnocení evokovaných potenciálů, individuální nastavení parametrů stimulace – především intenzity – na podkladě hodnocení reflexu otvírání tlamy, matematické zpracovávání získaných dat), na druhou stranu se technika pokusu v obou případech v mnoha detailech značně liší, proto jsou popisovány odděleně.

Pokusy byly schváleny etickou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. LF UK a etickou komisí Université Paris VII ve Francii. Probíhaly podle doporučení Ethics Committee of the International Association for the Study of Pain (*Zimmermann 1983*).

## Behaviorální model

Podstatou behaviorálního modelu je pozorování reakce pokusného zvířete na bolest. Použitá laboratorní zvířata se účastnila pouze tohoto pokusu, do další části studie (neurofyziologický model A a B – viz níže) jsme zahrnuli zcela odlišné jedince.

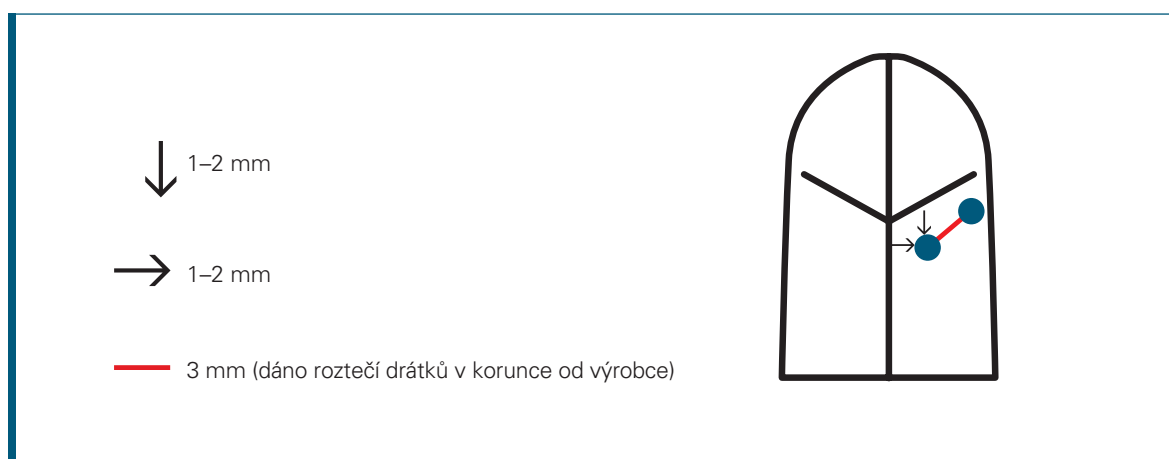
**Laboratorní zvířata.** K pokusu jsme použili celkem 32 dospělých potkanů kmene Long Evans, samců i samic, o hmotnosti 200–350g. Zvířata byla chována ve zvěřinci za standardizovaných podmínek, s volným přístupem k potravě a vodě a s pravidelným cirkadiálním rytmem 12 hodin osvětlení a 12 hodin ve tmě. Průměrná teplota v místnosti byla  $22 \pm 2$  °C a relativní vlhkost  $55\% \pm 10\%$ . Doba aklimatizace byla 5 dnů před zahájením pokusu.

**Testování bolesti.** Podstatou behaviorálního modelu je pozorování reakce pokusného zvířete na bolest – plantar test. U laboratorních zvířat jsme měřili dobu latence, po níž potkan zvedne končetinu nebo ocas nad podložku, na kterou působí bolestivý termický podnět (Plantar test;

Ugo Basile, Comerio, Itálie; Tail Flick Analgesia Meter; Life Sciences, USA). Každá končetina byla měřena zvlášť, měření bylo opakováno třikrát, pokaždé s minutovou pauzou a ke statistickému hodnocení byla použita průměrná hodnota získaná těmito třemi měřeními. U zdravých zvířat byl zjišťován účinek korové stimulace na ipsilaterálních (pravostranných) a kontralaterálních (levostranných) končetinách.

**Implantace elektrod pro korovou stimulaci.** Použili jsme elektrody z nerezové oceli, které jsme umístili do subdurálního prostoru nad oblastí somatosenzorické kůry odpovídající korové reprezentaci pro přední končetinu. Operace probíhala v celkové anestézii vedené ketaminem s xylazinem v dávce 100 mg/kg a 16 mg/kg hmotnosti zvířete. Elektrody byly následně fixovány zubním tmelem.

Umístění elektrod je schematicky znázorněno na obrázku (**Obr. 1**). Negativní elektrodu jsme umístili 1 mm dorsálně ad 3 mm napravo od bregmatu a pozitivní elektrodu 1 mm rostrálně a 3,5 mm doprava od bregmatu. Fixní vzájemná vzdálenost obou elektrod byla dána technickým aspektem (tvar plastového konektoru, upevněno zubním tmelem na kalvu).



**Obr. 1: Schéma umístění elektrod při pohledu shora na křížení švů na lebce (sagitální šev – svislá linie; koronární šev – vodorovná linie, bregma – křížení obou švů).**

V rámci pokusu jsme u každého zvířete po implantaci elektrod ověřovali, zda byla umístěna správně, tedy nad pravostrannou sensorimotorickou kůrou. Za tímto účelem jsme systematicky stimulovali levou přední končetinu a snímali somatosenzorické evokované potenciály (SEP) nad pravostrannou sensorimotorickou kůrou. Ke snímání SEP jsme použili právě tyto implantované elektrody, přičemž výbavnost potenciálů potvrdila, že elektrody jsou umístěny v požadované poloze. Elektrická stimulace probíhala formou aplikace pravoúhlých pulzů o trvání 0,2 ms s frekvencí 25 Hz. V další fázi pokusu pak implantované elektrody, poté co byla ověřena jejich správná

lokalizace, sloužily již pouze ke kontinuální elektrické stimulaci se zamýšleným antinociceptivním efektem. Další pokusy byly prováděny po sedmi dnech, kdy se zvířata zotavila z operačního zákroku.

**Parametry stimulace.** Studijní protokol byl založen na principu kontinuální elektrické stimulace v trvání přesně pěti hodin po dobu pěti po sobě následujících dnů. Ke stimulaci jsme používali supramaximální intenzitu, tj. 80% té intenzity, která vyvolala viditelný myoklonus levé přední končetiny. Stimulační intenzita tedy byla individualizována pro každé pokusné zvíře. Skutečnost, že korová stimulace vyvolala při určité intenzitě stimulace myoklonus na kontralaterální přední končetině, rovněž sloužila jako kontrola toho, že stimulační elektroda zůstávala správně umístěna a plně funkční.

**Měření prahu bolesti.** Technikou tail-flick a plantar test bylo měření prováděno vždy před zahájením a po skončení stimulace, tedy dvě měření denně po dobu pěti po sobě jdoucích dnů. Statisticky jsme porovnávali rozdíly v prahu bolesti před a po stimulaci pro každý den zvlášť a pak rozdíly v prahu bolesti na začátku a na konci celého pokusu.

**Deaferentace.** Operace probíhala v celkové anestézii ketaminem s xylazinem v dávce 100 mg/kg a 16 mg/kg hmotnosti zvířete. Přední dorzální rhizotomie kořenů C5-Th1 byla provedena na levé straně, kontralaterálně k dříve implantovaným korovým elektrodám (umístěnými nad pravostrannou senzomotorickou kůrou). Standardizovaná technika dorzální rhizotomie přetětím kořenů C5-Th1 v celkové anestézii používaná na našem pracovišti byla detailně popsána a publikována (*Vaculín et al. 2004*).

**Průběh experimentu.** Pokusná zvířata byla rozdělena do dvou skupin. V první skupině bylo 18 kontrolních zvířat bez deaferentace, kterým byly výše zmíněným postupem implantovány korové stimulační elektrody. Práh bolesti byl stanovován vždy před a po kontinuální pětihodinové stimulaci.

Do druhé skupiny jsme zařadili 14 zvířat. Před deaferentací jsme u nich změřili standardním způsobem práh bolesti a tyto hodnoty jsme považovali za výchozí. Následně byla provedena deaferentace (viz výše) a 4–6 týdnů poté následovala pětidenní elektrická korová stimulace s měřením prahu bolesti vždy před a po pěti hodinách kontinuální stimulace. Deaferentovaná končetina byla z měření prahu bolesti vyloučena.

Při pilotní analýze výsledků jsme nenašli signifikantní rozdíly mezi samečkami a samičkami, proto jsme při dalším vyhodnocování nebrali ohled na pohlaví zvířete.

**Statistické hodnocení.** Získané výsledky jsme hodnotili testem ANOVA pro opakovaná měření. V první skupině jsme použili metodu dvoucestné ANOVA pro techniku tail-flick. Latence

před a po stimulaci jsme označili jako faktor *stimulace*, pět po sobě jdoucích dnů, kdy probíhala stimulace, představovalo faktor *trend*. Plantar test jsme hodnotili zvláště pro přední a zadní končetiny, metodou trojcestné ANOVA, přičemž třetí faktor (*strana*) porovnával nocicepci na pravostranných vůči levostranným končetinám.

Ve druhé skupině jsme testovali vliv deaferentace a elektrické korové stimulace metodou jednocestné ANOVA, zpracovávající data ze tří opakovaných měření zahrnujících výsledky před deaferentací (výchozí hodnoty), práh bolesti po deaferentaci před stimulací a následně naměřené hodnoty latencí po kontinuální korové stimulaci u těchto deaferentovaných zvířat. Stabilitu působení stimulace jsme ověřovali dvoucestnou ANOVA s faktorem *stimulace* (porovnání latencí před a po stimulaci) a faktorem *trend* odpovídajícímu účinku pětidenního bloku stimulací. U plantar testu jsme rovněž porovnávali pravolevý stranový rozdíl pro zadní končetinu (jak již bylo zmíněno výše, pro deaferentovanou levou přední končetinu jsme práh bolesti nestanovovali).

Intraindividuální variabilitu jsme posuzovali na základě jedenácti opakovaných měření nocicepce – před deaferentací, po deaferentaci před stimulací a posléze po skončení stimulace v pěti po sobě jdoucích dnech. K post hoc porovnání jsme použili Bonferroniho test. Výsledky jsou prezentovány jako průměrná hodnota  $\pm$  směrodatná odchylka, jako statisticky významné jsme určili  $p < 0,05$ .

## Neurofyziologický model

Podstatou neurofyziologického modelu je sledování změn korových evokovaných potenciálů u pokusného zvířete v závislosti na bolesti (vyvolané stimulací zubní dřevě) a na předpokládaném antinociceptivním působení kontinuální korové elektrické stimulace.

Tato část studie se skládá ze dvou samostatných pokusů (v dalším textu uváděných jako „Neurofyziologický model A“ a „Neurofyziologický model B“), provedených na stejném počtu vždy 15 potkanů. Oba pokusy přes některé společné prvky v metodice však probíhaly odděleně a na jiných zvířatech.

## Neurofyziologický model A

**Laboratorní zvířata.** K pokusu jsme použili 15 dospělých potkanů (samců) kmene Sprague-Dawley, o hmotnosti 300–350g. Zvířata byla chována ve zvěřinci za standardizovaných podmínek, podobných jako při předchozím pokusu (volný přístup k potravě a vodě, pravidelný cirkadiální rytmus 12 hodin osvětlení a 12 hodin ve tmě, teplota v místnosti  $22 \pm 3$  °C a relativní vlhkost  $60\% \pm 10\%$ . Doba aklimatizace 7 dnů před zahájením pokusu).

**Implantace elektrod.** V celkové anestézii vedené ketaminem (Imalgene® 500, Rhône Merieux, Francie; 100mg/kg IM) byly do zubní dřeně dolního řezáku zavedeny bipolární stříbrné stimulační elektrody a upevněny zubním cementem (SuperBond® C&B, Sun Medical Co.,LTD, Shiga, Japonsko).

Následně jsme obtočili stříbrnou EMG elektrodu kolem předního bříska m.digastricus na ipsilaterální straně. Tato elektroda byla určena ke snímání reflexu otvírání tlamy (*Boucher et al. 1993*). Periferní referenční elektrodu jsme umístili do podkoží za ucho.

Aktivní korovou elektrodu jsme vložili do epidurálního prostoru nad kontralaterální sensorimotorickou korovou reprezentaci pro oblast dolní čelisti a zubů (1 mm rostrálně od bregmatu a 3 mm pod koronárním švem lbi) (*Rehnig et al. 1984*). Referenční korová elektroda byla umístěna do levé nosní kůstky a vlákna vycházející z obou elektrod byla vložena do konektoru přichyceného ke kraniu (*Limoge-Lendais et al. 1994*). Další pokusy byly prováděny po sedmi dnech, kdy se zvířata zotavovala z operačního zákroku.

**Průběh experimentu.** Pokusná zvířata byla rozdělena do dvou skupin, v první skupině (10 zvířat) probíhala jednorázová stimulace zubní dřeně s následným hodnocením korových evokovaných potenciálů. Druhá skupina (5 zvířat) byla stimulována podle protokolu využívajícího efektu podmiňování, kdy byla aplikována dvojice impulsů – testovací a následně stimulační – a to tak, že interval mezi oběma impulsy (testovacím a stimulačním) byl proměnlivý.

**Jednorázová stimulace.** U 10 zvířat z první skupiny jsme získávali JOR a dřeňové evokované potenciály (tooth pulp evoked potentials, TPEP) během 250 ms po jednorázové stimulaci zubní dřeně (tooth pulp stimulation, TPS). Pro nastavení intenzity stimulace jsme se řídili prahovými hodnotami jednotlivých složek JOR, tedy pomalou (long latency, LL), rychlou (short latency, SL) a obou (LL+SL), abychom stimulovali nejprve nemyelinizovaná vlákna v zubní dřeni a posléze i myelinizovaná vlákna z parodontu.

**Stimulace s podmiňováním.** Protokol pro druhou skupinu, v níž bylo pět zvířat, byl založen na podmiňování, kdy úvodní impuls byl s proměnným intervalem (interstimulační interval ISI) následován stimulačním impulzem o měnlivé intenzitě. Různé intenzity stimulace sloužily k podmiňování a následně pokusnému vyvolání následujících reflexů: dvojitý LL, SL následovaný LL reflexem, dvojitý SL v kombinaci s LL a posléze dvojitý SL reflex.

Interval mezi stimulacemi (interstimulační interval, ISI) se pohyboval v rozmezí 80 ms až 30 ms, se schodovitým průběhem 10 ms kroků, pak v rozmezí 30 ms až 5 ms s kroky po 5 ms. Před každým pokusem jsme pečlivě ověřovali, že u zvířete dokážeme jasně rozlišit obě složky (LL a SS) reflexu JOR.

**Parametry stimulace a evokované potenciály.** Ke stimulaci zubní dřeně (TPS) jsme použili elektrický stimulátor 302-T (WPI, UK), jako zdroj impulzů s napětím 2 V, trvajících 1 ms, aplikovaných každé 2 sec. Intenzita stimulace se výrazně lišila u jednotlivých zvířat, pohybovala se v rozmezí od 100  $\mu$ A do 10 mA, vždy nadprahově – práh intenzity, která byla schopna vyvolat jednotlivé složky JOR, jsme určovali vždy zvlášť u každého zvířete.

Vlastní stimulace dřeně byla řízena speciálním softwarem (Clampex® 8.0, Axon Instruments, USA) s použitím digitálně-analogového konvertoru (Digidata® 1200 A, Axon Instruments, USA) a lineárního izolátoru stimulů (A 395, WPI, Velká Británie).

Evokované potenciály byly získávány a zpracovávány předzesilovačem (AI 417 a AI 405, Axon Instruments, USA) a zesíleny programovatelným zesilovačem (Cyberamp® 380, Axon Instruments, USA). K digitálně-analogické filtraci dat jsme použili konvertor (Digidata® 1200 A, Axon Instruments, USA).

Pokus probíhal u bdělých zvířat, která nebyla vystavena působení žádného farmaka, pozornost byla věnována i zevním podmínkám (klidné, ničím nerušené bezhlučné prostředí s konstantní teplotou a vlhkostí, během experimentu nebyla v místnosti přítomna žádná další osoba ani jiné pokusné zvíře). Touto cestou jsme usilovali o zamezení stresu, který může potlačovat svalovou odpověď pomalé složky (LL) reflexu JOR (*Pajot et al. 1984, Rehnig et al. 1987*).

V průběhu stimulace zubní dřeně jsme usilovali o to, aby nebyly u zvířat přítomny žádné viditelné behaviorální známky bolesti nebo stresu, jako kupříkladu vokalizace, útlum, změny v chování zvířete, rovněž jsme dbali o to, aby nevznikaly mimovolní pohyby nebo dystonické projevy. Pokud se objevily mimovolní pohyby, nebo změny chování, byl pokus přerušen a po zklidnění započat znovu.

**Zpracování signálu.** Výsledné evokované potenciály byly získávány zprůměrováním 100 po sobě jdoucích úseků o délce 250 ms. Analogová data byla konvertována do digitální podoby a podrobena dalším úpravám s cílem standardizovat křivky a odstranit artefakty.

Další krok spočíval v komplikovaném postupu zacíleném na potlačení šumu. Každý evokovaný potenciál byl převeden do sady základních sinusoidních funkcí (waveletová transformace). V průběhu zpracovávání dat se jako nejúčinnější ukázala metoda Symlet 8. řádu.

Po zkomprimování waveletových koeficientů jsme přistoupili k reverzní transformaci signálu, abychom získali zpět původní křivku evokovaného potenciálu, nyní však již zbavenou šumu (*Bertrand et al. 1994*). K tomuto postupu jsme použili software Matlab® (Mathick, CA, USA) a Wavelet toolbox®.

**Statistické hodnocení.** Získané výsledky JOR a TPEP se vyznačovaly významnou interindividuální variabilitou, což výrazně ztěžuje možnosti srovnávání výsledků získaných u jednotlivých zvířat. Z tohoto důvodu bylo nutné přistoupit ke standardizaci dat.

Abychom obdrželi výsledky v podobě poměrů (procenta z variací), porovnávali jsme každé zvíře zvlášť „samo se sebou“. Následně jsme křivky TPEP rozdělili do různých skupin podle latence a k interindividuálnímu porovnání jsme užíli testu ANOVA a následně Turkeyova testu pro porovnávání jednotlivých skupin.

Nízký počet zkoumaných zvířat neznamenal omezení pro možnost statistického zpracování dat, byl totiž vyvážen velkým objemem dat dostupných pro každé jednotlivé pokusné zvíře.

## Neurofyziologický model B

**Laboratorní zvířata.** K pokusu jsme použili 15 dospělých potkanů (samců) kmene Sprague-Dawley, o hmotnosti 300–350g. Zvířata byla chována ve zvěřinci za standardizovaných podmínek, podobných jako při předchozím pokusu (volný přístup k potravě a vodě, pravidelný cirkadiální rytmus 12 hodin osvětlení a 12 hodin ve tmě, teplota v místnosti  $22 \pm 3$  °C a relativní vlhkost  $60\% \pm 10\%$ . Doba aklimatizace 7 dnů před zahájením pokusu).

**Implantace elektrod.** V celkové anestézii vedené ketaminem (Imalgene® 500, Rhône Merieux, Francie; 100mg/kg intraperitoneálně) byly do zubní dřeně levého řezáku zavedeny bipolární stimulační elektrody z Teflonu pokrytého 125  $\mu$ m vrstvou platiny a upevněny zubním cementem (SuperBond® C&B, Sun Medical Co.,LTD, Shiga, Japonsko).

Následně jsme dvě stříbrem potažené EMG teflonové elektrody připevnili kolem předního bříška m.digastricus na ipsilaterální (levé) straně, k zachycení jednotlivých komponent reflexu JOR. Po zesílení byl signál zobrazován na obrazovce osciloskopu, aby bylo možné na podkladě tvaru EMG křivky průběžně vybavovaného reflexu JOR cíleně nastavit intenzitu stimulace. Periferní referenční elektrodu jsme umístili do podkoží za ucho.

Ke stimulaci zubní dřeně jsme použili stimulátor 302-T (WPI, Velká Británie). jako zdroj pravoúhlých impulsů o délce 1 ms, s frekvencí 0,5Hz a ručně nastavenou intenzitou v rozmezí 0,01 až 10 mA. Tímto postupem jsme vybavovali jednotlivé složky JOR: pomalou (LL) při nízké intenzitě stimulace, obě – pomalou i rychlou (SL+LL) při střední intenzitě a posléze pouze rychlou složku (SL) reflexu při vysoké intenzitě elektrické stimulace. Jednotlivé složky reflexu otvírání tlamy byly dobře diferencovatelné na obrazovce osciloskopu.

Nakonec jsme přistoupili k implantaci dvou ocelových nerez elektrod, s dvojí funkcí, sloužící k registraci korových evokovaných potenciálů (TPEP) i ke kontinuální sensorimotorické korové stimulaci (potkani na rozdíl od člověka nemají mozkovou kůru jednoznačně členěnou na sensorický a motorický kortex – Kolb 1990, Paxinos et al. 2007, Starr et al. 1991).

Korové elektrody jsme umístili do epidurálního prostoru, 1 mm rostrálně a 1 mm doprava od bregmatu, druhou elektrodu 1 mm kaudálně a 2 mm laterálně od bregmatu, následně jsme

je upevnili k lebce zubním cementem (Superbond®, C&B, Japonsko). Referenční elektroda se nacházela v nosní kosti.

**Průběh experimentu.** V celkové anestézii byla provedena pouze implantace elektrod. Ostatní postupy (TPS, natáčení TPEP, korová stimulace) probíhaly u volně se pohybujících, farmaky neovlivněných laboratorních zvířat. Další pokusy byly prováděny po sedmi dnech, kdy se zvířata zotavovala z operačního zákroku.

Zdrojem vlastní kontinuální stimulace byl pulzní generátor Medtronic®-3625 (Medtronic, Inc. Minneapolis, USA), který vydával pravoúhlé pulsy o délce 0,2 ms, s frekvencí 60 Hz (skupina 60) nebo 40 Hz (skupina 40). Intenzitu stimulace jsme volili individuálně, na hladině 80–90 % intenzity schopné vyvolat záškuby lícních svalů (pohybovala se v rozmezí 0,27–0,150 mA). Kontinuální korová elektrická stimulace trvala 1, 3 a 5 hodin.

K registraci evokovaných potenciálů (TPEP) jsme použili identických korových elektrod, tedy těch, které slouží zároveň jako stimulační elektrody v rámci korové elektrické stimulace. Získané signály jsme zesilovali (zesilovač AI417 and AI 405; Cyberamp® 380, Axon Instruments, USA) a převáděli do digitální podoby (Digidata® 1200A, Axon Instruments, USA).

Po týdenní pauze ke zotavení po operačním zákroku jsme natočili TPEP pro tři různé intenzity stimulace zubní dřeně bez stimulace mozkové kůry (**Obr. 9, 10**)

Každé laboratorní zvíře jsme stimulovali odděleně, intenzitu stimulace jsme upravovali individuálně na podkladě hodnocení pomalé a rychlé složky reflexu JOR tak, abychom si mohli ověřit, že právě stimulujeme myelinizovaná A vlákna parodontu a/nebo nemyelinizovaná C vlákna zubní dřeně. Intenzity stimulace tedy vykazovaly výraznou inter/intraindividuální variabilitu a nemohou být proto zobrazeny v jedné přehledné tabulce.

V další fázi experimentu jsme zvířata rozdělili do tří skupin. První skupina (skupina 60) byla vystavena působení pětihodinové kontinuální korové stimulace o frekvenci 60 Hz. V průběhu pokusu jsme snímali TPEP po 1, 3 a 5 hodinách stimulace (**Obr. 9, 10**). U druhé skupiny (skupina 40) jsme postupovali obdobně, jen frekvence stimulace byla v tomto případě 40Hz. Třetí skupina byla kontrolní, bez kontinuální korové stimulace, ale měření TPEP probíhalo podle stejného principu, jako u předešlých dvou skupin.

Celkem jsme analyzovali 128 záznamů TPEP o délce 250 ms pomocí protokolu zaměřeného na redukci šumu dle Bertranda (*Bertrand et al. 1994*). Technika waveletové transformace a zpětné rekonstrukce křivky byla identická s technikou použitou v předchozím pokusu (a detailně popsáné v kapitole zpracování signálu v oddílu „neurofyziologický model A“). Tento poměrně složitý postup jsme zvolili, abychom vůbec mohli mezi sebou porovnávat zvířata s kolísavou interindividuální variabilitou křivek TPEP (*Falinower et al. 1994, Grass et al. 2003, Shigenaga et al. 1974, You et al. 2003*).



**Statistické hodnocení.** Obdobně jako u předchozího pokusu jsme výsledky uvedli v podobě procentuálního podílu variance. Pro každou křivku TPEP jsme určili maximální amplitudu hlavní vlny (objevuje se v rozmezí 20 a 30 ms) a integraci celé křivky.

Získaná data jsme porovnávali s cílem určit, zda nalezneme statisticky významný rozdíl mezi parametry TPEP po 1 hodině, 3 hodinách nebo 5 hodinách trvající kontinuální korové stimulace s frekvencí 60 Hz a s frekvencí 40 Hz. Z důvodu omezení velikosti souboru a nejisté normality souboru jsme použili neparametrický Kruskalův-Wallisův test, následovaný Dunnovým testem vícečetného porovnávání. Ke statistickému hodnocení jsme použili software XLSTAT® v 2007.1 (Addinsoft, USA).

## VÝSLEDKY

Na tomto místě je užitečné vymezit přesně termín „stimulace“, který se v textu vyskytuje ve dvou konotacích:

- stimulace zubní dřeně (TPS) – tato stimulace má za cíl vybavení korových evokovaných potenciálů (TPEP). Parametry stimulace, zejména intenzita této stimulace, se řídily podobou reflexu otevírání tlamy (JOR). TPS jsme v této studii považovali za nociceptivní faktor. TPS jsme používali pouze v neurofyziologickém modelu.
- kontinuální korová stimulace – tato stimulace má předpokládaný antinociceptivní účinek, probíhá dle protokolu od jedné do pěti hodin. Před zahájením a po skončení této kontinuální korové stimulace jsme zjišťovali prahy bolesti nebo analyzovali evokované potenciály (TPEP) a dle změny prahu bolesti nebo změny tvaru a latencí TPEP jsme usuzovali na antinociceptivní působení korové stimulace. Elektrická korová stimulace byla používána v behaviorálním i v neurofyziologickém modelu.

### Behaviorální model

**Účinek stimulace na zdravá zvířata.** V kontrolní skupině zvířat bez deaferentace neměla opakovaná korová stimulace vliv na práh bolesti u zadních končetin ( $F(1,17) = 2,563$ ;  $p = 0,127$ ) ani na tail flick test ( $F(1,17) = 2,382$ ;  $p = 0,141$ ). Stimulace měla stejný účinek na obě zadní končetiny, pravolevý stranový faktor nebyl signifikantní ( $F(1,17) = 2,147$ ;  $p = 0,161$ ).

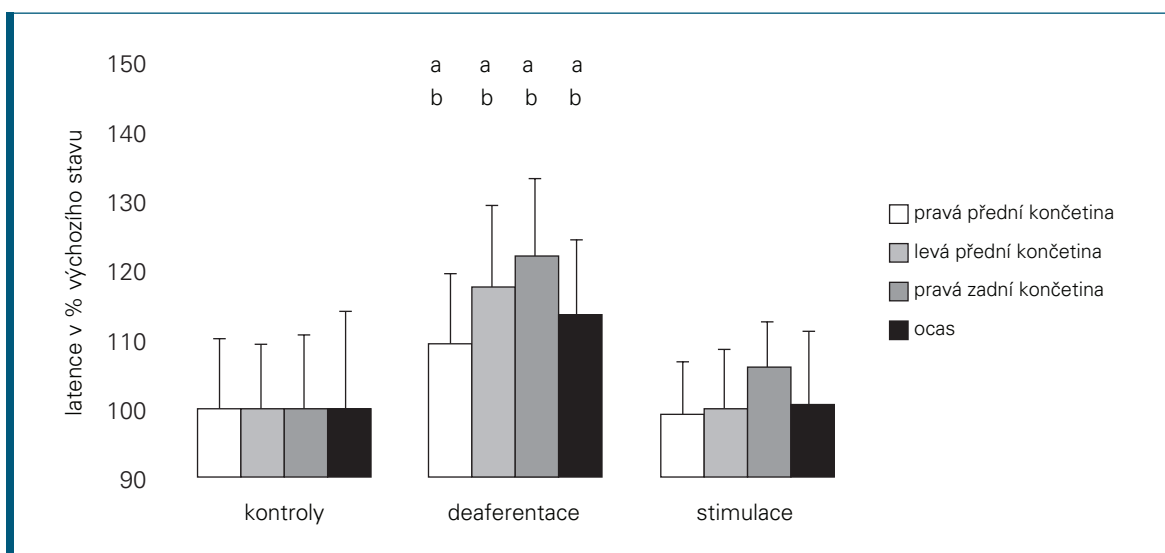
U předních končetin byla situace odlišná. Stimulace sensorimotorické mozkové kůry prodloužila latence z  $3,23 \text{ s} \pm 0,49$  na  $3,41 \text{ s} \pm 0,52$  (hlavní efekt stimulace byl  $F(1,17) = 12,09$ ;  $p = 0,0029$ ). Významný byl v tomto ohledu stranový rozdíl  $F(1,17) = 6,82$ ;  $p = 0,0182$ , který dokumentuje, že korová stimulace ovlivnila především stranu kontralaterální – tedy levou přední končetinu při umístění stimulačních elektrod nad pravou hemisférou. Post hoc Bonferroniho test vykázal  $p = 0,0108$ .

Působení stimulací navozené analgezie na přední končetiny kolísalo v průběhu pokusu (interakce faktorů trend vs. stimulace  $F(4,68) = 2,67$ ;  $p = 0,0391$ ), s vyššími latencemi – a tedy i vyšším prahem pro bolest – po 3 hodinách ( $p = 0,0265$ ) a po 5 hodinách ( $p = 0,0427$ ) stimulace.

**Účinek deaferentace na nocicepci.** Po deaferentaci jsme naměřili vzestup prahu bolesti v plantar testu i v tail flicku ve srovnání se základním stavem. Před deaferentací byla klidová hodnota pro pravou přední končetinu (kontralaterálně vůči deaferentované levé přední končetině),

3,55 s ± 0,35. Za šest týdnů po deaferentaci jsme zaznamenali nárůst na 4,22 s ± 0,51 ( $t = 4,04$ ;  $p = 0,0014$ ). Prahy bolesti pro levou zadní končetinu (ipsilaterálně vůči deaferentované levé přední končetině) byly 3,58 s ± 0,34 před a 4,2 s ± 0,39 po deaferentaci ( $t = 4,25$ ;  $p = 0,0009$ ). Prahy bolesti pro pravou zadní končetinu (kontralaterálně vůči deaferentované levé přední končetině) byly 3,55 s ± 0,38 před a 4,43 s ± 0,59 po deaferentaci ( $t = 5,79$ ;  $p = 0,00006$ ). Latence pro tail flick byly 3,61 s ± 0,5 před a 4,26 s ± 0,43 po deaferentaci ( $t = 3,41$ ;  $p = 0,0046$ ).

**Účinek stimulace na deaferentované zvíře.** Jednocestná ANOVA prokázala u opakovaných měření signifikantní rozdíly mezi porovnávanými výsledky, tj. mezi latencí před deaferentací, po deaferentaci a latencí po stimulaci, a to u všech nociceptivních testů (pro přední končetinu  $F(2,26) = 8,38$ ;  $p = 0,0015$  a pro ocas  $F(2,26) = 7,38$ ;  $p = 0,0029$ ). Výsledky shrnuje **Obr. 2**.

