

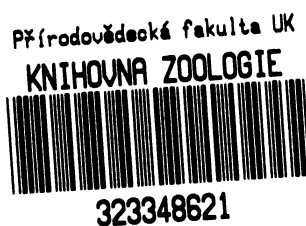
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie

Vliv baclofenu na změny excitability neokortexu

Jiří Lindovský

591.48



DP 2582

KNIHOVNA KATEDER ZOOLOGIE
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy
128 44 Praha 2, Viničná 7.

2730/2001

vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Fyziologický ústav AVČR v Praze

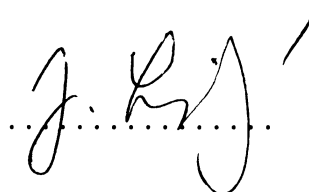
interní školitel: RNDr. Jan Moravec

Praha 2001

Práce byla realizována na Fyziologickém ústavu AVČR v Praze

Prohlašuji, že jsem pracoval samostatně, s použitím citované literatury.

Pokud bude tato práce používána k dalším studijním účelům, je nutné pramen převzatých údajů řádně citovat.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. R. J.' with a horizontal dotted line underneath it.

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat především vedoucímu diplomové práce Prof. MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za pracovní zázemí a pomoc při organizaci experimentů jakož i poskytnutí klidného útočiště pro sepsání tohoto textu.

Také děkuji RNDr. R. Haugvicové a Ing. J. Kaminskému za úvodní seznámení s metodikou a technikami, které jsem při svých experimentech používal.

Rovněž bych rád vyjádřil vděčnost svým rodičům, bez jejichž trvalé podpory by mé studium ani tato práce nebyly myslitelné.

Považuji za vhodné na tomto místě vyjádřit rovněž svou lítost nad tím, že se podobně zaměřená experimentální práce neobejde bez použití laboratorních zvířat. Zacházení s nimi se řídilo nejen platnou legislativou, ale také nepsanými pravidly slušného chování.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A, (A1, A2)	-	amplituda evokovaného potenciálu (prvního, druhého)
ANOVA	-	analýza rozptylu (analysis of variance)
AP	-	antero-posteriorně
ARAS	-	ascendentní retikulární asociační systém
baclofen	-	(β -p-chlorofenyl- γ -amino-máselná kyselina)
cAMP	-	cyklický adenosinmonofosfát
CGP 35348	-	kyselina P-(3-aminopropyl)-P-diethoxymethylfosforitá
CNS	-	centrální nervová soustava
ECoG	-	elektrokortikogram
EEG	-	elektroencefalogram
EPSP	-	excitační postsynaptický potenciál
GABA	-	γ -amino-máselná kyselina
GAD	-	glutamát dekarboxyláza
IPSP	-	inhibiční postsynaptický potenciál
L	-	laterálně
L1, L2	-	latence první pozitivní a první negativní vlny evokovaného potenciálu
LF	-	levá frontální elektroda (left frontal)
LO	-	levá okcipitální elektroda (left occipital)
LP	-	levá parietální elektroda (left parietal)
RO	-	pravá okcipitální elektroda (right occipital)
S.E.M.	-	střední chyba průměru (standard error of the mean)
SW	-	spike-and-wave (rytmus hrot-vlna)

OBSAH

1.	ÚVOD.....	6
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	8
2.1.	GABA _B receptory.....	8
2.2.	Thalamo-kortikální reverberační systém.....	12
2.3.	Následný výboj typu hrot-vlna.....	14
2.4.	Korový cyklus excitability následného výboje typu hrot-vlna.....	17
2.5.	Elektrická stimulace.....	19
2.6.	Evokované potenciály.....	19
3.	FORMULACE EXPERIMENTÁLNÍCH OTÁZEK.....	23
4.	METODIKA.....	24
4.1.	Zvířata.....	24
4.2.	Implantace elektrod.....	24
4.3.	Záznamová a stimulační aparatura.....	26
4.4.	Baclofen.....	26
4.5.	Vliv baclofenu na spontánní elektrokortikogram (ECoG).....	27
4.6.	Vliv baclofenu na transkalozální evokované potenciály.....	27
4.6.1.	Závislost parametrů evokovaného potenciálu na intenzitě stimulačního proudu.....	27
4.6.2.	Stimulace párovými pulzy.....	28
4.7.	Stimulační prahy pro následné výboje.....	28
4.8.	Cyklus excitability následného výboje typu hrot-vlna.....	29
4.9.	Statistické vyhodnocení.....	30
5.	VÝSLEDKY.....	31
5.1.	Vliv baclofenu na spontánní ECoG.....	31
5.2.	Vliv baclofenu na transkalozální evokované potenciály.....	31

5.2.1.	Závislost amplitudy a latence evokovaných potenciálů na intenzitě stimulačního proudu.....	31
5.2.2.	Stimulace párovými pulzy.....	32
5.3.	Stimulační prahy pro následné výboje.....	33
5.4.	Cyklus excitability následného výboje typu hrot-vlna.....	33
6.	DISKUZE.....	35
7.	ZÁVĚR.....	40
8.	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY.....	41
9.	OBRAZOVÁ PŘÍLOHA.....	48

1. ÚVOD

Nerovnováha mezi excitačními a inhibičními ději v CNS může v některých jejích částech vést ke vzniku patologické rytmické aktivity - epileptického záchvatu. Při projevech i klasifikaci záchvatů hraje klíčovou roli jejich lokalizace ve strukturách CNS. Nejčastěji je do epileptické aktivity vtažen limbický systém a neokortex, konkrétních typů záchvatů je však z klinické praxe i na zvířecích modelech známo mnoho. Epileptická aktivita může končit náhle ve všech postižených oblastech mozku, či zaniká postupně s pozvolným návratem normální aktivity v daných strukturách. Za ukončení epileptického záchvatu jsou však vždy zodpovědné *aktivní mechanismy*.

Proběhlý záchvat po sobě zanechává v mozku krátkodobé i dlouhodobé stopy. Samostatnou kapitolou jsou dlouhodobé změny v souvislosti s progresivní epileptogenezou a vznikem onemocnění zvaného epilepsie; problematika dlouhodobých a trvalých následků epileptického záchvatu však přesahuje tematický rámec předkládané práce.

V bezprostředním pozáchvatovém období můžeme však ve vlastnostech postižených struktur také sledovat určité změny. V první řadě jde o tzv. fázi *postiktální deprese*. Postiktální deprese je krátká perioda snížené citlivosti k novému epileptogennímu podnětu. Neschopnost zúčastněných struktur generovat nový záchvat je možné studovat experimentálně pomocí páru stejných stimulačních podnětů aplikovaných v krátkém časovém intervalu. Odpověď na druhý z nich je pak zkrácena či jinak oslabena, nebo chybí vůbec. Na fázi postiktální deprese plynule navazuje perioda citlivosti zvýšené, kdy druhý stejný podnět vyvolá naopak odpověď silnější. Tento *cyklus excitability* se odehrává v měřítku desítek minut po skončení záchvatu a může jít o projevy změněných vlastností receptorů či iontových kanálů. Např. v limbickém systému jsou v něm

prokazatelně zapojeny opioidní receptory (Frenk *et al.*, 1979; Velíšek and Mareš, 1992). Posuny v excitabilitě jsou však patrně multifaktoriálního původu, v úvahu připadají také metabolické změny neuronů, gliových buněk, změny extracelulárního prostoru a řada jiných faktorů.

Schopnost centrální nervové soustavy potlačit probíhající epileptický záchvat a vznik postiktální deprese vypovídají o přítomnosti určitých aktivních mechanismů, jejichž činnost je vyvolána v průběhu této silné specifické patologické zátěže. Otázka po podstatě takových mechanismů (a v širších souvislostech po podstatě regulačních mechanismů nervové tkáně vůbec) je jistě motivací, která stojí v pozadí prezentovaných experimentů.

Tato diplomová práce má za cíl první orientační náhled na případný význam *gabaergní inhibice* v cyklu excitability neokortexu. Použitá metodika vychází ze zkušeností laboratoře, kde byla diplomová práce realizována. Na zdejším běžně používaném modelu (laboratorní potkan s chronicky implantovanými mozkovými elektrodami, epileptický záchvat vyvoláván elektrickou stimulací charakteristických parametrů) byl testován vliv *baclofenu*, který je znám jako specifický agonista GABA receptorů typu B. Získané poznatky ukazují, že tento inhibiční systém se v neokortexu na vzniku postiktální deprese, tj. změn vyprovokovaných proběhlým záchvatem, skutečně podílí, ačkoliv základní (předzáchvatová) úroveň excitability jím není výrazně ovlivněna.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. GABA_B receptory

γ -amino-máselná kyselina (GABA) je hlavním inhibičním neurotransmiterem v savčí centrální nervové soustavě. Její specifický účinek se realizuje pomocí tří známých typů GABA receptoru: typu A, B a C. Receptory GABA_A a GABA_C jsou ionotropní, jejich funkce souvisí se změnami vodivosti Cl⁻ kanálů.

Receptor GABA_B je metabotropní, tzn. funkčně spjatý z trimerními G-proteiny. Jeho molekula obsahuje sedm transmembránových průniků, přičemž C-konec se nachází uvnitř buňky. Sekvenčně je příbuzný metabotropnímu receptoru glutamátovému (Kaupmann *et al.*, 1997), funkční GABA_B receptor však vystupuje jako heterodimer podjednotek GABA_BR1 a GABA_BR2 (Jones *et al.*, 1998; Kaupmann *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998; Kuner *et al.*, 1999). Vazba podjednotek probíhá na jejich C-koncových doménách, které obsahují "coiled-coil" strukturní motiv. Dimerizace je pro funkci receptoru nezbytná, samotné podjednotky R1 jsou sice schopné vázat agonisty, bez přítomnosti podjednotek R2 však nevstupují do plazmatické membrány, také afinita a specifita k ligandům a další vlastnosti jsou dimerizací zásadně ovlivněny (Jones *et al.*, 2000).

Přirozený agonista GABA_B receptoru (γ -amino-máselná kyselina) vzniká v neuronech z glutamátu odštěpením karboxylové skupiny účinkem glutamát dekarboxylázy (GAD). Ze synaptické štěrbin je GABA odstraňována zpětným vychytáváním (reuptake) presynaptického neuronu a gliových buněk, tamtéž probíhá také její odbourávání. Konečným produktem degradace jsou opět glutamát a také sukcinát. Z výzkumného i medicínského hlediska jsou obzvláště důležití uměle syntetizovaní agonisté a antagonisté se specifitou pouze ke GABA_B typu receptorů. V současné době je nejčastěji používaným specifickým

agonistou baclofen (β -p-chlorofenyl- γ -amino-máselná kyselina). Antagonistů je naproti tomu k dispozici daleko větší výběr. Tradičním a osvědčeným kompetitivním antagonistou je např. CGP 35348 (kys. P-(3-aminopropyl)-P-diethoxymethylfosforitá). V příslušné literatuře je však popsáno mnoho dalších, se stále se zvyšující specifitou a potencí (Bittiger *et al.*, 1993; Froestl *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 1998). Nevýhodou většiny z nich, což platí také o agonistickém působení baclofenu, je nejasná, patrně stejná specifita k pre- i postsynaptickým GABA_B receptorům (Blaxter and Carlen, 1985), ačkoliv byla již také publikována v tomto směru nadějná zpráva o nových antagonistech (Ong *et al.*, 2001). Rozlišení presynaptického a postsynaptického působení baclofenu je možné *in vitro* kupříkladu pomocí pertussis toxinu, který inhibuje postsynaptickou hyperpolarizaci, presynaptická funkce k této látce citlivá není (Seabrook *et al.*, 1990). V souvislosti s baclofenem je třeba zmínit se také o stereospecifitě jeho účinku, neboť jeho R-(-) stereoizomer má mnohem vyšší potenci než S-(+) stereoizomer (Bowery *et al.*, 1985), a také o podstatné vlastnosti baclofenu, kterou je jeho dobrá prostupnost hematoencefalickou bariérou (Bowery *et al.*, 1997).

Molekulárními efekty GABA_B receptoru jsou, samozřejmě zprostředkovaně pomocí aktivace příslušných G-proteinů, především adenylyl cykláza, draslíkové iontové kanály a vápníkové iontové kanály. Diskutovány byly i některé další signální cesty, např. interakce receptoru s fosfolipázou C (Crawford and Young, 1988), nebo fosfolipázou A (Duman *et al.*, 1986), první tři vyjmenované jsou však neznámější a patrně nejdůležitější.

Základní vliv GABA_B receptoru na aktivitu adenylyl cyklázy je inhibiční, formace cAMP je jím snižována, a je sprostředkován α -podjednotkou Gi/Go skupiny G-proteinů. Avšak za specifické situace, kdy je adenylyl cykláza současně stimulována některým transmitterským systémem používajícím k přenosu informace Gs proteiny, může mít aktivace GABA_B receptorů za následek

naopak facilitaci takového stimulačního vlivu a tím paradoxně zvyšovat koncentraci cAMP v buňce (Karbon and Enna, 1985; Andrade, 1993). Mechanismus popsaného efektu spočívá ve schopnosti podjednotkového komplexu $\beta\gamma$ stimulovat některé druhy adenylyl cykláz -např. typ II. (klasifikace viz. Tang and Gilman, 1992), přičemž komplex $\beta\gamma$ nemusí pocházet výhradně z Gs typu G-proteinu, ale také ze jmenované skupiny Gi/Go. Takto interaguje GABA_B -ergní signalizační systém se systémem noradrenergním, histaminergním i jinými.

Zvýšená vodivost K⁺ kanálů jako důsledek GABA_B aktivace je efekt, který můžeme sledovat na postsynaptické membráně GABA-ergních inhibičních synapsí. Je podkladem tzv. pozdního inhibičního postsynaptického potenciálu (IPSP). Jak název napovídá, kinetika pozdního IPSP se odlišuje od rychlého a krátkého IPSP vznikajícího při stimulaci ionotropních GABA_A receptorů, které přímo regulují tok Cl⁻ iontů. Od stimulace presynaptické terminály k nástupu pozdního IPSP tak uplyne přibližně 20 ms, vrcholu hyperpolarizace je dosaženo za 200 ms a pozvolný návrat k původní hodnotě membránového potenciálu trvá ještě několik dalších stovek milisekund. Celý IPSP může trvat až 1500 ms, výsledný posun membránového potenciálu činí 10 - 20 mV (Mott, 1996). Nejpravděpodobněji se na změnách draslíkové vodivosti podílejí K⁺ kanály typu inward-rectifiers (Mott and Lewis, 1994).

V presynaptické membráně se GABA_B receptory vyskytují také. Jejich význam zde je komplikovanější než význam receptorů postsynaptických, také dílčí mechanismy jejich působení jsou dosud hůře objasněny. GABA_B receptory pravděpodobně působí inhibičně na napětím ovládané Ca²⁺ kanály, mění charakteristiky jejich napěťové závislosti (Mott, 1996) a tím dokaží snížit celkový tok Ca²⁺ do buňky během akčního potenciálu. Takto může být omezen výlev excitačních neuromediátorů, např. noradrenalinu (Bowery and Hudson, 1979) nebo excitačních aminokyselin (Seabrook *et al.*, 1990). GABA_B receptory jsou

však známy též jako presynaptické autoreceptory na samotných GABA-ergních zakončeních, kde zprostředkovávají negativní zpětnou vazbu při regulaci výlevu GABA (Davies *et al.*, 1991; Deisz, 1996b). V problematice presynaptické inhibice ale přetrvává mnoho nejasností, zejména ohledně řetězce kroků propojujících receptor s kanály, pochyby jsou též o konkrétních typech zúčastněných Ca²⁺ kanálů, někdy dokonce o jejich podílu vůbec (Scanziani *et al.*, 1992).

Široké zastoupení receptorů pro GABA v mozkových strukturách poukazuje na jejich zásadní význam v CNS. Kvantitativní studie zaměřené na distribuci GABA_A a GABA_B vazebných míst v potkaním mozku (Bowery *et al.*, 1987; Chu *et al.*, 1990) přináší tyto poznatky:

a) ve většině regionů převažují receptory typu A nad receptory typu B

b) výjimkami, kde je tomu naopak, jsou zejména molekulární vrstva mozečku (dendrity Purkyňových buněk a presynapse paralelních vláken), ventrobazální thalamus, amygdala (ncl. lat. amygdalae), a dále tractus habenulo-interpeduncularis a ncl. interpeduncularis (mezencefalická součást limbických struktur)

c) receptory B byly společně s receptory A prokázány ve velkém množství také v celé kůře mozku, obzvláště ve vnějších čtyřech vrstvách, v colliculus superior a také v corpus geniculatum mediale i laterale

d) mizivé množství GABA_B receptorů je přítomno v corpus callosum

Kromě toho jsou GABA_B-ergní inhibiční neurony běžně přítomny v páteřní míše (lamina II a III), kde ovlivňují funkci primárních aferent (Bowery *et al.*, 1987) a v gangliích sympatického autonomního systému, kde regulují výdej katecholaminů (Kerr and Ong, 1995).

Z medicínského hlediska nejsou zatím specifické ligandy GABA_B receptoru příliš využívány. Jedinou tradiční problematikou, v níž aplikace baclofenu figuruje coby možná volba, je spasticita jako důsledek poruchy

pyramidální dráhy (Kerr and Ong, 1995). Myorelaxační účinek baclofenu se realizuje na míšní úrovni inhibicí mono- i polysynaptických reflexů. Při vyšších dávkách má však baclofen i nepříjemné vedlejší účinky: závratě, nevolnost, zmatenost, ospalost, možné ztráty vědomí a respirační komplikace. Další nadějně oblasti klinického využití jsou teprve objevovány. Je studován mj. podíl GABA_B receptorů při vzniku některých epileptických záchvatů (např. typu absence, kde hrají roli v patologické aktivitě thalamo-kortikálního reverberačního okruhu, viz. dále), nebo význam GABA_B inhibice při regulaci nocicepce (Hammond, 2001).

2.2. Thalamo-kortikální reverberační systém

Thalamo-kortikální reverberační systém je jeden z modulačních systémů centrální nervové soustavy regulujících kvalitativní a kvantitativní úroveň vědomí, t.j. vědomí ve smyslu bdělosti a aktuální schopnosti přijímat a zpracovávat informace. Funkce thalamo-kortikálního systému je svázána s důležitým okruhem -ascendentním retikulárním aktivačním systémem (ARAS), jehož popis je třeba zde nastínit. ARAS je součástí retikulární formace, aferentně je propojen s nespecifickými kolaterálami senzoričných drah a jeho eference míří jednak k nespecifickým převodním jádrům thalamu, jednak difúzně přímo do kůry. Velká konvergence jeho vstupů zajišťuje integraci signálů ze všech smyslových modalit a umožňuje vyhodnotit celkovou úroveň smyslového dráždění. ARAS se mimo jiné podílí na přechodu ze spánku do bdělého stavu (probouzecké reakce, arousal reaction). Reverberační a modulační systém thalamo-kortikální je s retikulárním aktivačním systémem funkčně spjat v jistém antagonistickém smyslu -poklesne-li nespecifická retikulo-thalamická aference z ARAS, zvyšuje svou činnost thalamo-kortikální okruh. Jeho reverberační aktivita působí jako filtr přicházejících signálů a mozková kůra je za takové situace chráněna před rušivými podprahovými smyslovými podněty. Na

elektroencefalogramu (EEG) pak můžeme sledovat pravidelný synchronní rytmus. Behaviorálním korelátem této synchronizace je pak snížení bdělosti.