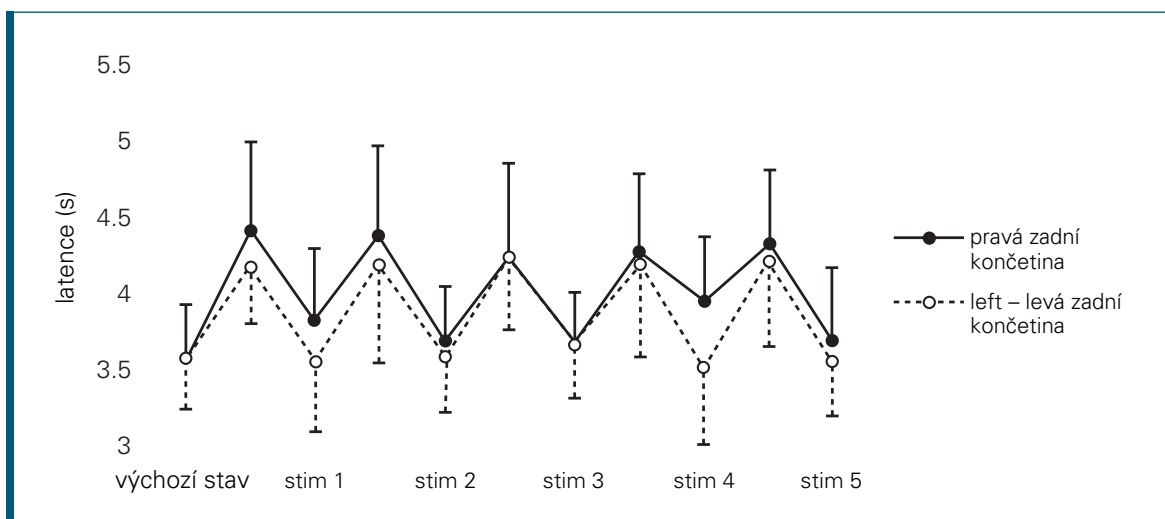


**Obr. 2: Porovnání změn v nocicepci ve zkoumaných oblastech po deaferentaci a po stimulaci, ve srovnání s klidovými hodnotami latencí před deaferentací.**  
**a – signifikantní rozdíl mezi deaferentovanými zvířaty a kontrolami**  
**b – signifikantní rozdíly mezi deaferentací a stimulací**

U všech testovaných končetin a u ocasu stimulace měla za následek opakovaný pokles měřených hodnot prahu bolesti zpět k původním hodnotám před deaferentací.

Podobné výsledky platí i pro zadní končetiny ( $F(2,26) = 27,53$ ;  $p < 0,000001$ ). Porovnání latencí pravostranné a levostranné zadní končetiny ukázalo též signifikantní stranový efekt ( $F(1,13) = 5,63$ ;  $p = 0,0337$ ). Delší byly latence na straně kontralaterální k deaferentované přední končetině. Latence na pravé zadní končetině byly vyšší než na levé zadní končetině po deaferentaci i po stimulaci (interakce faktoru *strana* a *trend*  $F(2,26) = 3,5$ ;  $p = 0,045$ ).

**Efekt opakované stimulace.** Stabilitu působení opakované kontinuální elektrické stimulace jsme testovali prostřednictvím hodnot měřených vždy před a po stimulaci během pěti po sobě jdoucích dnů, kdy byla prováděna stimulace. Účinek opakované stimulace na nocicepci u zadních končetin byl vysoce signifikantní ( $F(1,13) = 75,7$ ;  $p = 0,000001$ ). Změny v latencích po skončení stimulace byly stabilní po celou dobu trvání pokusu, efekt faktoru *trend* nebyl signifikantní ( $F(4,52) = 0,077$ ;  $p = 0,989$ ). Rozdíly mezi latencemi před a po stimulaci byly signifikantní pro každý pokus (**Obr. 3**).



**Obr. 3: Účinek pětihodinové stimulace opakované po dobu pěti po sobě následujících dnů na nocicepci pravé a levé zadní končetiny v plantar testu. Práh bolesti klesá po stimulaci a blíží se k původním klidovým hodnotám. Efekt stimulace mizí v průběhu 24 hodin a prahy bolesti opět stoupají na úroveň před zahájením stimulace. Další stimulace opětovně snížila prahy bolesti. Po deaferentaci jsme zaznamenali delší latence na straně kontralaterální vůči deaferentaci.**

Opakovaná stimulace potvrdila lateralizační efekt deaferentace s vyššími latencemi před a po stimulaci na straně kontralaterální k deaferentované končetině ( $F(1,13) = 9,96$ ;  $p = 0,0076$ ).

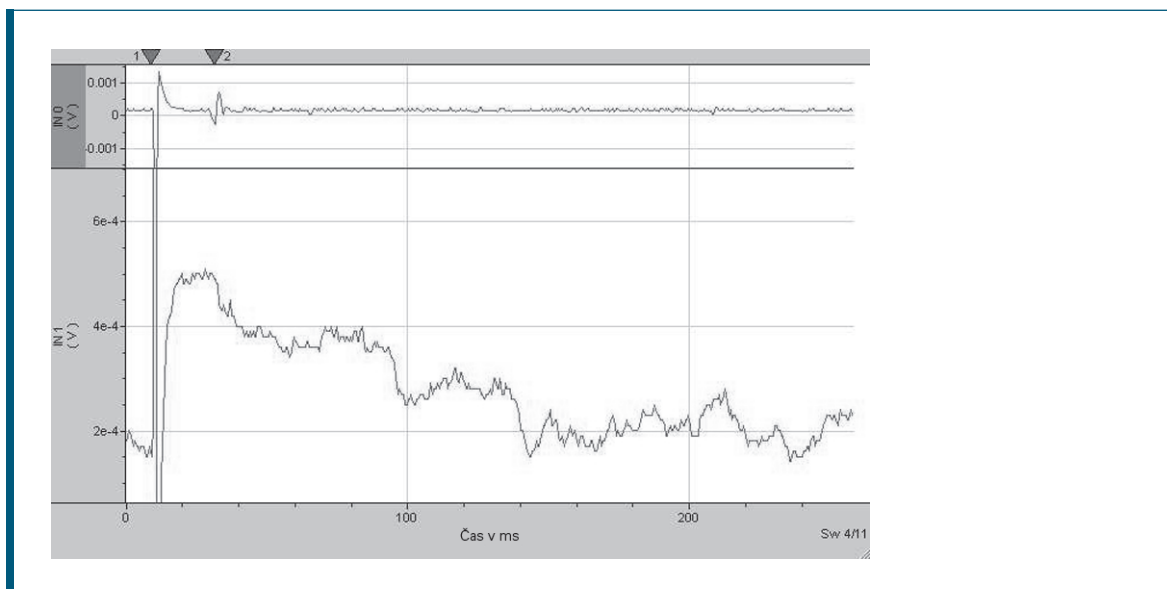
Korová stimulace rovněž snížila latence na přední končetině ( $F(1,13) = 73,55$ ;  $p = 0,000001$ ); nicméně tento pokles navozený stimulací se lišil v jednotlivých dnech stimulace (interakce faktorů *trend* x *stimulace*  $F(4,52) = 2,67$ ;  $p = 0,04226$ ). Efekt stimulace byl signifikantní 1. 3. a 5. den stimulace (Bonferroniho post hoc testy pro jednotlivé případy  $p = 0,000057$ ;  $p = 0,004385$  a  $p = 0,00028$ ).

Podobné byly i výsledky pro tail flick. Stimulace navodila pokles latencí tail flicku ( $F(1,13) = 21,63$ ;  $p = 0,00045$ ) a tento efekt byl v tomto případě stabilní po celou dobu pěti dnů stimulace. I když interakce faktoru *trend* x stimulace byl hraničně signifikantní ( $F(4,52) = 2,22$ ;  $p = 0,0793$ ), podobně jako v případě přední končetiny, pozorované rozdíly mezi latencemi před a po stimulaci byly signifikantní pouze 1. a 5. den stimulace (Bonferroniho post hoc testy pro oba tyto případy  $p = 0,0135$  a  $p = 0,00057$ ).

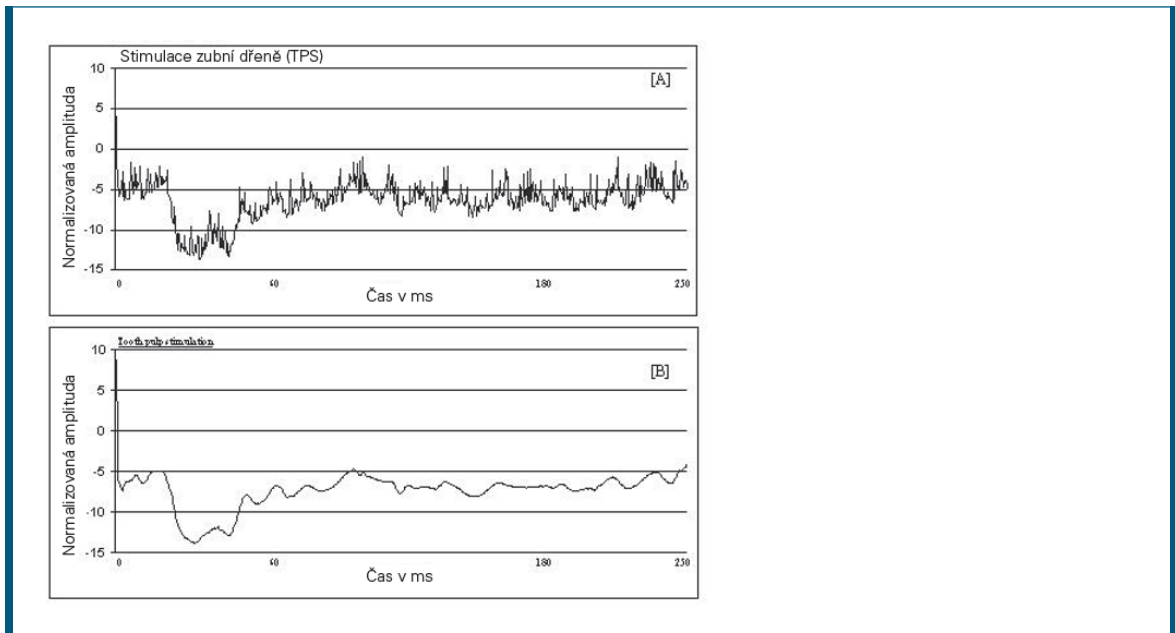
## Neurofyziologický model A

**Analýza evokovaných potenciálů.** Hodnocení výsledků ukázalo, že rekonstruovaný obraz evokovaných potenciálů má všechny základní rysy původní křivky při současném potlačení šumu (**Obr. 4 a–d**), tedy i přes složitou matematickou transformaci zůstala informační hodnota signálu zachována.

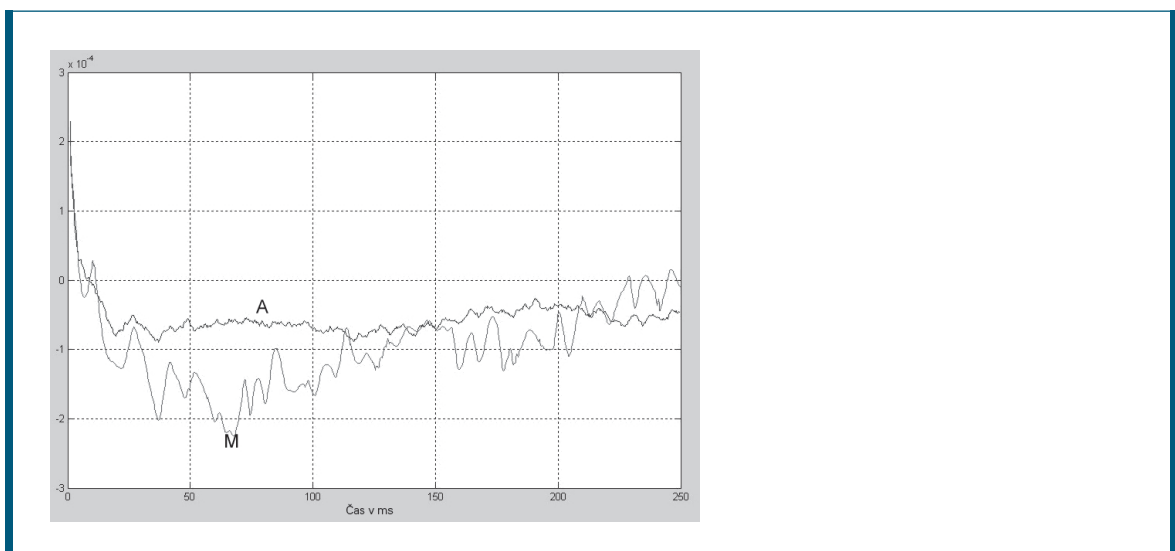
Porovnání metody průměrování („klasické“ zpracování evokovaných potenciálů) a multi-resoluční analýzy (waveletová transformace) potvrdilo, že poměru signálu vůči šumu ( $71\% \pm 22$ ) je signifikantně lepší než při použití klasické metody průměrování signálu ( $t = 4,95$ ;  $p < 0,001$ ).



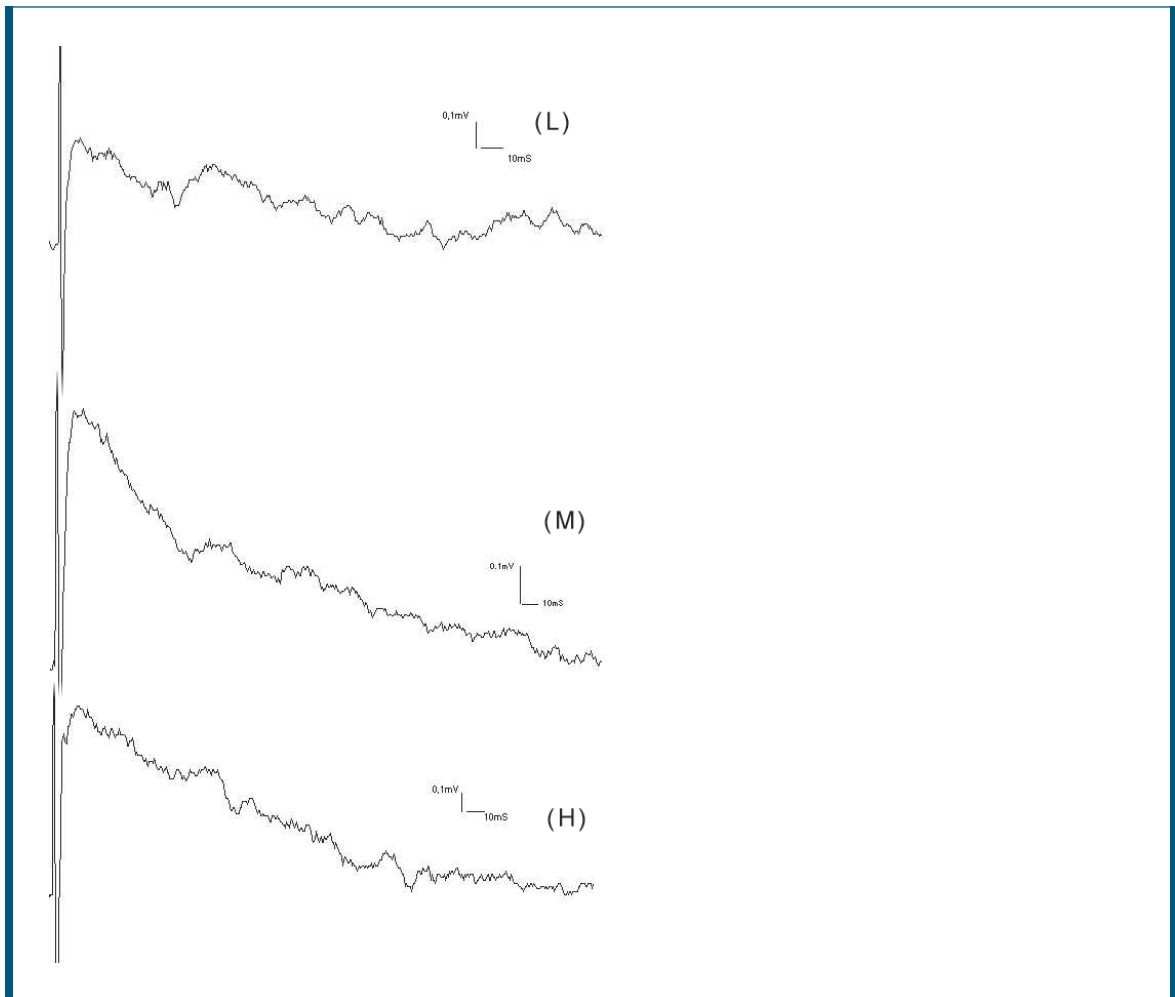
**Obr. 4a:** Křivka EMG (IN0) a korová aktivita (IN1) po stimulaci zubní dřeně o nízké intenzitě. Z obrázku je patrné, že EMG i evokované potenciály byly natáčeny současně.



Obr. 4b: Výsledek zpracování signálu waveletovou transformací. Izolovaná křivka korového evokovaného potenciálu (TPEP) [A] byla transformována a zbavena šumu a následně byl signál rekonstruován do původní podoby, již bez šumu [B]. Hlavní rysy původního signálu zůstávají po waveletové transformaci i nadále zachovány (waveletová transformace je podrobněji popsána v metodice).



Obr. 4c: Efekt odstranění šumu: srovnání výsledku klasického průměrování (A) a waveletové transformace (M). Z porovnání obou obrázků jasně vyplývá, že waveletová transformace poskytuje lepší výsledek při odstranění šumu, aniž by se ztratila kvalita signálu.



**Obr. 4d: S rostoucí intenzitou stimulace zubní dřeně (nízká L, střední M, vysoká H) jsou generovány různé tvary evokovaných potenciálů (L, M a H).**

**Jednorázové stimulační.** Pro všechny modalities stimulace uvádíme TPEP vždy ve vztahu k reflexu JOR, což umožňuje analyzovat, který typ vláken (nemyelinizovaná C vlákna zubní dřeně a/nebo myelinizovaná A vlákna parodontu) jsou v dané chvíli stimulována.

**Reflex otvírání tlamy.** Latenci JOR jsme zjišťovali vždy v závislosti na intenzitě stimulace zubní dřeně (TPS). U všech zvířat jsme zaznamenávali obě složky JOR, rychlou složku v rozmezí 5–8 ms (SL JOR) a pomalou složku (LL JOR) v intervalu 12–20 ms po zahájení stimulace.

**Korové evokované potenciály.** Při nízké intenzitě stimulace zubní dřeně se nad senzori-motorickou kůrou neobjevily žádné měřitelné evokované potenciály. Při nadprahové intenzitě stimulace jsme zaznamenávali TPEP s různými charakteristikami, v závislosti na intenzitě TPS.

Maximum amplitudy TPEP signifikantně ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,01$ ) korelovalo s intenzitou stimulace s výjimkou situace, kdy velmi vysoká intenzita stimulace způsobila stimulační artefakt, který byl tak výrazný, že zcela překryl časné složky evokovaného potenciálu.

Maximální amplitudy TPEP byly značně odlišné u jednotlivých laboratorních zvířat, nicméně nepřesáhly rozmezí 48–53 ms.

Při nízkých intenzitách stimulace jsme vybavili pomalou složku reflexu (LL JOR) a v tomto případě měly korové evokované potenciály (TPEP) dvě fáze:

- časnou složku [0–17 ms] (**Tab. 1**) – tvořenou polyfázickou vlnou N6,5 ± 1,1 ms, P11 ± 1,2 ms a nekonstantně N17 ± 1,2 ms; celý komplex měl nízkou amplitudu (<32 μV ± 10)
- pozdní složku [20–240 ms] (**Tab. 1**) – tvořenou trifázickou vlnou N27 ± 2,9 ms, P53 ± 7,5 ms, N69 ± 5,8 ms, po níž následoval hrot N88 ± 13 ms a oddálená multifázická odpověď v podobě komplexu složek o kolísavé amplitudě N132 ± 4,7 ms, P160 ± 9,7 ms, N204 ± 14,2 ms. Trifázický komplex [N27, P53, N69] se signifikantně (ANOVA a Tukeyho test,  $p < 0,05$ ) lišil v závislosti na intenzitě stimulace (**Tab. 1**) a je v přímém vztahu k pomalé složce JOR (LL JOR), odpovídá tedy stimulaci nemyelinizovaných C vláken zubní dřeně.

Intenzita stimulace	TPEPs									
	N6.5	P11.1	N17.2	N27*	P53*	N69	P88	N132	P160	N204
nízká	N6.5	P11.1	N17.2	N27*	P53*	N69	P88	N132	P160	N204
sd	1.1	1.2	1.2	2.9	7.4	13	4.7	4.7	9.7	14.2
střední	N7.6	P11.2	N17.1	N23	P48	–	P87	N125	P155	N220
sd	1.6	1.3	1	2.47	6.8	–	3.6	13.7	6.6	12.3
vysoká	N6.0	P10.7	N16.5	N22	P51	–	PN73	N124	P161	N216
sd	0.8	1.4	1.4	3.52	9.7	–	7.2	4.3	17.2	16.3

**Tab. 1: Komplexy evokovaných potenciálů získaných stimulací zubní dřeně (TPEP), v tabulce jsou uvedeny průměrné latence (v ms) a směrodatné odchylky (sd) jednotlivých komplexů TPEP. Nízká intenzita stimulace odpovídá na EMG pomalé složce reflexu otvírání tlamy (LL JOR), střední hodnoty oběma složkám (SL + LL JOR) a vysoké intenzity stimulace vyvolaly pouze rychlou složku (SL JOR). Při nízkých intenzitách stimulace zubní dřeně (TPS), odpovídající pouze pomalé složce reflexu otvírání tlamy (LL JOR) zaznamenaném elektrodou v m. digastricus, se hroty N27 a P53 od sebe signifikantně lišily (\*), při středních a vysokých intenzitách TPS je vlna N69 nepřítomna**



Při intermediárních hodnotách stimulace pulpy jsme registrovali obě složky JOR, pomalou i rychlou (SL + LL JOR). Korové evokované potenciály TPEP měly následující podobu:

- časnou složku s nízkou amplitudou ( $<32 \mu\text{V} \pm 10$ ) tvořenou třemi vrcholy [N7,6  $\pm$  1,6 ms, P11,2  $\pm$  1,3 ms, N17,1  $\pm$  1 ms] (**Tab. 1**), po nichž následovala bifázická křivka [N23  $\pm$  2,5 ms, P48  $\pm$  6,8 ms]
- polyfázickou pozdní složku v podobě komplexní sady hrotů o variabilní amplitudě [P87  $\pm$  3,6 ms, N125  $\pm$  13,7 ms, P155  $\pm$  6,6 ms, N220  $\pm$  12,3 ms] (**Tab. 1**)

Při stimulaci pulpy o vysoké intenzitě jsme zaznamenali pouze rychlou složku JOR (SL JOR). V tomto případě vypadaly korové evokované potenciály TPEP takto:

- časná složka o nízké amplitudě ( $<32 \mu\text{V} \pm 10$ ) se skládala z komplexu [N6  $\pm$  0,8 ms, P10,7  $\pm$  1,4 ms, N16,5  $\pm$  1,4 ms] (**Tab. 1**), po němž následovala bifázická odpověď [N22  $\pm$  3,5 ms, P51  $\pm$  9,7 ms]
- pozdní polyfázický komplex měl opět řadu hrotů o variabilní amplitudě [P73  $\pm$  7,2 ms, N124  $\pm$  4,3 ms, P161  $\pm$  17,2 ms, N216  $\pm$  16,3 ms] (**Tab. 1**)

Velmi časnou složku TPEP, která se objevovala v rozmezí [0–20 ms], jsme nacházeli ve všech případech, bez ohledu na jednotlivé složky JOR.

**Stimulace s podmiňováním.** Pro přehlednost uvádíme v první části odpovědi na úrovni reflexu otvírání tlamy a v druhé části analýzu korových evokovaných potenciálů.

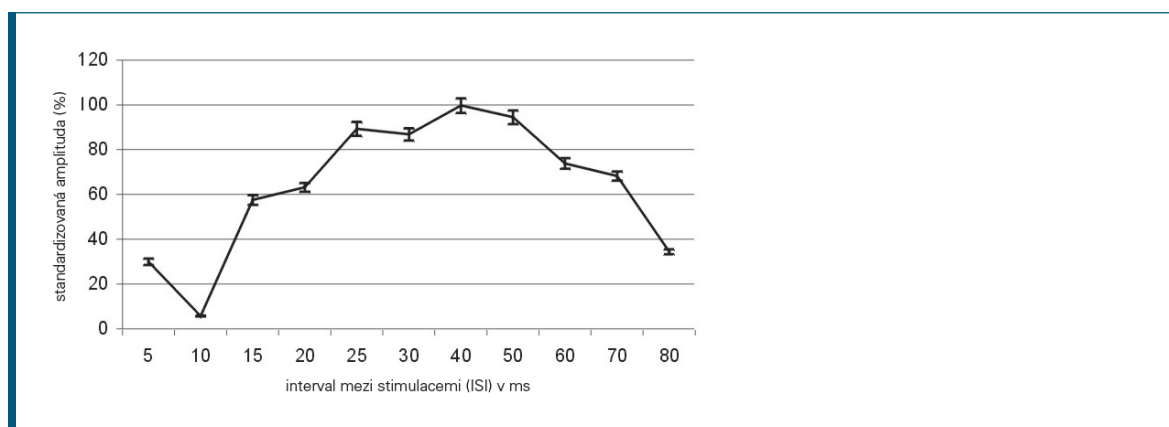
**Reflex otvírání tlamy.** V tomto případě vznikaly tři různé situace:

- 1) když úvodní impuls vyvolal JOR s rychlou složkou (SL JOR) a intenzita stimulačního impulsu byla nastavena tak, aby za standardních podmínek vyvolávala JOR s pomalou složkou (LL JOR), výsledkem bylo v tomto případě přítomnost **obou** složek JOR (SL + LL JOR).
- 2) když jsme snižovali interval mezi úvodním a stimulačním impulzem (tedy interstimulační interval ISI) a postupovali stejně jako v předchozím případě, pokud jde o intenzity stimulace, výsledkem byl:
  - nárůst amplitudy rychlé složky reflexu (SL JOR) při ISI =  $40 \pm 3,2$  ms.
  - poté pokles k prahové hodnotě při ISI =  $10 \pm 0,2$  ms (**Obr. 5a**).
  - zároveň pomalá složka reflexu (LL JOR) prokazovala skokový nárůst amplitudy dokud se interstimulační interval nepřiblížil hodnotě ISI =  $25 \pm 9,1$  ms (**Obr. 5b**).

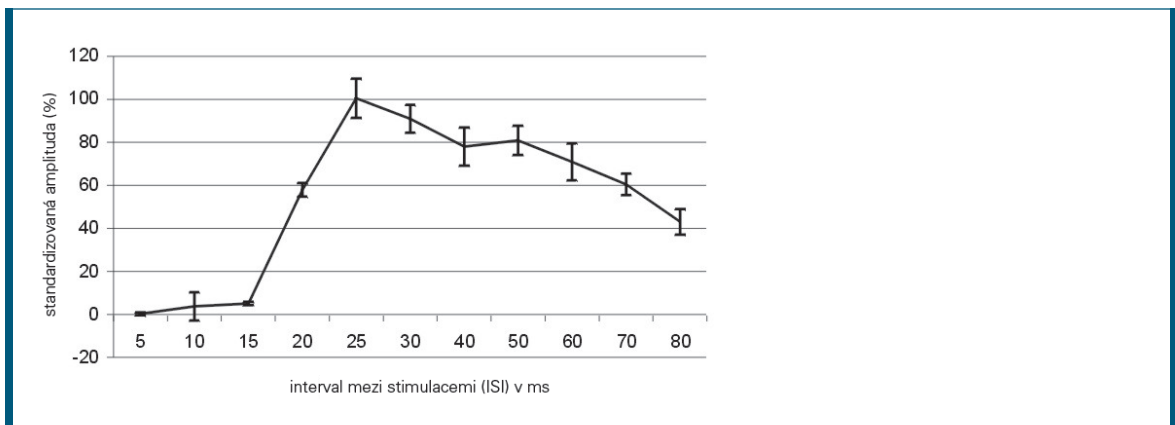
3) když úvodní impulz vyvolal rychlou složku reflexu (SL JOR) a intenzita stimulačního impulzu byla nastavena tak, aby za standardních podmínek vyvolávala JOR s rychlou složkou (SL JOR), výsledkem byla v tomto případě přítomnost **pouze rychlé** složky (SL JOR).

- tento typ odpovědi se změnil při zkrácení intervalu ISI pod 45 ms (**Obr. 6, 7**). Při poklesu ISI pod  $35 \text{ ms} \pm 7,4$  se objevil nečekaný reflex s pomalou složkou (LL JOR) po testovací stimulaci TPS (**Obr. 6a, b**).
- amplituda zmiňované pomalé složky (LL JOR – viz předchozí bod) dosáhla maxima při ISI =  $9 \pm 0,7$  ms (**Obr. 6c**) a pak se postupně vytrácela (**Obr. 6d**). Zároveň klesala amplituda rychlé složky (SL JOR) až k prahové hodnotě při ISI = 5 ms (**Obr. 7**).

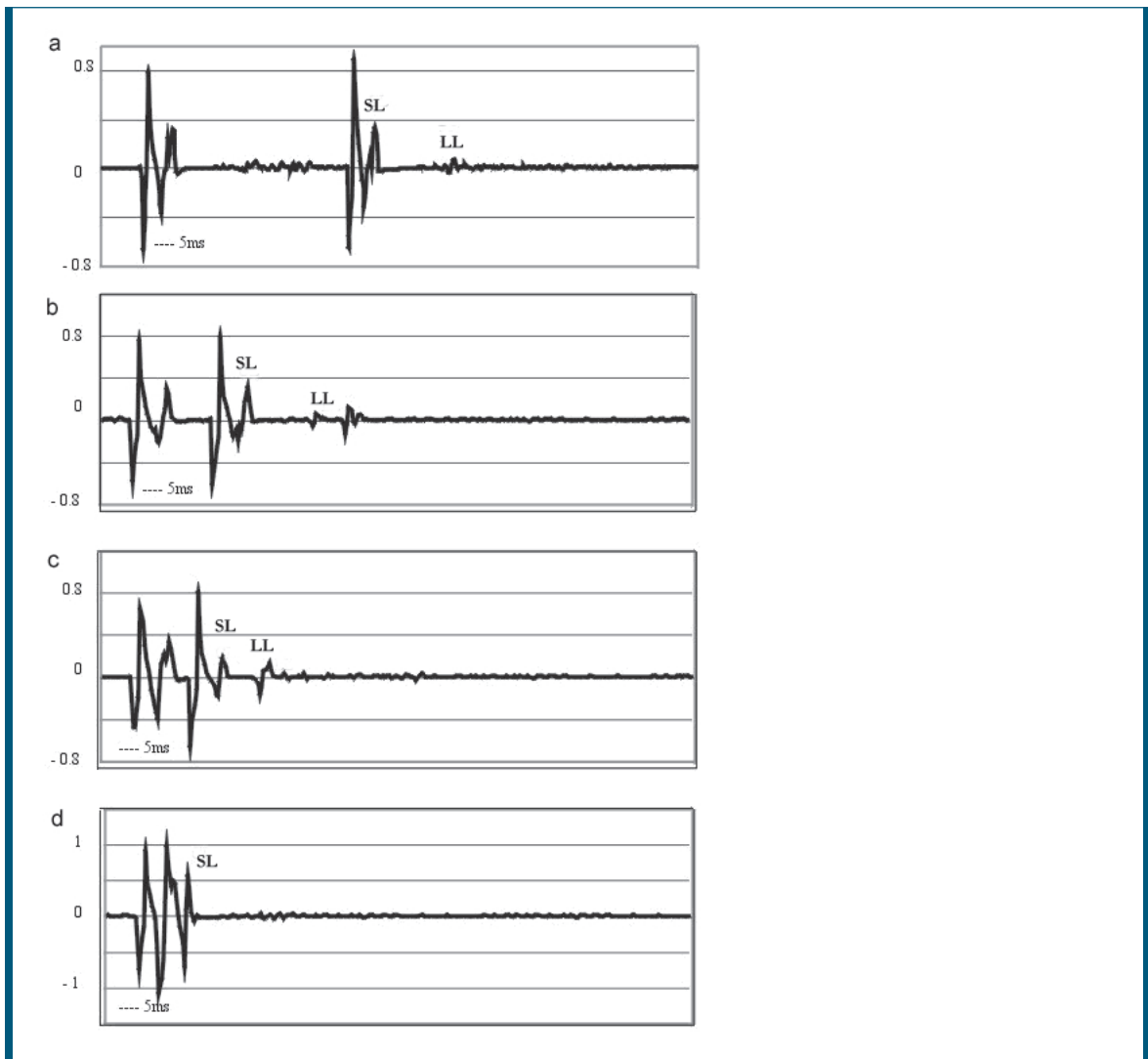
**Korové evokované potenciály.** Účinek podmiňování na korové potenciály jsme zkoumali u pěti zvířat. Při nízké intenzitě stimulace zubní dřeně se v souladu s předchozím pozorováním neobjevily nad sensorimotorickou kůrou žádné měřitelné evokované potenciály. Při intenzitě podmiňující stimulace, která vyvolala rychlou složku reflexu (SL JOR) v kombinaci s testovací stimulací vyvolávající rovněž rychlou složku reflexu (SL JOR) jsme zaznamenali korovou odpověď s maximem N30 po úvodním stimulu. Se zkracováním intervalu ISI amplituda vlny N30 narůstala s maximem při ISI =  $26 \text{ ms} \pm 6,2$  a pak amplituda N30 klesala, až postupně vlna zcela vymizela (ISI <  $10 \text{ ms} \pm 4,1$ ).



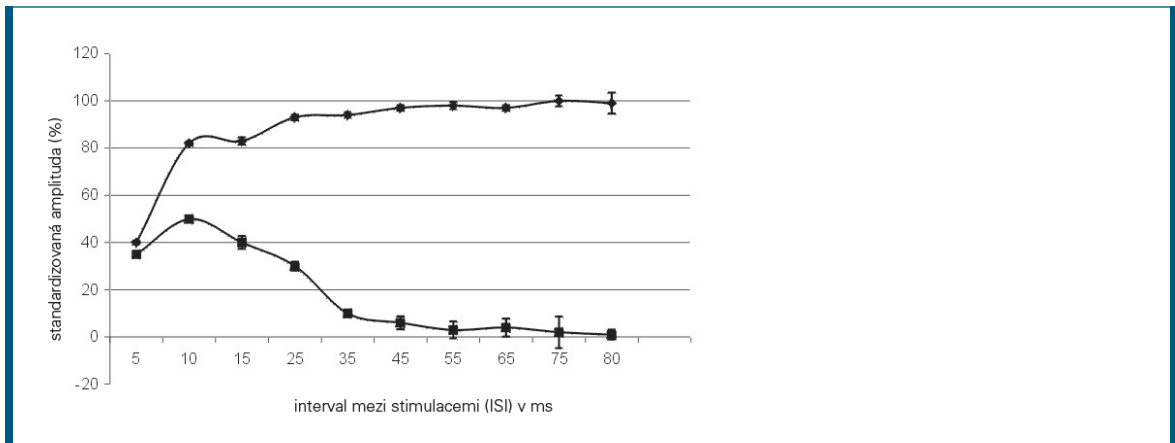
**Obr. 5a: Proměny latence rychlé složky reflexu otvírání tlamy (SL JOR) při stimulaci s podmiňováním, nízká intenzita stimulace zubní dřeně (v obrázku znázorněny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky). Během zkracování interstimulačního intervalu (ISI) z výchozí hodnoty 80 ms (vpravo) standardizovaná amplituda SL JOR narůstá, maxima dosahuje v intervalu  $40 \pm 3,2$  ms mezi oběma stimulemi, pak amplituda opět klesá až do  $10 \pm 0,2$  ms (vlevo).**



**Obr. 5b: Proměny latence pomalé složky reflexu otvírání tlamy (LL JOR) při stimulaci s podmiňováním, nízká intenzita stimulace zubní dřeně (v obrázku znázorněny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky). Během zkracování interstimulačního intervalu (ISI) z výchozí hodnoty 80 ms (vpravo) standardizovaná amplituda LL JOR narůstá, maxima dosahuje v intervalu  $25 \pm 9,1$  ms mezi oběma stimulacemi, pak amplituda opět klesá až do  $10 \pm 6,5$  ms (vlevo).**



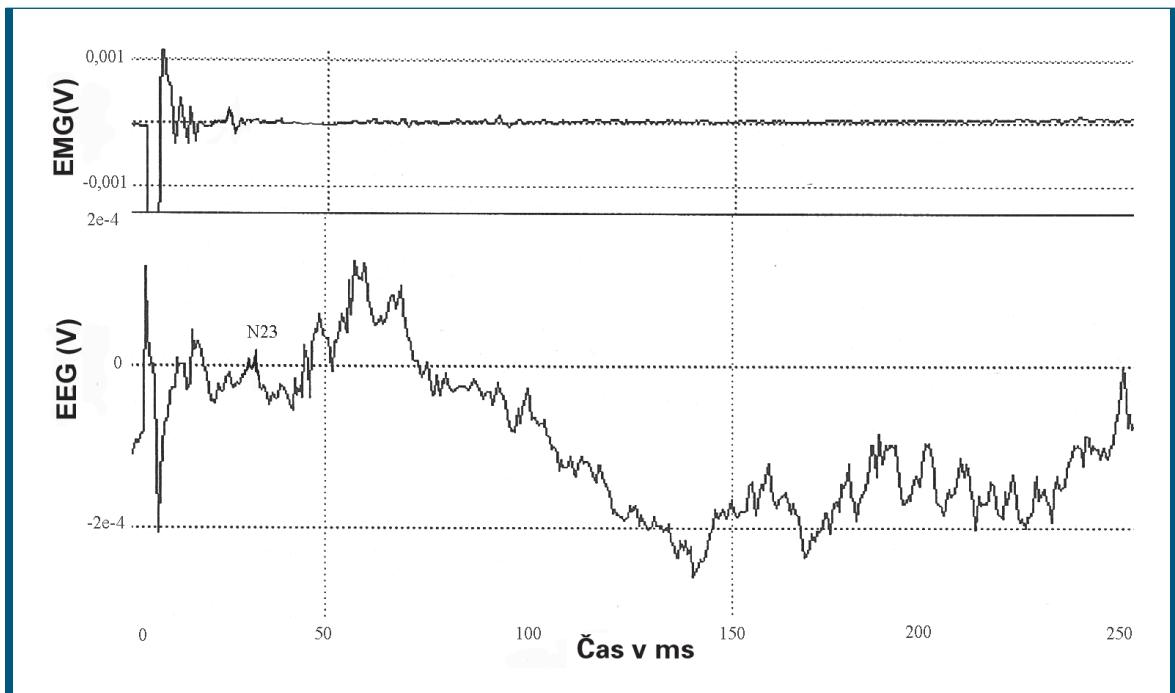
Obr. 6: Interakce obou složek reflexu otvírání tlamy (SL +LL JOR) při stimulaci s podmiňováním, vysoká intenzita stimulace. Během zkracování intervalu mezi stimulacemi (ISI) 30 ms (Obr. 6a), 15 ms (Obr. 6b), 10 ms (Obr. 6c) a 5 ms (Obr. 6d) se mění amplitudy obou složek reflexu. Pomalá složka (LL JOR) se objevuje při ISI nad 32 ms. Se zkracováním ISI nejdříve amplituda LL JOR narůstá a dosahuje maxima při ISI = 9 ms, s dalším zkracováním ISI však začíná klesat, až vymizí při ISI < 5 ms. Zároveň s tím, jak se zkracuje interval mezi stimulacemi (ISI), se mění i amplituda rychlé složky reflexu (SL JOR), ale s opačným trendem, nejdříve se zmenšuje a následně opět narůstá.



**Obr. 7:** Interakce pomalé složky (LL JOR – čtverečky) a rychlé složky (SL JOR – kolečka) reflexu otvírání tlamy při stimulaci s podmiňováním, vysoká intenzita stimulace. Během zkracování intervalu mezi stimulacemi (ISI) klesá amplituda SL JOR, zatímco amplituda LL JOR zpočátku narůstá, pak ale začíná postupně klesat (zprava doleva).

## Neurofyziologický model B

**Evokované potenciály.** Podobně jako v předchozím pokusu (neurofyziologický model A) jsme při různých intenzitách stimulace zubní dřeně (TPS) pozorovali různé odpovědi reflexu otvírání tlamy (JOR) na úrovni m. digastricus a různé podoby korových evokovaných potenciálů (TPEP) (**Obr. 8**).

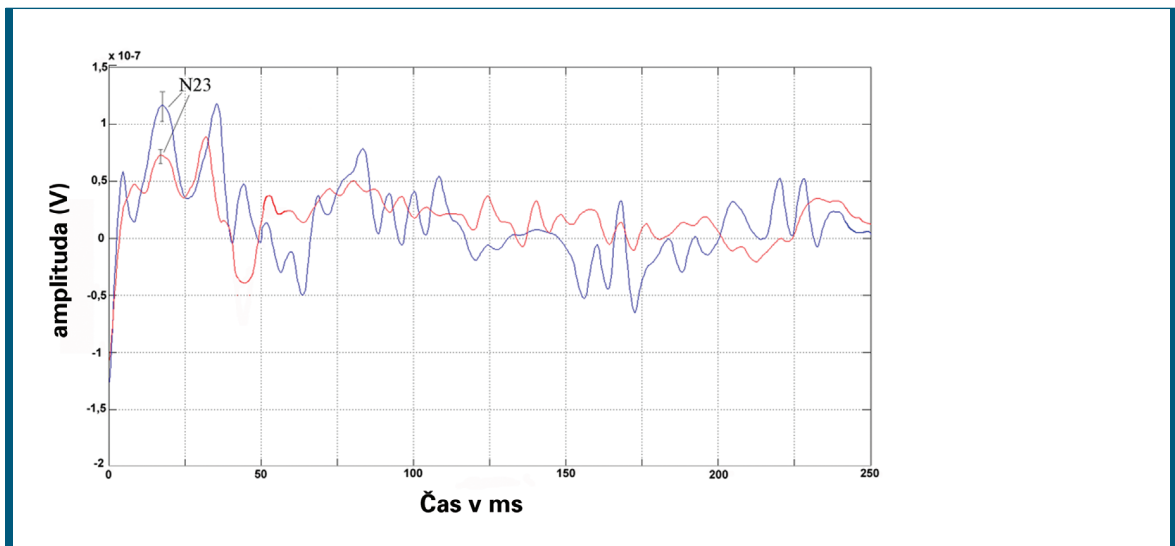


**Obr. 8: Odpovědi vyvolané jednorázovou stimulací zubní dřeně, zaznamenané na úrovni m.digastricus (reflex otvírání tlamy JOR- EMG kanál, nahoře) a na úrovni mozkové kůry (TPEP: EEG kanál, dole). Oba záznamy jsou pořízeny současně, doba snímání je 250 ms a amplituda je ve V.**

Při nízkých intenzitách TPS jsme zaznamenali pomalou složku reflexu (LL JOR) s průměrnou latencí 16 ms, střední intenzita stimulace vyvolala obě složky (SL + LL JOR) a posléze při vysoké intenzitě stimulace zubní dřeně jsme vyvolali pouze rychlou složku (SL JOR) s průměrnou latencí 6 ms.

Získané korové evokované potenciály (TPEP) měly na začátku stimulační artefakt mezi 0 a 17 ms. Následoval buď trifázický komplex (N27, P53, N69) při nízkých stimulačních intenzitách nebo bifázické časné komplexy (N23, P48) a (N22, P51) při středních a vyšších intenzitách stimulace (TPS). Ve všech případech, bez ohledu na intenzitu stimulace, následoval s časovým odstupem polyfázický komplex složený z několika hrotů o variabilní amplitudě (**Obr. 9**).

Získané hodnoty jsou zcela srovnatelné s těmi, které jsme získali v předchozím pokusu (neurofyziologický model A). V tomto pokusu jsme věnovali pozornost především časnému komplexu.



**Obr. 9: Průměr ze 128 křivek TPEP po waveletové transformaci, získané po stimulaci zubní dřeně (TPS) před (modře) a po pěti hodinách (červeně) kontinuální korové stimulace o frekvenci 60 Hz (skupina 60). Na obrázku je vidět významný pokles amplitudy vlny N23.**

Maximální amplitudu TPEP jsme zaznamenali po 27 ms při nízké intenzitě stimulace, po 23 ms při střední intenzitě a po 22 ms při vysoké intenzitě TPS. Maximální amplituda se pohybovala v rozpětí 75 – 250  $\mu\text{V}$ . Průměrná hodnota maximální amplitudy byla 87  $\mu\text{V}$  pro nízkou intenzitu, 150  $\mu\text{V}$  pro střední a 210  $\mu\text{V}$  pro vysokou intenzitu stimulace zubní dřeně (TPS).

Distribuce amplitudy hrotů korelovala s intenzitou stimulace zubní dřeně (TPS) – ( $r = 0,96$ ;  $p < 0,01$ ).

**Vliv korové stimulace na evokované potenciály.** Výsledky pro obě stimulované skupiny (frekvence 60 Hz a frekvence 40 Hz) jsou patrné na **Obr. 10 a 11**. Evokované potenciály jsme hodnotili odděleně po 1, 3 a 5 hodinách kontinuální stimulace a výsledky jsme porovnávali s hodnotami naměřenými u téhož zvířete před korovou stimulací.

**Korová stimulace a latence evokovaných potenciálů.** Bez ohledu na to, jakou jsme použili intenzitu stimulace, jsme nepozorovali žádnou signifikantní variaci v latenci TPEP. Rovněž tak se změna frekvence kontinuální korové stimulace neprojevila na latenci evokovaných potenciálů (TPEP) měřených po ukončení stimulace.

### **Korová stimulace a maximální amplituda TPEP.**

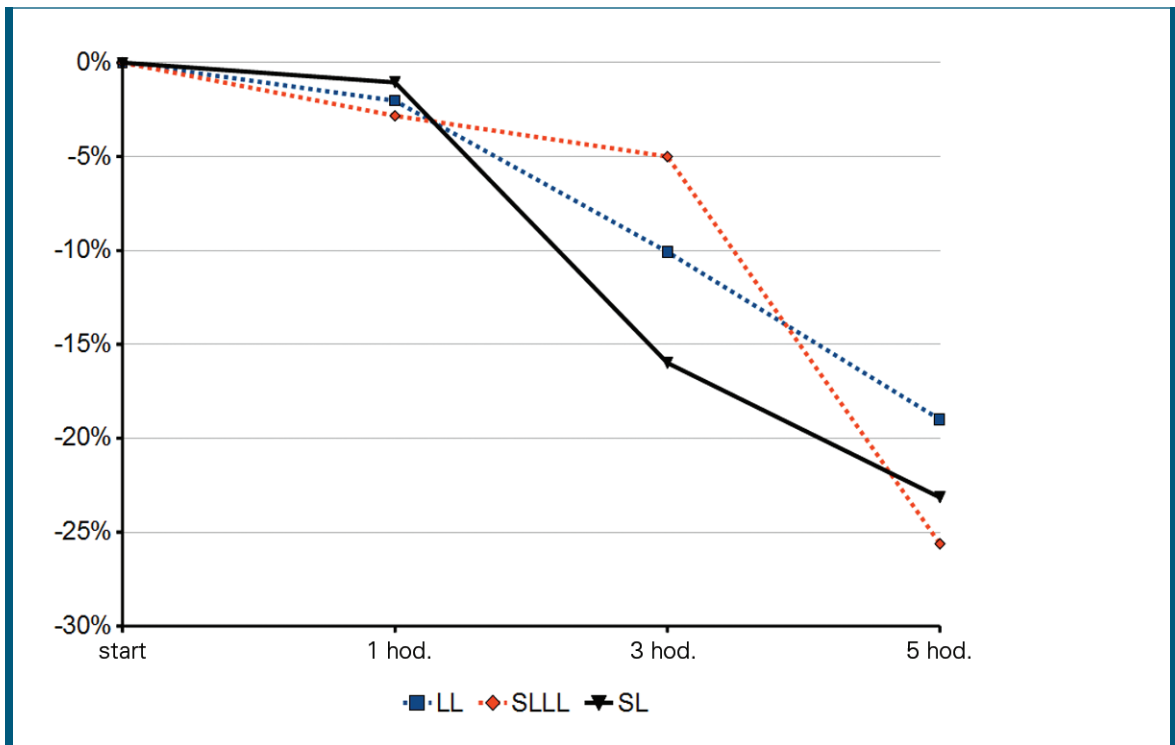
- Při nízkých intenzitách TPS (vyvolávající pomalou složku reflexu – LL JOR) jsme pozorovali progresivní pokles maximální amplitudy v závislosti na délce korové stimulace (**Obr. 10**). V obou skupinách (skupiny 60 a 40) se tento pokles stal významným po 5 hodinách kontinuální korové elektrické stimulace ( $-19\% \pm 2,26$  pro skupinu 60 a  $-6,34\% \pm 2,16$  pro skupinu 40).
- Při středních hodnotách TPS (což odpovídá generování současně rychlé i pomalé složky reflexu – SL + LL JOR) jsme obdrželi podobné výsledky. Ve skupině 60 jsme našli významný pokles ( $-25,62\% \pm 5,03$ ) amplitudy hlavního hrotu časné odpovědi již po 3 hodinách stimulace. Ve skupině 40 amplituda hrotu N23 poklesla významně ( $-7,99\% \pm 4,07$ ) až po 5 hodinách kontinuální korové stimulace.
- Podobná byla i odezva na vysokou intenzitu stimulace zubní dřeně (TPS) vyvolávající pouze rychlou složku reflexu (SL JOR). V obou sledovaných skupinách (skupina 60 i 40) jsme pozorovali významný pokles v amplitudě vlny N22 po 5 hodinách kontinuální korové stimulace ( $-23,15\% \pm 7,03$  při 60 Hz a  $-9,66\% \pm 4,96$  při 40 Hz).

V kontrolní skupině jsme nenalezli významné změny v latenci ani v amplitudě evokovaných potenciálů, a to bez ohledu na intenzitu stimulace zubní dřeně (TPS).

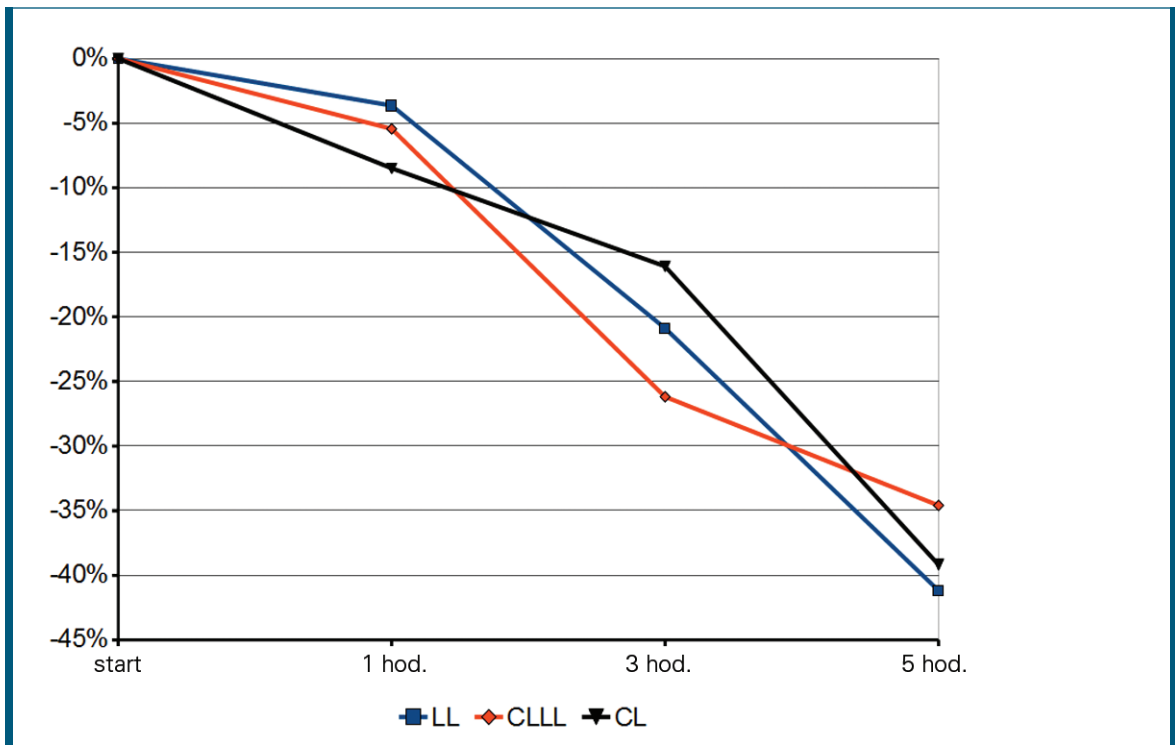
**Korová stimulace a integrace křivky evokovaných potenciálů.** Při analýze integrace evokovaných potenciálů byl patrný podobný trend jako pro amplitudu. Bez ohledu na intenzitu stimulace zubní dřeně (TPS) a frekvenci korové stimulace (60 Hz nebo 40 Hz) klesala integrace významně po 5 hodinách kontinuální korové stimulace (**Obr. 11**).

V kontrolní skupině jsme nenalezli významné změny v integraci evokovaných potenciálů, a to bez ohledu na intenzitu stimulace zubní dřeně (TPS).





Obr. 10: Variace a směrodatné odchylky maximální amplitudy TPEP po stimulaci v procentech. Potenciály byly natočeny po stimulaci zubní dřeně nad senzomotorickou kůrou po 1 hodině, 3 a 5 hodinách kontinuální elektrické stimulace o frekvenci 60Hz (skupina 60) v korelaci s jednotlivými složkami reflexu otvírání tlamy – pomalou (LL JOR), oběma (SL + LL) a rychlou (SL JOR). Signifikantní rozdíly se objevily po 5 hodinách kontinuální korové stimulace (pokles zaznamenaný po 1 hodině a po 3 hodinách ještě nedosahuje statistické významnosti).



Obr. 11: Variace a směrodatné odchylky integrace TPEP po stimulaci v procentech. Potenciály byly natočeny po stimulaci zubní dřeně nad sensorimotorickou kůrou po 1 hodině, 3 a 5 hodinách kontinuální elektrické stimulace o frekvenci 60Hz (skupina 60) v korelaci s jednotlivými složkami reflexu otvírání tlamy – pomalou (LL JOR), oběma (SL + LL) a rychlou (SL JOR). Signifikantní rozdíly se objevily po 5 hodinách kontinuální korové stimulace (pokles zaznamenaný po 1hodině a po 3 hodinách ještě nedosahuje statistické významnosti).

Vzhledem ke komplikované struktuře pokusů a množství získaných výsledků je pro větší přehlednost tato kapitola rozdělena do dvou částí. V první části je detailně pojednáno o aspektech týkajících se jednotlivých experimentů. Druhá, syntetická část, umožní shrnout hlavní zjištěné poznatky a utřídit je v podobě několika souhrnných bodů.

## Behaviorální model

Hlavní zjištění, které tento experiment přinesl, jsou následující:

- I. Stimulace sensorimotorické kůry u zdravého zvířete neovlivňuje práh bolesti na končetinách, s výjimkou kontralaterální přední končetiny.**
- II. Deaferentace zvyšuje latence reakcí po bolestivé stimulaci.**
- III. Stimulace sensorimotorické kůry vrací zvýšené latence zpět na původní hodnotu (odpovídající klidové hodnotě před deaferentací).**
- IV. Účinek korové stimulace u deaferentovaných zvířat odeznívá do 24 hodin.**
- V. Účinek korové stimulace na deaferentované zvíře je kolísavý a proměnlivý.**

V další části jsou zmíněná zjištění diskutována bod po bodu.

**Korová stimulace u zdravých jedinců.** Při stimulaci sensorimotorické kůry jsme nepozorovali žádné změny v percepční prahu bolesti pro obě zadní končetiny a pravou přední končetinu.

Při měření prahu bolesti na levé přední končetině před a po stimulaci jsme zjistili zvýšení prahu pro bolest v důsledku korové stimulace. Nález je v dobré korelaci s umístěním stimulační elektrody nad kontralaterální sensorimotorickou kůrou v projekční oblasti pro přední končetinu.

Toto zjištění je rovněž v souladu s publikovanými údaji o zvýšení prahu citlivosti na chlad po vysokofrekvenční repetitivní transkraniální magnetické stimulaci u člověka (*Summers et al. 2004*). Tento typ stimulace má podobné účinky jako elektrická korová stimulace a používá se někdy v praxi jako test před implantací elektrody pro stimulaci motorické kůry u lidí (*Lefaucheur et al. 2001*).

**Deaferentace a práh bolesti.** V pokusu jsme použili deaferentaci zadních rohů míšních technikou dorzální rhizotomie jako model kauzalgie. Deaferentace v naší studii zvýšila odolnost vůči termickému bolestivému podnětu aplikovanému na volně pohyblivé a plně inervované končetiny.

V literatuře byl popsán obdobný nárůst prahu pro bolest po deaferentaci (*Kayser et al. 1990*). Tento nárůst byl jen přechodný a autoři jej dávají do souvislosti se ztrátou tonické aferentace (z deaferentované končetiny) do míchy. Důsledkem bude pokles bazálních výbojů míšních inter-neuronů v celé míše a následně musí intaktní periferní neurony z ostatních končetin vyvinout větší aktivitu, aby mohly účelně „spustit“ druhý neuron ve spinotalamické dráze.

V našem souboru byl však účinek deaferentace spíše dlouhotrvající. To může být způsobeno skutečností, že u potkanů není práh bolesti v čase stabilní. Během desetidenního sledování po unilaterální deaferentaci (*Kříž et al. 1998*) byly pozorovány simultánní oscilace v automutilačním chování zároveň s kolísáním v latencích tail-flick (latence byly nejnižší v obdobích výrazné automutilace).

V souladu s dalšími publikovanými údaji (*Kayser et al. 1990*) jsme pozorovali vyšší práh bolesti na zadní končetině kontralaterálně k místu deaferentace. Tento účinek byl zcela stabilní a pozorovali jsme jej jak před korovou stimulací, tak po jejím skončení. Výsledky naší studie nám však neumožňují jednoznačně uzavřít, zda příčinou je změněná aktivita neuronů zadních rohů míšních, které jsou pod vlivem descendentních antinociceptivních drah, nebo zda je nutné hledat příčinu ve změněné aktivitě motoneuronů předních rohů míšních, které mohou být rovněž ovlivněny dorsální rhizotomií (*Cuppini et al. 1999*).

U člověka bylo prokázáno, že po avulzi brachiálního plexu se rozvíjí chronická bolest (*Mailis 1996, Nashold et al. 1991, Pagni et al. 1993*). Z klinického pohledu jsou velmi rozdílné názory na to, jak chronická bolest ovlivňuje práh bolesti na nepostižené straně. Někteří autoři popsali zvýšení prahu pro bolest u pacientů s chronickou bolestí (*Yang et al. 1985, Peters et al. 1992*), jiní naopak našli u svých pacientů snížení prahu bolesti v důsledku chronické bolesti (*Langemark et al. 1993, Bendtsen et al. 1996*).

Zdá se, že prahy bolesti závisí na typu bolesti. Autotomie, která byla popsána po extenzivní dorzální rhizotomii (*Basbaum 1974*) se v našem souboru nevyskytla, což může souviset s ketaminovou anestézií, kterou jsme použili v rámci deaferentačního zákroku (*Vaculín et al. 2004*).

**Korová stimulace a práh bolesti po deaferentaci.** Hlavním zjištěním našeho experimentu je skutečnost, že prahy bolesti, které byly ovlivněny deaferentací, se působením stimulace sensorimotorické kůry přechodně a opakovaně vracejí na úroveň, kterou měly před deaferentací.

Působení korové stimulace vyhasíná v průběhu 24 hodin. Toto zjištění odpovídá publikovaným údajům z klinických studií, které popisují právě tento přechodný ráz (*Nguyen et al. 1999*).

Tyto výsledky jsou o to zajímavější, pokud vezmeme v úvahu rozdíly v anatomii mozkové kůry mezi člověkem a potkanem. Výrazně členění kůry do závitů u člověka (gyrencephalon) je provázáno striktním oddělením motorických oblastí od somatosenzorických oblastí centrální rýhou (sulcus centralis Rolandi). Potkan naproti tomu má závitů málo (lisencephalon) a korové oblasti motorické a sensorické jsou vzájemně promíchány (*Kolb 1990, Paxinos et al. 2007*).

Pouze jediná publikovaná studie se zabývá vlivem stimulace motorické kůry na práh bolesti u člověka (*Drouot et al. 2002*). U pacientů s částečnou ztrátou cití poklesl působením stimulace motorické kůry práh pro bolestivé tepelné podněty na kontralaterální straně. Ačkoliv tento efekt nebyl statisticky signifikantní, a v článku navíc nejsou uvedeny základní prahové hodnoty, přesto tato studie podporuje hypotézu o podobném účinku stimulace motorické kůry na člověka a na zvířata.

Detailní analýza účinku opakované korové stimulace na nocicepci v našem souboru ukázala, že míra potlačení bolesti kolísala ve dvoudenních intervalech. Působení stimulace bylo nejvýraznější v prvním, třetím a pátém dnu stimulace. Podobné výsledky byly publikovány (*Caggiula et al. 1998, Kucinski et al. 1998*) při zkoumání účinku opakovaného podávání kokainu nebo morfinu v rámci šokové hypoalgie.

Jednodenní stimulační interval s podprahovou intenzitou stimulace, který jsme použili v naší studii, má blízko k paradigmatu kindlingu, ačkoliv délka stimulace a stimulované oblasti jsou odlišné. Lze totiž předpokládat, že proces rozvoje chronické bolesti může mít – podobně jako kupříkladu některé epileptické syndromy – v sobě prvky kindlingu (*Post 2002*).

## Neurofyziologický model A

Hlavní zjištění v této části studie jsou následující:

- I. S rostoucí intenzitou stimulace zubní dřeně lze spolehlivě odlišit obě složky reflexu otvírání tlamy, pomalou (LL JOR) a rychlou (SL JOR).**
- II. Pomalá složka reflexu (LL JOR) odpovídá aktivaci nociceptivních nemyelinizovaných C vláken zubní dřeně.**
- III. Rychlá složka reflexu (SL JOR), odpovídající aktivitě interneuronů zprostředkované myelinizovanými A vlákny z parodontu, má inhibiční dopad na nociceptivní aferenci ze zubní dřeně. Tento efekt lze zesílit nebo oslabit podmiňováním.**
- IV. Korelát nociceptivní aference ze zubní dřeně je v komplexu korových evokovaných potenciálů (TPEP) vlna N27 (při nízkých intenzitách stimulace se objevuje s latencí 27 ms po TPS), respektive N23 (při středních a vysokých intenzitách stimulace se vlna objevuje s latencí 23 ms po TPS).**
- V. Vlna N27 jako korelát nocicepce odpovídá srovnatelným pozorováním v literatuře (zejména ve farmakologických studiích).**

Interpretace korových evokovaných potenciálů s nízkým poměrem mezi signálem a šumem je náročným úkolem, pokud jsou navíc evokované potenciály částečně překryty kontinuální EEG aktivitou.

Somatosenzorické evokované potenciály jsou ve své podstatě komplexní a tranzitorní nestacionární signály (tj. bez přímého sepětí času a stimulu). Digitální filtrace těchto signálů je poměrně komplikovaným procesem. Zprůměrování vysokého počtu záznamů v mnoha případech poskytuje přijatelné výstupy. Nicméně, v důsledku širokého analogového pruhu záběru při natáčení, mnohdy i po zprůměrování zůstává příměs vysokofrekvenčního šumu. Někdy se dokonce stává, že frekvence šumu je ve stejném frekvenčním pásu jako signál evokovaných potenciálů (EP).

Ve snaze zlepšit rozlišení EP byly vyvinuty různé metody, především Wienerovské filtrování (*De Weerd 1981, Dowman et al. 1988, Law et al. 1993*), nebo časově vázané filtry (*Bertrand et al. 1994, Yu et al. 1994*), které se zdají lépe odpovídat našim potřebám.

V souladu s pracemi jiných autorů (*Bertrand et al. 1994, Quiroga et al. 1999*) metoda, kterou jsme použili v naší studii, významně zlepšila poměr signálu vůči šumu v návaznosti na klasické zprůměrování křivek. Charakteristiky výsledné křivky EP zůstaly po waveletové transformaci plně zachovány (**Obr. 4b**). Při využití metody průměrování bez dalšího zpracování signálu bývá nutné natočit až 800 záznamů k získání jedné výsledné hodnotitelné křivky EP. Metoda waveletové transformace spolu s vyřazením nadlimitních a podlimitních odpovědí (tedy signálů mimo vymezené pásmo) umožnila získat spolehlivé výstupy již při desetině objemu vstupních dat (tedy 80 záznamů na jedno měření).

**Reflex otvírání tlamy (JOR).** Pokud stimulujeme zubní dřeň (tooth pulp stimulation, TPS), můžeme elektrodou obtočenou kolem m. digastricus detekovat dvousložkový reflex otvírání tlamy (jaw opening reflex, JOR) (*Boucher et al. 1993*).

**Jednorázová stimulace.** Při nízké intenzitě stimulace vzniká pomalá složka reflexu (LL JOR), v důsledku podráždění nemyelinizovaných pomalu vedoucích nociceptivních C vláken zubní dřeně.

S rostoucí intenzitou stimulace se začnou impulzy šířit do parodontu s aktivací zde začínajících rychle vedoucích myelinizovaných A vláken a EMG elektroda zaznamenává rychlou složku reflexu (SL JOR). Proto při stoupající intenzitě stimulace zubní dřeně (TPS), poté co je dosažena prahová hodnoty pro vybavení rychlé složky (SL JOR), jsou zachytitelné obě složky reflexu (SL+LL JOR) současně.

Aferentace z parodontu však tlumí aktivitu motoneuronů pro m.digastricus, s následným přerušením vstupů ze zubní dřeně (*Carter et al. 1989*). Při dalším nárůstu intenzity stimulace proto postupně mizí pomalá složka (LL JOR) a elektroda na m.digastricus již zachycuje pouze rychlou složku reflexu (SL JOR).