Thalamo-kortikální okruh tvoří tři skupiny neuronů ve vzájemném recipročním propojení: inhibiční neurony ncl. reticularis thalami, excitační neurony thalamických převodních buněk (relay cells) a korové pyramidální neurony. Pacemakerem, zdrojem rytmické aktivity, může být patrně samotné ncl. reticularis, za přirozených podmínek jsou však synchronizovány též thalamo-kortikální (převodní) neurony a následně i aktivita kůry (Krosigk *et al.*, 1993; Kostopoulos, 2000). Primární rytmus pravděpodobně vzniká díky vzájemným inhibičním zpětným vazbám uvnitř ncl. reticularis thalami, nebo mezi ncl. reticularis a převodními buňkami, které při aktivitě neuronů způsobí jejich následnou výraznou hyperpolarizaci. Při hyperpolarizaci začnou přes buněčnou membránu zúčastněných neuronů téci tzv. zpětně usměřňující proudy (inwardly rectifying currents), přičemž způsobený posun membránového potenciálu (směrem ke klidové hodnotě) otevře T (low-voltage-activated) Ca²⁺ kanály. To má okamžitě za následek další excitaci neuronu (Huguenard *et al.*, 1995) -tzv. odražená aktivace, rebound activation. Vápníkové kanály však podléhají rychlé inaktivaci a pro obnovení aktivovatelného stavu je potřebná přechodná hyperpolarizace, což je v tomto případě zajištěno právě inhibiční zpětnou vazbou (Caddick and Hosford, 1996). Z thalamu se rytmické výboje šíří do kůry a na EEG pak můžeme sledovat synchronizaci elektrické aktivity.

Aktivita thalamo-kortikálního okruhu se na EEG projevuje nejčastěji v podobě alfa vln -při zavření očí, nebo spánkových vřeten -ve druhém spánkovém stádiu (Servit, 1983), v patologickém případě některých epileptických záchvatů pak také typickým rytmickým signálem, např. typu hrot-vlna.

2.3. Následný výboj typu hrot-vlna

Rytmus hrot-vlna (spike-and-wave, SW) je EEG korelátem různých typů epileptického záchvatu, zejména však tzv. absencí, myoklonických záchvatů a patrně též klonické fáze generalizovaného tonicko-klonického záchvatu (Kubová *et al.*, 1999; Mareš and Zouhar, 1988; klasifikace epil. záchvatů viz. Servít, 1983) a to jak u lidí, tak u zvířecích modelů. Skládá se z pravidelně se opakujících grafoelementů hrotu a vlny, generovaných s relativně pomalou frekvencí -přibližně 3 Hz.

Rytmus hrot-vlna zřejmě vzniká jako abnormální aktivita některé části thalamo-kortikálního reverberačního okruhu (Avanzini *et al.*, 1992), nejspíše kůry (Steriade *et al.*, 1998a; Steriade *et al.*, 1998b). Odtud se šíří do thalamu, jehož přirozená schopnost tvorby rytmu je zřejmě touto patologickou oscilací podmaněna (Neckelmann *et al.*, 1998). Frekvence výboje 3 Hz patrně vyhovuje jak požadavkům na dostatečnou dobu pro deinaktivaci T-Ca²⁺ kanálů v thalamu, tak vlastnostem kůry, u níž je při mezistimulačním intervalu 300 ms (což přibližně odpovídá zmíněné frekvenci) prokázáno výrazné potlačení inhibice díky autoreceptorům na GABA -ergních terminálách (Deisz, 1996b). Typický elektroencefalografický projev hrotů a vln je dán pravidelným střídáním excitace a inhibice korových pyramidálních neuronů. V době, kdy na EEG registrujeme hrot, jsou pyramidální neurony depolarizovány a tvoří skupiny akčních potenciálů (bursts). Pak převládne inhibiční vliv ncl. reticularis thalami na převodní buňky i kůru a na EEG se v tu chvíli objevuje vlna. Činnost korových neuronů je během SW rytmu silně synchronizována a to nejen oproti jejich běžné aktivitě za bdělého stavu, ale i ve srovnání s činností během přirozeně synchronních period, např. spánkových rytmů (Steriade and Amzica, 1994).

Rytmické výboje typu hrot-vlna mohou být u zvířat vyvolány nejrůznějšími způsoby. Většinou se tak činí v souvislosti s modelováním

epileptického záchvatu typu absence nebo myoklonických křečí (Mareš and Zouhar, 1988).

Absence patří mezi tzv. primárně generalizované záchvaty (záchvaty postihující difúzně celou CNS) a je charakterizována jako velmi krátce trvající (2-15s) ztráta vědomí, která není nutně doprovázena svalovými křečemi. Na EEG je během absence patrný rytmus typu hrot-vlna přibližně s frekvencí 3 Hz. Modelově se záchvaty tohoto typu vyvolávají např. systémovým podáním nízkých dávek metrazolu (pentylenetetrazolu; Kubová *et al.*, 1999), nebo vysokých dávek penicilinu (Feline Generalized Penicillin Epilepsy, FGPE: Gloor, 1979), ale existují také genetické modely absence (Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg, GAERS: Marescaux *et al.*, 1992; WAG/Rij inbred strain: Coenen and Luijtelaar, 1987). Tento druh epileptického záchvatu je považován za projev zvýšené funkce určitých inhibičních okruhů mozku oproti okruhům excitačním. Uvažuje se v této souvislosti o významu receptorů GABA_A i GABA_B, neboť absence může být potlačena či omezena antagonizováním kteréhokoliv z uvedených typů, agonisté těchto receptorů naopak vznik absencí facilitují (Caddick and Hosford, 1996; Huguenard *et al.*, 1995; Hosford *et al.*, 1992). V některých modelech je jasně prokázán vznik SW rytmu plynulým přechodem z normální pomalé aktivity thalamo-kortikálního reverberačního systému během synchronních spánkových vln (Steriade *et al.*, 1998b) a tomuto přechodu lze zabránit podáním GABA_B antagonistů (Krosigk *et al.*, 1993).

Zcela jiným typem epileptických záchvatů, jež jsou však také na EEG charakteristické aktivitou hrot-vlna, jsou myoklonické záchvaty. U laboratorního potkana je můžeme modelovat např. nízkofrekvenční elektrickou stimulací sensorimotorické kůry (Kubová *et al.*, 1996). Je-li stimulační intenzita dostatečná, podaří se nám vyprovokovat vznik následného výboje typu hrot-vlna. Jeho průměrná délka se obvykle pohybuje okolo 8 sekund (Mareš *et al.*, 1982). Během stimulace i během následného výboje pak můžeme na pokusném zvířeti

sledovat rytmické svalové křeče v oblasti hlavy a předních končetin, které jsou synchronní se stimulačními pulzy, případně s okamžiky výskytu hrotů na ECoG záznamu následného výboje. Kromě těchto primárních motorických projevů se při vyšších intenzitách stimulace objevují také tonické křeče - zvíře se zdvihá na zadních tlapkách, někdy následuje též jeho pád. Při stálém zvyšování intenzity stimulačního proudu se v určitém okamžiku může epileptická aktivita začít šířit do jiných, např. limbických struktur. To je doprovázeno specifickými změnami ECoG (místo SW se objeví hroty, generované s rychlou frekvencí) a také v chování. Typické jsou některé automatizmy, jako např. otřepávání se (wet-dog-shakes) nebo orientační chování, kdy se zvíře rozhlíží, obchází svůj box a čenichá, ačkoliv se nachází ve známém prostředí.

Charakter farmakologického ovlivnění následného výboje typu hrot-vlna vyvolaného elektrickým drážděním je zřetelně rozdílný od absencí, což platí pro celou řadu látek (Kubová *et al.*, 1996; Kubová *et al.*, 1999). V této souvislosti lze usuzovat zejména na odlišný význam gabaergní inhibice, neboť, na rozdíl od absencí, látky podporující GABA_A transmisi působí u tohoto modelu na výboje hrotů a vln tlumivě (Polášek *et al.*, 1996). Některé práce také odhalují určitou roli excitačních neurotransmiterových systémů, jako např. význam glutamátových non NMDA receptorů při vzniku výboje (Mareš *et al.*, 1992; Kubová *et al.*, 1997), nebo při jeho šíření do limbických struktur (Koryntová *et al.*, 1997).

Rytmické výboje typu hrot-vlna je možné vyvolat i dalšími způsoby (bez nároku na jasnou klasifikaci modelu z hlediska humánní medicíny), např. systémovou i lokální korovou aplikací bicucullinu (antagonista GABA_A receptoru; Steriade *et al.*, 1998a) nebo korovou aplikací baclofenu (Brailowsky *et al.*, 1995).

Přes všechny odlišnosti se zdá, že základní epileptická oscilace, projevující se v EEG zápisu hroty a vlnami s frekvencí přibližně 3 Hz, patrně vzniká jediným, všem modelům společným způsobem a to v thalamo-kortikálním

reverberačním okruhu. Její šíření a zahrnutí dalších mozkových struktur do rytmické aktivity má pak patrně za následek popsané rozdíly ve farmakologii a možnostech ovlivnění jednotlivých typů záchvatů (Kubová *et al.*, 1999).

2.4. Korový cyklus excitability následného výboje typu hrot-vlna

Epileptický následný výboj vyvolaný elektrickou stimulací je (podobně jako všechny iktální epileptické fenomény) následován různě dlouhým obdobím, během něhož je značně snížena možnost vyvolání nového záchvatu další stimulací. Toto období označujeme jako postiktální deprese. Na postiktální depresi plynule navazuje naopak perioda zvýšené pravděpodobnosti vzniku záchvatu. Obě fáze změněné vzrušivosti, jimiž podrážděná mozková struktura prochází, se souhrnně nazývají cyklus excitability. K experimentálnímu zkoumání jeho průběhu se používá dvou stimulací totožných parametrů, které po sobě následují v různých, z hlediska sledovaných změn relevantních časových intervalech. První stimulace má cyklus excitability vyvolat ("nastartovat", někdy se jí též říká podmiňující), druhá má za úkol zjistit, zda se v danou chvíli nějaké posuny ve vzrušivosti odehrávají (nazývá se testující). V experimentech na laboratorních potkanech byla tímto způsobem popsána postiktální deprese po následném výboji typu hrot-vlna (vyvolaném stimulací neokortexu; Mareš *et al.*, 1982). Postiktální deprese přetrvávala v období 30 sekund až 2 minuty po jeho skončení, což se projevilo jednak kratší průměrnou dobou trvání následných výbojů, jednak signifikantně nižší incidencí jejich vzniku. V čase 3 a 5 minut byl druhý následný výboj stejně dlouhý jako první a v období od 7. až do 60. minuty bylo prokazatelné jeho prodloužení. Poté se vzrušivost CNS již navrátila k původnímu stavu. Téměř stejný průběh cyklu excitability byl demonstrován i po následném výboji hrot-vlna vyvolaném elektrickou stimulací thalamu (Mareš and Marešová, 1989).

Experiment lze uspořádat také složitěji, jako sérii většího počtu stimulací oddělených vždy stejným (anebo i různým) časovým intervalem. Kombinování intervalů však s sebou nese jisté interpretační obtíže, jelikož stimulační impulsy vyvolávají ve sledovaném systému znova tytéž procesy, avšak vždy z jeho jiného počátečního stavu - což může význam jednotlivých mezistimulačních intervalů ovlivnit (Mareš *et al.*, 1981). Naproti tomu užití stejného intervalu demonstruje opakovatelnost (jistou "vytrvalost") či naopak efemernost daného jevu. Práce na 25 dní starých mláďatech ukazují, že při použití konstantního intervalu 1 minuta je možné vyvolat statisticky významnou postiktální depresi ještě po 5. stimulaci (Mareš and Marešová, 1998).

U potkaních mláďat mladších 25-ti dnů se takovýto cyklus excitability vyvolat nepodaří, mechanismy zúčastněné na vzniku postiktální deprese se patrně vyvíjejí až ve třetím postnatálním týdnu (Mareš, 1991).

Podobné změny jako po následném výboji vyvolaném korovou stimulací jsou rovněž popsány po elektrickém dráždění hipokampu (Mareš and Marešová, 1989). Následný výboj zde má jiný vzhled (delta vlny se superponovanými hroty) a také časový průběh cyklu excitability je poněkud odlišný. Postiktální deprese je prokazatelná ještě 5 až 10 minut po skončení následného výboje, "neutrální" období trvá mezi 10. a 20. minutou a zvýšená dráždivost se projevuje v čase od 30. do 60. minuty. V pozdní fázi postiktální deprese se v tomto případě zřejmě uplatňují endogenní opiáty, jelikož podání naloxonu, nespecifického antagonisty opiátových receptorů, vede k potlačení postiktální deprese u 10-ti minutového mezistimulačního intervalu (Velíšek and Mareš, 1992).

Případná účast jiných receptorových soustav na postiktálních změnách vzrušivosti není známa.

2.5. Elektrická stimulace

Již bylo řečeno, že pro vyvolání následného výboje typu hrot-vlna je možné použít elektrické stimulace neokortexu a že je třeba při tom dodržet jisté parametry stimulace. Předně musí intenzita stimulačního proudu dosáhnout prahové hodnoty. Mezi intenzitou proudu a délkou následného výboje pak existuje pozitivní korelace. Překročí-li však stimulační intenzita určitou mez, vede to k propagaci epileptických výbojů do limbických struktur a tím i změně celkového charakteru následného výboje (Kršek *et al.*, 1998; Koryntová *et al.*, 1997). Také frekvence stimulačních pulzů je podstatná pro typ následného výboje. Vyšší frekvence (50 Hz) vedou k formaci rychlých hrotů, mezi nimiž se komponenta vlny objevuje až v průběhu výboje a k jeho konci je opět potlačena, přičemž hroty se začnou vyskytovat ve skupinkách. Naproti tomu nižší stimulační frekvence (8 Hz) spolehlivě vyvolávají typický rytmus hrot-vlna. Popsané rozdíly jsou dány jiným charakterem působení stimulace na kůru: pomalý rytmus dráždicích pulzů vede k synchronizovanému vybíjení korových neuronů již během stimulace, zatímco rychlá stimulační frekvence patrně způsobí v týchž neuronech pouze silnou depolarizaci. Ta teprve po skončení dráždicí série postupně dává vzniknout rytmickému výboji (Mareš *et al.*, 1981).

2.6. Evokované potenciály

Chceme-li zkoumat vlastnosti určité informační cesty, například neuronální dráhy, jeví se jako logická možnost její podráždění na vstupním konci a záznam odpovědi na výstupu, nejlépe pak při různých kombinacích vnějších faktorů. Na tomto principu pracuje také metoda evokovaných potenciálů, jen je třeba si upřesnit, jakého druhu má být příslušné podráždění a co rozumíme pojmy vstup a výstup.

Jelikož obecně platí, že snímací zařízení zaznamenávají nejen specifickou odpověď, ale také jistou hladinu nepodstatného signálu, šumu, která může být značně vysoká např. u povrchově registrovaného EEG, používají se pro stimulaci evokovaných potenciálů velmi krátké a zároveň intenzivní podněty. Takové dráždění pak vede ke vzniku jednoznačné a časově přesně lokalizované odpovědi. Tak je-li předmětem zájmu některá senzoričká dráha, volí se ke stimulaci např. krátký záblesk světla (u zraku), krátké cvaknutí (sluch), nebo elektrický pulz aplikovaný na periferní nerv (somatické čítí; Bureš, 1967). Místo dráždění ("vstup") se ale nemusí nacházet jen na periférii, elektrickým podnětem lze stimulovat také části CNS, např. různé oblasti mozkové kůry, thalamus, apod. Sledování evokovaných potenciálů ("výstup") pak lze také provádět v různých lokalitách. Při senzoričkých odpovědích registrujeme především v podkorových centrech příslušných drah a v místě jejich primárních korových prezentací, při stimulaci mozkových struktur zase v oblastech monosynapticky spojených s drážděnou oblastí. Užívají se k tomu nejčastěji nízkoodporové kovové elektrody, které zaznamenávají sumační signál tvořený vektorovým součtem excitačních a inhibičních postsynaptických potenciálů, jindy se volí záznam jednotkové aktivity za pomoci vysokoodporových elektrod. Dále se pro dosažení čistšího signálu využívá zprůměrnění či superpozice více záznamů, neboť v takovém případě se nahodilé příspěvky šumu a případných artefaktů navzájem odečtou, zatímco pravidelné, opakované rysy evokovaného potenciálu se zvýrazní.

Evokované potenciály zaznamenané v kůře mozku mají v ideálním případě typický průběh: po krátkém čase latence se objeví nejprve pozitivní vlna, která plynule přechází v negativní. To je primární část odpovědi, která je projevem samotné kůry v oblasti registrace. Pozitivní vlna je výrazem depolarizace neuronů v hlubších vrstvách kortexu, kde končí primární aferenty, zatímco jako negativní vlna se demonstruje jejich následná hyperpolarizace spolu s depolarizací vrstev povrchních (Bureš, 1967; Creutzfeldt, 1974). Latence ilustruje rychlost vedení

informace sledovanou dráhou. Kromě této bifázické primární části evokovaného potenciálu se může s jistým zpožděním objevit i méně specifická sekundární odpověď, zejména byla-li užita vyšší intenzita stimulačního podnětu. Oproti primární odpovědi není omezená lokalizací na konkrétní oblast korové projekce, nýbrž ji lze zaznamenat téměř po celé mozkové kůře (nicméně její tvar nemusí být všude úplně stejný) a to i poté, co bylo místo primární odpovědi odděleno od zbytku kůry cirkulárním řezem. Je tomu tak proto, že sekundární část evokovaného potenciálu vytvářejí polysynaptickými okruhy podkorové mozkové struktury, např. asociační a nespecifická jádra thalamu, z nichž se sekundární odpověď šíří difúzně do celé kůry (Ganong, 1997).