Naše pozorování potvrzují zmíněné interakce mezi oběma složkami reflexu JOR. Rychlá složka reflexu (SL JOR) odpovídá aktivaci interneuronů, které mají tlumivý vliv na aferentace ze zubní dřeně vedené nemyelinizovanými C vlákny. Tento proces může využívat různých cest od nesyntaktické inhibice primární aferentní dráhy po aktivaci inhibičních interneuronů, které se podílejí na zpětnovazebné kontrole excitačních drah.

Interneurony, které jsou zapojeny do časné fáze reflexu JOR, se nacházejí na různých úrovních trigeminového komplexu a v intertrigeminální krajině (*Appentag et al. 1985*). U koček se interneurony rychlé složky reflexu (SL JOR) nacházejí v rostrální části trigeminového komplexu (subnucleus oralis a interpolaris) (*Landgren et al. 1986*). U potkana je údajů méně, má se však za to, že odpovídající interneurony se budou nacházet v nucleus principalis a v intertrigeminální oblasti (*Boucher et al. 1993*). Přesná anatomie zapojení JOR reflexu však není bezesbýtku ujasněna.

**Stimulace s podmiňováním.** V naší studii jsme se snažili aplikovat paradigma dvojí stimulace (tedy vlastně metodu podmiňování) s cílem přesnějšího sledování a analýzy reflexu JOR a koroových evokovaných potenciálů (TPEP). Podobná metodika dosud nebyla u potkanů použita.

Principem našeho protokolu bylo použití dvojí stimulace: nejprve je podán úvodní (podmiňovací) stimul, po určitém intervalu (interstimulační interval – ISI) následuje podnět stimulační. Tato metoda umožňuje lépe hodnotit jednotlivé složky reflexu otvírání tlamy (JOR).

V našem pokusu jsme použili dvě po sobě jdoucí stimulace o vysoké intenzitě (TPS), každá z nich je schopna vyvolat pouze rychlou složku reflexu (SL JOR); pomalá složka reflexu při této intenzitě stimulace již nebyla zachytitelná. Při delším intervalu mezi stimulacemi (ISI = 45–80 ms) jsme vybavili rychlou složku reflexu (SL JOR) mnohem snáze, naopak kratší interval (ISI = 10–45 ms) působil inhibičně (**Obr. 5a, 5b**).

Pokud byl interval mezi oběma stimulacemi velmi krátký, začala se objevovat pomalá složka reflexu (LL JOR), jakmile poklesla amplituda rychlé složky (SL JOR) **druhého** reflexu (**Obr. 6 a–d**). Ukázalo se tedy, že pokles rychlé složky reflexu (SL JOR) a vzestup pomalé složky (LL JOR) mají simultánní průběh (**Obr. 6b**).

Toto zjištění objasňuje vztah mezi oběma složkami reflexu JOR (*Boucher et al. 1993*) a podporuje hypotézu o vzájemné interakci mezi vlákny C a A. Obdobný inhibiční a facilitační proces byl prokázán u dalších základních reflexů, jako je blink reflex (*Ellrich et al. 1997, Power et al. 1997*), který má rovněž dvě složky (časnou a pozdní), jež jsou ve vzájemné interakci. Navíc metoda podmiňování (dvojitá stimulace) s využitím různých druhů stimulace umožňuje obě složky od sebe odlišit a přispěla tak k poznání anatomie drah tohoto reflexu.

Naše výsledky potvrzují význam rychlé složky reflexu (SL JOR) jako korelátu aferentace z parodontu v procesu facilitace/inhibice nociceptivních drah ze zubní dřeně. Naše výsledky mohou sloužit jako podklad ke kvantifikaci inhibičního působení aferentace z parodontu (**Obr. 7**).

Amplituda znovu se objevivší pomalé složky reflexu (LL JOR) nedosahuje amplitudy vyvolané předešlou nízkou intenzitou stimulace (– 30%). Z toho lze usuzovat, že inhibiční proces alespoň zčásti přetrvává za těchto podmínek.

**Somatosenzorické evokované potenciály.** Naše studie potvrzuje dřívější pozorování (*Rehnig et al. 1984*) ukazující, že stimulace zubní dřeně (TPS) vyvolává korovou odpověď v oblasti situované 1 mm rostrálně od bregmatu nad kontralaterální sensorimotorickou kůrou.

Amplituda evokovaného potenciálu má vztah k charakteru TPS a mění se s jeho intenzitou (*Stevens 1970, Toda et al. 1980*). S rostoucí intenzitou stimulace narůstá amplituda evokovaného potenciálu až do určité hraniční hodnoty, přes kterou už amplituda evokovaného potenciálu nepřestoupne, i když budeme intenzitu stimulace nadále zvyšovat. Můžeme tudíž usuzovat, že evokovaný potenciál vzniká v důsledku postupného zabírání (recruitment) nervových vláken po TPS až do chvíle, kdy už se na tvorbě EP podílejí všechna aferentní vlákna.

Počet nemyelinizovaných axonů v zubní dřeni řezáku v dolní čelisti potkana se pohybuje v rozmezí 127 až 224 (*Bishop 1981, Fried et al. 1988*). Nízký recruitment vláken (v rámci některých studií) může být důvodem, proč bylo obtížné vybavit TPEP stimulací o nízké intenzitě („LL deficit“). Z toho můžeme usuzovat, že musí existovat specifický práh pro recruitment vláken, který je nezbytný k tomu, aby mohla být vybavena korová odpověď.

Skutečnost, že při velmi nízké intenzitě stimulace zubní dřeně, která nepostačuje k vybavení korového potenciálu (TPEP) rovněž nelze vybavit pomalou složku reflexu otvírání tlamy (LL JOR) dokazuje, že existuje vztah mezi JOR a TPEP. Příčinou může být buď podprahový počet nervových aferenzí nebo nedostatečný recruitment.

V této souvislosti někteří autoři (*Hayama et al. 1993*) vznesli otázku o možné myogenní kontaminaci signálu korových evokovaných potenciálů (TPEP). Dalo by se proto namítnout, že v časně fázi (5–20 ms) po stimulaci, kdy jsme zaznamenávali reflex otvírání tlamy (JOR), nelze spolehlivě hodnotit TPEP. V našem protokolu TPEP vyvolané jednorázovou stimulací vykazovaly totiž časnou složku v rozmezí  $6 \pm 0,8$  ms až  $17,2 \pm 1,2$  ms (**Tab. 1**), v rozmezí možné myogenní kontaminace.

Délka dolního řezáku potkana je kolem 25 mm. Elektrody jsme implantovali do zubní dřeně do vzdálenosti 12 mm od hrany zubu. Vezmeme-li v úvahu rychlost vedení v nemyelinizovaných vláknech uvnitř zubní dřeně (0,5 m/s) a rychlost vedení v myelinizovaných vláknech mimo zubní dřeň (2,9 až 25 m/s) (*Rehak 1963, Sato et al. 1988*), pak doba vedení impulzu do sensorické kůry by neměla trvat méně než 20 ms. Z tohoto důvodu korová odpověď, zaznamenaná v rozmezí 6–20 ms od okamžiku stimulace, nemůže pocházet ze zubní dřeně. V jedné studii (*Rehnig et al. 1984*) byla po stimulaci horního řezáku pozorována korová odpověď se dvěma hroty, N6 a P12. V našem pokusu se objevila vlna N6 současně s rychlou složkou reflexu otvírání tlamy (SL JOR). Je tudíž možné předpokládat, že N6 odpovídá aferentaci z parodontu



a zachycení motorické reflexní odpovědi (JOR) korovými elektrodami, určenými k registraci evokovaných potenciálů.

Sledování talamické projekce primárních senzitivních aferencí (*Shigenaga et al. 1974*) potvrzuje, že evokované potenciály se nemohou objevit v době kratší než 8 ms po stimulaci. V další studii byly zachyceny talamické evokované potenciály za 8 ms, 20–30 ms a 40–90 ms po TPS (*Azerad et al. 1986*). V tomto kontextu s přihlédnutím na naše výsledky po jednorázové stimulaci zubní dřeně, můžeme konstatovat, že teprve složky evokovaných potenciálů, které jsme zachytili v rozmezí 20–250 ms po stimulaci, jsou opravdu korovými TPEP (Tab. 1).

**Jednorázová stimulace.** Při tomto pokusu jsme získali korové evokované potenciály s různými vlastnostmi v závislosti na intenzitě stimulace zubní dřeně. Statistická identifikace vln N23  $\pm$  2,5 ms a P48  $\pm$  6,8, odpovídajících pomalé složce reflexu (LL JOR) potvrzuje, že tato složka TPEP skutečně specificky odpovídá nemyelinizovaným C vláknům zubní dřeně.

**Stimulace s podmiňováním.** U protokolu s podmiňováním (dvojí stimulace) záleželo na tom, s jakou intenzitou jsme stimulovali. Pokud druhá stimulace vyvolala pomalou složku reflexu (LL JOR), nezaznamenali jsme žádnou paralelní korovou odpověď (tedy nevýbavné TPEP). Nicméně, při vyšších intenzitách stimulace zubní dřeně (TPS) – takových, že dokázaly vyvolat rychlou složku reflexu (SL JOR) – jsme zaznamenali slabou korovou odpověď (TPEP). Tento jev může být důsledkem aktivací aferentních myelinizovaných A vláken s následným přesunem senzitivních vzruchů do mozkové kůry.

Při stimulaci s podmiňováním jsme pozorovali sumaci odpovědi na úrovni reflexu otvírání tlamy, jak již bylo detailně diskutováno výše. Na korové úrovni (při analýze evokovaných potenciálů) jsme však nezachytili srovnatelnou aktivitu. Důvodem může být nedostatečné uplatnění aferencí na nižší (kmenové nebo talamické) úrovni. Tento předpoklad je nepřímo potvrzen korelací ( $r = 0,96$ ) mezi integrací evokovaných potenciálů a intenzitou stimulace zubní dřeně (TPS).

**Význam vlny N27.** V naší studii se nejvyšší amplitudou vyznačovala vlna N 27, což bylo nejvíce patrné v protokolu podmiňování, a to při druhé stimulaci. Vlna N27  $\pm$  2,7 ms je totožná s vlnou N 23 získané při jednorázové stimulaci o nižší intenzitě (v důsledku aktivace nemyelinizovaných C vláken ze zubní dřeně, odpovídající vybavení pomalé složky reflexu otvírání tlamy LL JOR).

Při stimulaci s podmiňováním se vlna N 27 objevovala pouze při takové intenzitě stimulace, která byla schopna vyvolat rychlou složku reflexu (SL JOR). Tato skutečnost pravděpodobně zrcadlí difuzi stimulačního proudu do tkání parodontu s následnou aktivací myelinizovaných A vláken.

Rozpětí intervalu mezi stimulacemi (ISI = 70 až 10 ms), potřebného pro generování vlny N 27 odpovídá rozmezí ISI pro generování pomalé složky reflexu otvírání tlamy (LL JOR) při druhé sti-

mulaci (**Obr. 7**). Můžeme tudíž usuzovat na to, že vlna N 27 je korelátem stimulace nociceptivních nemyelinizovaných pomalých C vláken.

V dalším pokusu („Behaviorální model B“) bude věnována pozornost analýze vlny N27 a jejímu ovlivnění antinociceptivním působením kontinuální elektrické korové stimulace.

## Neurofyziologický model B

Hlavní zjištění v této části studie jsou následující (**Obr. 8,9**):

- I. S rostoucí intenzitou stimulace zubní dřeně (TPS) narůstá amplituda hlavního komplexu (obsahujícího vlnu N 27) korových evokovaných potenciálů (TPEP) a zároveň se zkracuje jeho latence.**
- II. Kontinuální korová stimulace snižuje amplitudu a integraci (plochu pod křivkou) hlavního komplexu TPEP (doklad možného antinociceptivního účinku).**
- III. Korová stimulace neměla signifikantní vliv na latence evokovaných potenciálů, ani na vyvolání reflexu otvírání tlamy (JOR).**

Úhelným kamenem metodiky naší studie bylo zajistit, abychom v průběhu stimulace zubní dřeně (TPS) stimulovali nociceptivní C vlákna a nikoliv okolní struktury, a aby současně natáčené evokované potenciály nad sensorimotorickou kůrou skutečně odpovídaly indukované nocicepci.

Za tímto účelem jsme detailně analyzovali reflex otvírání tlamy (JOR), vybavovaný stimulací zubní dřeně. Tento reflex jsme zachycovali elektrodou z m. digastricus, s cílem potvrdit, že naše experimentální stimulace zubní dřeně aktivuje skutečně nociceptivní vlákna.

Reflex otvírání tlamy (JOR) je tvořen dvěma odlišnými složkami v závislosti na intenzitě stimulace (*Carter et al. 1989*).

Nízká intenzita stimulace vyvolá pomalou složku reflexu (LL JOR), v důsledku stimulace pomalu vedoucích nemyelinizovaných C vláken, což jsou jediná vlákna v zubní dřeni řezáku potkana přístupná elektrické stimulaci (*Jiffry 1981*). Až při vyšší intenzitě stimulace se objeví rychlá složka reflexu (SL JOR), protože proud proniká do vzdálenějších tkání parodontu a v něm aktivuje rychle vedoucí parodontální myelinizovaná A vlákna (*Azerad et al. 1988*).

Anatomické uspořádání tak vysvětluje proč – při stoupající intenzitě stimulace – jsme zaznamenali pomalou složku reflexu ještě dříve než složku rychlou. Naše zjištění tak neodporuje základnímu neurofyziologickému principu, totiž že A vlákna mají nižší práh než C vlákna při elektrické stimulaci (*You et al. 2003*).

Amplituda reflexu JOR není v přímém vztahu k nocicepci a bolesti, neplatí tedy, že by bolestivější podnět vyvolal intenzivnější odpověď JOR. Do našeho protokolu jsme reflex JOR zahrnuli z jiného důvodu. Šlo nám o to, abychom mohli ověřit, že stimulace zubní dřeně (TPS) v dané chvíli skutečně stimuluje A vlákna parodontu a C vlákna zubní dřeně.

**Stimulace zubní dřeně a evokované potenciály.** Stimulací zubní dřeně (TPS) jsme vyvolali vznik korových evokovaných potenciálů, které jsme zachytili nad kontralaterální senzomotorickou kůrou. Výsledná křivka TPEP má časnou a pozdní složku.

Časná složka v rozmezí 0 – 17 ms od okamžiku stimulace v sobě zahrnuje rozsáhlý stimulační artefakt. Jak jsme již zmínili v předchozí kapitole, z důvodu centrálního kondukčního času (neboli doby vedení, tedy času potřebného k tomu, aby signál dorazil z periferie do mozkové kůry) tato časná složka nemůže být odrazem dějů v zubní dřeni.

Z uvedeného důvodu jsme analyzovali pouze tu část křivky evokovaného potenciálu, která se pohybuje v rozmezí 20 – 250 ms. V souladu s publikovanými údaji (*Shigenaga et al. 1974, Danneman 1994*) a s přihlédnutím k výsledkům předchozího pokusu (viz výše) jsme první negativní hrot časné složky (vlna N 27, která se objevuje se v rozmezí 22 až 27ms po TPS – **Obr. 10,11**) považovali za korelát nocicepce.

Jak latence, tak i amplituda evokovaných potenciálů (TPEP) závisela na intenzitě stimulace zubní dřeně (TPS) – čím vyšší byla intenzita stimulace, tím byla větší amplituda a kratší latence evokovaného potenciálu.

Jinými slovy, při nízkých intenzitách stimulace se aktivují pomalu vedoucí nemyelinizovaná C vlákna zubní dřeně, což prodlužuje latence evokovaných potenciálů. Při zvětšení intenzity stimulace (TPS), jsou stimulována C vlákna – ale i myelinizovaná A vlákna parodontu, což má za následek zkrácení latencí a vzestup amplitudy TPEP. Z tohoto důvodu se domníváme, že negativní hroty, které se objevují 27, 23 a 22 ms po stimulaci (v závislosti na intenzitě stimulace TPS), jsou variací jedné a téže vlny.

**Vliv korové stimulace na evokované potenciály.** Nárůst amplitudy a zkrácení latence analyzované vlny TPEP (v závislosti na intenzitě stimulace zubní dřeně – TPS), zevrubně diskutované v předchozím oddílu, se týká zvířat měřených **před** zahájením kontinuální elektrické korové stimulace. Stejný protokol, tj. snímání korových evokovaných potenciálů při současném zachycení reflexu JOR, jsme zopakovali po skončení kontinuální stimulace senzomotorické kůry.

V naší studii jsme pozorovali konzistentní pokles amplitudy časné složky TPEP s rostoucí dobou kontinuální korové stimulace. V literatuře (*Danneman 1994, Logginidou et al. 2003*) je pokles amplitudy TPEP považován za korelát analgezie u člověka i u zvířete.

Většina dostupných údajů k tomuto tématu pochází z farmakologických studií. U zdravých dobrovolníků byl prokázán pokles korových evokovaných potenciálů vybavených stimulací zubní dřevě po podání kodeinu (*Suri et al. 1996*). V další studii (*Cox et al. 1998*) byl nalezen pokles amplitudy časného komplexu EP po podání alfentanilu, aniž by však došlo k ovlivnění latence komplexu. Dále bylo prokázáno (*Logginidou et al. 2003*), že propofol (lék bez analgetického účinku) způsobuje v závislosti na dávce depresi somatosenzorických evokovaných potenciálů a prodlužuje latenci odpovědí. Zkoumání TPEP u potkanů (*Danneman 1994*) ukázalo, že morfin snižuje maximální amplitudu, zatímco droperidol byl zcela bez efektu. Dannemanová (*1994*) proto pokles amplitudy časného komplexu TPEP považuje za marker antinocicepce, spíše než za důsledek celkové redukce korové excitability. Podobně i v naší studii pokles maximální amplitudy časného komplexu TPEP může reflektovat antinociceptivní působení kontinuální korové stimulace.

Křivky TPEP získané po skončení kontinuální korové stimulace (**Obr. 11**) vykazují na rozdíl od křivek TPEP před stimulací výraznou variabilitu ve svém tvaru. Pokud považujeme vlnu N 27 za marker (anti)nocicepce, může být hodnocení její amplitudy v tomto případě obtížné a výsledky zavádějící. Proto jsme se rozhodli (v analogii k dalším neurofyzilogickým metodám, například podobně jako u kondukčních studií EMG) analyzovat plochu pod křivkou cestou TPEP integrace.

Výsledky analýzy integrace jsou v dobré shodě s vývojem amplitudy: v obou stimulovaných skupinách jsme pozorovali signifikantní pokles integrace po 5 hodinách kontinuální korové stimulace. Tyto výsledky byl výraznější ve skupině stimulované s vyšší frekvencí (60 Hz). Data získaná hodnocením integrace považujeme za spolehlivější než analýzu pouze amplitudy.

Ve skupině stimulovaných zvířat o frekvenci 60 Hz jsme zaznamenali signifikantní pokles maximální amplitudy po 5 hodinách, ale rovněž už po 3 hodinách kontinuální korové stimulace. Naproti tomu integrace poklesla signifikantně až po 5 hodinách – což jasně dokládá větší benefit delší periody kontinuální stimulace sensorimotorické kůry.

**Korová stimulace a reflex otvírání tlamy (JOR).** Kontinuální stimulace sensorimotorické kůry neměla vliv na latenci TPEP ani na průběh reflexu otvírání tlamy (JOR). Toto zjištění nepřímo naznačuje, že korová stimulace působí spíše nepřímým antinociceptivním mechanismem, než že by měla vliv na korovou excitabilitu nebo ovlivňovala stav vědomí.

## Možné patofyziologické podklady působení korové stimulace

Mechanismy zodpovědné za antinociceptivní působení korové stimulace jsou zatím jen málo prozkoumané. Korová aktivita je ovlivněna jak dobou trvání, tak frekvencí korové stimulace, která působí dočasnou inhibici pravděpodobně se vzdáleným působením na subkortikální okruhy.

Určitou analogií mohou být dopady korové stimulace na projevy Parkinsonovy nemoci, kde se předpokládá aktivace neuromodulačních impulsů na úrovni kortiko-striatálních spojů (*Gutierrez et al. 2009*).

Korová stimulace může přispívat k uvolňování neurotrofních faktorů, které mají vzdálený efekt na nociceptivní transmisi v subkortikálních oblastech. Korová stimulace tak může změnit nastavení (re-balancing) kontrolních mechanismů non-nociceptivních senzitivních vstupů schopných potlačit nociceptivní aferentaci na úrovni kůry, talamu, kmene a míchy. Navíc může korová stimulace ovlivňovat i emoční složku nociceptivní percepce. Biochemické procesy zahrnující uvolňování morfinů a GABA mají rovněž svůj podíl na mechanismech účinku korové elektrické stimulace (*Cioni et al. 2007*).

Hlavním nedostatkem naší studie je omezený počet zkoumaných jedinců – což je obecný problém pokusů na zvířatech s implantovanými elektrodami (a konečně i klinických observací u pacientů po implantaci).

Dalším problémem může být působení stresu a úzkosti u zkoumaných zvířat. Nicméně, jak jsme detailně vylíčili v části věnované metodice, této otázce jsme věnovali velkou pozornost při designu naší studie. Navíc chování laboratorních zvířat během pokusu (kdy nebyla ovlivňována žádnou farmakoterapií) i mimo fázi experimentu se nijak nelišilo od chování ostatních laboratorních zvířat chovaných ve stejném zvěřinci. Na tomto místě je rovněž vhodné připomenout, že jsme použili stejných elektrod jak za účelem korové stimulace, tak i k zachycení korových evokovaných potenciálů. Tento postup jsme považovali za méně traumatický než případnou implantaci další dvojice elektrod.

V úvodním experimentu (behaviorální model) jsme prokázali, že korová stimulace ovlivňuje práh bolesti u deaferentovaných zvířat a že efekt korové stimulace mizí v průběhu 24 hodin.

Proto lze uzavřít, že pozorované změny jsou v přímé souvislosti s korovou stimulací samotnou, spíše než důsledkem případných změn impedance elektrody nebo poškození či zánětu mozkové tkáně, které by mohly být teoreticky navozeny implantací elektrod.

## ZÁVĚRY

Výsledky naší studie, sestávající ze tří skupin pokusů, můžeme shrnout do tří hlavních zjištění:

1. Nárůst prahu bolesti po deafferentaci lze považovat za důsledek deafferentace na zpracování bolestivých podnětů v nervovém systému. Z tohoto pohledu lze interpretovat vliv stimulace senzomotorické kůry na práh bolesti jako odraz přímého vlivu korové stimulace na bolest. Dospěli jsme tedy ke srovnatelným výsledkům jako při pozorování u člověka, a to přes významné rozdíly ve stavbě a organizaci mozkové kůry u člověka a u hlodavců.
2. Naše výsledky pomohly určit, které komponenty evokovaných potenciálů vyvolávaných stimulací zubní dřeně (TPEP) přímo odpovídají jednotlivým aferentacím podílejícím se na reflexu otvírání tlamy (JOR). Výsledky párových stimulací (využívajících efektu podmiňování) umožňují identifikovat a kvantifikovat interakce mezi jednotlivými složkami reflexu otvírání tlamy (JOR) a přesně je korelovat s evokovanými potenciály (TPEP).
3. Naše studie umožnila aplikací dlouhodobé korové stimulace, porovnáváním složek JOR a sledováním TPEP vytvořit nefarmakologický model tlumení bolesti. Současná analýza JOR a zároveň TPEP je podkladem velmi přesné identifikace průběhu stimulace zubní dřeně (TPS) a obou hlavních vláken – pomalu vedoucích nemyelinizovaných C vláken zubní dřeně a rychle vedoucích myelinizovaných A vláken parodontu – které se na tomto procesu podílejí. Matematické zpracování a „vyčištění“ získaných signálů spolu s analýzou TPEP integrace jsou dalším podstatným přínosem pro zpřesnění našich výsledů. Náš protokol studie tudíž umožňuje odlišit analgetické působení kontinuální korové stimulace na úrovni C a A aferentací.

Závěrem lze tedy potvrdit, že použití laboratorních zvířat v podobném kontextu je přínosem pro další výzkum na poli antalgického působení korové stimulace. Zvířecí model je tedy možné plně využít v úsilí o pochopení přesných mechanismů účinku korové stimulace na bolest, a to navzdory odlišnostem ve struktuře a organizaci mozkové kůry mezi člověkem a laboratorním zvířetem (v našem případě potkanem).

Vzhledem k tomu, že kontinuální korová stimulace způsobila pokles amplitudy TPEP, ale neovlivnila latenci maximální amplitudy, lze předpokládat, že korová stimulace má přímý anti-nociceptivní účinek.

Tuto hypotézu lze podpořit třemi argumenty: **a)** poklesem amplitudy časného komplexu evokovaných potenciálů v naší studii **b)** podobným analgetickým působením korové stimulace u jiných modelů bolesti (*Kuroda et al. 2000*) **c)** srovnatelné výsledky lze získat i na farmakologickém modelu (*Cox et al. 1998, Danneman 1994*).

Hlavním nedostatkem naší studie je omezený počet zkoumaných zvířat a proto je nutné dosažené výsledky hodnotit s určitou opatrností. Další výzkum, zejména na poli intracelulárních mechanismů, je nutný k lepšímu pochopení procesů navozených stimulací mozkové kůry. Naše práce tak může svým skromným dílem přispět k dalšímu poznání toho, jako ovlivňovat (nejen) chronickou bolest.

## POUŽITÁ LITERATURA

- 1 Alantar A, Azerad J, Limoge A, Robert C, Rokyta R, Pollin B. Potentiation of fentanyl suppression of the jaw-opening reflex by transcranial electrical stimulation. *Brain Res* 1997; 763: 14 – 20.
- 2 Albe-Fessard D, Nashold BS, Lombard MC, Yamaguchi Y, Boureau F. Rat after dorsal rhizotomy, a possible animal model for chronic pain. In: Bonica JJ, editor. *Advances in Pain Research and Therapy*, Vol. 3. New York: Raven Press; 1979. p. 761–6.
- 3 Albe-Fessard D, Rampin O, Sanderson P. Comparison of forelimb deafferentation syndrome in man and animals. In: Sicuteri F, Vecchiet L, Fanciullacci M, editors. *Trends in cluster headache*. Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 29–40.
- 4 Ali Z, Meyer RA, Belzberg AJ. Neuropathic pain after C7 spinal nerve transection in man. *Pain* 2002; 96:41–7.
- 5 Anderson DJ, Hannam AG, Matthews B. Sensory mechanism in mammalian teeth and their supporting structures. *Physiol Rev.* 1970; 50: 171–195.
- 6 Appentag K, Donga R, William RG. Morphological and electrophysiological determination of the projections of jaw-elevator muscle spindle afferents in rats. *J. Physiol (Lond.)*1985; 369: 93–113.
- 7 Azerad J, Woda A. Tooth pulp projection to the trigeminal complex and jaw opening reflex in cat. *J Biol Buccale* 1976; 4: 109–115.
- 8 Azerad J, Kalifa P, Pollin B, Decorte L. Histochemical and immunocytochemical study of primary afferent neurons innervating the incisor dental pulp of the rat. *Neurosci Lett.* 1986; S26–S35
- 9 Azerad J, Fuentes F, Lendais I, Limoge A, Pollin B. Methods for selective tooth pulp stimulation in acute and chronic preparation in rats. *J Physiol (Lond).* 1988; 406: 3.
- 10 Basbaum AI. Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats. *Exp Neurol* 1974; 42:490–501.
- 11 Bendtsen L, Jensen R, Olesen J. Decreased pain detection and tolerance thresholds in chronic tension-type headache. *Arch Neurol* 1996; 53:373–6.
- 12 Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33:87–107.
- 13 Berman JS, Birch R, Anand P. Pain following human brachial plexus injury with spinal cord root avulsion and the effect of surgery. *Pain* 1998; 75:199–207.
- 14 Bertrand O, Bohorquez J, Pernier J. Time-frequency digital filtering based on an invertible wavelet transform: an application to evoked potentials. *IEEE Trans Biomed Eng.*1994; 41: 77-88.



- 15 Bishop MA. A fine structural survey of the pulpal innervation in the rat mandibular incisor. *Am J Anat.* 1981; 160: 213–29.
- 16 Boucher Y, Pollin B, Azérad J. Microinfusions of excitatory amino acid antagonists into the trigeminal sensory complex antagonize the jaw opening reflex in freely moving rats. *Brain Res.* 1993; 614: 155–63.
- 17 Caggiula AR, Antelman SM, Kucinski BJ, Fowler H, Edwards DJ, Austin MC, Gershon S, Stiller R. Oscillatory-sensitization model of repeated drug exposure: cocaine's effects on shock-induced hypoalgesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998; 22:511–21.
- 18 Canavero S, Bonicalzi V. Cortical stimulation for central pain. *J Neurosurg* 1995; 83:1117.
- 19 Carter GM, Matthews B. Responses of jaw muscles to electrical stimulation of tooth pulp in rat, cat and man. In: Van Steenberghe D, De Laat A eds., *Electromyography of jaw reflexes in man.* 1989. Leuven University Press, Leuven, p. 205 – 256.
- 20 Chapman CR, Gerlach R, Jacobson R, Buffington V, Kaufmann E. Comparison of short-latency trigeminal evoked potentials elicited by painful dental and gingival stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1986; 65: 20–6.
- 21 Chatrian GE, Canfield RC, Lettich E, Black RG. Cerebral responses to electrical stimulation of tooth pulp in man. *J Dent Res.* 1974; 22: 221–33.
- 22 Chudler EH, Dong WK, Kawakami Y. Tooth pulp evoked potentials in the monkey, cortical surface and intracortical distribution. *Pain.* 1985
- 23 Cioni B, Meglio M. Motor cortex stimulation for chronic non-malignant pain: current state and future prospects. *Acta Neurochir Suppl* 2007, 97:45-9.
- 24 Cox EH, Langemeijer MW, Danhof M, Leiden C. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the analgesic effect of alfentanil in the rat using tooth pulp evoked potentials. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1998; 39: 19–27.
- 25 Cuppini R, Sartini S, Ambrogini P, Fulgenzi G, Graciotti L. Rat motor neuron plasticity induced by dorsal rhizotomy. *Neurosci Lett* 1999; 275:29–32.
- 26 Danneman PJ. Cortical potentials evoked by tooth pulp stimulation differentiate between the analgesic and sedative effects of morphine in awake rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 1100 – 1106.
- 27 Drouot X, Nguyen JP, Peschanski M, Lefaucheur JP. The antalgic efficacy of chronic motor cortex stimulation is related to sensory changes in the painful zone. *Brain* 2002; 125:1660–4.
- 28 De Weerd JP. Facts and fancies about a posteriori Wiener filtering. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1981; 28: 252–257.
- 29 Dowman R, Stockbridge N. A programmable rapid roll-off low pass filter for evoked potentials and EEG recording. *Brain Res Bull.* 1988; 21: 335–339.

- 30 Ebel H, Rust D, Tronnier V, Boker D, Kunze S. Chronic precentral stimulation in trigeminal neuropathic pain. *Acta Neurochir (Wien)* 1996; 138:1300–6.
- 31 Ellrich J, Bromm B, Hopf HC. Pain evoked blink reflex. *Muscle nerve*. 1997; 20: 265–270.
- 32 Engstrand P, Shyu BC, Andersson SA. Is selective stimulation of the rat incisor tooth pulp possible? *Pain*. 1983; 15: 27–34.
- 33 Falinower S, Willer JC, Junien JL, Le Bars D. A C-Fiber reflex modulated by heterotopic noxious somatic stimuli in the rat. *J Neurophysiol* 1994; 72: 194 – 213.
- 34 Fried K, Aldskogius H, Hildebrand C. Proportion of unmyelinated axons in rat molar and incisor tooth pulps following neonatal capsaicin treatment and/or sympathectomy. *Brain Res*. 1988; 963: 118–123.
- 35 Gojyo F, Sugiyu S, Kuroda R, Kawabata A, Varathan V, Shigenaga Y, Takemura M. Effects of somatosensory cortical stimulation on expression of c-Fos in rat medullary dorsal horn in response to formalin-induced noxious stimulation. *J Neurosci Res* 2002; 68: 479 – 488.
- 36 Grass S, Crawley JN, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z . Reduced spinal cord sensitization to C-fiber stimulation in mice over-expressing galanin. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 1829 – 1832.
- 37 Gutiérrez JC, Seijo FJ, Alvarez Vega MA, Fernández González F, Lozano Aragonese B, Blázquez M. Therapeutic extradural cortical stimulation for Parkinson’s Disease: report of six cases and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009; 111:703-7.
- 38 Hassel HJ, Biedenbach MA, Brown AC. Cortical potentials evoked by tooth pulp stimulation in rhesus monkeys. *Arch Oral Biol*. 1972; 17: 1059–1066
- 39 Hayama T, Hashimoto K, Ogawa H. Projection of the inferior dental nerve to the primary somatosensory cortex in rats. *Neurosci Lett*. 1993; 164: 13–16.
- 40 Hayashi H. A problem in electrical stimulation of incisor tooth pulp in rats. *Exp Neurol* 1980; 67: 438 – 441.
- 41 Jiffry MM, Matthews B. Conduction velocities of pulpal afferents in the rat. *J Dent Res* 1977; 56: D128 – 160.
- 42 Jiffry MT. Afferent innervation of the rat incisor pulp. *Exp Neurol*. 1981; 73: 209–18.
- 43 Katayama Y, Tsubokawa T, Yamamoto T. Chronic motor cortex stimulation for central deafferentation pain: experience with bulbar pain secondary to Wallenberg syndrome. *Stereotact Funct Neurosurg* 1994; 62:295–9.
- 44 Kayser V, Basbaum AI, Guilbaud G. Deafferentation in the rat increases mechanical nociceptive threshold in the innervated limbs. *Brain Res* 1990; 508:329–32.
- 45 Keller O, Kalina M, Ujec E, Zivny A, Vyklicky L. Projection of tooth pulp afferents to the brainstem and to the cortex in the cat. *Neurosci Lett*. 1981; 25: 233–7.
- 46 Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50:355–63.

- 47 Kolb B. Animal models for human PFC-related disorders. In: *The Prefrontal Cortex: Its Structure, Function and Pathology*, Progress in Brain Research, vol. 85 (Uylings HBM, van Eden CG, de Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MGP, eds.). Elsevier, Amsterdam, 1990, p. 501 – 519.
- 48 Kowler E. *Reviews in Oculomotor Research*, vol. 4, Eye Movements and Their Role in Visual and Cognitive Processes. Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 486 – 498.
- 49 Kriz N, Yamamoto A, Tobias J, Rokyta R. Extracellular potassium rating level in thalamic nuclei and tail-flick latency after deafferentation in rats. *Journal of Physiology–London* 1998; 511P:57P–8P.
- 50 Kucinski BJ, Antelman SM, Caggiula AR, Fowler H, Gershon S, Edwards DJ, Austin MC. Oscillatory effects of repeated morphine on shock-induced hypoalgesia and beta-endorphin. *Synapse* 1998; 30:30–7.
- 51 Kuroda R, Kawabata A, Kawao N, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y. Somatosensory cortex stimulation-evoked analgesia in rats: potentiation by NO synthase inhibition. *Life Sci* 2000; 66: 271–276.
- 52 Kuroda R, Kawao N, Yoshimura H, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y, Kawabata A. Secondary somatosensory cortex stimulation facilitates the antinociceptive effect of the NO synthase inhibitor through suppression of spinal nociceptive neurons in the rat. *Brain Res* 2001; 903:110–6.
- 53 Landgren S, Olsson KA, Westberg KG. Bulbar neurons with axonal projections to the trigeminal motor nucleus in the cat. *Exp Brain Res*. 1986; 65: 98–111.
- 54 Langemark M, Bach FW, Jensen TS, Olesen J. Decreased nociceptive flexion reflex threshold in chronic tension-type headache. *Arch Neurol* 1993; 50:1061–4.
- 55 Law SK, Rohrbaugh JW, Adams CH, Eckardt MJ. Improving spatial and temporal resolution in evoked EEG responses using surface Laplacians. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1993; 88: 309–322.
- 56 Lee BH, Won R, Baik EJ, Lee SH, Moon CH. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *Neuroreport* 2000; 11:657–61.
- 57 Lefaucheur JP, Drouot X, Keravel Y, Nguyen JP. Pain relief induced by repetitive transcranial magnetic stimulation of precentral cortex. *Neuroreport* 2001; 12:2963–5.
- 58 Lefaucheur JP, Drouot X, Menard-Lefaucheur I, Nguyen JP (2004) Neuropathic pain controlled for more than a year by monthly session of repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol* 2004; 34: 91 – 95.
- 59 Limoge-Lendais I, Robert C, Degrange M, Goldberg M, Stinus L, Limoge A. Study on Superbond adhesion to the skull for chronic electrode implantation in the rats. *Neuroscience protocols*. 1994; 94: 1–11.

- 60 Logginidou HG, Li BH, Li DP, Lohmann JS, Schuler HG, DiVittore NA, Kreiser S, Cronin AJ. Propofol Suppresses the Cortical Somatosensory Evoked Potential in Rats. *Anesth Analg* 2003; 97: 1784–1788.
- 61 Mailis A. Compulsive targeted self-injurious behaviour in humus with neuropathic pain: a counterpart of animal autotomy? Four case reports and literature review. *Pain* 1996; 64:569–78.
- 62 Marfurt CF, Turner DF. The Central projection of tooth pulp afferent neurons in the rat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol*. 1984; 223: 535–547.
- 63 Masopust V, Beneš V, Netuka D, Pollin B, Rokyta R, Stejskal M. Stimulace motorické kůry v léčbě chronické talamické bolesti. *Bolest* 2001; 4:91–4.
- 64 Meyerson BA, Lindblom U, Linderöth B, Lind G, Herregodts P. Motor cortex stimulation as treatment of trigeminal neuropathic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993; 58:150–3.
- 65 Migita K, Uozumi T, Arita K, Monden S. Transcranial magnetic coil stimulation of motor cortex in patients with central pain. *Neurosurgery* 1995; 36:1037–9.
- 66 Morita N, Tamai Y, Tsujimoto T. Unit response activated by tooth pulp stimulation in lateral hypothalamic area of rat. *Brain Res*. 1977; 134: 158–60.
- 67 Mumford JM, Stanley SJ. Sensation on stimulating the pulps of human teeth threshold and tolerance ratio. 1981; 10: 391–8.
- 68 Myslinski N, Matthews B. Intrapulpal nerve stimulation in the rat. *J Neurosci Methods*. 1987; 22: 73–8.
- 69 Naftel JP, Richards LP, Pau M, Bernauke JM. Course and composition of the nerves that supply the mandibular teeth of the rat. *Anat Rec*. 1999; 256: 433–447.
- 70 Nashold BS, Ovelmen–Lewitt J. Deafferentation pain syndromes: pathophysiology and treatment. New York: Raven Press; 1991.
- 71 Nguyen JP, Keravel Y, Fève A, Uchiyama T, Cesaro P, Le Guerinel C, Pollin B. Treatment of deafferentation pain by chronic stimulation of the motor cortex: report of a series of 20 cases. *Acta Neurochir (Suppl)* 1997; 68: 54 – 60.
- 72 Nguyen JP, Lefaucheur JP, Decq P, Lohmann JS, Schuler HG, DiVittore NA, Kreiser S, Cronin C. Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomical data. *Pain* 1999; 82: 245 – 251.
- 73 Pagni CA, Lanotte M, Canavero S. How frequent is anesthesia dolorosa following spinal posterior rhizotomy? A retrospective analysis of fifteen patients. *Pain* 1993; 54:323–7.
- 74 Pajot J, Vassel A, Aigouy L, Rajaona J, Woda A. Variations of the jaw opening reflex observed in awake freely moving rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1984; 270: 309–317.
- 75 Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6 ed., Academic press, 2007

- 76 Peters ML, Schmidt AJ, Van den Hout MA, Koopmans R, Sluifster ME. Chronic back pain, acute postoperative pain and the activation of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Pain* 1992; 50:177–87.
- 77 Power AS, Schicatano EJ, Basso MH, Evinger C. To blink or not to blink: inhibition and facilitation of reflex blinks. *Exp Brain Res.* 1997; 113: 283–290.
- 78 Post RM. Do the epilepsies, pain syndromes, and affective disorders share common kindling-like mechanisms? *Epilepsy Res* 2002; 50:203–19.
- 79 Quiroga RQ, Schurmann M. Functions and sources of events-related EEG alpha oscillations studied with the wavelet transform. *Clin Neurophysiol.* 1999; 110: 643–654.
- 80 Rehak JR. Course and resection of the inferior alveolar nerve in the albino rat. *J Dent Res.* 1963; 42: 159–1168.
- 81 Rehnig HP, Brankack J, Klingberg F. Cortical tooth pulp evoked potentials in freely moving rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1984; 44: 205–16.
- 82 Rehnig HP, Brankack J, Klingberg F. Behaviour dependent variability of potentials in the somatosensory cortex evoked by stimulation of the trigeminal nuclei in freely moving rats. *Biomed Biochim Acta.* 1987; 46: 297–300.
- 83 Sato O, Maeda T, Kobayashi S, Iwanaga T, Fujita T, Takahashi Y. Innervation of periodontal ligament and dental pulp in the rat incisor: an immunohistochemical investigation of neurofilament protein and glia specific S-100 protein. *Cell Tissue Res.* 1988; 251: 13–21.
- 84 Senapati AK, Huntington PJ, LaGraize SC, Wilson HD, Fuchs PN, Peng ZB. Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. *Brain Res* 2005; 1057: 134 – 140.
- 85 Shigenaga Y, Matano S, Kusuyama M, Sakai A. Cortical neurons responding to electrical stimulation of the rats incisor pulp. *Brain Res.* 1974; 67: 153–6.
- 86 Starr R, Kristeva D, Cheyne G, Lindinger L, Deecke L. Localization of brain activity during auditory verbal short-term memory derived from magnetic recordings. *Brain Res* 1991; 558: 181 – 190.
- 87 Stevens SS. Neural events and the psychophysical law. *Science.* 1970; 170: 1043–1050.
- 88 Sugimoto T, Takemura M, Wakisaka S. Cell size analysis of primary neurons innervating the cornea and tooth pulp of the rat. *Pain* 1988; 32: 375 – 381.
- 89 Summers J, Johnson S, Pridmore S, Oberoi G. Changes to cold detection and pain thresholds following low and high frequency transcranial magnetic stimulation of the motor cortex. *Neurosci Lett* 2004; 368:197–200.
- 90 Suri ML, Kaltenbach BL, Grundy H, Derendorf E. Pharmacodynamic evaluation of codeine using tooth pulp evoked potentials *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 1126 – 1131.

- 91 Toda K, Ichioka M, Iriki A. Quantitative relations between noxious stimulus intensity and magnitude of central afferent evoked responses in rat. *Neurosci Lett.* 1980; 17: 313–316.
- 92 Toda K, Iriki A, Ichioka M. Selective stimulation of intrapulpar nerve of rat lower incisor using a bi-polar electrode method. *Physiol Behav.* 1981; 26: 307–11.
- 93 Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S. Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. *Acta Neurochir* 1991; 52: 137 – 139.
- 94 Vaculin S, Rokyta R. Effects of anesthesia and nociceptive stimulation in an experimental model of brachial plexus avulsion. *Physiol Res* 2004; 53:209–14.
- 95 Vaculin S, Franek M, Yamamotova A, Rokyta R. Motor cortex stimulation in rats with chronic constriction injury. *Exp Brain Res* 2008; 185: 331-335.
- 96 Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979; 7:103–11.
- 97 Yang JC, Richlin D, Brand L, Wagner J, Clark WC. Thermal sensory decision theory indices and pain threshold in chronic pain patients and healthy volunteers. *Psychosom Med* 1985; 47:461–8.
- 98 You HJ, Morch CD, Chen J, Arendt-Nielsen L. Role of central NMDA versus non NMDA receptor in spinal withdrawal reflex in spinal anesthetized rats under normal and hyperexcitable conditions. *Brain Res* 2003; 981: 12 – 22.
- 99 Yu XH, He ZY, Zhang YS. Time varying adaptive filter for evoked potentials estimation. *IEEE Trans Biomed Eng;* 1994; 41: 1062–1071.
- 100 Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16:109–10.

# SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

## Publikace, které jsou podkladem disertace

- Rusina R, Berek S, Vaculin S, Azerad J, Rokyta R: Cortical stimulation and tooth pulp evoked potentials in rats: A model of direct anti-nociception. *Acta Neurobiol Exp.* 2010 v tisku. **IF 0,940**
- Berek S, Rusina R, Pollin B, Azerad J. Somatosensory evoked response and jaw opening reflex elicited by tooth pulp stimulation in awake freely moving rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2007;28:121-30. **IF 0,703**
- Rusina R, Yamamatova A, Vaculin S, Berek S, Dvorakova H, Rokyta R. The effect of motor cortex stimulation in deafferentated rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2005;26:283-8. **IF 0,703**

## Publikace bez vztahu k tématu dizertace

### Impaktované:

- Rusina R, Ridzoň P, Kulišťák P, Keller O, Bartoš A, Buncová M, Fialová L, Koukolík F, Matěj R. Relationship between ALS and the degree of cognitive impairment, markers of neurodegeneration and predictors for poor outcome. A prospective study. *Eur J Neurol* 2010, 17: 23–30. **IF 2,732**
- Rusina R, Rektorová I, Sheardová K, Ridzoň P, Kulišťák P, Matěj R. Amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease-clinical and neuropathological considerations in two cases. *Eur J Neurol.* 2007;14:815-8. **IF 2,732**
- Rusina R, Bourdain F, Matěj R. Atrophie multi-systématisée et maladie d'Alzheimer : association rare de deux affections neuro-dégénératives. À propos d'un cas. *Rev Neurol (Paris)* 2007;163,1239-1241. **IF 0,456**
- Matěj R, Rusina R, Koukolík F. 5 let činnosti Národní referenční laboratoře lidských prionových onemocnění při Oddělení patologie a molekulární medicíny FTNSP: naše zkušenosti a přehled literatury. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103: 637-642. **IF 0,319**
- Sheardová K, Hort J, Rusina R, Bartoš A, Línek V, Rössner P, Rektorová I. Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103: 589–594. **IF 0,319**
- Spisek R, Kolouchova E, Jensovsky J, Rusina R, Fendrych P, Plas J, Bartunkova J. Combined CNS and pituitary involvement as a primary manifestation of Wegener granulomatosis *Clin Rheumatol.* 2005; 2:1-4. **IF 1,559**

**Bez IF:**

- Rektorová I, Rusina R, Hort J, Matěj R. The degenerative dementias. In: International Neurology: A Clinical Approach. Edited by Robert P. Lisak, Daniel D. Truong, William Carroll, and Roongroj Bhidayasiri. 2009 Blackwell Publishing, pp 126-136, ISBN: 978-1-4051-5738-4.
- Rusina R, Matěj R. Vaskulární demence. Neurol. pro praxi. 2009; 10: 250–253
- Rusina R, Matěj R. Vaskulární demence. Psychiat. pro praxi. 2007; 2: 81–84.
- Hort J, Rusina R. Paměť a její poruchy. Maxdorf 2007, edice Jessenius, 527 stran. ISBN: 978-80-7345-004-5.
- Rusina R, Ridzoň P, Kulišťák P, Matěj R. Onemocnění motoneuronu a kognitivní poruchy In: Rektorová I. a kol. Demence a kognitivní poruchy. Sborník Triton 2007, s.146-151. ISBN 978-80-7387-017-1.
- Matěj R, Rusina R. Tauopatie a frontotemporální demence. Čes ger rev. 2006;4,217-223.



# PŘÍLOHA

## PLNÉ ZNĚNÍ PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE

V příloze jsou uvedeny v plném znění všechny tři impaktované publikace se vztahem k disertaci.

V publikaci č. 2 (*Barek et al. 2006*) je drobná změna oproti textu v disertační práci: polarity hrotů evokovaných potenciálů jsou invertovány, tedy např. vlna N23 v textu disertace je totožná s vlnou P23 v textu publikace, vlna P221 odpovídá vlně N221 a pod.

# The effect of motor cortex stimulation in deafferentated rats

Robert Rusina<sup>1</sup>, Anna Yamamoto<sup>1</sup>, Simon Vaculin<sup>1</sup>, Stephan Berek<sup>2</sup>, Helena Dvorakova<sup>1</sup> and Richard Rokyta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Charles University, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, Prague, Czech Republic,

<sup>2</sup>University Denis Diderot, Laboratory of Physiology of Manducation, Paris VII, France

*Correspondence to:* Richard Rokyta, prof., MD  
Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology,  
3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University,  
Ke Karlovu 4, 120 00 Prague, Czech Republic.  
TEL: +420-224 923 241; Fax +420-224 923 827;  
EMAIL: Richard.rokyta@lf3.cuni.cz

*Submitted:* June 30, 2005

*Accepted:* July 14, 2005

*Key words:* **motor cortex stimulation; deafferentation; pain; rats; plantar test; tail-flick**

Neuroendocrinol Lett 2005;26(4):61-224 PMID:----- NEL260405A00 ©Neuroendocrinology Letters [www.nel.edu](http://www.nel.edu)

**OBJECTIVES:** The aim of the study was to describe the effect of motor cortex stimulation (MCS) on pain thresholds in deafferentated rats.

**SETTINGS AND DESIGN:** The effect of MCS was studied in 18 deafferentated and 14 intact laboratory rats, using a standardised plantar test and tail-flick latencies. Two innocuous stimulation electrodes were implanted subdurally over the cerebral cortex and a C5 – Th1 dorsal root rhizotomy was performed on the left side. Pain thresholds were measured before and after cortical stimulation. The data were analysed with ANOVA for repeated measures.

**RESULTS:** MCS in intact animals evoked no changes in pain thresholds except for the contralateral forelimb, in which the pain threshold increased after MCS. Following deafferentation, pain thresholds increased in both plantar test and tail-flick in comparison to baseline values. When MCS was applied to the deafferentated animals, the pain thresholds returned to baseline levels. The effect of MCS disappeared within 24 hours.

**MAIN FINDINGS:** 1. MCS in intact animals evoked hypoesthesia in the corresponding contralateral forelimb; 2. deafferentation itself increased pain thresholds in the unaffected limbs; 3. under MCS, pain thresholds in deafferentated rats were not different from pre-dafferentation values; 4. the effect of MCS disappeared in 24 hours and oscillated.

**CONCLUSIONS:** Our results show a similar effect of the stimulation in man and experimental animals despite the differences in the organisation of the cerebral cortex. The use of laboratory animals is promising for further studies in the field of involved analgesic mechanisms of MCS.

## Introduction

Motor cortex stimulation (MCS) has become an important part of the treatment of resistant, intolerable pain mainly of neuropathic origin. Its effect has been tested for thalamic, postherpetic, trigeminal, deafferentation and phantom pain [9,12,13,24,25,26,28].

In general, stimulating electrodes are placed over the motor pre-central cortex. The localization of electrodes somatotopically corresponds with the painful region of the body. Perioperative verification of the localization is based on somatosensory evoked potentials, where the central sulcus (sulcus centralis Rolandi) corresponds with the site of a phase reversal of N20. To confirm the precise location of the electrodes, the presumably placed contacts are stimulated at a relative high intensity to induce muscle twitch in the painful area. The stimulation is intermittent, because the MCS exhibits not only immediate – acute analgesic effect, but also post-stimulatory maintenance of analgesia for hours up to a few days [28].

As far as the authors know, two papers dealing with the effect of cortex stimulation in rats have been published so far. Electrodes were placed over the somatosensory area and stimulation evoked weak antinociception in formalin test [18] and the antinociception was suppressed by spinal administration of NOS inhibitors [19]. The effect of motor cortex stimulation on pain and nociception in experimental models of chronic neuropathic pain has not yet been described.

An extensive dorsal rhizotomy at the cervicothoracic level (C5–Th1) in the rat is used as a model of central pain [1,2,4] which often develops after brachial plexus avulsion in man [3,7,23,27,29]. Physiological changes following the rhizotomy in rats implicate development of a chronic pain syndrome in the ipsilateral limb. The dorsal rhizotomy model differs from other chronic pain models due to the localization of the nerve lesion, which is proximal to the neuronal body. It prevents any further afferent firing that occurs in other models – sciatic nerve transection/ligation [6,15,21,34] – in which lesions are localized in the distal part of the axon (related to the neuronal body). In the rhizotomy model any observed changes are to be of central nervous system origin.

The aim of our study was to explore the effect of motor cortex stimulation on pain thresholds in deafferentated and intact laboratory rats.

## Methods

**Animals.** The experiments were carried out on 32 adult Long Evans rats of either sex (body weight 200–350g). The rats were housed with free access to food and water and maintained under a regime with 12 h of light and 12 h of darkness per day. The mean temperature was  $22 \pm 2$  °C and the relative humidity equalled  $55\% \pm 10\%$ . The acclimation period was 5 days long. This experiment was approved by the Expert Committee for Animal Care and Use of the 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University, Prague, and conducted according

to the guidelines of the Ethics Committee of the International Association for the Study of Pain [36].

**Pain testing.** Nociception in rats was determined according to the latency (s) of avoidance reaction of the forelimbs, the hindlimbs and the tail to the noxious thermal stimulation (Plantar test; Ugo Basile, Comerio, Italy; Tail Flick Analgesia Meter; Life Sciences, USA). In one session every reaction was tested three times following one-minute break, and average values were used for statistical analysis. In intact animals, the effect of the motor cortex stimulation on plantar test was tested on ipsilateral (right) and contralateral (left) sides to the stimulation.

**Implantation of the electrodes.** Two stimulation electrodes made of inox wire were implanted subdurally over the forelimb representation area of the cerebral cortex under ketamine-xylazine anaesthesia (100 mg.kg<sup>-1</sup>, 16 mg.kg<sup>-1</sup>) and fixed with dental enamel. The stereotaxic coordinates were: negative electrode 1mm posterior and 3mm right, positive 1mm anterior and 3,5mm right related to bregma. Their appropriate location was verified by the stimulation of the left forelimb and recording of somatosensory evoked potentials through the electrodes. Electrical stimulation with duration 0.2ms of square-wave pulses at a frequency of 25Hz was delivered for five hours in five consecutive days. Subthreshold intensity was set as 80% of the intensity that evoked left limbs myoclonus.

**Deafferentation.** Under ketamine-xylazine anaesthesia (100 mg.kg<sup>-1</sup>, 16 mg.kg<sup>-1</sup>) the rhizotomy of dorsal roots C5 – Th1 was performed on the left side as described previously in details (Vaculin and Rokyta 2004).

**Experimental design.** 18 rats were included in the first group. Following recovery from the electrodes implantation, the pain thresholds were measured before and after cortical stimulation.

14 rats of the second group were implanted and their pain thresholds were measured before the deafferentation and these were considered as baseline values. Then the rats were deafferentated as described above. 4 – 6 weeks after the deafferentation the pain thresholds were measured before and after the stimulation in five consecutive days. The deafferentated forelimb was excluded from the measurements.

Sex differences in analysed thresholds were found non-significant; therefore the data from males and females were pooled together.

**Statistics.** Data were analysed with ANOVA for repeated measures. In the first group, two-way ANOVA has been used for the tail-flick test. Latency obtained before and after the stimulation represented the factor *stimulation*, five consecutive days of stimulation represented the factor *trend*. The plantar test was analysed separately for forelimbs and hindlimbs by three-way ANOVA where the third factor (*side*) compared nociception on right and left side.

In the second group, the main effects of **deafferentation** and stimulation were tested by one-way ANOVA with three repeated measures which included baseline values before deafferentation, mean values after

deafferentation and after the stimulation. Stability of stimulation effect was analysed by two-way ANOVA with factors *stimulation* comparing pre- and post-stimulation latencies and factor *trend* represented five days of stimulation. In the plantar test of hindlimbs, the factor side was also included in the analysis. Within-subject variability consists of eleven repeated measurements of nociception with the first baseline value and pairs of values obtained before and after the stimulation in five consecutive days. Bonferroni test was used for post hoc comparison. Data are expressed as means  $\pm$  standard deviations,  $p < 0.05$  was considered significant.

## Results

### The effect of the stimulation in intact animals

In the intact group, repeated motor cortex stimulation did not affect the pain thresholds in plantar test of hindlimbs ( $F(1,17)=2.563$ ,  $p=0.127$ ) as well as in tail flick test ( $F(1,17)=2.382$ ,  $p=0.141$ ). Stimulation had the same effect on both hindlimbs; the factor side was non-significant ( $F(1,17)=2.147$ ,  $p=0.161$ ).

Different results were obtained on forelimbs. The motor cortex stimulation increased latencies from  $3.23 \text{ s} \pm 0.49$  to  $3.41 \text{ s} \pm 0.52$  (the main effect of stimulation was  $F(1,17)=12.09$ ,  $p=0.0029$ ), however, significant interaction of factors side  $\times$  stimulation  $F(1,17)=6.82$ ,  $p=0.0182$  showed that this effect was lateralized mainly to the contralateral side to the stimulation (post hoc Bonferroni test  $p=0.0108$ ). Moreover, the magnitude of stimulation-induced analgesia of forelimbs was fluctuating during the observed period (interaction of factors trend  $\times$  stimulation  $F(4,68) = 2.67$ ,  $p=0.0391$ ) with higher latencies observed after the 3<sup>rd</sup> ( $p=0.0265$ ) and the 5<sup>th</sup> stimulation ( $p=0.0427$ ).

### The effect of the deafferentation on nociception

After the deafferentation the pain thresholds were increased in plantar test as well as in tail-flick test in comparison with the baseline values. The baseline value for the right forelimb (contralateral to the deafferentated forelimb) was  $3.55 \pm 0.35 \text{ s}$ , six weeks after the deafferentation it increased to  $4.22 \pm 0.51 \text{ s}$  ( $t=4.04$ ,  $p = 0.0014$ ,  $t$ -test for dependent samples). The pain thresholds of the left hindlimb (ipsilateral to the deafferentated forelimb) before and after the deafferentation were  $3.58 \pm 0.34$  and  $4.2 \pm 0.39$ , respectively ( $t=4.25$ ,  $p= 0.0009$ ). The pain thresholds of the right hindlimb (contralateral to the deafferentated forelimb) before and after the deafferentation were  $3.55 \pm 0.38$  and  $4.43 \pm 0.59$ , respectively ( $t=5.79$ ,  $p=0.00006$ ). The tail-flick latencies before and after the deafferentation were  $3.61 \pm 0.5$  and  $4.26 \pm 0.43$ , respectively ( $t=3.41$ ,  $p = 0.0046$ ).

### The effect of stimulation in deafferentated animals

One-way ANOVA for repeated measures showed significant differences between compared conditions, i.e. between baseline latency, latency after the deafferentation and latency after the stimulation in all nociceptive

tests (for forelimb  $F(2,26) = 8.38$ ,  $p= 0.0015$ , and for the tail  $F(2,26) = 7.38$ ,  $p= 0.0029$ ) Results are shown in Fig. 1. In all tested areas, the stimulation decreased withdrawal latencies to the baseline levels. The same applies to hindlimb ( $F(2,26) = 27.53$ ,  $p < 0.000001$ ). The comparison of latencies on right and left hindlimb showed also significant effect of side ( $F(1,13) = 5.63$ ,  $p= 0.0337$ ) with longer latencies observed on the contralateral side to the deafferentation. Latency on the right hindlimb was higher than on the left hindlimb after deafferentation as well as after the stimulation (interaction of factors side  $\times$  conditions  $F(2,26) = 3.5$ ,  $p=0.045$ ).

### The effect of repeated stimulation

Stability of the magnitude of repeated stimulation was tested from pre- and poststimulation values obtained during the five-day interval. The effect of repeated stimulation on nociception of hindlimbs was highly significant ( $F(1,13) = 75.7$ ,  $p = 0.000001$ ). The changes in withdrawal latencies were stable across the whole observation period of intermittent stimulation, the effect of factor trend was non-significant ( $F(4,52) = 0.077$ ,  $p = 0.989$ ). The differences between pre and poststimulation latencies were in every trial significant (Fig. 2). Repeated stimulation confirmed the lateralization effect of deafferentation with the higher both pre- and poststimulation latency on the contralateral side to the deafferentated limb ( $F(1,13) = 9.96$ ,  $p=0.0076$ ).

The cortex stimulation decreased also latencies of forelimb ( $F(1,13) = 73.55$ ,  $p=0.000001$ ). However, the stimulation-induced decrease was different in different days of stimulation (interaction of factors trend  $\times$  stimulation  $F(4,52)=2.67$ ,  $p=0.04226$ ). The effect of stimulation was significant after the 1st, the 3rd and the 5th day of stimulation (Bonferroni post hoc tests  $p=0.000057$ ,  $P=0.004385$  and  $P=0.00028$  respectively).

Similar results were obtained in the tail flick test. Stimulation decreased the tail flick latencies ( $F(1,13)=21.63$ ),  $p=0.00045$ ) and this effect was stable across the five day stimulation. Although the interaction of trend  $\times$  stimulation was marginally significant ( $F(4,52) = 2.22$ ,  $p=0.0793$ ), similarly to results obtained from forelimb, the observed differences between pre- and poststimulation latencies were only significant after the 1st and the 5th stimulation (Bonferroni post hoc tests  $p= 0.0135$  and  $p=0.00057$  respectively).

## Discussion

The main findings in our study are as follows: first, motor cortex stimulation in intact animals did not evoke any changes in pain thresholds except contralateral forelimb; second, deafferentation increases withdrawal latencies from the painful stimulation; third, the motor cortex stimulation returned increased latencies to the baseline levels; fourth, the effect of stimulation disappeared during 24 hours; fifth, the effect of stimulation oscillated. The results will be discussed in the above-mentioned order.

Motor cortex stimulation in intact animals did not evoke any changes in pain threshold in both hindlimbs and right forelimb. However, pain threshold in the contralateral (left) forelimb increased after MCS. It corresponds well with the location of electrode implantation, which is located in the representative motor cortex area of the left forelimb. It parallels the increase of cold pain threshold reported in man after a high frequency repetitive transcranial magnetic stimulation [32]. This type of stimulation is known to evoke similar effects, and it is used as a test before the electrode implantation for MCS [22].

The deafferentation resulted in increase of paw withdrawal latencies to thermal noxious stimulation in three innervated limbs. The transient increase of the thresholds after the deafferentation in rats was described by Kayser et al. [14], who tested mechanical nociceptive threshold after deafferentation. The authors concluded, that the loss of tonic afferent input from the deafferented limb results in a decrease in the background level of firing in whole spinal cord and thus a greater input from the intact limbs is required to drive the second neuron. According to our results, the increase of the thresholds is rather to be long lasting. However, pain threshold should not be stable in rats. During 10-week observation period after unilateral deafferentation Kříž et al. ([16]) found simultaneous oscillations in self-mutilation behavior and in tail-flick latencies, which was the lowest during self-mutilation attacks.

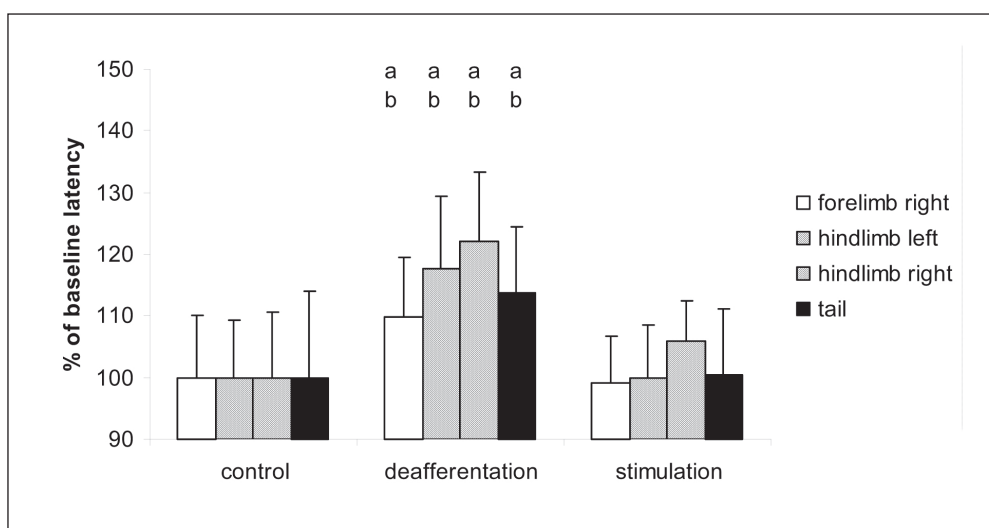
In accordance with Kayser et al. (1990), we also observed higher pain threshold on hindlimb contralateral to the side of deafferentation. This effect was stable and was present prior to as well as after the motor cortex stimulation. From our experiment we could not conclude whether this effect was predominantly maintained through the different activity of dorsal horn

neurons, which are under the descendent antinociceptive control, or through the activity of motor neurons in ventral horns, which should be affected by dorsal rhizotomy too [10].