Mezi korové evokované odpovědi patří také transkalozální evokovaný potenciál. Je to potenciál snímaný v kůře po stimulaci elektrodou symetricky umístěnou v odpovídajícím místě protilehlé hemisféry. Splňuje všechny popsané charakteristiky (Grafstein, 1963): primární fáze se skládá z pozitivní a negativní vlny, které se objeví se zpožděním asi 10 a 25 ms od stimulace, za nimi následuje nespecifická sekundární odpověď. Primární odpověď je zprostředkována monosynaptickou cestou vláknů corpus callosum. Její pozitivní vlnu tvoří excitační postsynaptický potenciál (EPSP) na somatech pyramidálních neuronů hlubších korových vrstev, přičemž těla presynaptických neuronů se nacházejí v hlubších vrstvách kůry (V. vrstva) v místě dráždění. Jejich akční potenciály jsou vedeny rychlejšími myelinizovanými vlákny corpus callosum. Primární negativní vlna vzniká nezávisle na předcházející pozitivitě a to podrážděním neuronů povrchnějších vrstev kůry, jejichž akční potenciály jsou vedeny pomalejšími (sice také myelinizovanými, avšak tenčími) vlákny a vyvolávají EPSP v povrchních vrstvách kůry v místě registrační. Kromě toho se pravděpodobně současně uplatňuje hyperpolarizace neuronů z hlubokých částí kortexu.

Mimo aplikaci jednotlivých pulzů se při studiu vlastností synaptického přenosu používají také stimulace pomocí páru nebo celé série pulzů. Tak byla

popsána potenciace párovými podněty, kdy při mezistimulačním intervalu v rozsahu 50 - 200 ms je amplituda druhého transkalozálního evokovaného potenciálu vyšší než amplituda první odpovědi. Podstata tohoto jevu není objasněna, obdobné potenciační fenomény však bývají dávány do souvislosti s procesem vzniku epileptického záchvatu v daných strukturách a to např. ve smyslu stejné farmakologické ovlivnitelnosti a potažmo účasti stejných fyziologických mechanismů (Nowack *et al.*, 1979; Kubová and Mareš, 1992).

3. FORMULACE EXPERIMENTÁLNÍCH OTÁZEK

Předkládaná práce se snaží nalézt odpovědi především na takto položené otázky:

A) Jakým způsobem se podílí GABA_B receptory na regulaci excitability neokortexu, zvláště jeho citlivosti k epileptogením podnětům a vzniku epileptického záchvatu typu hrot-vlna?

B) Účastní se GABA_B receptory mechanismů, které zabraňují vzniku nového epileptického záchvatu typu hrot-vlna v bezprostředním postiktálním období, neboli takzvané postiktální deprese?

4. METODIKA

4.1. Zvířata

Pro všechny pokusy byli použiti dospělí samci bílého laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) kmene Wistar z vlastního chovu, jejich předoperační hmotnost se pohybovala mezi 300 - 400 gramy. Zvířata byla chována v klecích po jednom, se stravou a vodou přístupnou bez omezení, světelný denní cyklus činil 12 hod. světla / 12 hod. tmy a teplota v příručním zvěřinci byla udržována na 22 ± 1 °C.

Projekt pokusu byl schválen Odbornou komisí Fyziologického ústavu AVČR v souladu se Zákonem na ochranu zvířat 1994, sb.

4.2. Implantace elektrod

Implantace proběhly pod celkovou anestézií navozenou kombinací ketaminu (Narkamon, Spofa, 100 mg/kg i.p.) s xylazinem (Rometar, Spofa, 20 mg/kg i.p.), délka operací nepřesáhla 55 minut.

Zvířeti ve spolehlivé anestézii (pravidelný dech, atonické, bez reakcí na bolestivé stimuly) byla vystříhána srst na temeni a proveden oválný stříh o délce cca 1,5 cm umožňující přístup k lebce mezi bodem λ a nazálními kostmi. V celé délce stříhu byl řezem, odtažením a sedřením vaziva skalpelem úplně očištěn povrch kosti. Na něm byl identifikován bod bregma (průsečík sagitálního a koronárního švu) jako počátek souřadnic, orientace viz. (Zilles, 1985). Další operační kroky byly prováděny ve stereotaxické aparatuře, všechny implantované elektrody byly povrchové, epidurální, podrobnější popis dále.

a) Zvířatům pro experimenty s následnými výboji byly na lebce vyměřeny, lihovým fixem vyznačeny a elektrickou vrtačkou odvrtnuty asi 1 mm velké otvory pro tyto elektrody: dvě stimulační nad pravým sensorimotorickým kortexem (AP = +1 a -1; L = 2 mm); registrační nad levou hemisférou (left frontal, LF; AP = 0; L = 2 mm), (left occipital, LO; AP = 6; L = 4); registrační nad pravou hemisférou (right occipital, RO; AP = 6; L = 4); indiferentní (v levé nazální kosti), obr. 1a). Kuličkové stimulační a ploché registrační elektrody jsem vyráběl ze stříbrného drátku o průměru 0.8 mm otavením konce, resp. jeho sklepnutím kladívkem, jako indiferentní elektroda posoužil šroubek z nerezavějící oceli.

b) Zvířatům pro ostatní experimenty byly elektrody umístěny podle modifikovaného schématu: stimulační nad pravým sensorimotorickým kortexem (AP = +1 a -1; L = 2 mm); registrační nad levou hemisférou (LF; AP = 0; L = 2), (left parietal, LP; AP = 3; L = 3), (LO; AP = 6; L = 4); nad pravou hemisférou (RO; AP = 6; L = 4); indiferentní (v levé nazální kosti); zemnicí (v okcipitální kosti) a další dva otvory určené pro fixační šroubky (pravá kost nazální a parietální), obr. 1b). Z prostorových důvodů byly vrtány menší otvory o průměru asi 1 mm, a to ručně injekční jehlou. Všechny elektrody měly podobu prostého stříbrného drátku bez další úpravy.

K elektrodám byl připájen šesti- (v případě popsaném v odstavci a)) nebo osmimístný konektor a celek fixován rychletvrdnoucí dentální pryskyřicí (Duracrol, Spofa) k lebce, obr. 1c). Před vlastním pokusem byl zvířatům poskytnut jeden týden klidu k rekonvalescenci.

4.3. Záznamová a stimulační aparatura

Pro záznam a zpracování biopotenciálů byla použita sestava vytvořená v laboratoři z komerčně dostupných i ve zdejších dílnách vyrobených přístrojů. Základní součástí byl počítačem řízený elektroencefalograf, jen v experimentech s následnými výboji jsem použil elektroencefalograf klasický se zápisem na papír. Pro stimulaci byl použit generátor s konstantním proudovým výstupem. 1 ms dlouhé pravoúhlé bipolární pulzy byly aplikovány buď jednotlivě (pro evokované potenciály -dále uváděno jen jako "jednotlivé pulzy") nebo v 15 sekund dlouhé dráždící sérii s frekvencí 8 Hz (dále uváděno jako "8 Hz / 15 s") . Intenzita stimulačního proudu byla volitelná ve skocích od 0.2 do 14 mA s velikostí napět'ového skoku postupně: 0.1 mA (v rozsahu 0.2 - 1.6 mA); 0.2 mA (1.6 - 2.6); 0.5 mA (3 - 6); 1 mA (6 - 10) a 2 mA (10 - 14).

4.4. Baclofen

V těchto studiích byl použit jako specifický agonista GABA receptorů typu B baclofen. Je to β -p-chlorofenyl- γ -amino-máselná kyselina (racemická směs, Sigma, St. Louis, MO), jejíž roztok jsem si vždy před experimentem připravoval čerstvý z práškové formy, skladované ve tmě při 4 °C. Koncentrace roztoku činila 3 mg/ml destilované vody. Baclofen byl vždy aplikován intraperitoneální injekcí a to ve dvou množstvích- 3 nebo 6 mg na kg aktuální hmotnosti zvířete.

4.5. Vliv baclofenu na spontánní elektrokortikogram (ECoG)

Zvířata byla umístěna po jednom v průhledných boxech z plexiskla a připojena k bezpapírovému elektroencefalografu. Experimentální skupinu tvořila vždy 4 zvířata. Spontánní záznam trval 1 hodinu, poté byl u 4 zvířat aplikován baclofen v dávce 6 mg/kg i.p., u jiných 8 zvířat bylo toto množství rozděleno do dvou dávek po 3 mg/kg i.p. s rozestupem 1 hodiny. Poté byl ECoG monitorován ještě 2 hodiny. Po celou dobu bylo též digitální kamerou zaznamenáváno chování zvířat.

4.6. Vliv baclofenu na transkalozální evokované potenciály

4.6.1. Závislost parametrů evokovaného potenciálu na intenzitě stimulačního proudu

Zvířata byla umístěna individuálně v průhledném boxu z plexiskla a připojena k záznamové a stimulační aparatuře. Po habituaci na nové prostředí začala kontrolní část pokusu první stimulační sérií osmi jednotlivých (1 ms dlouhých pravoúhlých bipolárních) pulzů při nejnižší intenzitě - tj. 0.3 mA. Interval mezi pulzy byl generován náhodně v rozmezí 5 - 9 sekund. Bezprostředně následovaly další série vždy o vyšší intenzitě, dokud se neobjevily na ipsilaterální okcipitální elektrodě takové artefakty, které maskovaly bioelektrickou odpověď (přibližně při intenzitě 4 mA). Po 45 minutách klidu byla aplikována první dávka baclofenu (3 mg/kg i.p.) a po 15 minutách byly zopakovány všechny série v identickém rozsahu intenzit stimulačního proudu. Stejný postup jsem zopakoval i při druhé aplikaci baclofenu (další 3 mg/kg i.p.), obr. 2. Při hodnocení bylo počítačem zprůměrněno všech 8 odpovědí při stejné intenzitě stimulace a stejné dávce baclofenu. Na tomto zprůměrněném záznamu jsem měřil latence první pozitivní (L1) a první negativní (L2) vlny jako dobu od

okamžiku stimulace (stimulačního artefaktu) k okamžiku jejich amplitudového maxima, resp. minima a dále vzájemný rozdíl velikosti těchto jejich amplitudových extrémů (A), obr 3.

4.6.2. Stimulace párovými pulzy

Byla použita stejná zvířata (po 3 dnech klidu), aparatura i uspořádání experimentu jako v odstavci 4.6.1., místo série osmi jednotlivých pulzů jsme však stimulovali sérií osmi párů pulzů, obr. 2. Sérií bylo vždy 14, délka mezistimulačního intervalu byla prodlužována od 50 do 1000 ms. Intenzita proudu byla neměnná, stanovená pro každé zvíře jako dvojnásobek té intenzity, při níž se v experimentu 4.6.1. již objevil zřetelný bifázický evokovaný potenciál, t.j. dvojnásobek prahové intenzity. U zprůměrněných záznamů (viz. 4.6.1.) byla hodnocena a vzájemně srovnávána velikost amplitudy prvního a druhého evokovaného potenciálu (A1; A2; A2/A1).

4.7. Stimulační prahy pro následné výboje

Stejná zvířata jako v odstavci 4.6. byla po dalších 3 dnech klidu umístěna individuálně v průhledném boxu z plexiskla, přičemž osmi byl injikován baclofen (6 mg/kg i.p.) 15 minut před začátkem stimulace. Po habituaci a připojení k záznamové a stimulační aparatuře bylo zaznamenáno nejméně 40 sekund klidového ECoG a následovala stimulace (8 Hz / 15 s) o intenzitě 0.8 mA. Další stimulace následovaly po 10 minutách se zvyšující se intenzitou (1; 1.5; 2; 3; 3.5; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 14 mA), dokud nebyl klasifikován následný výboj smíšeného typu. Odpovědi na jednotlivé stimulace byly off-line klasifikovány do těchto 4 stupňů:

1. bez následného výboje, ale během stimulace rytmické motorické projevy v oblasti hlavy, předních či zadních tlapek, vstávání (rearing), nebo pád
2. následný výboj typu hrot - vlna na ECoG
3. následný výboj typu hrot - vlna doprovázený motorickou složkou jako v bodě 1.
4. následný výboj smíšeného (limbického) typu, v mezistimulačním ECoG přítomny rekurentní výboje

a byly stanoveny prahové hodnoty intenzity stimulačního proudu pro jednotlivé stupně.

4.8. Cyklus excitability následného výboje typu hrot-vlna

V tomto experimentu absolvovalo každé zvíře maximálně 6 sezení vždy s rozestupy 3-4 dnů klidu. První sezení bylo přípravné, zvířata po habituaci v plexisklovém boxu a připojení ke stimulátoru a elektroencefalografu absolvovala posloupnost stimulací (8 Hz / 15 s) oddělených pětiminutovými pauzami. Intenzita stimulačního proudu v posloupnosti stimulací vzrůstala (3; 3.5; 4; 4.5; 5; 6; 8 mA), dokud se nepodařilo vyvolat nesporný následný výboj typu hrot-vlna. Vyšší intenzity se pak již netestovaly a tato intenzita byla použita v následujících sezeních. V těchto sezeních bylo dodrženo schéma 4 stimulací chápaných jako 2 samostatné stimulační páry, obr. 4. Všechny mezistimulační intervaly byly měřeny od konce výboje hrot-vlna, vyvolaného předchozí stimulací do začátku následující stimulace. Vnitropárový mezistimulační interval byl identický u obou párů a volen při každém sezení náhodně z množiny (2, 3, 5, 10 a 20 min) tak, aby každé zvíře podstoupilo nakonec všechny intervaly. Interval mezi stimulačními páry byl konstantní, 15 minut, v jeho 5. minutě byl aplikován

baclofen (6 mg/kg i.p.), u kontrolních zvířat stejné množství fyziologického roztoku. Hodnocena byla délka následných výbojů hrot-vlna a též motorické projevy během nich i během stimulace (podle upravené stupnice dle - citace).

4.9. Statistické vyhodnocení

Veškeré statistické výpočty a konstrukce grafů byly provedeny v programu SigmaStat a SigmaPlot (SPSS Inc. 1999). Ke srovnávání dvou skupin dat byly použity podle způsobu získání dat t-test nebo párový t-test, při srovnávání více skupin dat byla použita jednocestná analýza rozptylu (ANOVA; v případě jiného než normálního rozložení neparametrická) s následným srovnáním všech dvojic pomocí Tukeyho testu. Hladina významnosti byla stanovena $\alpha = 0.05$, konkrétní hodnoty p jsou vždy uvedeny. Číselné výsledky uvádím v podobě: průměr \pm střední chyba průměru (S.E.M., standard error of the mean).

5. VÝSLEDKY

5.1. Vliv baclofenu na spontánní ECoG

U zvířat, která dostala baclofen jednorázovou injekcí v dávce 6 mg/kg, bylo možné s latencí v rozmezí 12-17 minut po aplikaci sledovat změny ECoG oproti kontrolnímu záznamu. Ve všech svodech vzrostla četnost i amplituda delta rytmu a amplituda theta rytmu, naopak v oblasti alfa rytmu byl zaznamenán výrazný pokles četnosti, zejména v okcipitálních svodech. Tyto změny přetrvaly přibližně dvě hodiny od aplikace baclofenu, pak se ECoG začal postupně vracet k původnímu charakteru. Příklad analýzy čtyřhodinového záznamu jednoho zvířete je na obr. 5.

Když byl baclofen aplikován ve dvou injekcích (každá 3 mg/kg) s rozestupem jedné hodiny, byly na ECoG nalezeny podobné, ale méně výrazné změny.

5.2. Vliv baclofenu na transkalozální evokované potenciály

5.2.1. Závislost amplitudy a latence evokovaných potenciálů na intenzitě stimulačního proudu

Mezi zvířaty byly nalezeny značné rozdíly v rozsahu i tvaru křivky závislosti amplitudy evokovaného potenciálu na stimulační intenzitě, dvě ukázky jsou na obr. 6. Prahové hodnoty intenzity nutné k vyvolání bifázického evokovaného potenciálu se pohybovaly v rozmezí 0.3 - 2.0 mA (průměr \pm s.e.m.: 1.0 ± 0.2 mA), maximální použité intenzity stimulace se pohybovaly v rozmezí 2.2 - 4.0 mA (3.4 ± 0.2 mA). Pro hodnocení byla použita u každého zvířete relativní tříbodová stupnice stimulační intenzity: 1. -prahová intenzita, 2. -

dvojnásobek prahové intenzity, 3. -trojnásobek prahové intenzity. Latence (L1; L2) a amplituda evokovaných potenciálů při těchto hodnotách intenzity stimulace a různých dávkách baclofenu jsou zprůměrněny v tab 1, 2 a 3 a na obr. 7 a 8. Délky latencí se v závislosti na intenzitě stimulace nelišily, L1 i L2 však vykazovaly tendenci k prodlužování v závislosti na dávce baclofenu. Statisticky významný rozdíl byl nalezen u latence L1 při stimulaci dvojnásobkem prahové intenzity, kde došlo při dávce 6 mg/kg k prodloužení z 16.1 ± 0.5 ms na 18.4 ± 0.5 ms (analýza rozptylu s následným Tukeyho testem; $p=0.020$; $n=11$). Baclofen také ovlivňoval amplitudu evokovaných potenciálů, její zvětšení však bylo statisticky nevýznamné.

5.2.2. Stimulace párovými pulzy

Výslednou veličinou byla relativní velikost amplitudy druhého evokovaného potenciálu (A2) vzhledem k amplitudě prvního (A1) -tj. $(A2/A1) \times 100$ %. Tato veličina byla vypočtena u každého zvířete pro všechny mezistimulační intervaly a dávky baclofenu, průměr z 11 zvířat ukazují tab. 4 a graf na obr. 9. Kratší mezistimulační intervaly (50 - 160 ms) měly za následek zvětšení A2 oproti A1 a tato potenciace přetrvala u kontrol i při delších intervalech. Zatímco ani jedna dávka baclofenu (3 resp. 6 mg/kg i.p.) neovlivnila potenciaci při krátkých intervalech, při intervalu 200 ms baclofen potenciaci potlačil -druhá odpověď měla stejnou amplitudu jako první. Statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a vyšší dávkou baclofenu byl zjištěn u intervalů 250 a 1000 ms (analýza rozptylu s následným Tukeyho testem; $p=0.038$; $n=11$), mezi kontrolou a nižší dávkou jen u intervalu 1000 ms (stejně testy; $p=0.006$; $n=11$).

5.3. Stimulační prahy pro následné výboje

Průměrné prahové hodnoty stimulačního proudu vyvolávající jednotlivé typy odpovědí (klasifikace odpovědí do čtyř stupňů viz. metodika) u 10 kontrolních zvířat a 8 ovlivněných baclofenem (6 mg/kg i.p.) shrnuje tab. 5 a graf na obr. 10.

Všechny stimulační prahy vykazovaly po baclofenu oproti kontrolním zvířatům tendenci ke snížení, nejvíce byl ovlivněn práh pro přechod do smíšeného (limbického) typu záchvatu: ze 7.0 ± 1.4 na 3.6 ± 0.6 mA. Ani zde však vliv baclofenu nedosáhl jednoznačné statistické významnosti. Také totožnost prahové stimulační intenzity pro 2. a 3. stupeň klasifikace, která byla pozorována u všech zvířat, nebyla porušena, tzn. podání baclofenu nevedlo k disociaci bioelektrických projevů záchvatu a křečí -následný výboj typu hrot-vlna probíhal vždy s typickou motorickou složkou.