In man, deafferentation caused by brachial plexus avulsion results in chronic pain [23,27,29]. From clinical studies, there are conflicting views about the effect of chronic pain on pain thresholds of unaffected sites. Whereas Yang et al. [35] and Peters et al. [30] described increase of pain thresholds in patients with chronic pain, Langemark et al. [20] and Bendtsen et al. [5] found decrease of the thresholds in patients with chronic pain. The thresholds seem to be dependent on the type of pain. Autotomy reported to develop after extensive dorsal rhizotomy [4] has not been observed in our study because of the ketamine anaesthesia used for the deafferentation [33].

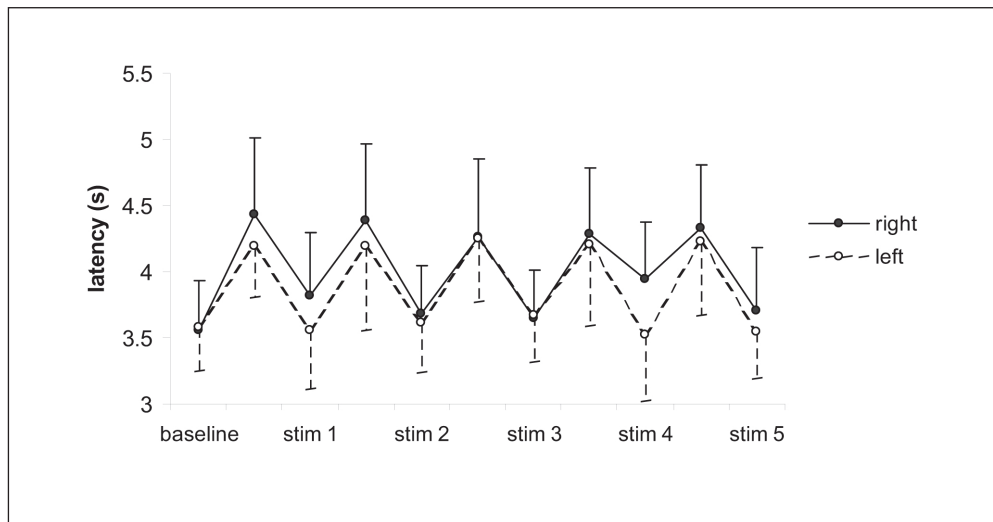
The main result in present study is that pain thresholds being impaired by the deafferentation recover transiently and repeatedly to the pre-deafferentation values after the motor cortex stimulation. The effect of the stimulation disappeared in one day, which corresponds well with findings from clinical studies, where transience of the effect is described [28]. These results are more interesting when differences in anatomy of cerebral cortex between humans and rats are considered. The man is gyrencephalon and motor and somatosensory areas in the cortex are strictly divided by the central sulcus, whereas the rat is lissencephalon and the representative fields of both sensory and motor areas are mixed up.

There is only one study dealing with the effect of MCS on pain thresholds in man [11]. In patients with partial sensory loss, the threshold to the nociceptive warm stimulation in contralateral side decreased after MCS, however in non-significant manner. Despite



**Figure 1:** Comparison of changes in nociception on tested areas after the deafferentation and after the stimulation expressed relatively to the baseline latencies obtained prior to the deafferentation. "a" significant differences between deafferentation and control, "b" significant differences between deafferentation and stimulation.





**Figure 2:** The effect of five-hour stimulation repeated for five days on nociception of right and left hindlimb in the plantar test. The pain thresholds decreased after the stimulation to the baseline values. The effect of the stimulation disappeared in 24 hours and pain thresholds increased to the pre-stimulation levels. The next stimulation resulted in decrease of the thresholds again. After the deafferentation, longer latencies were observed on the side contralateral to the deafferentation.

that and the fact, that the baseline thresholds were not known in that study, the results support hypothesis about the similar effect of MCS in man and animals.

The detailed analysis of the effect of repeated MCS on nociception showed that the degree of pain suppression in forelimb and tail oscillates within two-day intervals. The suppression was significant after the first, the third and the fifth stimulation. Similar results were observed after repeated cocaine or repeated morphine exposure on shock-induced hypoalgesia [8,17].

One-day interval of stimulation with subthreshold intensity used in our experiment is close to kindling paradigm, although the duration of the stimulation and the stimulated structure were different. It is hypothesized that pain evolution also should possess kindling-like phenomenon [31].

In conclusion, we considered the increase of pain threshold after the deafferentation as an impact of deafferentation on pain processing, thus afterwards we interpreted observed changes in the thresholds during MCS as the effect of MCS on pain. In this respect, our results show a similar effect of the stimulation in man and experimental animals despite the differences in the organisation of the cerebral cortex. Thus, the usage of laboratory animals is promising for further studies in the field of involved analgesic mechanisms of MCS.

**Acknowledgements:** The study was supported by grant IGA NF 7406–3/2003.

#### REFERENCES

- Albe-Fessard D, Nashold BS, Lombard MC, Yamaguchi Y, Boureau F. Rat after dorsal rhizotomy, a possible animal model for chronic pain. In: Bonica JJ, editor. *Advances in Pain Research and Therapy*, Vol. 3. New York: Raven Press; 1979. p. 761–6.
- Albe-Fessard D, Rampin O, Sanderson P. Comparison of forelimb deafferentation syndrom in man and animals. In: Sicuteri F, Vecchiet L, Fanciullacci M, editors. *Trends in cluster headache*. Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 29–40.
- Ali Z, Meyer RA, Belzberg AJ. Neuropathic pain after C7 spinal nerve transection in man. *Pain* 2002; **96**:41–7.
- Basbaum AI. Effects of central lesions on disorders produced by multiple dorsal rhizotomy in rats. *Exp Neurol* 1974; **42**:490–501.
- Bendtsen L, Jensen R, Olesen J. Decreased pain detection and tolerance thresholds in chronic tension-type headache. *Arch Neurol* 1996; **53**:373–6.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; **33**:87–107.
- Berman JS, Birch R, Anand P. Pain following human brachial plexus injury with spinal cord root avulsion and the effect of surgery. *Pain* 1998; **75**:199–207.
- Caggiula AR et al. Oscillatory-sensitization model of repeated drug exposure: cocaine's effects on shock-induced hypoalgesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998; **22**:511–21.
- Canavero S, Bonicalzi V. Cortical stimulation for central pain. *J Neurosurg* 1995; **83**:1117.
- Cuppini R, Sartini S, Ambrogini P, Fulgenzi G, Graciotti L. Rat motor neuron plasticity induced by dorsal rhizotomy. *Neurosci Lett* 1999; **275**:29–32.
- Drouot X, Nguyen JP, Peschanski M, Lefaucheur JP. The analgesic efficacy of chronic motor cortex stimulation is related to sensory changes in the painful zone. *Brain* 2002; **125**:1660–4.
- Ebel H, Rust D, Tronnier V, Boker D, Kunze S. Chronic precen-tral stimulation in trigeminal neuropathic pain. *Acta Neurochir (Wien)* 1996; **138**:1300–6.
- Katayama Y, Tsubokawa T, Yamamoto T. Chronic motor cortex stimulation for central deafferentation pain: experience with bul-bar pain secondary to Wallenberg syndrome. *Stereotact Funct Neurosurg* 1994; **62**:295–9.
- Kayser V, Basbaum AI, Guilbaud G. Deafferentation in the rat increases mechanical nociceptive threshold in the innervated limbs. *Brain Res* 1990; **508**:329–32.
- Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; **50**:355–63.

- 16 Kriz N, Yamamoto A, Tobias J, Rokyta R. Extracellular potassium resting level in thalamic nuclei and tail-flick latency after deafferentation in rats. *Journal of Physiology–London* 1998; **511P**:57P–8P.
- 17 Kucinski BJ et al. Oscillatory effects of repeated morphine on shock-induced hypoalgesia and beta-endorphin. *Synapse* 1998; **30**:30–7.
- 18 Kuroda R, Kawabata A, Kawao N, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y. Somatosensory cortex stimulation-evoked analgesia in rats: potentiation by NO synthase inhibition. *Life Sci* 2000; **66**: L271–L276.
- 19 Kuroda R et al. Secondary somatosensory cortex stimulation facilitates the antinociceptive effect of the NO synthase inhibitor through suppression of spinal nociceptive neurons in the rat. *Brain Res* 2001; **903**:110–6.
- 20 Langemark M, Bach FW, Jensen TS, Olesen J. Decreased nociceptive flexion reflex threshold in chronic tension-type headache. *Arch Neurol* 1993; **50**:1061–4.
- 21 Lee BH, Won R, Baik EJ, Lee SH, Moon CH. An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *Neuroreport* 2000; **11**:657–61.
- 22 Lefaucheur JP, Drouot X, Keravel Y, Nguyen JP. Pain relief induced by repetitive transcranial magnetic stimulation of precentral cortex. *Neuroreport* 2001; **12**:2963–5.
- 23 Mailis A. Compulsive targeted self-injurious behaviour in humans with neuropathic pain: a counterpart of animal autotomy? Four case reports and literature review. *Pain* 1996; **64**:569–78.
- 24 Masopust V, Beneš V, Netuka D, Pollin B, Rokyta R, Stejskal M. Stimulace motorické kožkové kúry v léčbě chronické talamické bolesti. *Bolest* 2001; **4**:91–4.
- 25 Meyerson BA, Lindblom U, Linderöth B, Lind G, Herregodts P. Motor cortex stimulation as treatment of trigeminal neuropathic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993; **58**:150–3.
- 26 Migita K, Uozumi T, Arita K, Monden S. Transcranial magnetic coil stimulation of motor cortex in patients with central pain. *Neurosurgery* 1995; **36**:1037–9.
- 27 Nashold BS, Ovelmen–Lewitt J. Deafferentation pain syndromes: pathophysiology and treatment. New York: Raven Press; 1991.
- 28 Nguyen JP et al. Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomical data. *Pain* 1999; **82**:245–51.
- 29 Pagni CA, Lanotte M, Canavero S. How frequent is anesthesia dolorosa following spinal posterior rhizotomy? A retrospective analysis of fifteen patients. *Pain* 1993; **54**:323–7.
- 30 Peters ML, Schmidt AJ, Van den Hout MA, Koopmans R, Sluifster ME. Chronic back pain, acute postoperative pain and the activation of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). *Pain* 1992; **50**:177–87.
- 31 Post RM. Do the epilepsies, pain syndromes, and affective disorders share common kindling-like mechanisms? *Epilepsy Res* 2002; **50**:203–19.
- 32 Summers J, Johnson S, Pridmore S, Oberoi G. Changes to cold detection and pain thresholds following low and high frequency transcranial magnetic stimulation of the motor cortex. *Neurosci Lett* 2004; **368**:197–200.
- 33 Vaculin S, Rokyta R. Effects of anesthesia and nociceptive stimulation in an experimental model of brachial plexus avulsion. *Physiol Res* 2004; **53**:209–14.
- 34 Wall PD et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain* 1979; **7**:103–11.
- 35 Yang JC, Richlin D, Brand L, Wagner J, Clark WC. Thermal sensory decision theory indices and pain threshold in chronic pain patients and healthy volunteers. *Psychosom Med* 1985; **47**:461–8.
- 36 Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; **16**:109–10.

# Somatosensory Evoked Response and Jaw Opening Reflex Elicited by Tooth Pulp Stimulation in awake freely moving rats

Stephane BAREK<sup>1</sup>, Robert RUSINA<sup>2</sup>, Bernard POLLIN<sup>3</sup> & Jean AZERAD<sup>1</sup>

1. Laboratoire de physiologie de la mastication, University Paris VII – Denis Diderot, Paris – France
2. Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague – Czech Republic
3. CNRS, Paris, France

Correspondence to: Stephane BAREK  
Université de Paris 7  
5, rue Garancière, 75006 Paris, FRANCE  
PHONE: +33-1-47 20 34 90  
EMAIL: dr.barek@wanadoo.fr

Submitted: 2007-01-15

Accepted: 2007-02-15

Key words: rat; pain; jaw opening reflex; dental pulp; evoked potentials

Neuroendocrinol Lett 2007; **28**(2):121–130 PMID: 17435676 NEL280207A04 ©2007 Neuroendocrinology Letters [www.nel.edu](http://www.nel.edu)

## Abstract

**OBJECTIVE:** Investigation of pain and nociception refers to different models. Depending upon the intensity of stimulation, unmyelinated pulpal fibers or periodontal A-fibers can be stimulated producing a short or a long latency jaw opening reflex of the digastric muscle. This paper investigates the different components of the jaw opening reflex in addition to the correlation between afferent fibers involved in the cortical evoked response.

**DESIGN AND SETTING:** Fifteen awake male rats were implanted with tooth pulp stimulation electrodes, digastric and cortical recording electrodes. Ten rats were submitted to recordings after a single tooth pulp stimulation, while five rats were using conditioning and test stimulation. Tooth pulp evoked potentials and digastric EMG were simultaneously recorded. A multiresolution denoising method was used for signal processing.

**RESULTS:** Following tooth pulp stimulation, a cortical response was produced including the following peaks: P6.5 ± 1.1, N11 ± 1.2, P17 ± 1.2, P27 ± 2.9, N53 ± 7.5, P69 ± 5.8, P88 ± 13, N160 ± 9.7, P204 ± 14.2. The distribution and amplitude of these peaks are correlated to the stimulation intensity ( $r=0.96$ ,  $p<0.01$ ). An interaction between the different components of the jaw opening reflex was identified on EMG, following a conditioning shock, where a cortical evoked response showed a P30 ± 2.7 peak which was observed concurrently with the jaw opening long latency reflex.

**CONCLUSION:** Our results identify the interaction between the different components of the jaw opening reflex and the correlation to the cortical evoked response.



#### ABBREVIATIONS:

TPS	- tooth pulp stimulation
EP	- evoked potentials
TPEPs	- tooth pulp evoked potentials
JOR	- jaw opening reflex
LL JOR	- long latency component of the jaw opening reflex
SL JOR	- short latency component of the jaw opening reflex
ISI	- inter stimulus interval

## INTRODUCTION

Different animal models were identified in order to determine the relationship between pain, nociception and motor control. In this respect, electrical tooth pulp stimulation allowed the activation of high threshold receptors, mainly connected to A-delta and C-fibers. This reflex, considered as a relevant orofacial protective reflex, mediated at the brain stem level can also be elicited by the stimulation of low threshold mechanoreceptors, such as those located in the periodontal ligament and oral mucosa. Previous studies showed an interaction between pain and behavioral activity [33]. In humans, the study of cortical responses following tooth pulp stimulation (TPS) has been used for pain investigation [9,27].

In rats, tooth pulp stimulation of incisors produces a jaw opening reflex (JOR) usually recorded on the digastric muscle, this usually being a way to analyze the mechanisms of pain [36]. Two different JOR components are recorded at different latencies, depending upon the TPS intensity. It is commonly admitted that moderate TPS evokes a long latency (LL) reflex (10–25 ms) corresponding to the stimulation of pulpal unmyelinated fibers [8,9,26]. With the increasing stimulus intensity, the long latency reflex amplitude increases, then decreases and disappear; concurrently, a short latency (SL) reflex ( $\approx 6$  ms) appear. This short latency reflex is due to the electrical stimulus spreading to the periodontal myelinated nerve fibers [3]. The LL response loss is due to an inhibitory effect produced by the periodontal afferents on the response of the motoneurons of the digastric muscle [8]. Different authors investigated the JOR following TPS. In rats, the LL and SL JOR has been well identified and few papers demonstrated that LL JOR could be recorded without SL JOR, following TPS [7,8].

Following TPS, a response can be evoked in the somatosensory cortex concurrently with the JOR. The afferent volley is triggered by the TPS and is conducted through sensory relays to the somatosensory cortex. The study of tooth pulp evoked potentials (TPEPs) allows to analyze the projection of primary sensory afferent neurons to the somatosensory cortex. In this respect, different investigations were performed on rats [15,25,33,36,38], on cats [1,20], on monkeys [17] and on human [9,10].

In rat, though the central projection of the pulp has already been identified with trans-ganglionic transport of HRP peroxidase [4,24], the central pathway of the JOR is still unknown. The incisors of the rats are continuously growing teeth, the pulp of which is almost entirely innervated by unmyelinated axons [6,23,28,34,35]. The conduction velocity of these fibers may vary between 0.6 and 2.9 m/s [38], although some of them may be myelinated outside of the pulp with a conduction velocity of 25m/s. Thus, the conductive period of time between the crown and root apex of the lower incisor is about 12–25 ms when stimulation was performed at the incisal part of the crown of the teeth. When high intensity TPS was performed on the lower incisor of the rat, it is possible that the stimulus spreads to periodontal tissues [8].

Neither the interaction of the different components of the JOR nor the cortical evoked responses following the TPS have been completely described. This paper aims at analyzing the interaction of the different components of the JOR in freely moving rats, the correlation between the different components of the JOR and the cortical potentials, and the interaction between the different components of the JOR and cortical response after paired shocks.

## MATERIALS AND METHOD

### Surgical procedures

The experiments were performed on 15 male rats of the Sprague-Dawley strain, weighing 300 to 350 g which were operated under anesthesia with Ketamine® (Imalgène 500, 100 mg/Kg i.m.). Peripheral bipolar stimulation silver electrodes were implanted in the lower incisor tooth pulp and sealed with dental cement (SuperBond C&B, Sun Medical Co.,LTD, Shiga, Japan). Silver EMG electrodes were wrapped over the ipsilateral anterior belly of the digastric muscle to record the JOR [7]. Then a peripheral reference electrode was inserted subcutaneously behind the auricular area. Epidural recording electrodes were placed in the contralateral somatosensory cortex over the tooth field (bregma-anterior +1 mm, lateral 3 mm below the crest of the skull) [33]. A cortical reference electrode was implanted in the left nasal bone and the wires were connected to a connector which was sealed on the cranial skull [23]. The animals were placed in a controlled animal house for six days in order to recover from surgery, all experiments were realized in accordance to ethical guidelines.

### Recordings

Freely moving animals were divided into 2 groups, according to the stimulation paradigm.

In the first group (G1, n=10), the JOR and TPEPs were recorded during 250 ms following a single TPS. TPS intensity was adjusted to 3 different levels slightly above the threshold of the 3 components of the JOR (LL, LL and SL, SL alone) so as stimulating pulpal unmyelinated fibers and then periodontal myelinated fibers.

Regarding the second group (G2, n=5), the JOR and the TPEPs were recorded by means of a stimulation paradigms consisting of a conditioning stimulation followed at variable delay by a test stimulation of variable intensities. In this group, different intensities of stimulation were applied for conditioning and test stimulation in order to produce: a double LL reflex, a SL reflex followed by a LL reflex, double LL + SL and double SL reflex. Recordings were performed for an inter-stimulus interval (ISI) varying from 80 ms to 30 ms with steps of 10 ms and from 30 to 5 ms with steps of 5 ms.

Before each experiment a test was performed to ensure that animals presented clearly differentiated LL and SL jaw opening reflex. The animals were placed in a controlled environmental area to ensure that experimental conditions will prevent them from stress which inhibits the LL muscular responses [29,34].

TPS was produced by a stimulation unit (302-T, WPI, UK) at 2 V (continuous current), for 1 ms, every 2 s. Different TPS intensities was adjusted slightly, between 100  $\mu$ A and 10 mA, above the level corresponding to the threshold of each components of the JOR, after testing individually each animal. TPS was delivered using dedicated software (Clampex 8.0, Axon instrument, USA) by means of an D/A converter (Digidata 1200 A, Axon instruments) and a linear stimulus isolator (A 395, WPI, UK). Responses were recorded using a preamplifier probe (AI 417 and AI 405, Axon instrument) and a programmable amplifier (Cyberamp 380, Axon instrument). A/D acquisition was realized through a converting card (Digidata 1200 A) at 2 kHz sampling rate. Then data were stored and assessed on a PC. In all cases, in accordance with respecting the rule of ethic committee, TPS amplitude were applied without nociceptive behavioral expression of pain or distress like vocalization, depression or other behavioral changes, abnormal appearance or abnormal posture or immobility.

#### Signal processing

100 sweeps of 250 ms were recorded for each run in order to perform an acceptable digital filtering. Following A/D converting, a signal processing procedure was used to standardize sweeps and to eliminate artifact responses. Then a multiresolution thresholding method was applied to TPEPs data to eliminate noise of the signals. Each EP was divided (transforming process) into a set of basic sinusoid functions called wavelets. Different processing tests demonstrated that the 8<sup>th</sup> order Symlet wavelet was the most efficient to eliminate noise. Following shrinkage of the wavelets coefficients, an inverse transforming process was applied to the signal to restore a de-noised signal, as previously demonstrated [5]. Signal processing was programmed by means of the Matlab® software language (Mathick, CA, USA) with the Wavelet toolbox®. Signal averaging was also performed on the same data in

order to evaluate the performance of the multiresolution method in relation with the averaging method.

#### Statistical analysis

JOR or TPEPs recordings presented important inter individual variations of intensity between animals which limited the comparison of the results. So it was necessary to standardized data in order to allow a comparison across animals. In order to obtain results as ratios (percentage of variation) we compared each animal to himself. Then TPEPs were split into different classes of latency and tested using the ANOVA and complementary Tukey-test for an inter-group comparison. The low number of animals used in different portions of the studies did not affected statistical analysis and was compensated by the great number of datas which were recorded for each animal.

## RESULTS

### SIGNAL ANALYSIS OF EVOKED POTENTIALS

Signal analysis of the showed that the wavelet shrinkage method, for all the different components of the evoked response were preserved (Figure 1) though the noise was eliminated. The comparison between the averaging method and the multiresolution analysis significantly improved (71%  $\pm$  22) the signal-to-noise ratio measured out in relation to the averaging method (t=4.95, p<0.001).

### SINGLE SHOCK STIMULATIONS

For all stimulation paradigms, TPEPs are described in relation to the JOR, which is used as a reference value to determine which type of fibers (pulpal and/or periodontal) was stimulated.

#### Jaw opening reflex

The latency of the JOR was recorded after TPS. For all animals, the two components of the JOR were recorded: between 5 and 8 ms for the SL JOR and between 12 and 20 ms for the LL JOR.

#### Cortical evoked responses

For low TPS situated under the threshold of the JOR, TPEPs did not appear on the somatosensory cortex.

For supraliminal TPS, the TPEPs recorded on the somatosensory cortex presented different patterns, in relation with the TPS intensity. The maximum TPEP amplitude and the intensity of the stimulation were significantly correlated (r=0.96, p<0.01), excepted when stimulus artifact obscuring recordings like when the TPEPs was saturated at high stimulus intensity. The maximum amplitude of the TPEPs varied among the rats, but was still recorded between 48 and 53 ms.

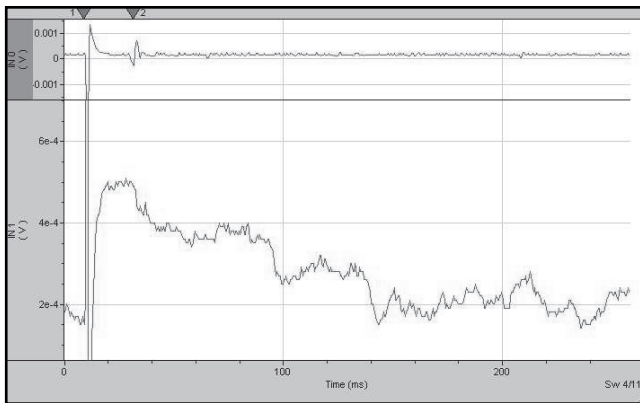


Figure 1a

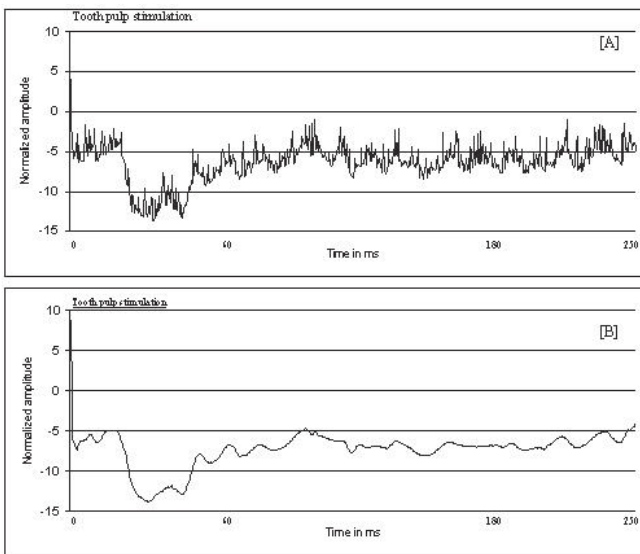


Figure 1b

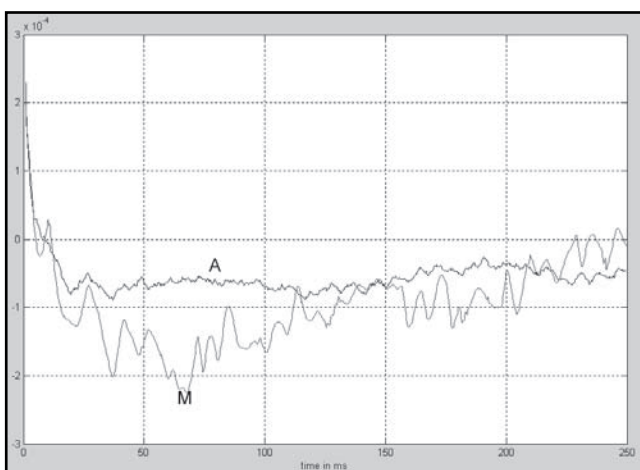


Figure 1c

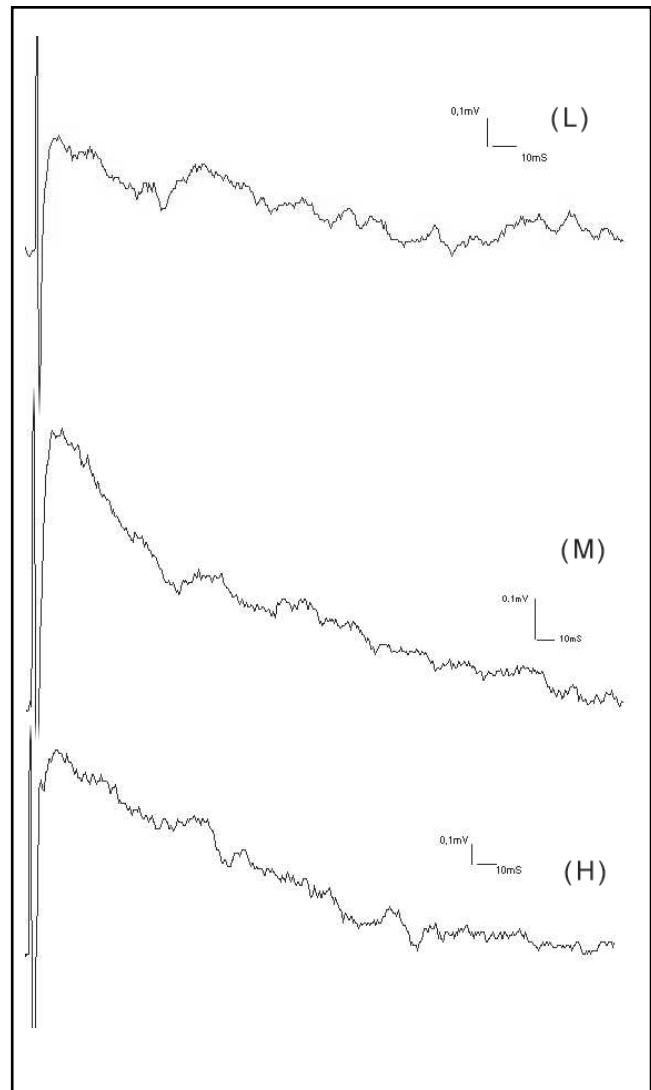


Figure 1d

**Figure 1a.** Time-locked EMG (IN0) and cortical activation (IN1) after moderate tooth pulp stimulation. At the same time of the EMG, the cortical activation was recorded.

**Figure 1b.** Effect of the multiresolution signal processing. Cortical tooth pulp evoked potential (TPEPs) of single sweep [A] transformed and denoised with a wavelet 'Symlet' of the 8<sup>th</sup> order then this signal was reconstituted without noise in [B]. The characteristics of the original signal remain present after wavelet signal processing.

**Figure 1c.** Denoising method: Comparison between averaging (A) and multiresolution method (M). In comparison to the averaging method; the multiresolution method gives a better reduction of the noise without attenuation of the output signal.

**Figure 1d.** When increasing the intensity of tooth pulp stimulation (low, moderate or high) different pattern of evoked potentials were recorded (L, M and H).

For low stimulation intensity, when TPS evoked a LL JOR, the TPEPs were characterized by 2 phases:

- An early component [0 ms–17 ms] (Table 1), consisting of a low amplitude ( $<32 \mu\text{V} \pm 10$ ) polyphasic wave P6.5  $\pm$  1.1 ms, N11  $\pm$  1.2 ms and inconstant P17  $\pm$  1.2 ms.
- A late component [20 ms–240 ms] (Table 1), was characterized by a three-phase wave: P27  $\pm$  2.9 ms, N53  $\pm$  7.5 ms, P69  $\pm$  5.8 ms, followed by a P88  $\pm$  13 peak and a late multiphase response composed of a complex set of components of variable amplitude, P132  $\pm$  4.7 ms, N160  $\pm$  9.7 ms, P204  $\pm$  14.2 ms. The [P27, N53, P69] components were statistically identified (ANOVA and Tukey test,  $p < 0.05$ ) and linked to the JOR LL component.

For medium stimulation intensities, when the SL and the LL JOR were recorded: TPEPs were characterized by an early, low amplitude ( $<32 \mu\text{V} \pm 10$ ) component [P7.6  $\pm$  1.6, 11.2  $\pm$  1.3, 17.1  $\pm$  1] (Table 1) followed by a biphasic component [P23  $\pm$  2.5, N48  $\pm$  6.8] and a polyphasic component constituted by a complex set of components of variable amplitude [N87  $\pm$  3.6, P125  $\pm$  13.7, N155  $\pm$  6.6, P220  $\pm$  12.3] (Table 1).

For high stimulation intensities, when only the SL JOR persisted, TPEPs are characterized by an early, low amplitude ( $<32 \mu\text{V} \pm 10$ ) component [P6  $\pm$  0.8, 10.7  $\pm$  1.4, 16.5  $\pm$  1.4] (Table 1) followed by a biphasic response [P22  $\pm$  3.5, N51  $\pm$  9.7] and a polyphasic component constituted by a complex set of components of variable amplitude [N73  $\pm$  7.2, P124  $\pm$  4.3, N161  $\pm$  17.2, P216  $\pm$  16.3] (Table 1).

The early component of the TPEPs [0–20 ms], was present in each case and no correlation could be found with any component of the JOR.

## PAIRED SHOCKS EXPERIMENTS

### Jaw opening reflex response

#### A.

When the conditioning stimulation evoked a SL JOR and the test stimulation intensity was adjusted to the amplitude that normally evokes a LL JOR, then a SL and a LL JOR reflex was present after the test stimulation.

#### B.

With a decreasing inter stimulus interval (ISI), in the same conditions of stimulus intensities as in (A.): After the test stimulation, the amplitude of the SL JOR raised when the ISI = 40  $\pm$  3.2 ms, and then decreased to a threshold for ISI = 10  $\pm$  0.2 ms (Figure 2a), concurrently, the amplitude of the LL JOR after test shock increased by step (Figure 2b) until the ISI reached 25  $\pm$  9.1 ms and then decreased and disappeared when the ISI was shorter than 10  $\pm$  6.5 ms.

#### C.

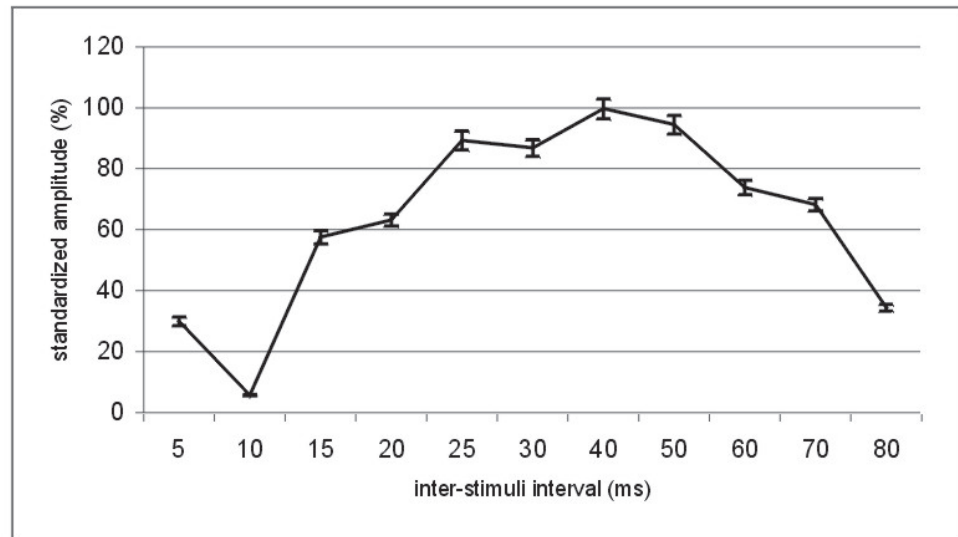
When the conditioning stimulation evoked a SL JOR and the test stimulation intensity was adjusted to the amplitude that normally evokes a SL JOR, only the SL JOR was observed after the conditioning stimulus and the test stimulus. This response pattern changed when the ISI decrease below 45 ms (Figure 3 and 4). When the ISI was below 35 ms  $\pm$  7.4, an unexpected LL reflex appeared following the test TPS (Figure 3a and b). The amplitude of the LL reflex reached a maximum value (ISI = 9  $\pm$  0.7 ms) (Figure 3c) and then faded away progressively

**Table 1.** Components of the tooth pulp evoked potentials recorded after tooth pulp stimulation.

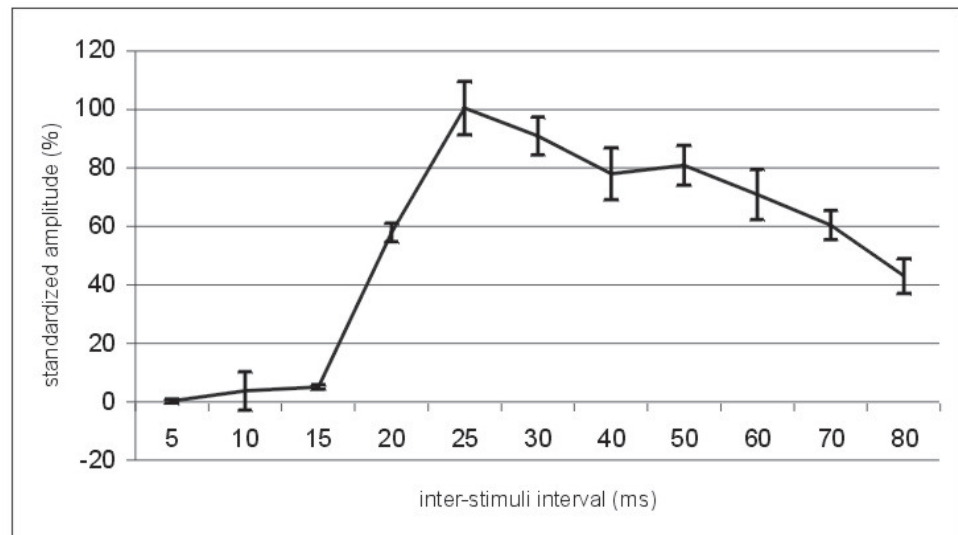
Intensity of stimulation	TPEPs									
<b>Low</b>	P6.5	N11.1	P17.2	P27*	N53*	P69	N88	P132	N160	P204
<b>sd</b>	1.1	1.2	1.2	2.9	7.4	13	4.7	4.7	9.7	14.2
<b>Moderate</b>	P7.6	N11.2	P17.1	P23	N48	—	N87	P125	N155	P220
<b>sd</b>	1.6	1.3	1	2.4	6.8	—	3.6	13.7	6.6	12.3
<b>High</b>	P6.0	N10.7	P16.5	P22	N51	—	N73	P124	N161	P216
<b>sd</b>	0.8	1.4	1.4	3.5	9.7	—	7.2	4.3	17.2	16.3

Mean latency (in ms) and standard deviation (sd) of the tooth pulp evoked potentials. Low intensity tooth pulp stimulation corresponded on the EMG to the long latency component of the JOR, moderate intensity of stimulation corresponded to the short and the long latency component together and high intensity of tooth pulp stimulation corresponded to short latency JOR alone. For low intensity tooth pulp stimulation, when a long latency jaw opening reflex was recorded on the digastric muscle, the P27, N53 evoked potentials present significant differences; for medium and high intensity of stimulation; P69 could not be observed.

**Figure 2a.** Short latency jaw opening reflex after paired tooth pulp low intensity stimulations (mean values and standard deviation). During reduction of the inter stimuli interval, the standardized amplitude of the short latency jaw opening reflex after test stimulation increase and raised for a inter stimuli interval of  $40 \pm 3.2$  ms, then the amplitude decreased till  $10 \pm 0.2$  ms.



**Figure 2b.** Long latency jaw opening reflex after paired tooth pulp low intensity stimulations (mean values and standard deviation). During reduction of the inter stimuli interval, the standardized amplitude of the long latency jaw opening reflex after test stimulation increase and raised for a inter stimuli interval of  $25 \pm 9.1$  ms, then the amplitude decreased till  $10 \pm 6.5$  ms.



(Figure 3d). At the same time, the amplitude of the SL reflex decreased till a threshold for ISI = 5 ms (Figure 4).

Evoked potentials

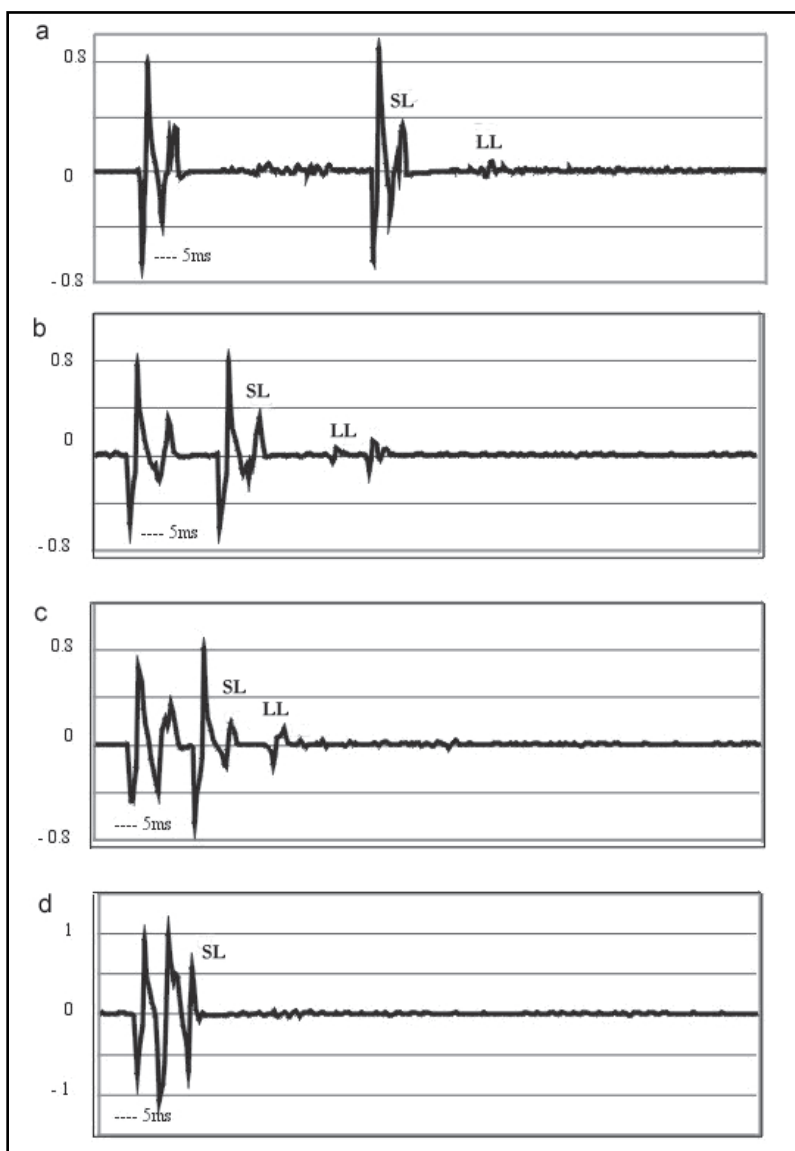
The impact of paired TPS on responses evoked on the somatosensory cortex was investigated in group G2 (n=5) with freely moving rats. After low intensity TPS no change were observed in relation with the TPEPs after simple stimulation paradigms.

When the conditioning stimulation evoked a SL JOR and the test stimulation was adjusted to a high intensity that normally evokes a SL JOR a P30 component was observed after the second stimulation, when ISI was decreasing,. The amplitude of such a component increased till ISI =  $26 \text{ ms} \pm 6.2$  and then decreased and disappeared (ISI <  $10 \text{ ms} \pm 4.1$ ).

**DISCUSSION**

SIGNAL PROCESSING

The investigation of evoked cortical potentials with a low signal-to-noise ratio represents a serious challenge when the potentials are embedded in the ongoing EEG activity. Somatosensory evoked potentials are complex and transient non-stationary signals (i.e. not time locked to stimulus). Digital filtering of such signals, with time invariant descriptors such as Fourier's transform analysis, remains a difficult issue. The averaging of a high number of sweeps is generally used to obtain a satisfactory result. Nevertheless, due to the large analog bandwidth used during recordings, a high frequency noise still remains following averaging. It happens that this noise frequency is in the same frequency range as one of the evoked potentials (EP).



**Figure 3.** Interaction of the two component of the jaw-opening reflex after single sweep high intensity paired shocks. For decreasing inter stimuli interval of 30 ms (a), 15 ms (b), 10 ms (c) and 5 ms (d), the long latency (LL) component of the jaw opening reflex started to appear for a inter stimuli interval <32 ms. Then the amplitude of this component increase until the inter stimuli interval reach 9ms and then decreases to disappear for a inter stimuli interval <5 ms. Concurrently the short latency (SL) component of the jaw-opening reflex decreases and then increases again.

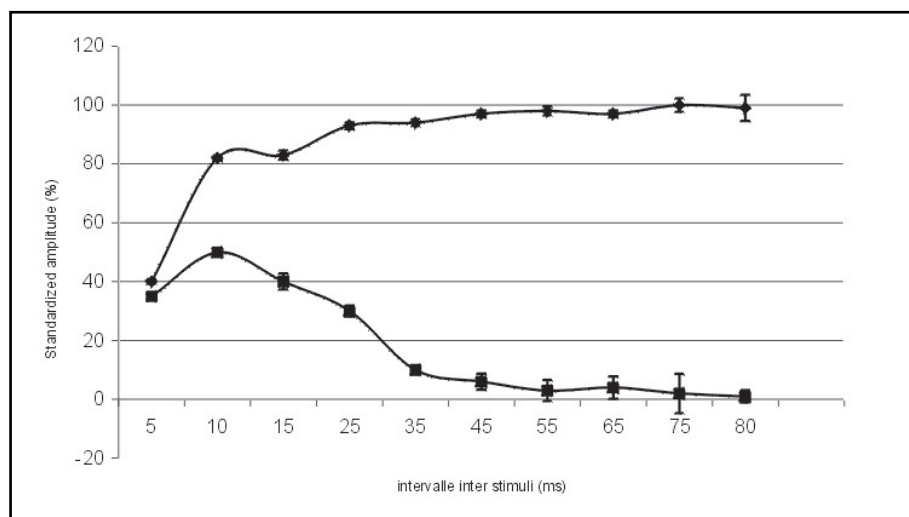
Several methods have been identified to improve the EP resolution such as Wiener filtering [12,13,21]. However time-varying filters or optimal time-varying filters [5,40] were more adapted to the characteristics of EP. In accordance with other studies [5, 31] the time-varying signal processing method used in this paper, improved significantly the signal-to-noise ratio in relation to the averaging method. The characteristics of the evoked signal are preserved after wavelet analysis (Figure 1). Usually the averaging method requires at least 800 sweeps for each run. Together with the rejection of overloaded responses the wavelet method allowed for the reduction of the number of sweeps necessary to obtain a satisfactory response with a ratio of 1 to 10.

#### JAW OPENING REFLEX

A two-component reflex was elicited in the ipsilateral digastric muscle after a single TPS [7]. A LL reflex component was produced at low stimulation intensity, by the activation of unmyelinated axons of the pulp. With increasing TPS intensity, a SL reflex component was elicited by the stimulation of periodontal myelinated fibers due to the current spread to periodontal tissues. Periodontal afferents caused an inhibitory period on digastric motoneurons canceling inputs from tooth-pulp, as demonstrated earlier [8]. Therefore, when the TPS intensity increased and reached the threshold of the SL JOR, the LL reflex was progressively inhibited.

Our results confirm these interactions between the JOR components. This inhibitory process may use different pathways from the pre-synaptic inhibition of

**Figure 4.** Interaction of the long latency (squares) and short latency (circles) component of the jaw-opening reflex after high intensity paired shocks (mean values and standard deviation). During reduction of the inter stimuli interval, while the amplitude of the short latency component decrease; the amplitude of the long latency component increases and then decreases gradually.



primary afferents to the activation of inhibitory interneurons controlling the excitatory neuronal chain. The interneurons involved in the early JOR are localized at all levels of the trigeminal sensory complex (TSC) and in the inter-trigeminal area [2].

In cats, previous experiments suggested that SL reflex interneurons could be localized in the rostral part of the TSC (subnuclei oralis and interpolaris). In rats, although controversial, interneurons could be localized in the nucleus principalis [7] and in the intertrigeminal area [22]. However the JOR pathway remains a speculative issue.

In our experiment we tried to apply the double stimulation paradigm to investigate the JOR and TPEPs. This method has not been used in the field of JOR studies in rats. The double stimulation enhanced a period of facilitation (ISI = 80 to 45 ms) after SL JOR component, followed by a phase of inhibition (ISI = 45 to 10 ms) (Figure 2a and 2b). The results show that the SL reflex decrease and the LL reflex increase are simultaneous (Figure 3b). This clarifies the relation between the two components of the JOR observed [7] and supports to the assumption of an interaction between C and A fibers.

The inhibition and facilitation process has been identified on other facial reflexes such as blink reflexes [14,30] which presents two components (early and late components) interacting together. In addition, double shock stimulation may be used to disclose component interactions and to elucidate the reflex pathways, produced according to different ways of stimulation.

In our experiment, a double high intensity stimulation eliciting a SL JOR allows the reappearance of a LL JOR component as soon as the second SL reflex component decreases (Figure 3 a,b,c and d). Those results confirm the importance of the SL JOR and the periodontal afferences in the facilitation/inhibitory process. Regarding our results it is possible to quantify the inhibitory effects

of the periodontal afferents (Figure 4). The amplitude of the reappearing LL JOR did not reach the amplitude of the LL JOR produced at low intensity stimulation (~30%). This could indicate that the inhibitory process partially persists under these conditions.

#### SOMATOSENSORY EVOKED POTENTIALS

Previous results [33] showed that the TPS produced a cortical response in an area being one millimeter anterior to bregma in the TPS controlateral somatosensory cortex; it was confirmed in our results. The amplitude of the EP is in relation with the intensity of the TPS and follows a power law [37,39]. When the TPS intensity increases, this relation reaches a limit which could be attributed to fibers saturation. Thus we could consider that the EP is in relation with the recruitment of nervous fibers after TPS.

The number of unmyelinated axons of the mandibular incisor dental pulp of rats varies between 127 and 224 [6,16]. The low recruitment of fibers, in some experimental conditions, may be the reason why it was difficult to record the TPEPs after low intensity stimulation (LL evoking). This allows us to consider that there is a specific threshold of recruitment necessary to evoke a cortical response.

The lack of TPEPs for Low TPS, situated under the threshold of the LL JOR, showed that there is a link between JOR and TPEPs. This could be due, either to the threshold of nervous afferences or to an insufficient recruitment of fibers.

The question of a possible myogenic contamination of TPEPs was evoked by different authors [18]. This should be considered as a possible bias in our study for the [5–20 ms] interval in which the JOR was recorded. In our studies, the TPEPs elicited after a single stimulation show



an early component, at about [ $6 \pm 0.8$  to  $17.2 \pm 1.2$  ms] (Table 1), in the range of a possible myogenic contamination. Selected rats presented a lower incisor length about 25 mm. Electrodes were implanted in their pulp at 12 mm from the incisal edge. If we consider the conductive time-period of the non-myelinated fibers into the pulp (0.5 m/s) and the conductive time-period of fibers outside the pulp (2.9 to 25 m/s) [32,35], consequently, the conductive period of time to the somatosensory cortex should not be less than 20 ms and the cortical evoked responses recorded for 6 to 20 ms of latency did not have a pulpal origin. Following TPS of the upper incisor, Rehnig [33] observed a P6 and N12 peak. In our study, P6 was concurrent with the SL JOR component, and it is possible to suppose that P6 corresponds to the periodontal afferents activation and the recording of motor reflex response with the TPEP recording electrodes.

The study of the thalamic projection of the primary sensory afferent neurons [36] confirms the lack of TPS evoked potentials prior to 8 ms. Furthermore the thalamic EPs were recorded for 8 ms, [20–30 ms] and [40–90 ms] following the TPS (4). In this respect, considering our results after single TPS, the [20–250 ms] EP components are acceptable as cortical TPEPs (Table 1).

When single TPS evoke cortical responses, our results showed different patterns depending on TPS intensity. Statistically identification of the [ $P23 \pm 2.5$ ,  $N48 \pm 6.8$ ] component after low intensity TPS, evoking LL JOR, could suggested that this TPEP component corresponds specifically to the pulpal unmyelinated fibers.

Concerning double stimulation experiments, when the second stimulation produced a LL JOR, no specific EP was evoked by the second stimulation. However, some potential were elicited by higher TPS intensities producing a SL reflex. This could be due to the weak afferent volleys reaching the cortex. As we observed for the JOR, a cortical evoked response could be expected following after conditioning shock, due to summation of responses. This effect was not observed at the cortical level, confirming the weakness of the input at this level. This assumption is confirmed by the effective correlation ( $r=0.96$ ) between the integration of the EP and the TPS intensity.

In this experimental configuration, the results showed main peak values at P30 following the second stimulation.  $P30 \pm 2.7$  appeared only after the double SL TPS, namely when the current spread through the periodontal tissues and probably activated myelinated afferents. The window of appearance of P30 (ISI = 70 to 10 ms) corresponded to the window of appearance of the JOR LL component following the second stimulation (Figure 4). Accordingly we could assume that P30 was evoked by the stimulation of unmyelinated slow fibers.

As a conclusion our results allow to determine the TPEPs corresponding to the stimulation of the different afferences involved in the JOR. Results after paired shocks makes it possible to identify and to quantify the interaction between the different components of the JOR and to establish a correlation with the TPEPs.

## REFERENCES

- 1 Anderson DJ, Hannam AG, Matthews B. Sensory mechanism in mammalian teeth and their supporting structures. *Physiol Rev.* 1970; **50**: 171–195.
- 2 Appentag K, Donga R, William RG. Morphological and electrophysiological determination of the projections of jaw-elevator muscle spindle afferents in rats. *J. Physiol (Lond.)* 1985; **369**: 93–113.
- 3 Azérad J, Fuentes F, Lendais I, Limoge A, Pollin B. Methods for selective tooth pulp stimulation in acute and chronic preparation in rats. *J Physiol (Lond).* 1988; **406**: 3.
- 4 Azerad J, Kalifa P, Pollin B, Decorte L. Histochemical and immunocytochemical study of primary afferent neurons innervating the incisor dental pulp of the rat. *Neurosci Lett.* 1986; **526–535**
- 5 Bertrand O, Bohorquez J, Pernier J. Time-frequency digital filtering based on an invertible wavelet transform: an application to evoked potentials. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1994; **41**(1): 77–88.
- 6 Bishop MA. A fine structural survey of the pulpal innervation in the rat mandibular incisor. *Am J Anat.* 1981; **160**(2): 213–29.
- 7 Boucher Y, Pollin B, Azérad J. Microinfusions of excitatory amino acid antagonists into the trigeminal sensory complex antagonize the jaw opening reflex in freely moving rats. *Brain Res.* 1993; **614**(1–2): 155–63.
- 8 Carter GM, Matthews B. Responses of jaw muscles to electrical stimulation of tooth pulp in rat, cat and man. In: Van Steenberghe D. & De Laat A. (Editors), *Electromyography of jaw reflexes in man.* 1989. Leuven University Press, Leuven.
- 9 Chapman CR, Gerlach R, Jacobson R, Buffington V, Kaufmann E. Comparison of short-latency trigeminal evoked potentials elicited by painful dental and gingival stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1986; **65**(1): 20–6.
- 10 Chatrian GE, Canfield RC, Lettich E, Black RG. Cerebral responses to electrical stimulation of tooth pulp in man. *J Dent Res.* 1974; **53**(5): 1299; **22**(3): 221–33.
- 11 Chudler EH, Dong WK, Kawakami Y. Tooth pulp evoked potentials in the monkey, cortical surface and intracortical distribution. *Pain.* 1985
- 12 De Weerd JP. Facts and fancies about a posteriori Wiener filtering. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1981; **28**(3): 252–257.
- 13 Dowman R, Stockbridge N. A programmable rapid roll-off low pass filter for evoked potentials and EEG recording. *Brain Res Bull.* 1988; **21**(2): 335–339.
- 14 Ellrich J, Bromm B, Hopf HC. Pain evoked blink reflex. *Muscle nerve.* 1997; **20**(3): 265–270.
- 15 Engstrand P, Shyu BC, Andersson SA. Is selective stimulation of the rat incisor tooth pulp possible? *Pain.* 1983; **15**: 27–34.
- 16 Fried K, Aldskogius H, Hildebrand C. Proportion of unmyelinated axons in rat molar and incisor tooth pulps following neonatal capsaicin treatment and/or sympathectomy. *Brain Res.* 1988; **963**(1): 118–123.
- 17 Hassel HJ, Biedenbach MA, Brown AC. Cortical potentials evoked by tooth pulp stimulation in rhesus monkeys. *Arch Oral Biol.* 1972; **17**: 1059–1066
- 18 Hayama T, Hashimoto K, Ogawa H. Projection of the inferior dental nerve to the primary somatosensory cortex in rats. *Neurosci Lett.* 1993; **164**(1–2): 13–16.
- 19 Jiffry MT. Afferent innervation of the rat incisor pulp. *Exp Neurol.* 1981; **73**(1): 209–18.
- 20 Keller O, Kalina M, Ujec E, Zivny A, Vyklicky L. Projection of tooth pulp afferents to the brainstem and to the cortex in the cat. *Neurosci Lett.* 1981; **25**(3): 233–7.
- 21 Law SK, Rohrbach JW, Adams CH, Eckardt MJ. Improving spatial and temporal resolution in evoked EEG responses using surface Laplacians. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1993; **88**(4): 309–322.



- 22 Landgren S, Olsson KA, Westberg KG. Bulbar neurons with axonal projections to the trigeminal motor nucleus in the cat. *Exp Brain Res.* 1986; **65**(3): 98–111.
- 23 Limoge-Lendais I, Robert C, Degrange M, Goldberg M, Stinus L, Limoge A. Study on Superbond adhesion to the skull for chronic electrode implantation in the rats. *Neuroscience protocols.* 1994; 94-70-01: 1–11.
- 24 Marfurt CF, Turner DF. The Central projection of tooth pulp afferent neurons in the rat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1984; **223**(4): 535–547.
- 25 Morita N, Tamai Y, Tsujimoto T. Unit response activated by tooth pulp stimulation in lateral hypothalamic area of rat. *Brain Res.* 1977; **134**(1): 158–60.
- 26 Myslinski N, Matthews B. Intrapulpal nerve stimulation in the rat. *J Neurosci Methods.* 1987; **22**(1): 73–8.
- 27 Mumford JM, Stanley SJ. Sensation on stimulating the pulps of human teeth threshold and tolerance ratio. 1981; **10**(3): 391–8.
- 28 Naftel JP, Richards LP, Pau M, Bernauke JM. Course and composition of the nerves that supply the mandibular teeth of the rat. *Anat Rec.* 1999; **256**(4): 433–447.
- 29 Pajot J, Vassel A, Aigouy L, Rajaona J, Woda A. Variations of the jaw opening reflex observed in awake freely moving rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1984; **270**(2): 309–317.
- 30 Power AS, Schicatano EJ, Basso MH, Evinger C. To blink or not to blink: inhibition and facilitation of reflex blinks. *Exp Brain Res.* 1997; **113**(5): 283–290.
- 31 Quiroga RQ, Schurmann M. Functions and sources of events-related EEG alpha oscillations studied with the wavelet transform. *Clin Neurophysiol.* 1999; **110**(4): 643–654.
- 32 Rehak JR. Course and resection of the inferior alveolar nerve in the albino rat. *J Dent Res.* 1963; **42**: 159–1168.
- 33 Rehnig HP, Brankack J, Klingberg F. Cortical tooth pulp evoked potentials in freely moving rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1984; **44**(5): 205–16.
- 34 Rehnig HP, Brankack J, Klingberg F. Behaviour dependent variability of potentials in the somatosensory cortex evoked by stimulation of the trigeminal nuclei in freely moving rats. *Biomed Biochim Acta.* 1987; **46**(4): 297–300.
- 35 Sato O, Maeda T, Kobayashi S, Iwanaga T, Fujita T, Takahashi Y. Innervation of periodontal ligament and dental pulp in the rat incisor: an immunohistochemical investigation of neurofilament protein and glia specific S-100 protein. *Cell Tissue Res.* 1988; **251**(1): 13–21.
- 36 Shigenaga Y, Matano S, Kusuyama M, Sakai A. Cortical neurons responding to electrical stimulation of the rats incisor pulp. *Brain Res.* 1974; **67**(1): 153–6.
- 37 Stevens SS. Neural events and the psychophysical law. *Science.* 1970; **170**(962): 1043–1050.
- 38 Toda K, Iriki A, Ichioka M. Selective stimulation of intrapulpar nerve of rat lower incisor using a bi-polar electrode method. *Physiol Behav.* 1981; **26**(2): 307–11.
- 39 Toda K, Ichioka M, Iriki A. Quantitative relations between noxious stimulus intensity and magnitude of central afferent evoked responses in rat. *Neurosci Lett.* 1980; **17**(3): 313–316.
- 40 Yu XH, He ZY, Zhang YS. Time varying adaptive filter for evoked potentials estimation. *IEEE Trans Biomed Eng;* 1994; **41**(11): 1062–1071.

# Cortical stimulation and tooth pulp evoked potentials in rats: A model of direct anti-nociception

Robert Rusina<sup>1\*</sup>, Stephane Barek<sup>2</sup>, Šimon Vaculín<sup>1</sup>, Jean Azérad<sup>2</sup>, and Richard Rokyta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, \*Email: robert.rusina@ftn.cz; <sup>2</sup>Laboratoire de physiologie de la mastication, University Paris VII – Denis Diderot, Paris, France

While the effect of cortex stimulation on pain control is widely accepted, its physiological basis remains poorly understood. We chose an animal model of pain to study the influence of sensorimotor cortex stimulation on tooth pulp stimulation evoked potentials (TPEPs). Fifteen awake rats implanted with tooth pulp, cerebral cortex, and digastric muscle electrodes were divided into three groups, receiving 60 Hz, 40 Hz and no cortical stimulation, respectively. TPEPs were recorded before, one, three and five hours after continuous stimulation. We observed an inverse relationship between TPEP amplitude and latency with increasing tooth pulp stimulation. The amplitudes of the early components of TPEPs increased and their latency decreased with increasing tooth pulp stimulation intensity. Cortical stimulation decreased the amplitude of TPEPs; however, neither the latencies of TPEPs nor the jaw-opening reflex were changed after cortical stimulation. The decrease in amplitude of TPEPs after cortical stimulation may reflect its anti-nociceptive effect.

Key words: pain, sensorimotor cortex stimulation, TPEP, rats

## INTRODUCTION

Chronic pain remains a challenging field for investigation and development of further therapeutic approaches. Pain control, and methods to achieve it, have been topics of study for many years. In contrast to pharmacotherapy, which is not always efficient, there is less data available regarding non-pharmacological management of chronic pain, in particular regarding electrophysiological methods.

Clinical research, in humans, has provided data demonstrating the efficiency of long-term motor cortex stimulation (MCS) in the treatment of trigeminal neuropathic pain (Boucher et al. 1993, Meyerson et al.

1993, Nguyen et al. 1997, Lefaucheur et al. 2004), deafferentation pain (Tsubokawa et al. 1991), and thalamic, post-herpetic and phantom pain (Meyerson et al. 1993, Nguyen et al. 1999). Although the therapeutic benefit of motor cortex stimulation has become widely accepted, the underlying physiological mechanisms and determinant factors of its analgesic effect remain poorly understood.

To date, few papers have dealt with the effect and mechanisms of cortical stimulation in animals. The pain model of cortical stimulation in awake rats has shown weak anti-nociception efficacy in the formalin test (Kuroda et al. 2000), and the effect of anti-nociception has been shown to be suppressed by spinal administration of nitric oxide synthase (NOS) inhibitors (Kuroda et al. 2001). Cortical stimulation has also been shown to transiently inhibit the responses of spinal cord dorsal horn neurons to nociceptive stimuli

Correspondence should be addressed to R. Rusina,  
Email: robert.rusina@ftn.cz

Received... accepted...

(Senapati et al. 2005), while rhizotomized animals (central pain model) (Rusina et al. 2005) and animals with ligated sciatic nerves (causalgia model) (Vaculin et al. 2008) recovered pain thresholds to normal levels after cortical stimulation. Somatosensory cortical stimulation in rats has been shown to decrease upregulated expression of c-Fos, an immediate early gene protein product sensible to noxious stimulation in medullary dorsal horn neurons (Gojyo et al. 2002).

Despite several controversies, it is generally accepted that in rats, tooth pulp stimulation (TPS) represents a valuable pain model (Morita et al. 1977, Toda et al. 1980, Chapman et al. 1986, Sugimoto et al. 1988, Alantar et al. 1997); moreover, TPS has been proposed as a model for trigeminal pain (Chapman et al. 1986).

Tooth pulp stimulation evokes the jaw-opening reflex (JOR) in rats, considered to be a correlate of pain, which is mediated by C fibers – the only pain conducting fibers present directly within the tooth pulp. Low intensity TPS elicit a long latency JOR (15 ms). When TPS intensity is increased, the long latency component of the JOR decreases and finally disappears, while a short latency component of the JOR (6 ms) appears. This is elicited by activation of more distant periodontal afferents and fast conducting A fibers (Azerad and Woda 1976, Jiffry and Matthews 1977, Hayashi 1980, Jiffry 1981, Toda et al. 1981, Engstrand et al. 1983, Carter and Matthews 1989, Kowler 1990).

Tooth pulp cortical evoked potentials (TPEP) are considered to be a useful tool for investigation of analgesic drug action (Cox et al. 1998). TPEP amplitude decrease and latency increase demonstrated a drug induced antinociceptive effect (Dannemann 1994). To our knowledge there is no study showing similar changes in TPEP latency and/or amplitude in a non-pharmacological setting.

The aim of our study was to analyze modifications of TPEPs following cortical stimulation as a marker of non-pharmacologically induced antinociception. We used tooth pulp stimulation (TPS) as a painful stimulus. Concomitant TPEP and JOR recordings allowed a more precise identification of pulp stimulation induced nociception and its analysis. We evaluated the influence of cortex stimulation on TPEP amplitude and latency in awake and freely moving rats. Our hypothesis is that this arrangement would allow us to establish a useful model for the explanation of the complicated effect of motor cortex stimulation.

## METHODS

Experiments were carried out on fifteen adult male Sprague-Dawley rats (body weight 300–350 g), obtained from the Animal Facilities of Paris VII University. The experiment was conducted in accordance with the guidelines of the International Association for the Study of Pain (Zimmermann 1983) and the principles of laboratory animal care (NIH publication No. 86–23, revised 1985). The study was approved by the local animal care study committee.

Prior to electrode positioning surgery, the animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine® (Imalgene 500, Rhône Merieux- France) (100 mg/kg) and the implantation procedures were performed on a heat controlled operating table.

Three types of electrodes were implanted: (1) tooth pulp stimulating electrodes, (2) jaw opening reflex recording electrodes, and (3) cortical electrodes for both evoked potential recording and sensorimotor cortex stimulation (contrarily to humans, in rats there is no distinct division between the sensory and motor cortex (Kolb 1990, Starr et al. 1991, Paxinos and Watson 2007)).

The left mandibular incisor was carefully prepared and peripheral bipolar stimulation electrodes, made of Teflon coated 125 µm platinum wires, were implanted into the tooth pulp and sealed. Correct electrode placement was confirmed by evoking a JOR. The electrode wires led to a common, subcutaneously implanted, contact board located on the skull. Tooth pulp stimulation was delivered using a stimulation unit (302-T, WPI, UK). Stimulating parameters of the rectangular impulses were as follows: duration 1ms, frequency 0.5 Hz; intensity was manually adjusted within the range 0.01 to 10 mA in order to evoke three types of JOR latencies: (1) long latency alone (low intensity), (2) both long and short latency (moderate intensity), and (3) short latency JOR (high intensity).