5.4. Cyklus excitability následného výboje typu hrot-vlna

Přehled průměrných délek následných výbojů po všech čtyřech stimulacích je uveden v tab. 6 a na obr. 11, data jsou seříděna podle mezistimulačního intervalu. Do statistického zpracování nebyla zahrnuta experimentální sezení, při nichž se nepodařilo vyvolat první následný výboj druhého páru (t.j. 3. stimulace v pořadí byla neúspěšná), neboť následný výboj je podmínkou pro vyvolání požadovaného cyklu excitability. Jejich počet ve srovnání s počtem ostatních, úspěšně proběhnuvších sezení uvádí tab. 7. Při testování délek všech čtyř následných výbojů byla prokázána postiktální deprese u mezistimulačního intervalu 2 minuty v prvním páru stimulací kontrolních zvířat (neparametrická analýza rozptylu s následným Tukeyho testem; $p < 0.001$; $n=8$) a ve druhém páru stimulací po baclofenu (6 mg/kg; stejné testy; $p < 0.001$; $n=7$). U

zvířat, která později dostala baclofen, byla postiktální deprese patrná i v prvním páru stimulací, ale hladiny statistické významnosti dosáhla jen při použití párového t-testu ($p < 0.001$; $n = 7$). U těchto zvířat byl také významně prodloužen 3. následný výboj ve srovnání se zvířaty kontrolními (t-test; $p = 0.003$; $n_{\text{kontrola+baclofen}} = 8 + 7$) i ve srovnání s 1. následným výbojem ($p = 0.012$; $n = 7$), obr. 11. Mezistimulační interval 3 minuty měl také za následek vznik postiktální deprese u obou stimulačních párů u kontrol i po baclofenu, avšak vždy statisticky nevýznamné. Opačná tendence k potenciaci druhého následného výboje byla zřetelná u intervalu 10 minut, i zde však nedosáhla hranice statistické významnosti.

Dále byla pro každý pár stimulací vypočtena míra změny délky následného výboje jako rozdíl délek (2. násl. v.) - (1. násl. v.). Grafické vyjádření cyklu excitability sestavené z těchto dat pro první pár stimulací, (tedy před injekcí, zvířata byla proto zpracována dohromady), je na obr. 12. Pro snazší orientaci v grafu: jestliže směřují sloupečky vzhůru (do kladné části osy Y), byl u sledovaného páru druhý následný výboj delší než první, sloupečky směřující dolů (do záporné části osy Y) znamenají, že druhý následný výboj byl kratší než první. Na tomto grafu je opět patrná postiktální deprese u 2 minutového intervalu (párový t-test; $p < 0.001$; $n = 15$) a tendence k postiktální depresi resp. potenciaci u intervalu 3 resp. 10 minut. Pro srovnání s druhým párem stimulací, po injekci (baclofenu nebo fyziol. roztoku), slouží obr. 13. U kontrolních zvířat opakování stimulací potlačilo obě tendence -jak postiktální depresi, tak potenciaci, u intervalu 2 minuty dosáhly rozdíly mezi prvním a druhým stimulačním párem statistické významnosti (párový t-test; $p = 0.039$; $n = 8$). U zvířat po injekci baclofenu byla situace jiná. Při 2 minutovém intervalu došlo naopak ke zvýraznění postiktální inhibice (párový t-test; $p = 0.041$; $n = 7$) a u intervalů 5, 10 a 20 minut byly zřejmé tendence k výraznější postiktální potenciaci. Pozoruhodný byl rozdíl v reakci na mezistimulační interval 5 minut mezi skupinou kontrolních

a baclofenem ovlivněných zvířat, signifikantní rozdíly byly patrné v prvním páru stimulací, tedy ještě před injekcí (t-test; $p=0.025$; $n_{\text{kontrola}+\text{baclofen}}=10+10$); na obr. 12 je tento rozdíl skryt v průměru z obou skupin.

6. DISKUZE

V předkládané práci byl studován vliv baclofenu na spontánní a evokovanou aktivitu některých korových oblastí s cílem posoudit úlohu metabotropního gabaergního mediátorového systému při vzniku, potlačení nebo prevenci epileptických výbojů. Baclofen je agonista GABA_B receptorů, jehož lze použít jako vhodný experimentální nástroj, neboť jeho základní farmakologická funkce je dobře popsána a charakterizována (Seabrook *et al.*, 1990; Kerr and Ong, 1995; Deisz, 1996a). Je pochopitelné, že roli gabaergního systému je nutno ještě upřesnit a proto jsou tyto studie s baclofenem součástí širšího programu, v jehož rámci se v naší laboratoři nyní provádějí např. obdobné experimenty s CGP 35348 (kys. P-(3-aminopropyl)-P-diethoxymethylfosforitá), specifickým antagonistou stejného typu receptorů.

V případě baclofenu bylo především nutné ověřit alespoň nepřímo jeho použitelnost při systémové, intraperitoneální aplikaci, neboť farmakokinetická data pro tento způsob aplikace neexistují. Pomocí několikahodinového záznamu ECoG (elektrokortikogramu) před, během i po intraperitoneální aplikaci baclofenu jsme tedy prokázali dostatečně dlouhý (nejméně 2 hodiny) účinek této látky na spontánní aktivitu mozku. Patrné bylo především zvýraznění aktivity v oblasti pomalých vln (delta a theta vlny) a naopak potlačení alfa rytmu. Bylo-li ale stejné množství baclofenu rozděleno do dvou polovičních dávek aplikovaných v intervalu 1 hodiny, nebyly ani po první, ani po druhé injekci zaznamenány

stejně intenzivní změny ECoG jako při jednorázovém podání. Zřejmě bylo v předpokládaném místě účinku dosaženo nižších koncentrací baclofenu, neboť v intervalu mezi aplikacemi již patrně dochází k částečnému odstranění této látky (ať vylučováním, inaktivací, nebo degradací). Pro použití ve standardních schématech našich experimentů byl však zjištěný časový průběh účinku baclofenu dostačující. K fyziologické interpretaci konkrétních ECoG nálezů zatím nedošlo, k tomuto účelu bude zapotřebí většího souboru dat. Takto zaměřené experimenty v současné době již probíhají.

Při studiu transkalozálních evokovaných potenciálů se ukázalo, že křivka závislosti amplitudy evokovaného potenciálu na intenzitě stimulačního proudu nemá u všech zvířat předpokládaný "saturační" (esovitý) charakter. Lze pouze konstatovat, že tato křivka je ve sledovaném rozsahu stimulačních intenzit rostoucí. Velká různorodost mezi zvířaty byla shledána v hodnotě nejnižší (prahové) stimulační intenzity, která spolehlivě vyvolá bifázický typ evokovaného potenciálu. Tato různorodost může být jak projevem přirozené variability mezi zvířaty, tak způsobu jejich stimulace. Při epidurálním umístění stimulačních elektrod je totiž neznámá část stimulačního proudu vedena zkratem přes dura mater, aniž by měla účinek na níže uloženou kůru mozkovou. Aby bylo možné další srovnávání mezi zvířaty, byla definována relativní stupnice intenzity stimulace jako řada násobků prahové intenzity. Jelikož nejvyšší používaná intenzita stimulačního proudu byla průměrně 3.4 mA a nejnižší průměrně 1 mA, byla většina zvířat stimulována maximálně trojnásobkem prahové hodnoty a relativní stupnice proto mohla být tvořena třemi body.

Jedním ze základních nálezů je to, že parametry evokovaného potenciálu, zejména amplituda, nebyly podáním baclofenu výrazně ovlivněny. Latence evokovaného potenciálu jevíly při nadprahových stimulačních intenzitách tendenci k prodlužování v závislosti na dávce baclofenu, avšak pouze s jediným statisticky významným nálezem a to u latence 1. pozitivní vlny po vyšší dávce (6

mg/kg) baclofenu. Předpokládá se, že pozitivní vlna je projevem excitačního postsynaptického potenciálu na neuronech uložených v hlubších vrstvách kůry pod registrační elektrodou (Creutzfeldt, 1974). Těla presynaptických neuronů jsou pravděpodobně v V. korové vrstvě v místě dráždění (Grafstein, 1963). Délka latencí evokovaného potenciálu by mohla být ovlivněna změnou excitability (např. zvýšením membránového potenciálu) kteréhokoliv ze jmenovaných neuronů. Potvrdit takové vysvětlení mohou však pouze případné experimenty s intracelulárními elektrodami, které nebyly v našem uspořádání použity. Vliv baclofenu na rychlost vedení samotných vláken corpus callosum se zdá nepravděpodobný vzhledem k minimálnímu množství GABA_B receptorů v této struktuře (Bowery *et al.*, 1987). Také žádný nespecifický účinek baclofenu na buněčnou membránu není znám. O vlivu GABA_B-ergní inhibice na délku latencí referuje též Chowdhury (Chowdhury *et al.*, 1995), který na kočkách popsal zkracování latencí transkalozálních odpovědí na elektrickou stimulaci po aplikaci CGP 35348 (antagonista GABA_B receptorů).

Celkově je možno shrnout, že v prezentovaných pokusech se nepodařilo doložit výrazný vliv baclofenu na interhemisferální šíření stimulačního podnětu ve srovnání s kontrolními daty.

Při stimulaci párovými pulzy lze v celém testovaném rozsahu mezistimulačních intervalů (50 - 1000 ms) sledovat potenciaci druhého evokovaného potenciálu -jeho amplituda je větší, než amplituda prvního. Nejsilnější potenciace byla nalezena při nejkratších mezistimulačních časech (50-160 ms), což je v souladu s předchozími pozorováními (Kubová and Mareš, 1992). Žádný vliv baclofenu se neprojevil u těchto krátkých mezistimulačních intervalů, u intervalu 200 ms a delších však působil jasnou tendenci ke zmenšování relativní amplitudy 2. evokovaného potenciálu vůči kontrole, ve dvou případech statisticky významnou. Případná gabaergní inhibice při transkalozální stimulaci párovými pulzy byla diskutována také dříve: u koček

byla metodou single-unit recording pozorována při 200 ms dlouhém mezistimulačním intervalu inhibice druhé odpovědi (Chowdhury *et al.*, 1996); tato inhibice byla baclofenem zvýrazněna, kdežto CGP 35348 ji potlačil. Autoři zde navrhli účinek ligandů na presynaptickém GABA_B receptoru. Výsledky mé práce však naznačují spíše zapojení receptorů postsynaptických vzhledem k tomu, že působení baclofenu se projevuje při delších mezistimulačních intervalech (1000 ms), které nebyly předtím vyzkoušeny a které dobře korespondují s kinetikou GABA_B-ergního inhibičního postsynaptického potenciálu (Mott, 1996).

Výsledky studia prahových stimulačních intenzit pro různé stupně následného výboje v souvislosti s účinkem baclofenu nepřinesly signifikantní nálezy. Baclofen neovlivnil zásadně žádný z procesů, které souvisejí s formováním následného výboje typu hrot-vlna. Tendence ke snížení stimulačního prahu pro šíření epileptické aktivity do limbického systému by ale měla být dále zkoumána. Kdyby se dalšími sériemi pokusů prokázala statistická signifikance, pak by se jednalo o velmi zajímavé ovlivnění okruhu, v němž je přes několik jader v thalamu propojen systém thalamokortikální s limbickým systémem (Kršek *et al.*, 1998). Dosavadní práce může být tedy z tohoto hlediska považována za pilotní studii pro další výzkum.

Při posuzování experimentů s následnými výboji typu hrot-vlna a jimi vyvolaným cyklem excitability lze vyčlenit tři podstatné nálezy, z nichž první dva se týkají kontrolní situace a třetí působení baclofenu:

1. V kontrolním uspořádání se podařilo prokázat postiktální depresi v období 2 minut po skončení následného výboje a pozorovat tendenci k postiktální potenciaci v čase kolem 10. minuty, což souhlasí s předchozími nálezy u dospělých zvířat (Mareš *et al.*, 1982). Při intervalu přibližně 5 minut mezi drážděními zasahuje patrně druhá stimulace do krátkého období, kdy postiktální deprese ustupuje mechanismům excitačním. V průměru z větší populace (v

našem případě 20 zvířat) je to skutečně pětiminutový interval, během něhož je délka druhého následného výboje totožná s délkou prvního. U menších souborů (10 zvířat) však může být tato krátká perioda náhodně posunuta v čase vpřed nebo vzad, což lze uvést jako vysvětlení pozorované rozdílnosti v reakci na pětiminutový interval mezi dvěma skupinami sledovaných zvířat.

2. Opakování stimulací má vliv na účinnost mechanismů postiktální deprese. Ve druhém páru stimulací byla postiktální deprese kontrolních zvířat signifikantně potlačena oproti prvnímu stimulačnímu páru. Roli zde patrně hraje patnáctiminutová pauza oddělující oba páry stimulací. Ačkoli u žádné kontrolní skupiny nebylo zaznamenáno prodloužení třetího následného výboje oproti prvním dvěma, tendence k potenciaci při mezistimulačním intervalu 10 minut nasvědčuje možné aktivaci excitačních dějů přibližně v tomto období (Mareš *et al.*, 1982; Mareš and Marešová, 1989). Zda tyto děje skutečně interferují s principy, na základě kterých vzniká v neokortexu postiktální deprese, nemůžeme zatím doložit. Druhým hypotetickým vysvětlením je možnost, že mechanismy postiktální deprese jsou "vyčerpatelného" charakteru. Jejich aktivace během prvních dvou stimulací by pak měla za následek, že po třetí stimulaci je mozková kůra již "nemá k dispozici", t.j. nedojde ke vzniku srovnatelné postiktální deprese.

3. Postiktální depresi se podařilo vyvolat i u druhého páru stimulací, jestliže byl v pauze před nimi systémově aplikován baclofen. To svědčí o významné úloze gabaergní inhibice realizované akcí na receptorech typu B při posílení mechanismů či samotném vzniku postiktální deprese.

7. ZÁVĚR

A) Základní excitabilita mozkové kůry nebyla baclofenem zřetelně ovlivněna, nedotčeny zůstaly jak procesy vedoucí ke vzniku korového záchvatu typu hrot-vlna, tak ty, které souvisejí s jeho šířením.

B) Inhibiční děje v čase po skončení korového záchvatu typu hrot-vlna (postiktální deprese) byly baclofenem posíleny. Lze proto předpokládat účast $GABA_B$ receptorů v mechanismech zabraňujících vzniku stejného epileptického záchvatu v bezprostředním postiktálním období.

8. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Andrade R (1993) Enhancement of b-adrenergic responses by G_i-linked receptors in rat hippocampus. *Neuron*, **10**, 83-88.
- Avanzini G, DeCurtis M, Marescaux C, Panzica F, Spreafico R, Vergnes M (1992) Role of the Thalamic Reticular Nucleus in the Generation of Rhythmic Thalamo-Cortical Activities Subservicing Spike and Waves. *J. Neural Transm., Suppl.*, **35**, 85-95.
- Bittiger H, Froestl W, Mickel SJ, Olpe H-R (1993) GABA_B Receptor Antagonists: From Synthesis To Therapeutic Applications. *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 391-4.
- Blaxter TJ, Carlen PL (1985) Pre- and Postsynaptic Effects of Baclofen in the Rat Hippocampal Slice. *Brain Res.*, **341**, 195-9.
- Bowery NC, Hudson AL, Price GW (1987) GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*, **20**, 365-383.
- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL (1985) [³H](-) Baclofen: an Improved Ligand for GABA_B Sites. *Neuropharmacol.*, **24**, 207-10.
- Bowery NG, Hudson AL (1979) g-Aminobutyric Acid Reduces the Evoked Release of ³H-Noradrenaline from Sympathetic Nerve Terminals. *British Journal of Pharmacology*, **66**, 108.
- Bowery NG, Kerr DIB, Ong J (1997) GABA B Receptors. Role and Therapeutic Implications in CNS Disorders. *CNS Drugs*, **3**, 167-75.
- Brailowsky S, Montiel T, Meneses S, Scala GD (1995) Effects of GABA_B receptor antagonists on two models of focal epileptogenesis. *Brain Research*, **702**, 126-132.

- Bureš J (1967) Electrophysiology of the Cerebral Cortex. In: *Electrophysiological Methods in Biological Research*. Edited by J. Bureš, M. Petrůň and J. Zachar. Prague: Academia, pp. 507-585.
- Caddick SJ, Hosford DA (1996) The role of GABA_B Mechanisms in Animal Models of Absence Seizures. *Molecular Neurobiology*, **13**, 23-32.
- Coenen AML, Luijtelaar ELJMV (1987) The WAG/Rij Rat Model for Absence Epilepsy: Age and Sex Factors. *Epilepsy Res.*, **1**, 297-301.
- Crawford MLA, Young JM (1988) GABA_B Receptor-Mediated Inhibition of Histamine H₁-Receptor-Induced Inositol Phosphate Formation in Slices of Rat Cerebral Cortex. *Journal of Neurochemistry*, **51**, 1441-1447.
- Creutzfeldt O (1974) Electrical Activity from Neuron to the EEG and EMG. In: *Handbook of Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, Volume 2. Edited by A. Remond. Amsterdam: Elsevier, pp. 26-55.
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL (1991) GABA_B Autoreceptors Regulate the Induction of LTP. *Nature*, **349**, 609-11.
- Deisz RA (1996a) Electrophysiology of GABA_B Receptors. In: *The GABA Receptors*. Edited by S. J. Enna and N. G. Bowery. Totowa, NJ: Humana Press Inc., pp. 157-207.
- Deisz RA (1996b) The Frequency Dependence of Cortical Inhibition is Mediated by GABA_B Receptors on Interneurones. *Pharmacology Reviews and Communications*, **8**, 117-120.
- Duman RS, Karbon EW, Harrington C, Enna SJ (1986) An Examination of the Involvement of Phospholipases A₂ and C in the α -Adrenergic and g-Aminobutyric Acid Receptor Modulation of Cyclic AMP Accumulation in Rat Brain Slices. *Journal of Neurochemistry*, **47**, 810.

- Frenk H, J. Engel J, Ackermann RF, Shavit Y, Liebeskind JC (1979) Endogenous Opioids May Mediate Postictal Behavioral Depression in Amygdaloid Kindled Rats. *Brain Res.*, **167**, 435-40.
- Froestl W, Mickel SJ, Sprecher Gv, Diel PJ, Hall RG, Maier L *et al.* (1995) Phosphinic Acid Analogues of GABA. 2. Selective, Orally Active GABA_B Antagonists. *J. Med. Chem.*, **38**, 3313-31.
- Ganong WF (1997) Přehled lékařské fyziologie. Translated by P. Mareš. Jinočany: H&H, pp. 158-66.
- Gloor P (1979) Generalized Epilepsy With Spike-And-Wave Discharge: a Reinterpretation of Its Electrographic and Clinical Manifestations. *Epilepsia*, **20**, 571-88.
- Grafstein B (1963) Postnatal Development of the Transcallosal Evoked Response in the Cerebral Cortex of the Cat. *J. Neurophysiol.*, **26**, 79-99.
- Hammond DL (2001) GABA_B Receptors: New Tricks by an Old Dog. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **1**, 26-30.
- Hosford DA, Clark S, Cao Z, Wilson WA, Lin F, Morrisett RA *et al.* (1992) The Role of GABA_B Receptor Activation in Absence Seizures of Lethargic (lh/lh) mice. *Science*, **257**, 398-401.
- Huguenard JR, McCormick DA, Coulter D (1995) Thalamocortical interactions. In: *The Cortical Neuron*. Edited by M. J. Gutnick and I. Mody. New York: Oxford University Press, pp. 156-73.
- Chowdhury SA, Kawashima T, Konoshi T, Niwa M, Matsunami Ki (1995) GABA_B Receptor Antagonist CGP 35348 Shortens Transcallosal Response Latency of Pyramidal Tract Neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **285**, 99-102.
- Chowdhury SA, Kawashima T, Konoshi T, Niwa M, Matsunami Ki (1996) Study of Paired-pulse Inhibition of Transcallosal Response in the Pyramidal Tract Neuron in Vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, **314**, 313-17.

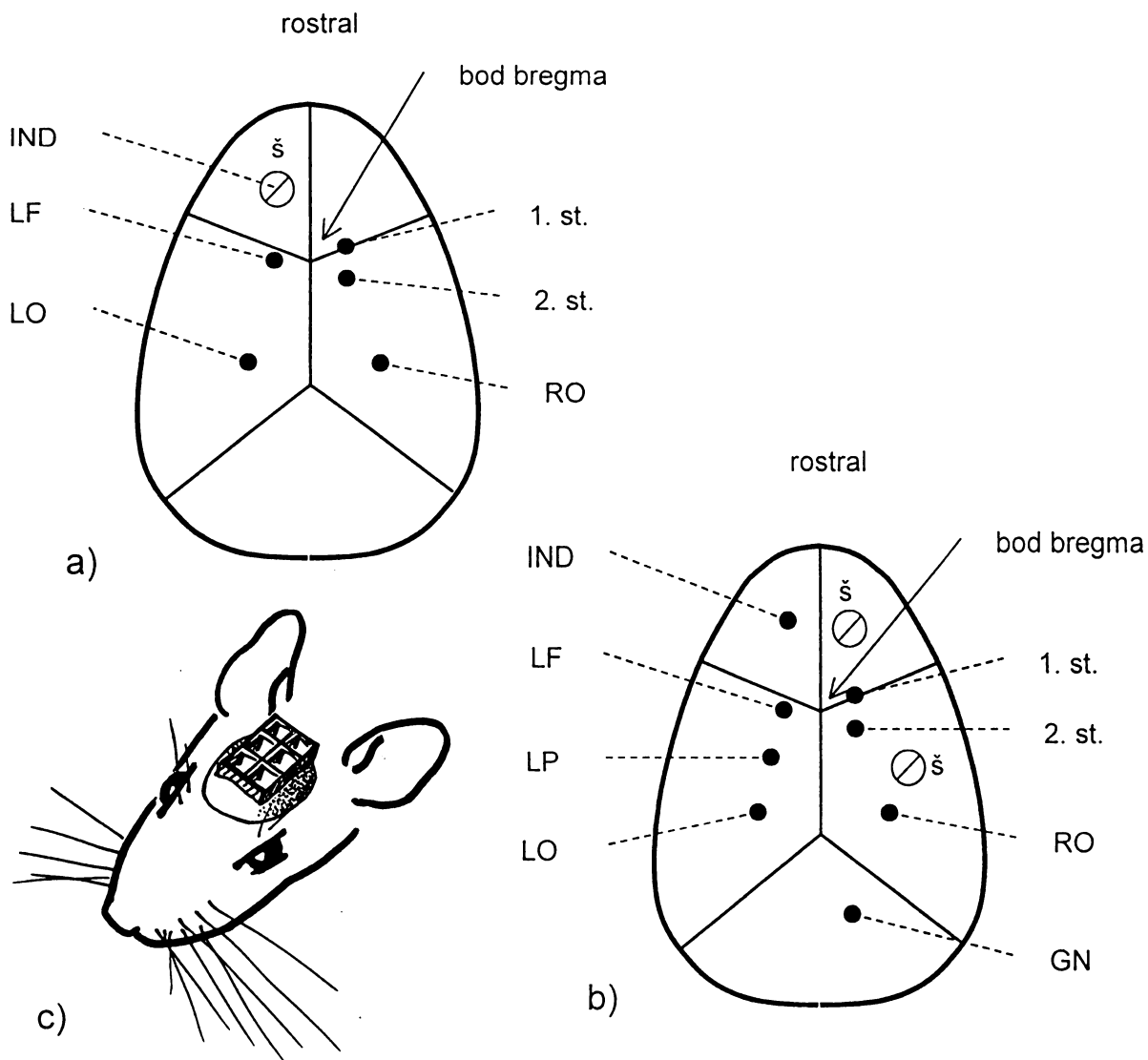
- Chu DCM, Albin RL, Young AB, Penney JB (1990) Distribution and kinetics of GABA_B binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*, **34**, 341-357.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M *et al.* (1998) GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature*, **396**, 674-679.
- Jones KA, Tamm JA, Craig DA, Yao WJ, Panico R (2000) Signal Transduction By GABA_B Receptor Heterodimers. *Neuropsychopharmacol.*, **23**, S41-S49.
- Karbon EW, Enna SJ (1985) Characterization of the Relationship Between g-Aminobutyric Acid B Agonists and Transmitter-coupled Cyclic Nucleotide-Generating Systems in Rat Brain. *Molecular Pharmacology*, **27**, 53-59.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ *et al.* (1997) Expression Cloning of GABA_B Receptors Uncovers Similarity to Metabotropic Glutamate Receptors. *Nature*, **386**, 239-246.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P *et al.* (1998) GABA_B-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, **396**, 683-687.
- Kerr DIB, Ong J (1995) GABA_B receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, **67**, 187-246.
- Koryntová H, Šlapal R, Langmeier M, Haugvicová R, Mareš P (1997) Effect of a Subconvulsant Dose of Kainic Acid on Afterdischarges Elicited by Cortical Stimulation in Rats. *Epilepsy Res.*, **29**, 25-33.
- Kostopoulos GK (2000) Spike-and-Wave Discharges of Absence Seizures As a Transformation of Sleep Spindles: the Continuing Development of a Hypothesis. *Clinical Neurophysiology*, **111**, S27-S38.

- Krosigk Mv, Bal T, McCormick DA (1993) Cellular Mechanisms of Synchronized Oscillation in the Thalamus. *Science*, **261**, 361-4.
- Kršek P, Haugvicová R, Mareš P (1998) Age-Dependent Phenytoin Effects on Cortical Stimulation in Rats. *Physiol. Res.*, **47**, 143-49.
- Kubová H, Lanštiaková M, Mocková M, Mareš P, Vorlíček J (1996) Pharmacology of Cortical Epileptic Afterdischarges in Rats. *Epilepsia*, **37**, 336-41.
- Kubová H, Mareš P (1992) Effects of Clonazepam on Paired Pulse and Frequency Potentiation of Evoked Potentials in Rats. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **317**, 5-15.
- Kubová H, Mocková M, Mareš P (1999) Midazolam Suppresses Spike-and-Wave Rhythm Accompanying Three Different Models of Epileptic Seizures. *Physiol. Res.*, **48**, 491-500.
- Kubová H, Világi I, Mikulecká A, Mareš P (1997) Non-NMDA receptor antagonist GYKI 52466 Suppresses Cortical Afterdischarges in Immature Rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **333**, 17-26.
- Kuner R, Köhr G, Grünwald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau H-C (1999) Role of Heteromer Formation in GABA_B Receptor Function. *Science*, **283**, 74-77.
- Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A (1992) Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg. *J. Neural Transm. Suppl.*, **35**, 37-69.
- Mareš J, Mareš P, Kadlecová-Jursíková D (1982) Changes in the Excitability of Rat Cerebral Cortex After a Self-Sustained After-Discharge. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, **53**, 283-88.
- Mareš J, Mareš P, Trojan S, Langmeier M (1981) *Cortical Self-Sustained After-Discharges in the Rat*. Prague: Universita Karlova.
- Mareš J, Marešová D (1998) Postiktální deprese u dvanáctidenních zvířat. *Československá fyziologie*, **47**, 67-73.

- Mareš P (1991) Epileptic Phenomena in the Immature Brain. *Physiological Research*, **40**, 577-84.
- Mareš P, Lanštiaková M, Vaňková S, Kubová H, Velíšek L (1992) Ketamine Blocks Cortical Epileptic Afterdischarges but not Paired-Pulse and Frequency Potentiation. *Neuroscience*, **50**, 339-44.
- Mareš P, Marešová D (1989) Excitability Cycles of Epileptic After-Discharges in Rats. *Physiol. bohemoslov.*, **38**, 55-61.
- Mareš P, Zouhar A (1988) Experimentální modely epileptických záchvatů. *Československá neurologie a neurochirurgie*, **51**, 353-356.
- Mott D (1996) The GABA_B receptor. In: *Cellular and Molecular Neurobiology*. Edited by C. Hammond. London: Academic Press Ltd., pp. 304-331.
- Mott DD, Lewis DV (1994) The Pharmacology and Function of Central GABA_B Receptors. *International Review of Neurobiology*, **36**, 97-223.
- Neckelmann D, Amzica F, Steriade M (1998) Spike-Wave Complexes and Fast Components of Cortically Generated Seizures. III. Synchronizing Mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, **80**, 1480-94.
- Nowack WJ, Johnson RN, Englander RN, Hanna GR (1979) Effect of Valproate and Ethosuximide on Thalamocortical Excitability. *Neurology*, **29**, 96-99.
- Ong J, Bexis S, Marino V, Parker DA, Kerr DI, Froestl W (2001) CGP 36216 Is a Selective Antagonist at GABA (B) Presynaptic Receptors in Rat Brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **415**, 191-5.
- Ong J, Kerr DIB, Bittiger H, Waldmeier PC, Baumann PA, Cooke NG *et al.* (1998) Morpholin-2-yl-phosphinic acids are potent GABA_B receptor antagonists in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, **362**, 27-34.
- Polášek R, Kubová H, Šlamberová R, Mareš P, Vorlíček J (1996) Suppression of Cortical Epileptic Afterdischarges in Developing Rats by Anticonvulsants Increasing GABAergic Inhibition. *Epilepsy Res.*, **25**, 177-84.

- Scanziani M, Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM (1992) Presynaptic Inhibition of Miniature Excitatory Synaptic Currents by Baclofen and Adenosine in the Hippocampus. *Neuron*, **9**, 919-927.
- Seabrook GR, Howson W, Lacey MG (1990) Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABA_B receptors on neurons in rat brain slices. ;*British Journal of Pharmacology*, **101**, 949-957.
- Servít Z (1983) *Epilepsie*. Praha: Avicenum.
- Steriade M, Amzica F (1994) Dynamic Coupling Among Neocortical Neurons During Evoked and Spontaneous Spike-Wave Seizure Activity. *Journal of Neurophysiology*, **72**, 2051-69.
- Steriade M, Amzica F, Neckelmann D, Timofeev I (1998a) Spike-Wave Complexes and Fast Components of Cortically Generated Seizures. I. Role of Neocortex and Thalamus. *J. Neurophysiol*, **80**, 1439-55.
- Steriade M, Amzica F, Neckelmann D, Timofeev I (1998b) Spike-Wave Complexes and Fast Components of Cortically Generated Seizures. II. Extra- and Intracellular Patterns. *J. Neurophysiol*, **80**, 1456-79.
- Tang W-J, Gilman AG (1992) Adenylyl Cyclases. *Cell*, **70**, 869-872.
- Velíšek L, Mareš P (1992) Differential Effects of Naloxone on Postictal Depression. *Epilepsy Res.*, **12**, 37-43.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH *et al.* (1998) Heterodimerization is required for the formation of functional GABA_B receptor. *Nature*, **396**, 679-682.
- Zilles K (1985) *The Cortex of the Rat, a Stereotaxic Atlas*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo.

9. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

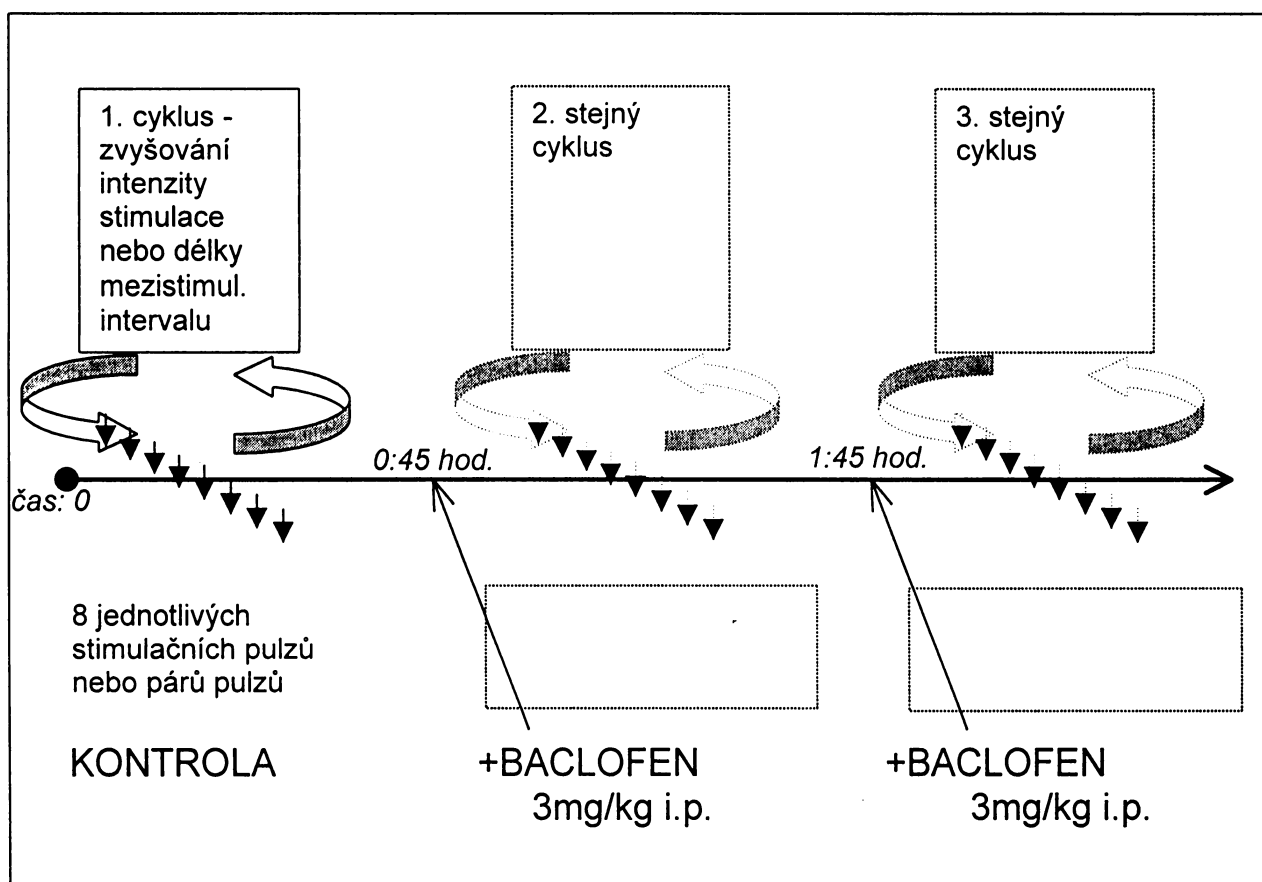


Obrázek 1. Schéma rozmístění implantovaných elektrod.

- a) jednodušší schéma použito v pokusech s cyklem excitability po následném výboji typu hrot-vlna
- b) složitější schéma použito v ostatních experimentech
- c) celkový pohled na hlavu s šestimístným konektorem

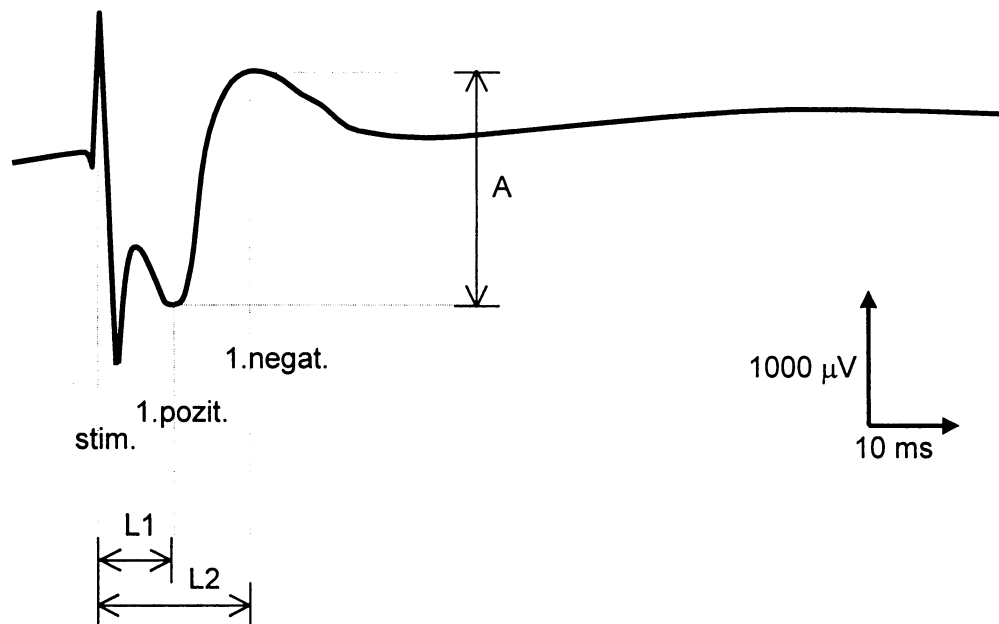
Pohled na lebku potkana je shora, rostrální směr vyznačen. Počátkem souřadnic je bod bregma (souřadnice převzaty z: Zilles, 1985)

elektrody: IND -indiferentní; LF -levá frontální; LP -levá parietální; LO -levá okcipitální; RO -pravá okcipitální; GN -zemnicí; 1.st., 2.st. -stimulační
 š -fixační šroubek, v a) použit zároveň jako indiferentní elektroda



Obrázek 2. Schéma pokusů s evokovanými potenciály.