Two 170 µm silver Teflon coated electrodes were exposed and placed over the anterior belly of the left digastric muscle in order to record EMG responses. The wires from this electrode led subcutaneously to the common contact board. After amplification, the signal was visualized on an oscilloscope so that JOR latencies could be set using electromyography.

Lastly, two cortical electrodes made of inox wire, to measure cortical evoked potentials and provide sensorimotor cortex stimulation, were inserted, after cran-

iotomy, and cemented to the skull with 4META resin (Superbond, C&B, Japan). Cortical epidural electrodes were placed (1) 1 mm rostral and 1 mm right, and (2) 1 mm caudal and 2 mm lateral to bregma. The ground reference electrode was inserted in the nasal bone.

Anesthesia was used only for implantation of electrodes. All other study procedures (TPS, TPEP recording, cortical stimulation) were done on awake freely moving rats.

A pulse generator, (Medtronic-3625, Medtronic, Inc. Minneapolis, USA) was used to deliver rectangular impulses 0.2 ms in duration at a frequency of 60 Hz (Group 60) or 40 Hz (Group 40). Stimulation frequencies of 40 Hz and 60 Hz were chosen on the basis of a pilot study (unpublished data). The intensity was set between 80–90% of the intensity that evoked facial muscles twitches (the range of stimulation was from 0.27–0.150 mA). Conscious test animals received continuous sensorimotor cortex stimulation for periods of 1, 3, and 5 hours.

TPEP recordings utilized the same electrodes used for cortical stimulation. In order to analyze TPEPs, the signals obtained from the electrodes were amplified (AI417 and AI 405; Cyberamp 380, Axon instrument, USA) and digitized using a sampling rate of 2 kHz (Digidata 1200 A, Axon instruments) for off-line signal processing.

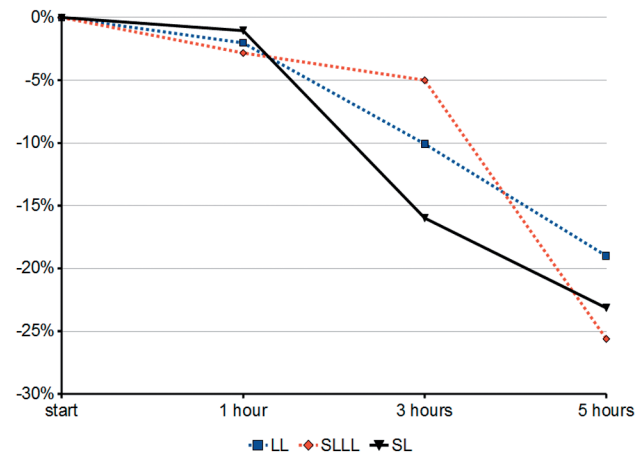


Fig. 1. Variation and SD of the maximum amplitude value of TPEPs after stimulation in percents; recorded over the sensorimotor cortex after 1 hour, 3 and 5 hours of cortical stimulation at 60 Hz (Group 60) for the different components of the jaw-opening reflex [(LL) long latency JOR; (SLLL) short and long latency JOR; (SL) short latency JOR] following tooth pulp stimulation. Significant differences appear after 5 hours of continuous cortical stimulation in contrast to non significant results after 1 hour and 3 hours of stimulation

Following a recovery period (5–7 days) after electrode implantation, TPEPs were recorded for three different intensities of tooth pulp stimulation (no sensorimotor cortex stimulation; START – Figs 1 and 2).

Each animal was stimulated separately; the stimulus intensity was adapted following the slow and rapid component of the JOR in order to obtain well designed curves which confirmed that periodontal A and/or pulpar C fibers, respectively, were actually stimulated. That means that stimulation intensities showed an important inter/individual variability and therefore cannot be displayed in a simple table

The animals were then divided into three groups. The first group (Group 60) received 5 hours of 60 Hz cortical stimulation. TPS induced TPEPs were recorded at one, three, and five hours (time 1, 3, 5 – Figs 1 and 2) after the start of stimulation. The second group (Group 40) received 40 Hz cortical stimulation following the same experimental paradigm. The third control group did not receive any cortical stimulation but underwent TPEP recordings following the same time intervals.

We analyzed 128 TPEP records of 250 ms duration using multi-resolution-based noise reduction using a protocol detailed by Bertrand and coauthors (1994). This method used a time-scale transformation of the

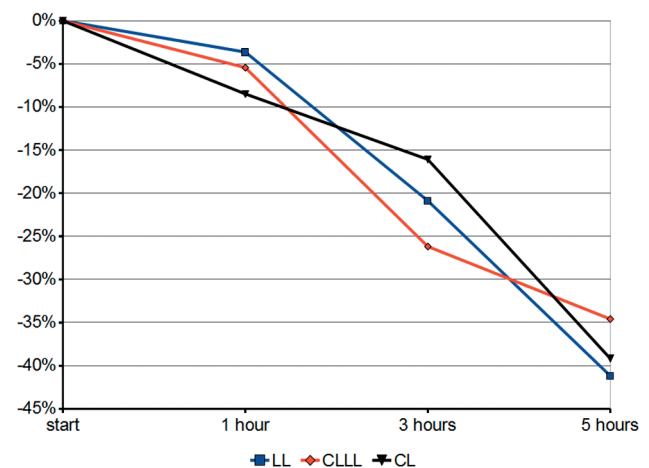


Fig. 2. Variation and SD of the integration of TPEPs after stimulation in percents; recorded over the sensorimotor cortex after 1, 3 and 5 hours of cortical stimulation at 60Hz (Group 60) for the different components of the jaw-opening reflex [(LL) long latency JOR; (SLLL) short and long latency JOR; (SL) short latency JOR] following tooth pulp stimulation. Significant differences appear after 5 hours of continuous cortical stimulation in contrast to non significant results after 1 hour and 3 hours of stimulation

signal similar to the time-frequency transformation used in FFT (Fast Fourier Transform). The coefficients of this time-scale transformation were adjusted in such a way as to cancel the non Gaussian white noise present in the TPEP, subsequently the inverse transform was computed in such a way as to return the de-noised TPEP. Because of fluctuant inter-individual variations of the TPEP curve, a normalization process was employed in this study to compare animals with noteworthy inter-individual differences (Shigenaga et al. 1974, Falinower et al. 1994, Grass et al. 2003, You et al. 2003).

Results are presented as a mean percentage of the variation observed between individual steps of cortical stimulation. Two parameters were calculated for every TPEP: (1) the maximal amplitude of the main wave (appearing between 20 and 30 ms), and (2) the integration of the whole evoked curve.

The data were compared in order to determine if there were statistical differences in observed parameters of TPEPs after 1 hour, 3 hours or 5 hours of cortical stimulation at 60 Hz or 40 Hz. Due to the small sample and uncertain data normality, the Kruskal-Wallis non parametric test was carried out, followed by the Dunn test for multiple comparisons. Statistical analysis was performed using XLSTAT software v 2007.1 (Addinsoft, USA).

## RESULTS

Depending on the tooth-pulp-stimulation intensity, different response patterns could be observed at the level of the digastric muscle (JOR) and at the cortical (TPEPs) level (Fig. 3). Low intensity TPS evoked long latency JORs (mean latency 16 ms), moderate intensity TPS evoked both long and short latency JORs, and high intensity TPS evoked short latency JORs (mean latency 6 ms).

The TPEPs consisted of a first component including the stimulation artifact and recorded between 0 and 17 ms. This component was followed by either a triphasic component (N27, P53, N69) at low intensity TPS, or a biphasic early component (N23, P48) and (N22, P51) at medium and high TPS intensities. Regardless the TPS intensity, those components were followed by a late polyphasic component composed of a complex set of peaks having variable amplitudes (Fig. 4).

We assessed the latency and amplitude of the first negative peak (N27 for low intensity TPS and N23 for

higher intensity TPS, respectively) as a marker of nociception, accordingly to previously published reports (Danneman 1994).

The maximal amplitude of TPEP was recorded at 27 ms for low intensity TPS, at 23 ms for medium intensity TPS and at 22 ms for high intensity TPS. The maximal amplitude ranged 75–250  $\mu$ V. The average value of the maximal amplitude was 87  $\mu$ V, 150  $\mu$ V and 210  $\mu$ V for low, medium, and high TPS, respectively.

The distribution and amplitude of the peaks correlated with TPS stimulation intensity ( $r=0.96$ ,  $P<0.01$ ).

### Effect of cortex stimulation on TPEP

Results are given for both stimulated groups after one hour, 3 hours and 5 hours of continuous cortical stimulation and compared to the values obtained in the same animal before cortical stimulation ( $T_0$ ) (Figs 1, 2).

### Cortex stimulation and latency of TPEP

Regardless of TPS intensity, no statistically significant variation of TPEP latency was observed. Accordingly, no significant latency differences were observed in relation to the frequency or the duration of cortical stimulation.

### Cortex stimulation and maximal amplitude of TPEP

For low intensity TPS (evoking long-latency JORs) a progressive decrease in the component of maximal amplitude was observed in both experimental groups after cortex stimulation (Fig. 1). In both experimental groups (Group 60 and 40), the decrease became significant,  $-19\% \pm 2.26$  and  $-6.34\% \pm 2.16$  respectively, after 5 hours of continuous cortical stimulation.

For the medium intensity TPS (evoking both short and long-latency JOR) similar results were obtained. In Group 60, a significant decrease ( $-25.62\% \pm 5.03$ ) in the early component maximal amplitude was found after 3 hours of continuous cortex stimulation. In Group 40, a significant decrease ( $-7.99\% \pm 4.07$ ) for the peak of the maximal amplitude of P23 was observed after 5 hours of continuous cortical stimulation.

Similar results were also obtained for the high intensity TPS (evoking only short-latency JORs). In both experimental groups (Group 60 and 40), a significant

decrease,  $-23.15\% \pm 7.03$  and  $-9.66\% \pm 4.96$ , respectively, was found in the maximal amplitude of the P22, after 5 hours of continuous cortical stimulation.

In the control group, no significant changes were found in the latency or in the amplitude of TPEP, regardless of TPS intensity.

### Cortex stimulation and integration of the TPEP curve

In the analysis of TPEP integration, a trend similar to that described for the maximal amplitudes, could be seen. Regardless of TPS intensity and cortical stimulation frequency, TPEP integration decreased significantly after 5 hours of continuous cortical stimulation (Fig. 2).

In controls, no significant changes were found in the integration of TPEP regardless of TPS intensity.

### DISCUSSION

A key point in our study methodology was to ensure that during tooth pulp stimulation (TPS) we stimulated nociceptive C fibers and not other surrounding struc-

tures, and that concomitantly recorded evoked potentials over the sensorimotor cortex really reflected induced nociception.

For this purpose we rigorously analyzed the jaw-opening reflex (JOR) obtained by pulp stimulation and recorded over the digastric muscle to reassure that our experimental tooth pulp stimulation activated nociceptive fibers.

The jaw opening reflex – as previously described (Carter and Matthews 1989), consists of two different responses which are dependent on stimulation intensity.

Low intensity TPS evokes long-latency JORs resulting from stimulation of slow conducting non-myelinated C-fibers, which are the only fibers present in the rat incisor tooth pulp that we stimulated (Jiffry 1981). Only a higher intensity TPS evokes short-latency JORs because it spreads toward the more distant periodontal tissue and also activates fast conducting periodontal myelinated A fibers (Azerad and Woda 1976).

These anatomical conditions explain why – with increasing intensity stimulation - we recorded the long latency component of JOR reflex prior to the short latency component. Therefore our findings are not in contradiction with basic neurophysiological principles

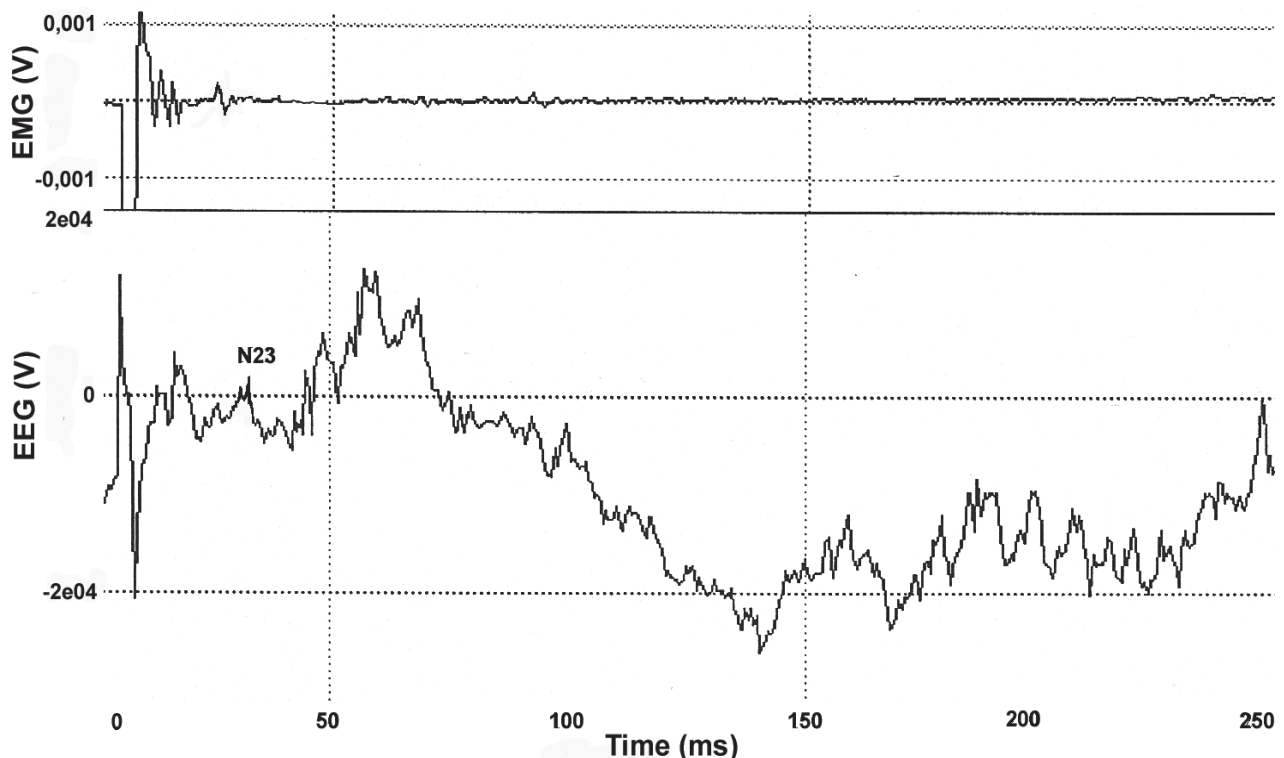


Fig. 3. Responses evoked after a single tooth pulp stimulation at the digastric level (jaw opening reflex – IN 0) and at the cortical level (tooth pulp evoked potentials – IN 1). JOR and TPEP are recorded at the same time for a duration of 250 ms. (IN 0 – EMG recording channel, IN 1 – EEG recording channel). Amplitude scale is in V for IN 0 and for IN 1

that A fibers have a lower threshold than C fibers when exposed to electrical stimulation (You et al. 2003).

The amplitude of the JOR is not directly related to nociception and pain in such a way that more the painful the stimulus the more intense the JOR response. We included the JOR into our study protocol with the aim to control that tooth pulp stimulation really stimulated the periodontal A fibers and pulpal C fibers. Our study enhanced three main findings in Figs 1 and 2: (1) the amplitudes of the early component of tooth pulp evoked potentials (TPEPs) increased and latencies decreased with increasing tooth pulp stimulation intensity, (2) cortical stimulation decreased both the amplitude of TPEP waves and curve integration (possible analgesic effect), and, (3) cortex stimulation did not significantly change the latencies of the TPEP waves or the appearance of the jaw-opening reflex.

First, in our study, TPS induced evoked potentials recordable over the sensorimotor cortex. The pattern of the TPEP curve consists of an early and a late component. The early component in the (0 ms–17 ms) range included a large stimulation artifact. Because of the conduction time between the tooth pulp and the somatosensory cortex, this early component could not be considered to be of pulpal origin (Barek et al. 2007). So we analyzed only the part of the cortical evoked

potential in the (20 ms to 250 ms) range. Regarding previous results and the results of this study the first negative peak of the early component (appearing between 22 and 27 ms after TPS – Figs 3 and 4) considered to be a correlate of nociception (Shigenaga et al. 1974, Danneman 1994, Barek et al. 2007).

Both TPEP latency and amplitude were dependent on the intensity of TPS: the greater the intensity of TPS, the higher the amplitude, and the lower the latency of the analyzed wave.

In other words, at lower stimulus intensities, slow conducting tooth pulp C-fibers were activated – resulting in longer TPEP latencies; when the stimulus intensity (TPS) was increased, both C-fibers and periodontal A-fibers were recruited, resulting in a shorting of TPEP latencies and an increase of the TPEP amplitude. Therefore, we believe that the waves appearing at 27, 23 and 22 ms, at different TPS intensities, were variations of the same wave.

Second, the increase in amplitude and decrease in latency of the analyzed TPEP wave (with increasing TPS intensity) were observed in animals prior to continuous cortical stimulation. The same procedure consisting of TPEP recording with concomitant JOR monitoring was repeated following continuous stimulation of the sensorimotor cortex.

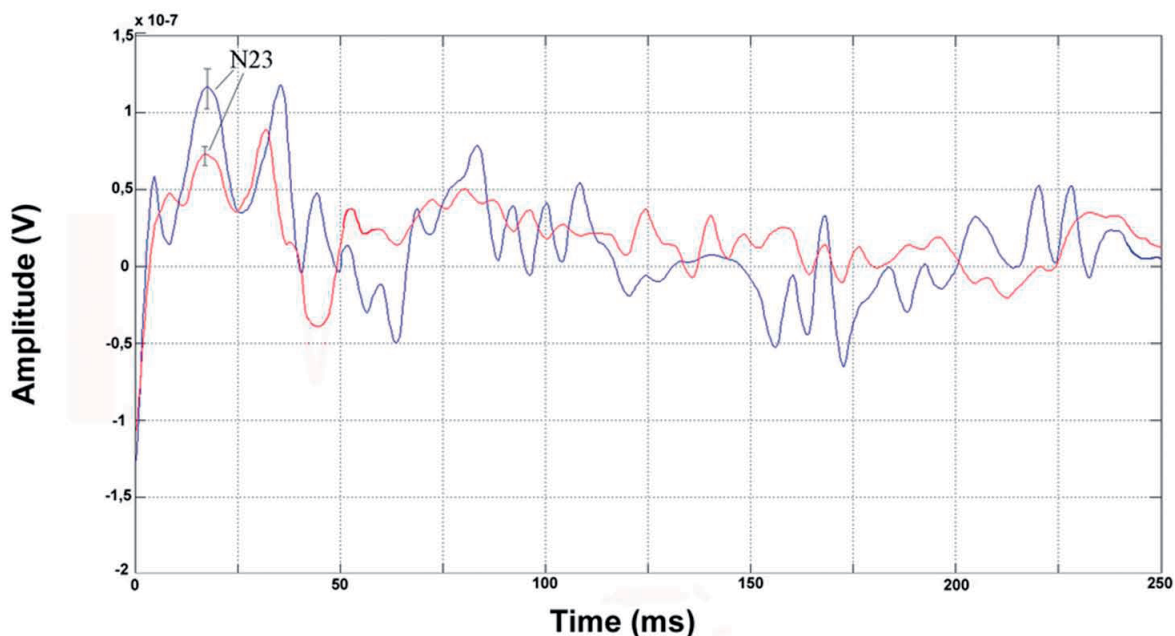


Fig. 4. Mean of 128 multi-resolution enhanced TPEPs recorded for medium intensity TPS before (blue) and after five hours (red) of stimulation at 60Hz (Group 60) and showing noteworthy attenuation of the evoked potential. Standardized error of main peak is presented on the peak.



In our study, the maximal amplitude of the early TPEP component tended to consistently decrease with the duration of cortex stimulation. In the current literature (Danneman 1994, Logginidou et al. 2003), decreases in the amplitude of tooth pulp evoked potentials are considered to be a correlate of analgesic effects in both humans and animals.

Most available data about this topic are based on pharmacological studies. Cortical evoked potentials after TPS, in human volunteers, were observed to decrease after codeine administration (Suri et al. 1996). A study involving TPS in rats (Cox et al. 1998) found a decrease in the amplitude of the early component after alfentanil administration, although the latency of the wave was unchanged. It was shown (Logginidou et al. 2003) that propofol (drug with no analgesic effect) produced a dose-dependent depression of somatosensory evoked potentials and prolonged the response latency. Another study using TPEP in rats (Danneman 1994) showed that morphine decreased the maximal amplitude, while droperidol had no effect. Consequently Danneman suggested that the decreased amplitude of the early component of TPEP could be considered as a marker of anti-nociception rather than a general reduction of cortical excitability (Dannemann 1994). Similarly, the decrease in the maximal amplitude of the early component observed in our study suggests an anti-nociceptive effect produced by cortical stimulation.

Due to the TPEP shape variability following motor cortex stimulation (Fig. 4), analysis of the early maximal amplitude component alone might be an insufficient marker, as such we preferred to analyze the area under the curve using TPEP integration.

The results of integration are in good agreement with amplitude evolution: in both stimulated groups the integration decreased significantly after 5 hours of stimulation, the results were more evident in the highest stimulation frequency group (Group 60). We consider data from integration evaluation to be more reliable if compared to amplitude analysis alone. Thus, in the 60 Hz group there was a significant decrease in the maximal amplitude at both 3 hours and 5 hours, however, a significant decrease in integration was only observed at 5 hours – demonstrating the greater benefit of a longer periods of continuous sensorimotor cortex stimulation.

Third, in our study, continuous sensorimotor cortex stimulation neither prolonged the latency of the analyzed TPEP wave nor did modify JOR patterns. These findings indirectly suggest that cortical stimulation

acts by a direct antinociceptive mechanism rather than impact on cortical excitability and/or arousal. Mechanisms responsible for anti-nociceptive effects are still quite poorly understood. Cortical activity is influenced by both duration and frequency of cortical stimulation inducing temporary inhibition probably with a distant effect on subcortical regions.

In a similar way, cortical stimulation in Parkinson's disease is thought to be effective at cortico-striatal circuits pathways by activation of neuromodulatory inputs on the basal ganglia-cortex loops (Gutierrez et al. 2009). Moreover, cortical stimulation could proceed to liberation of neurotrophic factors with a distant effect on nociceptive transmission in subcortical areas. Cortical stimulation may act by rebalancing the control of non-nociceptive sensory inputs over nociceptive afferents at cortical, thalamic, brainstem and spinal levels. In addition, it may interfere with the emotional component of nociceptive perception. Biochemical processes involving endorphins and GABA may also be implicated in the mechanism of motor cortex stimulation (Cioni and Meglis 2007).

The main limitation of our study was the small number of animals involved – which is the general problem of all experiments with implanted animals and the clinical observations of implanted humans. Another difficulty could have been the influence of stress and anxiety in animals with implanted electrodes. Nevertheless the behavior of implanted animals did not differ from other rats in our laboratory. It is worth noting that for continuous cortical stimulation we used the same epidural electrodes as for TPEP recording. We considered this process to be less traumatic than implantation of two electrodes and without influence on the final results. It has been demonstrated (Rusina et al. 2005, Berek et al. 2007) that cortical stimulation modifies the pain threshold in deafferented animals and the effect of cortical stimulation disappears within 24 hours.

Therefore we conclude that the observed changes in this study are directly related to cortical stimulation itself, rather than to eventual changes in the impedance of the electrode or any damage/inflammation to the underlying brain tissue.

## CONCLUSION

In the present study, we used the jaw-opening reflex to investigate the effect of sensorimotor cortex stimulation



on TPEPs – a non-pharmacologic pain control model. The concomitant use of TPEP analysis together with JOR recordings allowed a more precise identification of tooth pulp stimulation. Mathematical processing with signal purification and the analysis of TPEP integration added more precision to our results. Therefore, our protocol enables us to differentiate analgesic effects of continuous cortical stimulation on C and A afferents.

Since continuous cortical stimulation led to a decrease in TPEP amplitude, but did not reduce nor prolonged the latency of the maximal amplitude, cortical stimulation using the TPS models suggests a direct anti-nociception effect.

This hypothesis is supported by (1) the decrease in the early component maximal amplitude (present study) and (2) similar results showing at least slight anti-nociception from cortical stimulation in other acute pain models (Kuroda et al. 2000, Rusina et al. 2005). However, due to the small sample size, our results should be interpreted with care. Further research i.e. in cellular mechanisms would be beneficial for better understanding of the underlying processes induced by cortical stimulation.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by Research Goal 0021620816 and the Centre of Neuropsychiatric Studies 1M0517 and grant GACR 305/07/0242. The authors wish to thank Thomas Secrest, for revision of the English version of this article.

#### REFERENCES

- Alantar A, Azerad J, Limoge A, Robert C, Rokyta R, Pollin B (1997) Potentiation of fentanyl suppression of the jaw-opening reflex by transcranial electrical stimulation. *Brain Res* 763: 14–20.
- Azerad J, Woda A (1976) Tooth pulp projection to the trigeminal complex and jaw opening reflex in cat. *J Biol Buccale* 4: 109–115.
- Barek S, Rusina R, Pollin B, Azerad J (2007) Somatosensory evoked response and jaw opening reflex elicited by tooth pulp stimulation in awake freely moving rats. *Neuroendocrinol Lett* 28: 101–105.
- Bertrand O, Bohorquez J, Pernier J (1994) Time-frequency digital filtering based on an invertible wavelet transform: an application to evoked potentials. *IEEE Trans Biomed Eng* 41: 77–88.
- Boucher Y, Pollin B, J. Azerad J (1993) Microinfusions of excitatory aminoacid antagonists into the trigeminal sensory complex antagonize the jaw opening reflex in freely moving rats. *Brain Res* 614: 155–163.
- Carter GM, Matthews B (1989) Responses of jaw muscles to electrical stimulation of tooth pulp in rat, cat and man. In: *Electromyography of Jaw Reflexes in Man* (Van Steenberghe D, De Laat A Eds.). University Press, Leuven, BE, p. 205–256.
- Chapman CR, Gerlach R, Jacobson R, Buffington V, Kaufmann E (1986) Comparison of short-latency trigeminal evoked potentials elicited by painful dental and gingival stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 65: 20–26.
- Cioni B, Meglio M (2007) Motor cortex stimulation for chronic non-malignant pain: current state and future prospects. *Acta Neurochir Suppl* 97: 45–49.
- Cox EH, Langemeijer MW, Danhof M, Leiden C (1998) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the analgesic effect of alfentanil in the rat using tooth pulp evoked potentials. *J Pharmacol Toxicol Methods* 39: 19–27.
- Danneman PJ (1994) Cortical potentials evoked by tooth pulp stimulation differentiate between the analgesic and sedative effects of morphine in awake rats. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1100–1106.
- Engstrand P, Shya BC, Andersson SA (1983) Is selective stimulation of the rat incisor tooth pulp possible? *Pain* 15: 27–34.
- Falinower S, Willer JC, Junien JL, Le Bars D (1994) A C-Fiber reflex modulated by heterotopic noxious somatic stimuli in the rat. *J Neurophysiol* 72: 194–213.
- Gojyo F, Sugiyo S, Kuroda R, Kawabata A, Varathan V, Shigenaga Y, Takemura M (2002) Effects of somatosensory cortical stimulation on expression of c-Fos in rat medullary dorsal horn in response to formalin-induced noxious stimulation. *J Neurosci Res* 68: 479–488.
- Grass S, Crawley JN, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z (2003) Reduced spinal cord sensitization to C-fiber stimulation in mice over-expressing galanin. *Eur J Neurosci* 17: 1829–1832.
- Gutiérrez JC, Seijo FJ, Alvarez Vega MA, Fernández González F, Lozano Aragonese B, Blázquez M (2009) Therapeutic extradural cortical stimulation for Parkinson's Disease: report of six cases and review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg* 111: 703–707.
- Hayashi H (1980) A problem in electrical stimulation of incisor tooth pulp in rats. *Exp Neurol* 67: 438–441.
- Jiffry MM, Matthews B (1977) Conduction velocities of pulpal afferents in the rat. *J Dent Res* 56: D128–160.

- Jiffry MM (1981) Afferent innervation of the rat incisor pulp. *Exp Neurol* 73: 209–218.
- Kolb B (1990) Animal models for human PFC-related disorders. In: *The Prefrontal Cortex: Its Structure, Function and Pathology*, Progress in Brain Research (Vol. 85) (Uylings HBM, van Eden CG, de Bruin JPC, Corner MA, Feenstra MGP, Eds.). Elsevier, Amsterdam, NL, p. 501–519.
- Kowler E (1990) ~~Reviews in Oculomotor Research, vol. 4, (SHOULD BE: The role of visual and cognitive processes in the control of eye movement {???)~~. In: *Eye Movements and Their Role in Visual and Cognitive Processes* (Kowler E, Ed.). Elsevier, Amsterdam, NL, p. 486–498.
- Kuroda R, Kawabata A, Kawao N, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y (2000) Somatosensory cortex stimulation-evoked analgesia in rats: potentiation by NO synthase inhibition. *Life Sci* 66: 271–276.
- Kuroda R, Kawao N, Yoshimura H, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y, Kawabata A (2001) Secondary somatosensory cortex stimulation facilitates the antinociceptive effect of the NO synthase inhibitor through suppression of spinal nociceptive neurons in the rat. *Brain Res* 903: 110–116.
- Lefaucheur JP, Drouot X, Menard-Lefaucheur I, Nguyen JP (2004) Neuropathic pain controlled for more than a year by monthly session of repetitive transcranial magnetic stimulation. *Clin Neurophysiol* 34: 91–95.
- Logginidou HG, Li BH, Li DP, Lohmann JS, Schuler HG, DiVittore NA, Kreiser S, Cronin AJ (2003) Propofol suppresses the cortical somatosensory evoked potential in rats. *Anesth Analg* 97: 1784–788.
- Meyerson BA, Lindblom U, Linderoth B, Lind G, Herregots P (1993) Motor cortex stimulation as treatment of trigeminal neuropathic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 58: 150–153.
- Morita N, Tamai Y, Tsujimoto T (1977) Unit response activated by tooth pulp stimulation in lateral hypothalamic area of rat. *Brain Res* 134: 158–160.
- Nguyen JP, Keravel Y, Fève A, Uchiyama T, Cesaro P, Le Guerinel C, Pollin B (1997) Treatment of deafferentation pain by chronic stimulation of the motor cortex: report of a series of 20 cases. *Acta Neurochir Suppl* 68: 54–60.
- Nguyen JP, Lefaucheur JP, Decq P, Lohmann JS, Schuler HG, DiVittore NA, Kreiser S, Cronin C (1999) Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomical data. *Pain* 82: 245–251.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.). Academic Press, New York, NY.
- Rusina R, Vaculin S, Yamamotova A, Berek S, Dvorakova H, Rokyta R (2005) The effect of motor cortex stimulation in deafferentated rats. *Neuro Endocrinol Lett* 26: 283–288.
- Senapati AK, Huntington PJ, LaGraize SC, Wilson HD, Fuchs PN, Peng ZB (2005) Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. *Brain Res* 1057: 134–140.
- Shigenaga Y, Matano S, Kusuyama M, Sakai A (1974) Cortical neurons responding to electrical stimulation of the rats incisor pulp. *Brain Res* 67: 153–156.
- Starr R, Kristeva D, Cheyne G, Lindinger L, Deecke L (1991) Localization of brain activity during auditory verbal short-term memory derived from magnetic recordings. *Brain Res* 558: 181–190.
- Sugimoto T, Takemura M, Wakisaka S (1988) Cell size analysis of primary neurons innervating the cornea and tooth pulp of the rat. *Pain* 32: 375–381.
- Suri ML, Kaltenbach BL, Grundy H, Derendorf E (1996) Pharmacodynamic evaluation of codeine using tooth pulp evoked potentials *J Clin Pharmacol* 36: 1126–1131.
- Toda K, Iriki A (1980) Quantitative relations between noxious stimulus intensity and magnitude of central afferent evoked responses in rat. *Neurosci Lett* 17: 313–316.
- Toda K, Iriki A, Ichioka M (1981) Selective stimulation of intrapulpar nerve of rat lower incisor using a bi-polar electrode method. *Physiol Behav* 26: 307–311.
- Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S (1991) Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 52: 137–139.
- Vaculin S, Franek M, Yamamotova A, Rokyta R (2008) Motor cortex stimulation in rats with chronic constriction injury. *Exp Brain Res* 185: 331–335.
- You HJ, Morch CD, Chen J, Arendt-Nielsen L (2003) Role of central NMDA versus non NMDA receptor in spinal withdrawal reflex in spinal anesthetized rats under normal and hyperexcitable conditions. *Brain Res* 981: 12–22.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109–110.