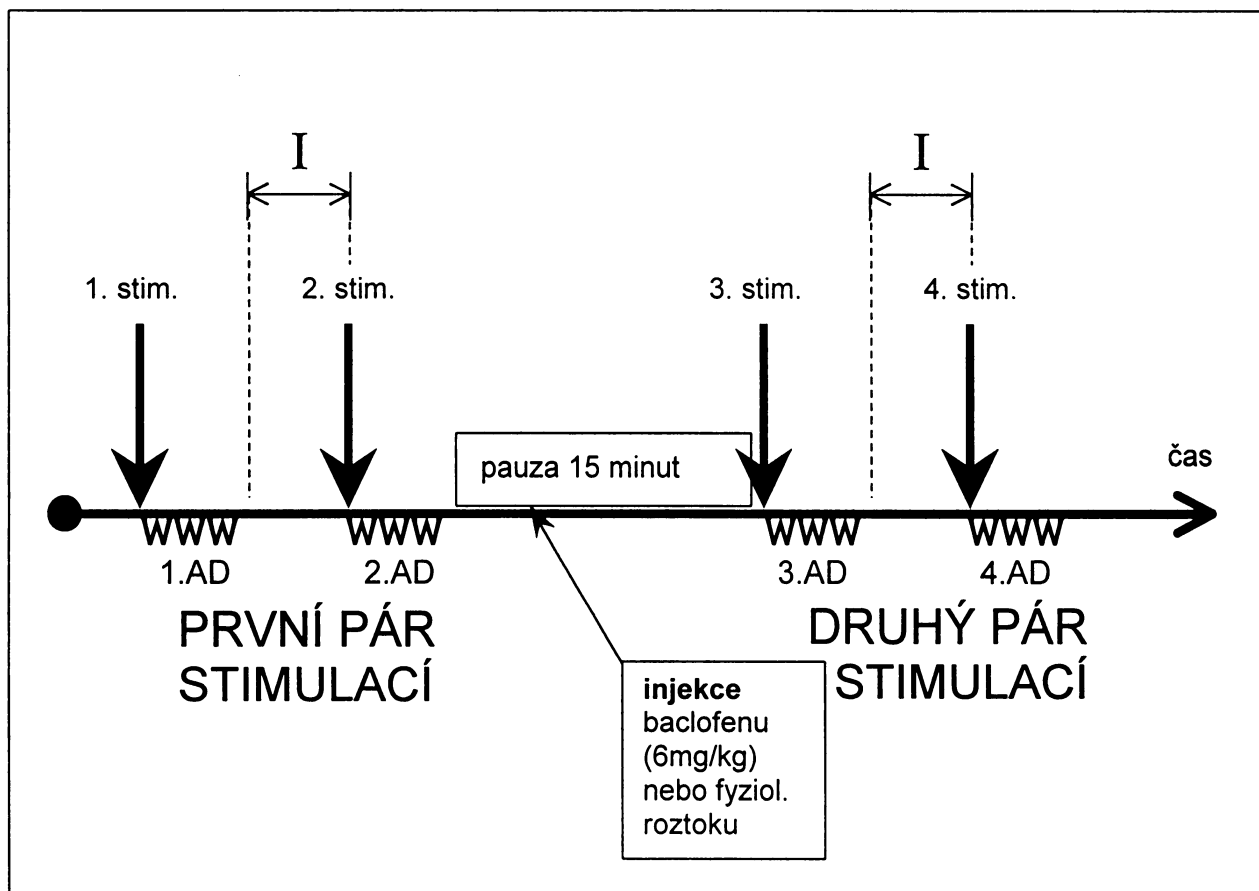
Schéma je společné pro všechny pokusy, tj. jak pro stimulace jednotlivými pulzy při hledání závislosti parametrů evokovaného potenciálu na intenzitě stimulace, tak pro stimulace párovými pulzy. Každé zvíře prodělalo 3 stejné po sobě následující cykly stimulací mezi nimiž bylo farmakologicky ovlivněno. Jedna obrátka cyklu znamená 8 jednotlivých resp. párových pulzů, v následující obrátce se mění sledovaný parametr stimulace -intenzita resp. délka mezistimulačního intervalu.



Obrázek 3. Schéma typického transkalozálního evokovaného potenciálu.

Evokovaný potenciál je vyvolán stimulací kontralaterální sensorimotorické kůry potkana bipolárním elektrickým pulzem.

- stim. -stimulační artefakt
- 1. pozit. -první pozitivní vlna
- 1. negat. -první negativní vlna
- A -amplituda
- L1 -latence první pozitivní vlny
- L2 -latence první negativní vlny



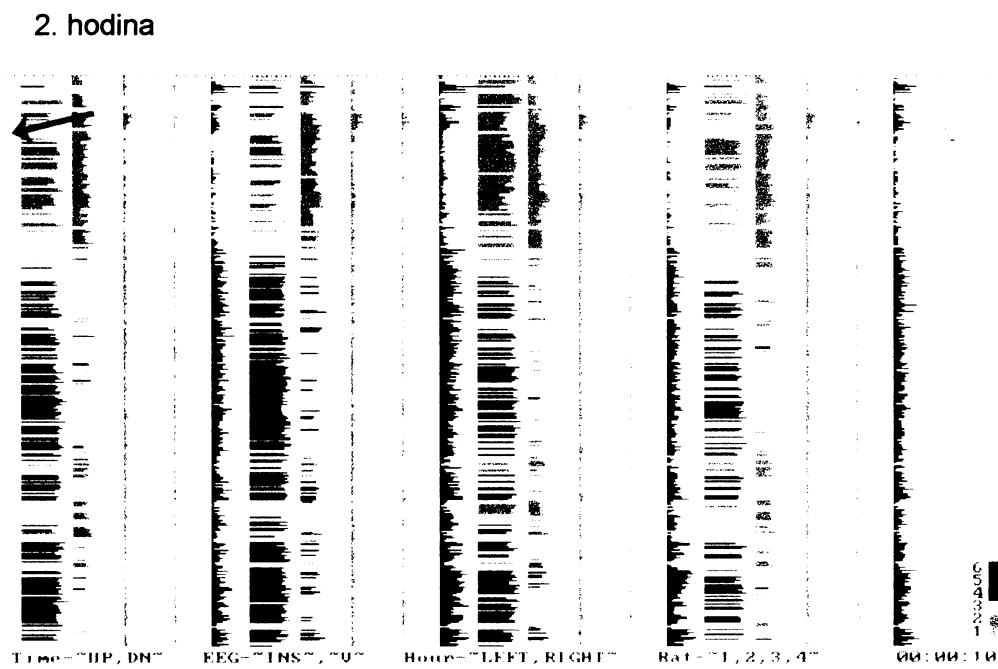
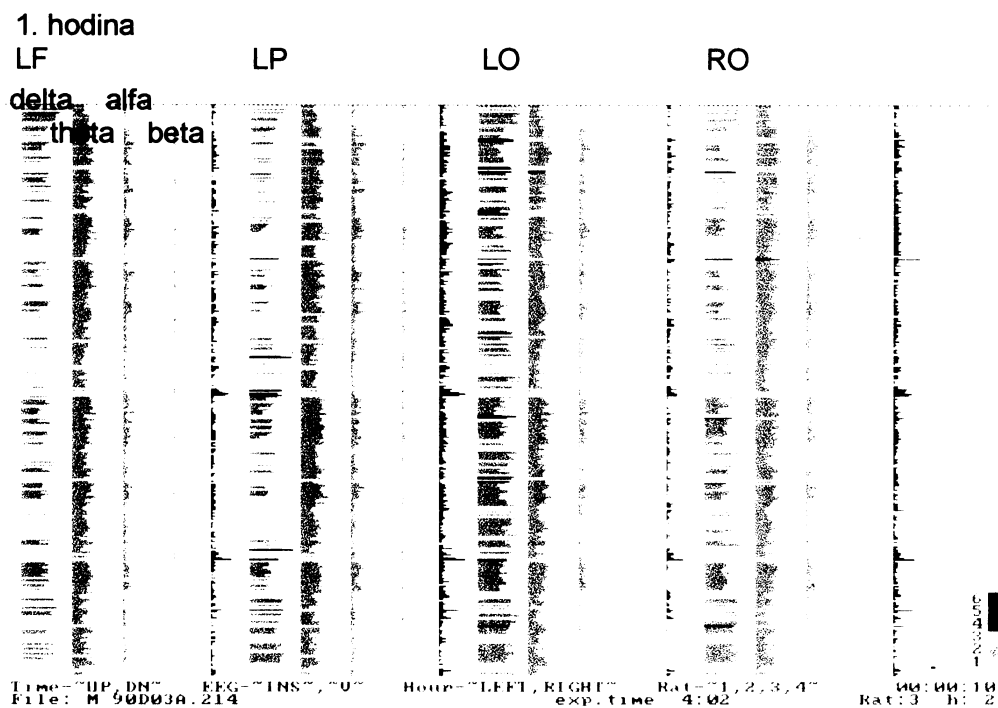
Obrázek 4. Schéma pokusu s cyklem excitability.

Schéma jednoho experimentálního sezení během něhož je zvíře 4x stimulováno (8Hz / 15s). Intenzita stimulačního proudu je stanovena v přípravném sezení tak, aby byl vyvolán následný výboj typu hrot-vlna. Injekce baclofenu nebo fyziologického roztoku je aplikována v 5. minutě mezipárového 15 minut dlouhého intervalu. Všechny intervaly se měří od okamžiku skončení následného výboje.

stim. -stimulace

AD -následný výboj (after-discharge) typu hrot-vlna

I -vnitropárový mezistimulační interval; 2, 3, 5,10 nebo 20 minut, v obou párech stejný



Obrázek 5. Příklad analýzy spontánního ECoG.

3. hodina

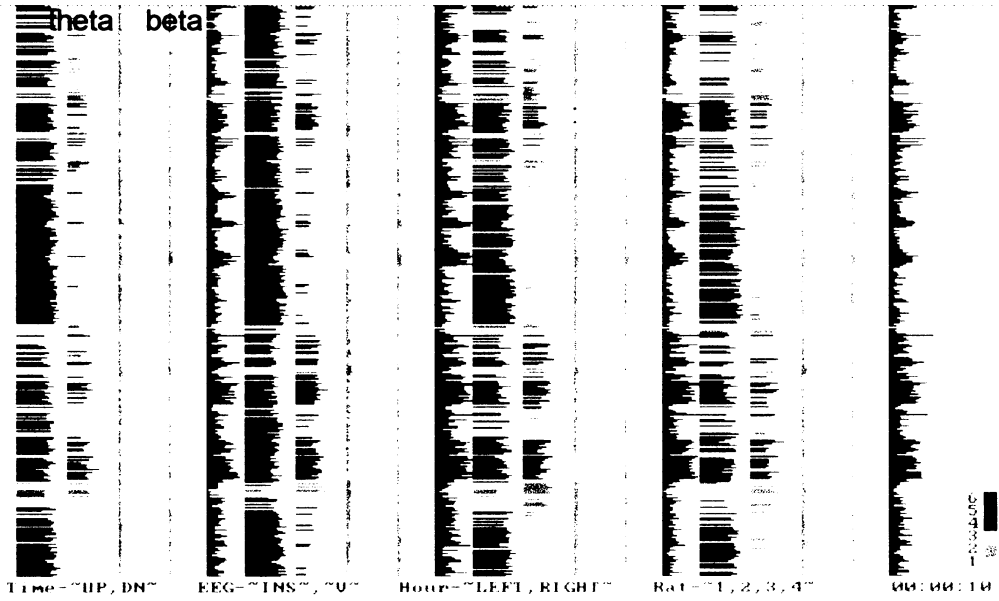
LF

LP

LO

RO

delta alfa

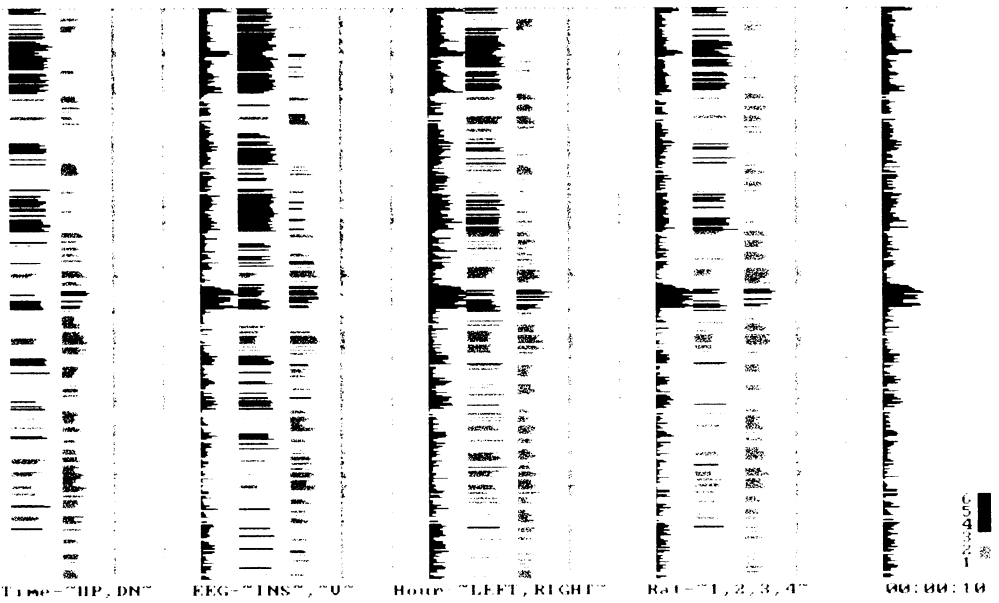


File: M 90D03A.214

exp.time 4:02

Rat:3 h: 4

4. hodina



Obrázek 5. (pokr.)

Obrázek 5. Příklad analýzy spontánního ECoG.

Analýza čtyřhodinového záznamu zvířete č. 3.

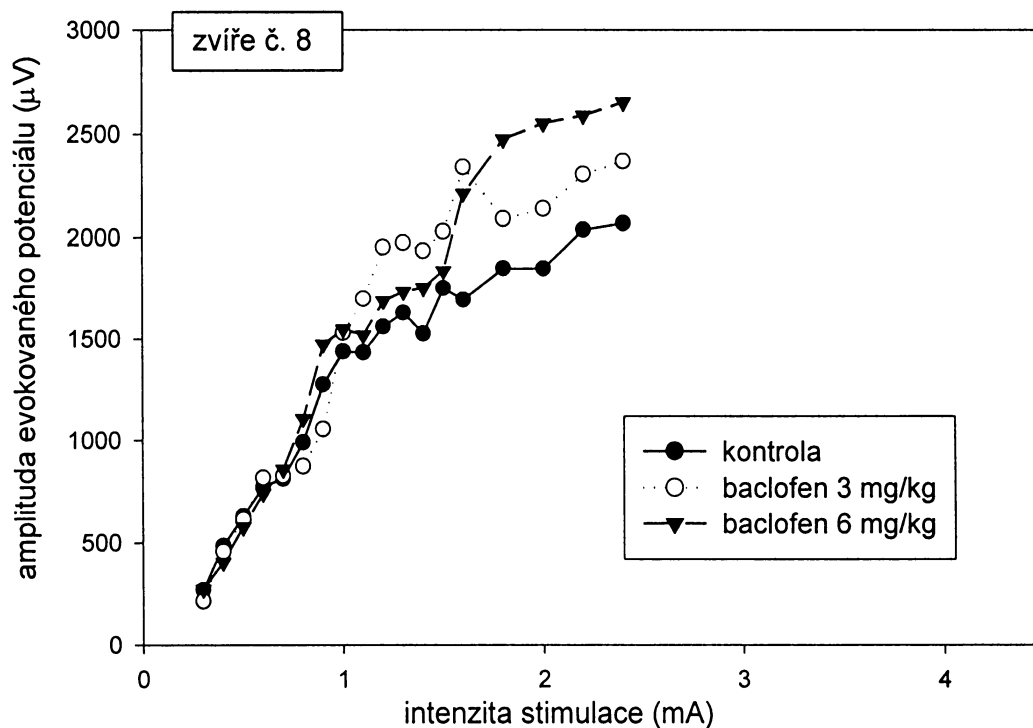
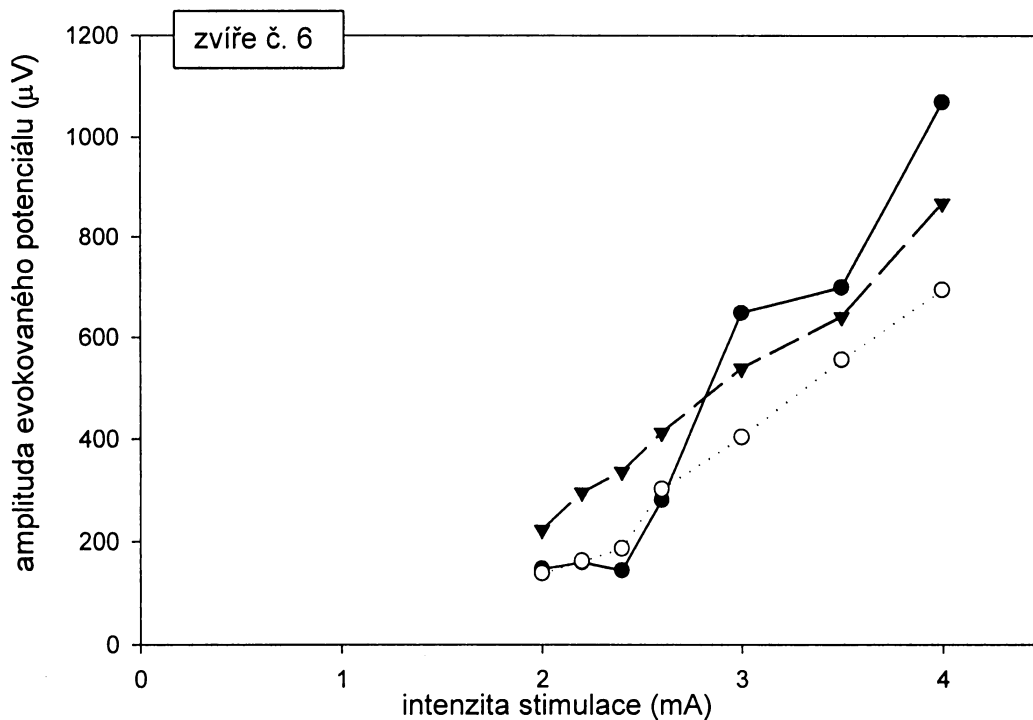
1. hodina -kontrolní ECoG
2. hodina -injekce baclofenu (6 mg/kg i.p.) v čase 1:06 (vyznačeno šipkou); přibližně v čase 1:15 - 1:20 patrné zvýšení četnosti i amplitudy delta vln a amplitudy theta vln, současně pokles četnosti alfa vln
3. hodina -změny ECoG maximálně vyjádřeny
4. hodina -návrat k původnímu charakteru ECoG během druhé poloviny 4. hodiny

LF, LP, LO, RO: monopolární svody z levé frontální, parietální, okcipitální a pravé okcipitální elektrody; v každém svodu postupně vyhodnoceny delta, theta, alfa a beta vlny (červeně četnost "ostrých vln")

čas: shora dolů; po levé straně měřítko, 1 dílek = 5 minut

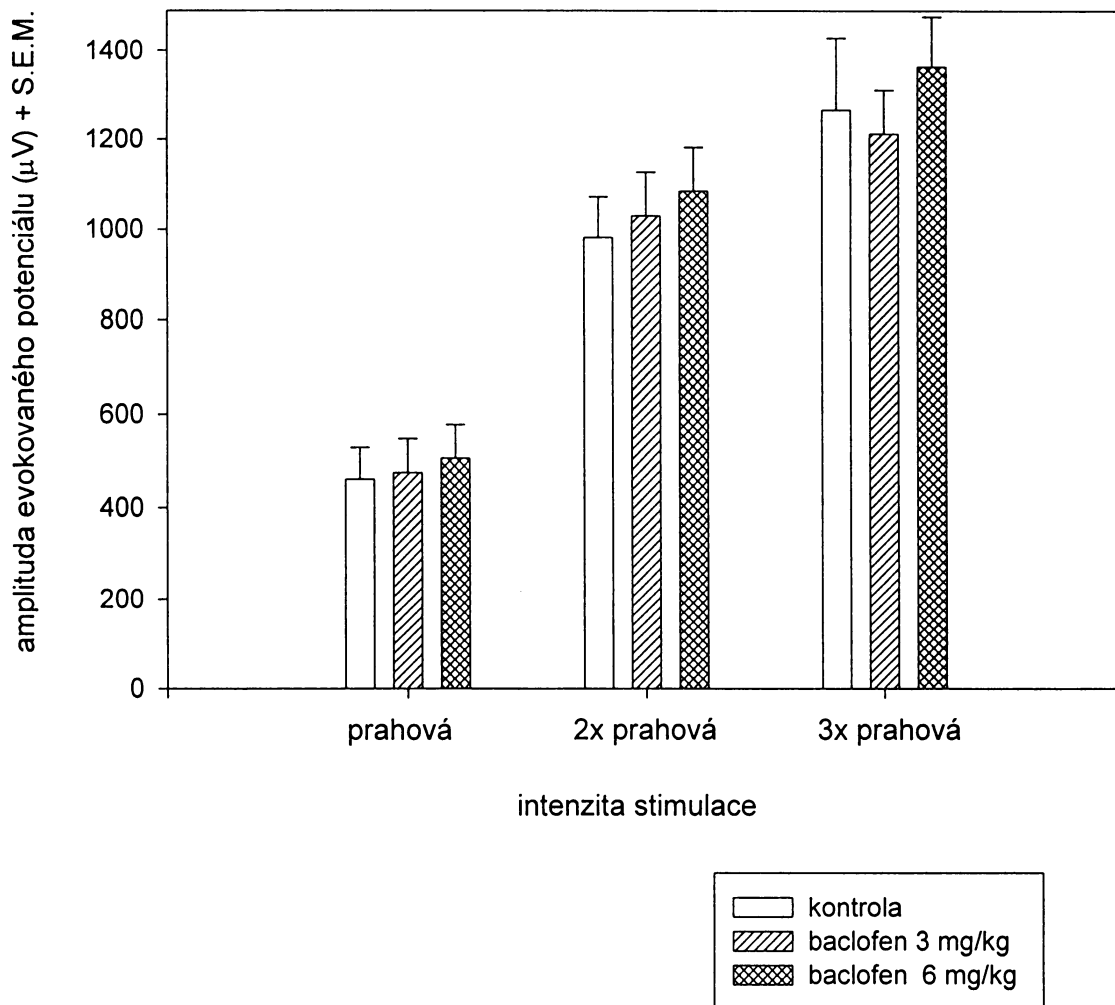
analýza: každých 10 sekund ECoG je reprezentováno vodorovnou čárkou ve všech částech spektra, její délka odpovídá relativní četnosti a barva amplitudě příslušného rytmu; barevná stupnice vpravo dole

6 (červená):	více než 500 μ V
5 (tmavě zelená):	400-500 μ V
4 (tmavě modrá):	300-400 μ V
3 (žlutá):	200-300 μ V
2 (světle zelená):	100-200 μ V
1 (světle modrá):	méně než 100 μ V



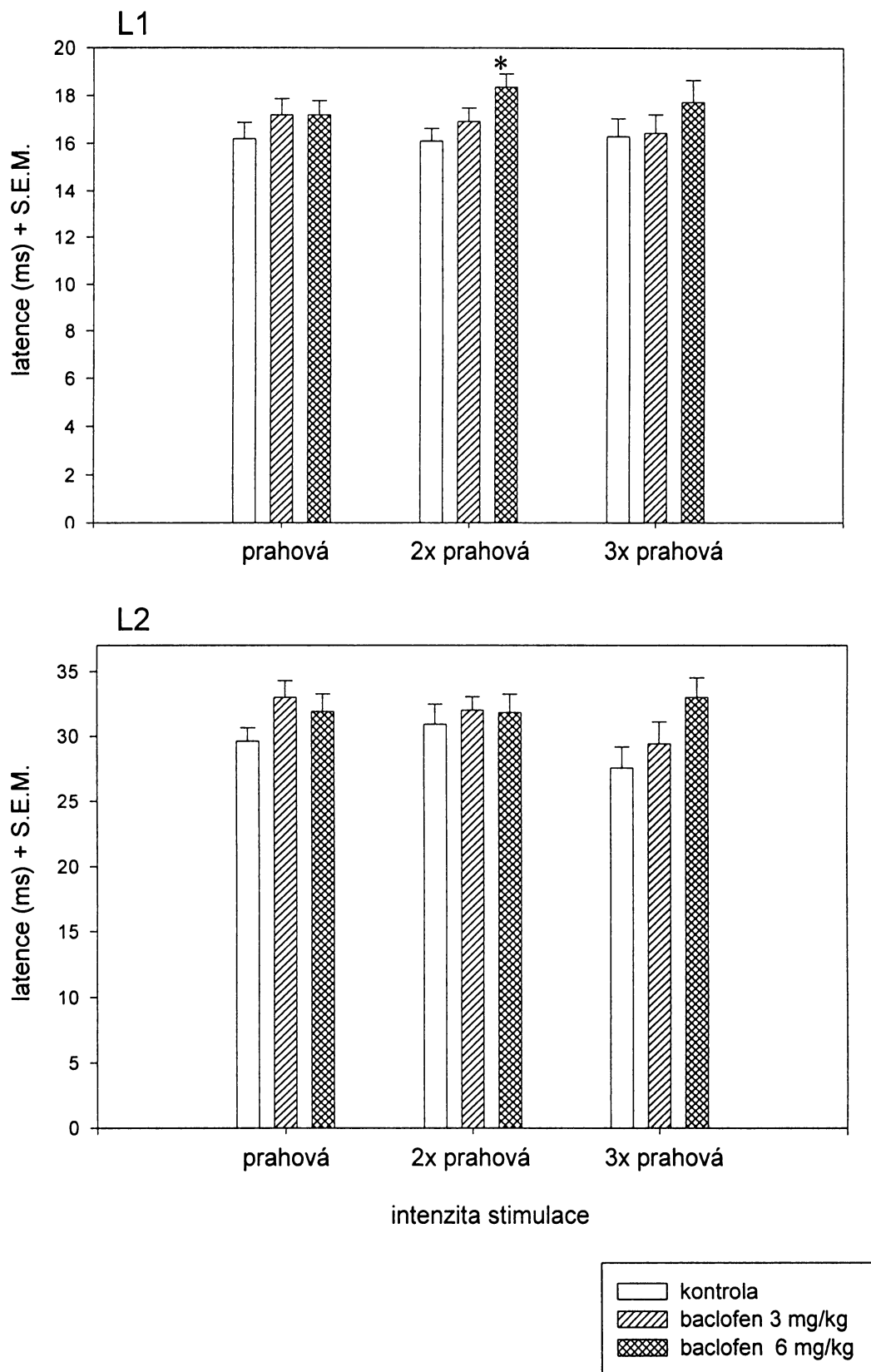
Obrázek 6. Závislost amplitudy evokovaného potenciálu na intenzitě stimulačního proudu. Ukázka dvou zvířat.

Ukázka zvířat č. 6 a 8 dokumentuje rozdíly v charakteru závislosti: u zvířete č. 6 spíše lineární typ závislosti, prahová hodnota intenzity stimulace vyvolávající bifázický typ evokovaného potenciálu je 2 mA, zvíře č. 8 vykazuje spíše "saturační" typ závislosti, prahová hodnota intenzity stimulace je 0.3 mA.



Obrázek 7. Vliv baclofenu na amplitudu evokovaných potenciálů při různých intenzitách stimulačního proudu.

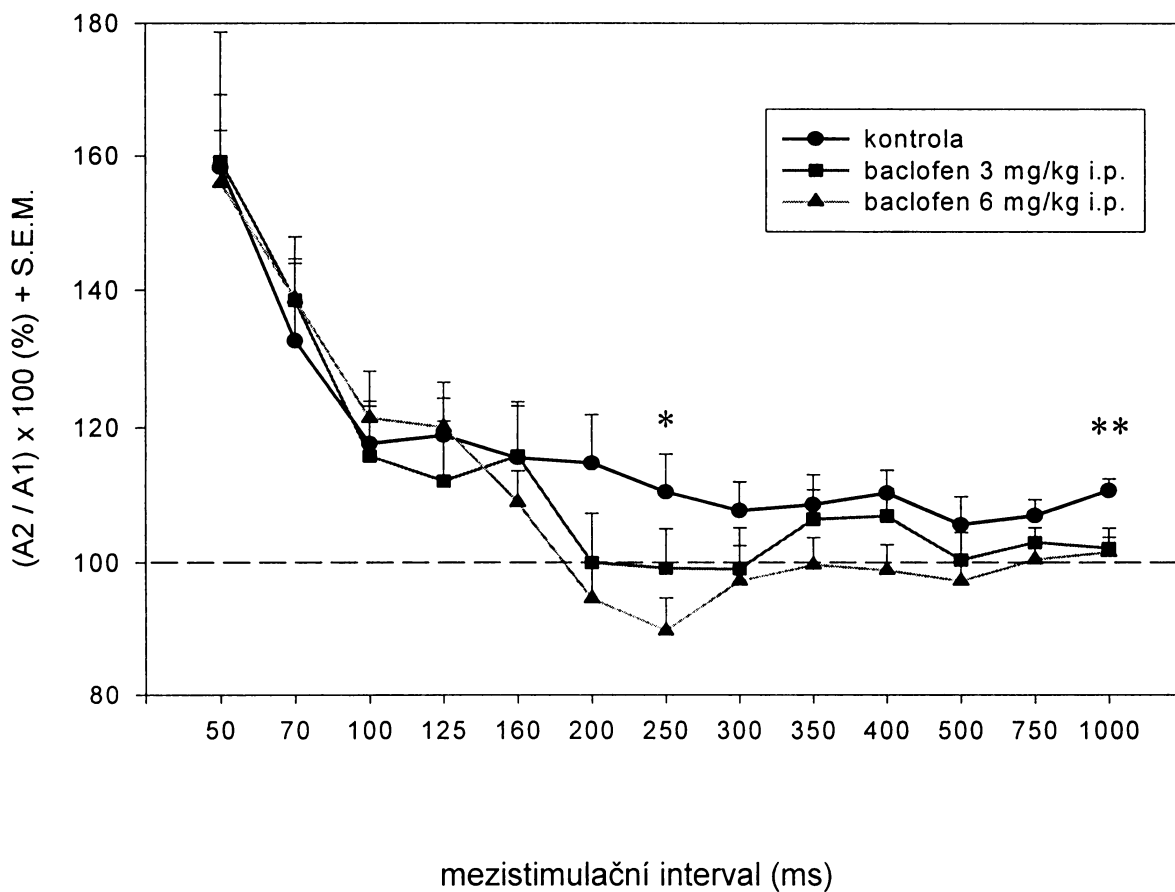
Vliv baclofenu nedosáhl hladiny statistické významnosti při žádné intenzitě stimulace.
 použité intenzity stimulačního proudu: prahová pro vyvolání bifázického evokovaného potenciálu, dvoj- a trojnásobek prahové hodnoty
 počet zvířat: n=11 (první dvě stimulační intenzity)
 n=8 (nejvyšší stimulační intenzita)



Obrázek 8. Vliv baclofenu na latence 1. pozitivní a 1. negativní vlny evokovaného potenciálu.

L1 -latence první pozitivní vlny; L2 -latence první negativní vlny
 použité intenzity stimulačního proudu: prahová pro vyvolání bifázického evokovaného potenciálu, dvoj- a trojnásobek prahové hodnoty
 počet zvířat viz. obr. 7

* statisticky významný rozdíl proti kontrole (analýza rozptylu s následným Tukeyho testem; $p=0.020$; $n=11$)

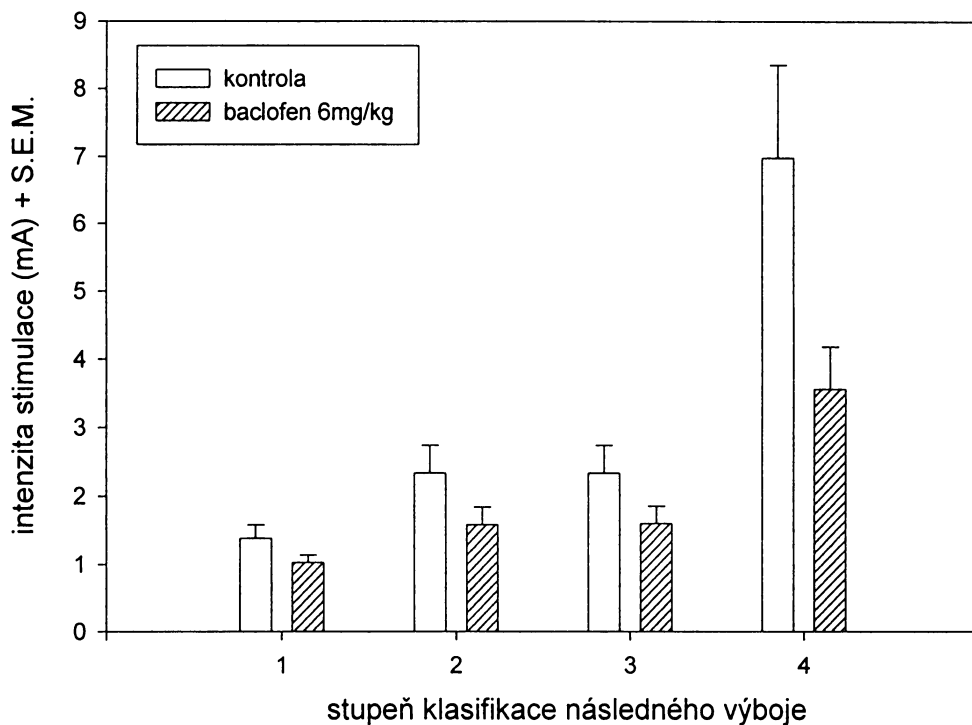


Obrázek 9. Párové stimulační- vliv baclofenu na relativní velikost amplitudy druhého evokovaného potenciálu při jednotlivých mezistimulačních intervalech.

svislá osa: A1 -amplituda prvního evokovaného potenciálu; A2 -amplituda druhého evokovaného potenciálu
počet zvířat: n=11

* rozdíl mezi kontrolou a baclofenem ve vyšší dávce (6 mg/kg; analýza rozptylu s následným Tukeyho testem; p=0.038)

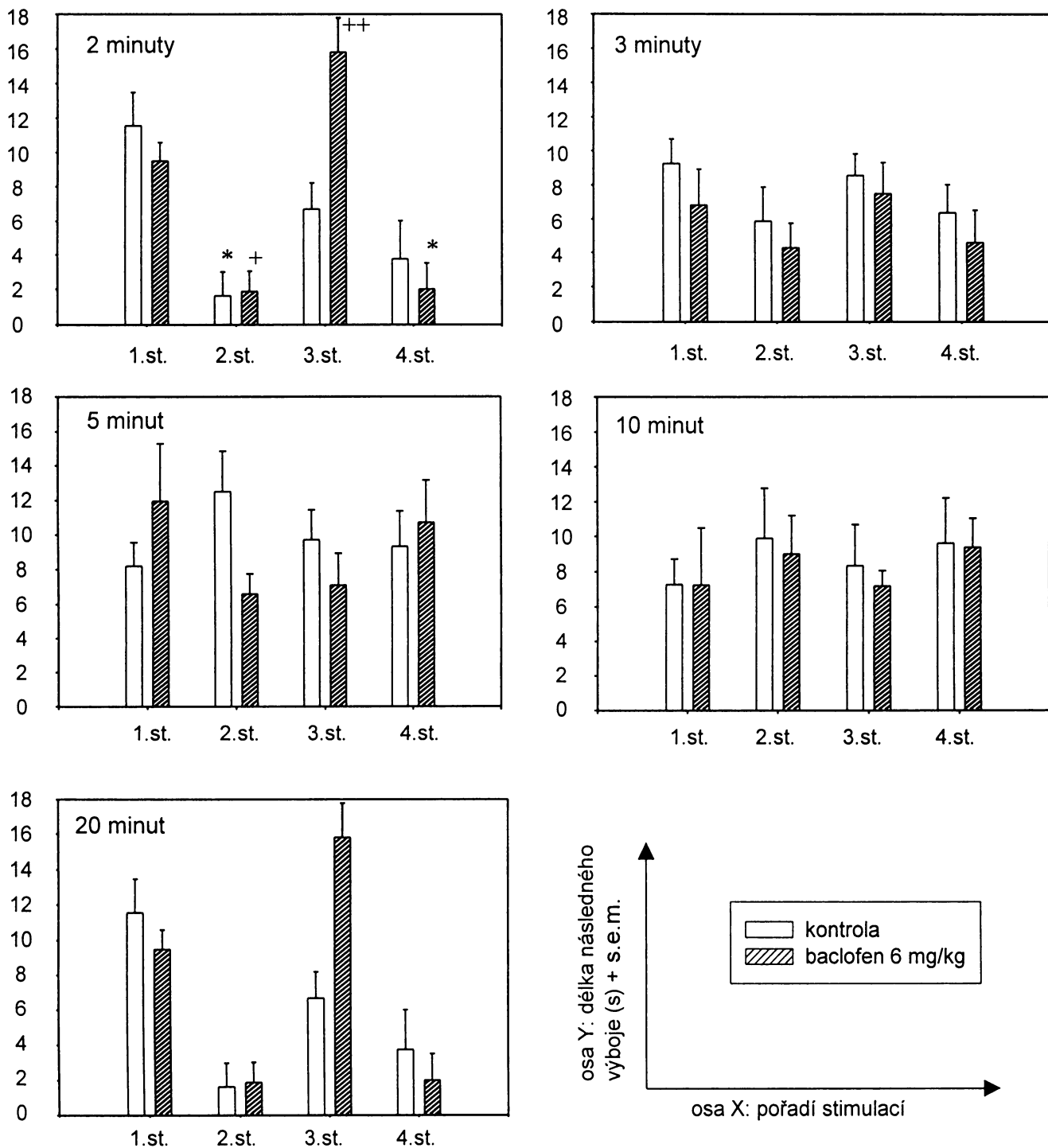
** rozdíl kontroly od obou dávek baclofenu (stejně testy; p=0.006)



Obrázek 10. Stimulační prahy pro následné výboje.

Prahové hodnoty intenzity stimulačního proudu vyvolávající následné výboje, které byly klasifikované stupněm 1 až 4. Klasifikace: 1 -během stimulace rytmické motorické projevy; 2 -následný ECoG výboj typu hrot-vlna; 3 -následný výboj typu hrot-vlna doprovázený motorickou složkou; 4 -následný výboj smíšeného typu

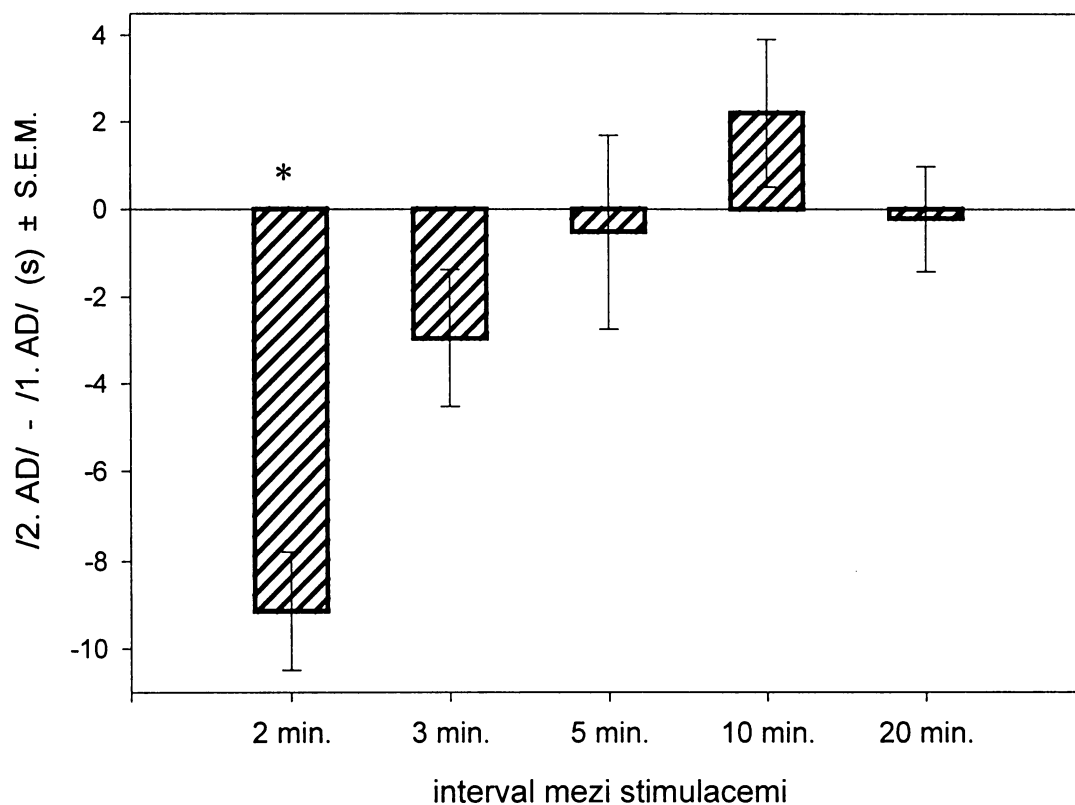
Rozdíly mezi kontrolou (n=10) a baclofenem (6 mg/kg; n=8) nedosáhly statistické významnosti.



Obrázek 11. Přehled trvání následných výbojů při jednotlivých mezistimulačních intervalech.

počty zvířat viz. tab. 7

- * -rozdíl mezi prvním a druhým následným výbojem daného páru (analýza rozptylu s následným Tukeyho testem: $p < 0.001$)
- + -délka prvního a druhého následného výboje se liší jen při srovnání párovým t-testem ($p < 0.001$)
- ++ -třetí následný výboj u ovlivněných zvířat se při srovnání párovým t-testem liší od prvního ($p = 0.012$) a také od třetího následného výboje u zvířat kontrolních (t-test; $p = 0.003$)



Obrázek 12. Cyklus excitability po následném výboji typu hrot-vlna.

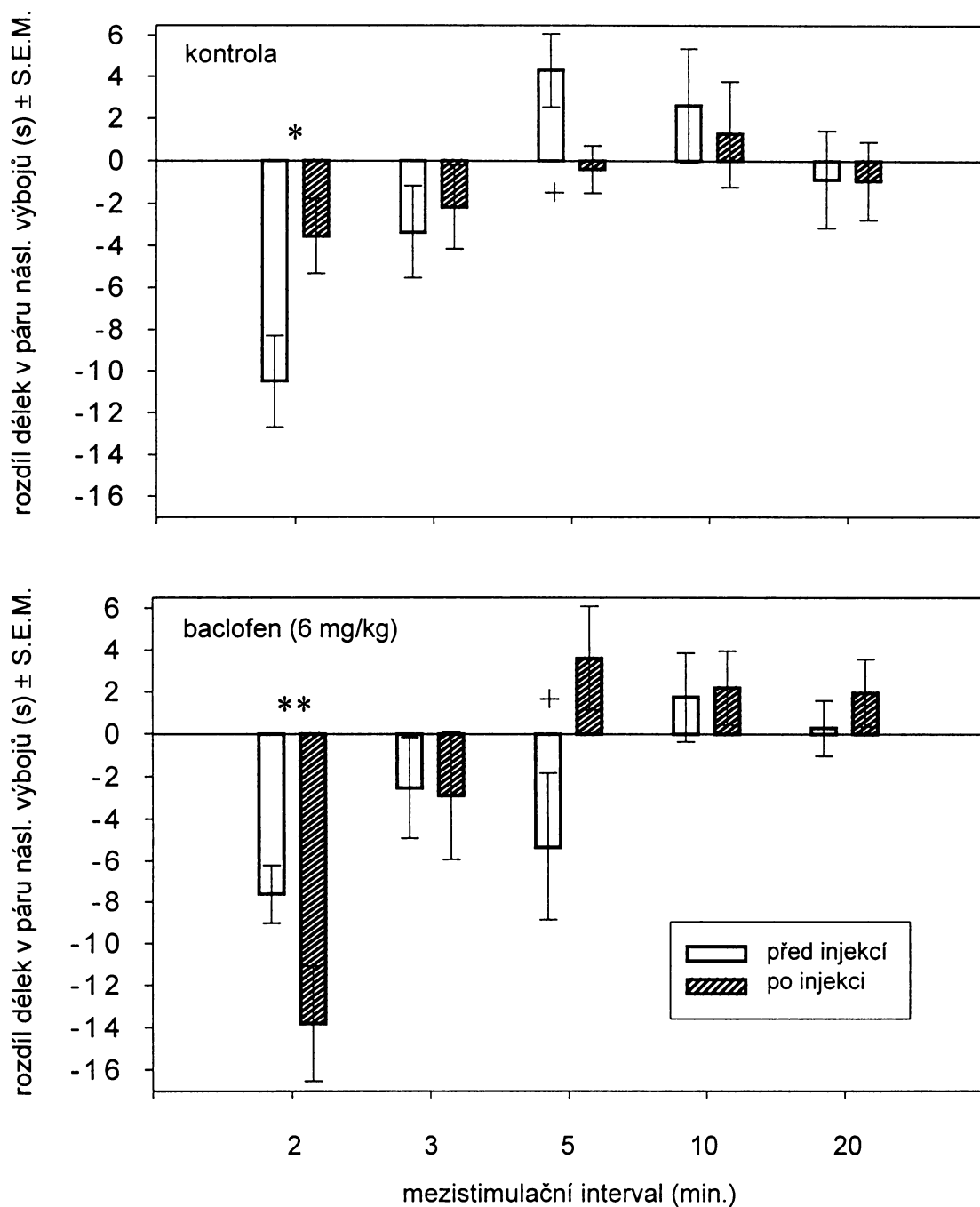
Znázorněn je rozdíl délky následných výbojů (v sekundách) při prvním páru stimulací (1. a 2. následný výboj). Protože injekce farmaka nebo fyziologického roztoku byla podávána až po prvním páru stimulací, jsou v tomto grafu zahrnuty obě skupiny zvířat.

svislá osa:

/1.AD/ -délka trvání 1. následného výboje

/2.AD/ -délka trvání 2. následného výboje

* -statisticky významný rozdíl mezi /1.AD/ a /2.AD/ (párový t-test; $p < 0.001$; $n = 15$)



Obrázek 13. Vliv baclofenu na cyklus excitability.

Injekce baclofenu byla podána mezi prvním a druhým párem stimulačí, kontrolní zvířata dostala injekci fyziologického roztoku. Svislá osa: rozdíl délky trvání 1. a 2. (před injekcí) resp. 3. a 4. (po injekci) následného výboje; sloupečky směřující vzhůru znamenají, že ve sledovaném páru byl druhý následný výboj delší než první, analogicky sloupečky směřující dolů znamenají jeho zkrácení.

* -rozdíl mezi prvním a druhým párem stimulačí (párový t-test; $p=0.039$; $n=8$)

** -rozdíl mezi prvním a druhým párem stimulačí (stejný test; $p=0.041$; $n=7$)

+ -u 5-ti minutového intervalu nalezen rozdíl mezi kontrolní a ovlivněnou skupinou již při prvním páru stimulačí, tedy před injekcí (t-test; $p=0.025$; $n=10+10$)

Tabulka 1. Amplituda evokovaného potenciálu.

	intenzita stimulace		
	prahová	2 x prahová	3 x prahová
kontrola	460,5 ± 67,5	981,8 ± 89,4	1266,7 ± 160,7
baclofen 3 mg/kg	474,8 ± 72,6	1029,1 ± 97,3	1212,1 ± 98,7
baclofen 6 mg/kg	505,0 ± 72,5	1083,8 ± 98,3	1363,4 ± 112,7

Amplituda (průměr + S.E.M.) je vyjádřena v μV ; průměry z 11 (obě nižší intenzity) resp. 8 (nejvyšší intenzita) zvířat .

Tabulka 2. Latence první pozitivní vlny evokovaného potenciálu.

	intenzita stimulace		
	prahová	2 x prahová	3 x prahová
kontrola	16,2 ± 0,7	16,1 ± 0,5	15,3 ± 0,7
baclofen 3 mg/kg	17,2 ± 0,7	16,9 ± 0,6	16,4 ± 0,8
baclofen 6 mg/kg	17,2 ± 0,6	18,4 ± 0,5	17,7 ± 0,9

Latence (průměr + S.E.M.) je vyjádřena v ms; průměry z 11 (obě nižší intenzity) resp. 8 (nejvyšší intenzita) zvířat

* -statisticky významný rozdíl proti kontrole (ANOVA s následným Tukeyho testem; $p=0.020$)

Tabulka 3. Latence první negativní vlny evokovaného potenciálu.

	intenzita stimulace		
	prahová	2 x prahová	3 x prahová
kontrola	29,6 ± 1,0	30,9 ± 1,6	27,6 ± 1,6
baclofen 3 mg/kg	33,0 ± 1,3	32,0 ± 1,0	29,4 ± 1,7
baclofen 6 mg/kg	31,9 ± 1,4	31,8 ± 1,4	33,0 ± 1,5

Latence (průměr + S.E.M.) je vyjádřena v ms; průměry z 11 (obě nižší intenzity) resp. 8 (nejvyšší intenzita) zvířat.

Tabulka 4. Relativní velikost amplitudy druhého evokovaného potenciálu (A2) vzhledem k amplitudě prvního evokovaného potenciálu (A1).

mezistimulační interval (ms)	kontrola	baclofen 3 mg/kg	baclofen 6 mg/kg
50	158,2 ± 20,5	159,1 ± 10,2	155,8 ± 8,0
70	162,7 ± 11,2	168,5 ± 9,2	166,7 ± 5,9
100	147,6 ± 6,3	145,8 ± 7,2	141,4 ± 6,9
125	148,8 ± 7,8	142,1 ± 8,9	120,0 ± 4,3
160	145,5 ± 7,7	145,8 ± 8,0	108,9 ± 4,7
200	144,7 ± 7,2	99,9 ± 7,4	94,5 ± 5,2
250	140,4 ± 5,7	99,1 ± 6,0	89,6 ± 5,0
300	107,7 ± 4,2	99,0 ± 6,2	97,1 ± 5,4
350	108,6 ± 4,5	106,5 ± 4,3	99,6 ± 4,2
400	110,3 ± 6,4	107,0 ± 4,0	98,8 ± 3,9
500	105,7 ± 4,1	100,4 ± 4,2	97,1 ± 2,9
750	107,0 ± 2,3	103,0 ± 2,3	100,4 ± 3,0
1000	110,6 ± 1,7	102,1 ± 3,1	101,5 ± 2,3

Párová stimulace. Relativní velikost amplitudy je vypočtena podle vzorce: $[(A2)/(A1)] \times 100 \% + S.E.M.$; průměry z 11 zvířat.

* -statisticky významný rozdíl od kontroly (ANOVA s následným Tukeyho testem; $p=0.038$)

** -statisticky významný rozdíl od kontroly (stejně testy; $p=0.006$)

Tabulka 5. Prahové hodnoty stimulace pro následné výboje.

stupeň klasifikace následného výboje	kontrola	baclofen 6 mg/kg
1. (pohyby při stimulaci)	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1
2. (následný výboj SW)	2,3 ± 0,4	1,6 ± 0,3
3. (klonické křeče)	2,3 ± 0,4	1,6 ± 0,3
4. (smíšený následný výboj)	7,0 ± 1,4	3,6 ± 0,6

Hodnoty stimulačního proudu vyvolávající jednotlivé typy následných výbojů jsou vyjádřeny v mA; průměr z 10 (kontrola) a 8 (baclofen) zvířat + S.E.M.

Tabulka 6. Trvání následných výbojů.

kontrola

mezistimulační interval	pořadí následných výbojů							
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
2 minuty	11,6*	19	16*	14*	6,7*	15	3,8*	2,3
3 minuty	9,2*	16	5,9*	2,0	8,5*	13	6,4*	4,7
5 minut	8,2*	13	12,5*	2,3	9,7*	7	9,3*	2,1
10 minut	7,3*	14	9,9*	2,9	8,3*	2,3	9,6*	2,6
20 minut	8,0*	19	7,1*	2,3	6,7*	1,1	5,8*	1,8

**baclofen
(6 mg/kg)**

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
2 minuty	9,5*	1,1	1,9*	1,2#	15,8*	2,0*	2,0*	1,5**
3 minuty	6,8*	2,1	4,3*	1,6	7,5*	1,8	4,6*	1,9
5 minut	12,0*	3,3	6,6*	1,2	7,1*	1,8	10,7*	2,5
10 minut	7,3*	3,2	9,0*	2,2	7,2*	0,9	9,4*	1,7
20 minut	4,7*	1,2	5,0*	0,8	5,8*	1,1	8,7*	1,7

Trvání následných výbojů je vyjádřeno v sekundách (průměr + S.E.M.); počty experimentálních sezení, z nichž byly průměry počítány, uvádí tab. 7.

- * -statisticky významný rozdíl od 1.následného výboje (ANOVA s následným Tukeyho testem; $p < 0.001$)
- ** -statisticky významný rozdíl od 3.následného výboje (stejně testy; $p < 0.001$)
- # -statisticky významný rozdíl od 1.následného výboje jen při srovnání párovým t-testem ($p < 0.001$)
- ♣ -při srovnání párovým t-testem rozdíl od 1. následného výboje ($p = 0.0012$) i od třetího následného výboje kontrolních zvířat (t-test; $p = 0.003$)

Tabulka 7. Počet experimentálních sezení v pokusu s cyklem excitability následných výbojů.

	mezistimulační interval				
	2 min.	3 min.	5 min.	10 min.	20 min.
kontrola					
použitá	8	11	10	9	7
nepoužitá	3	0	1	4	2
celkem	11	11	11	13	9
podíl nepoužitých (%)	27,3	0,0	9,1	30,8	22,2
baclofen					
použitá	7	11	10	8	10
nepoužitá	5	0	1	3	1
celkem	12	11	11	11	11
podíl nepoužitých (%)	41,7	0,0	9,1	27,3	9,1

Počet experimentálních sezení neodpovídá skutečnému množství pokusných zvířat, každé zvíře bylo podrobeno více sezením (průměrně čtyřem, maximálně však pěti, vždy s jiným mezistimulačním intervalem).

použitá -sezení použitá pro statistické zpracování
nepoužitá -sezení nepoužitá pro statistické zpracování protože se při nich nepodařilo při 3. stimulaci vyvolat následný výboj

Oprava:

strana	špatně	správně
str.2, předposlední ř. str. 3, 9. ř., str. 9, 4. ř. a str. 35, 14. ř.	Zacházení	Zacházení
str. 6, 9. ř.	diethoxymethylfosforitá <i>mechanismy</i>	diethoxymethylfosforečná <i>mechanizmy</i>
str. 8, 6. ř. 20. ř.	spjatý z trimerními před slovem "presynaptického" chybí slovo "činností"	spjatý s trimerními
str. 9, 25. ř.	sprostředkován	zprostředkován
str. 10, 25. ř.	dokaží	dokáží
str. 13, 13. ř.	zúčastněných	zúčastněných
str. 24, 2. ř.	<i>norwegicus</i>	<i>norvegicus</i>
str. 28, 16. ř.	osmi	osmi
str. 32, 3. ř.	tab 1, 2 a 3	tab. 1, 2 a 3

Na str. 30 chybí citace této práce: Racine R.J (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, **32**, 281-294.

V celé práci je použito anglického přepisu slova "baclofen" namísto českého "baklofen" (podobně "bicucullin" namísto "bikukulin"). Ionty uvedené jako Ca²⁺, K⁺ a Cl⁻ by pak měli správně vytištěny vypadat: Ca²⁺, K⁺, Cl⁻.

Za chyby se čtenářům omlouvám.

J.L.