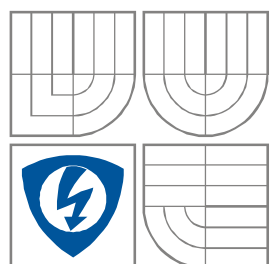




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

MIKROSTIMULÁTOR

MICROSTIMULATOR

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. Marie Tobolová

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

doc. Ing. Milan Chmelař, CSc.

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor

Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Studentka: Bc. Marie Tobolová

ID: 106104

Ročník: 2

Akademický rok: 2011/2012

NÁZEV TÉMATU:

Mikrostimulátor

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Prostudujte účinky elektrických stimulačních impulzů na živou tkáň. Zaměřte se na problematiku jejich tvaru hledisko kumulativního účinku podprahových impulzů. Dále prostudujte mikrostimulaci s použitím vysokonapěťových impulzů. 2) Na základě rozboru navrhnete blokové schéma bateriově napájeného mikrostimulátoru využívajícího kumulativního účinku podprahových impulzů. 3) Přístroj musí splňovat bezpečnostní předpisy pro zdravotnické přístroje. 4) Navrhnete a realizujete bateriový mikrostimulátor využívající kumulativní účinek stimulačních impulsů. Stimulační impulzy mají být do organismu vysílány po skupinách, počet impulzu ve skupině má být nastavitelný. Přístroj má mít možnost dobíjení interních akumulátorů z externího zdroje. Po dobu nabíjení nesmí být možno mikrostimulátor zapnout. 5) Realizovaný mikrostimulátor ověřte v aplikaci měření změn průtoku krve stimulovanou končetinou s využitím termodynamické sondy. 6) Výsledky statisticky vyhodnotte a proveďte diskusi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] CAPKO, J. Základy fyziotrické léčby. Grada, 1998. ISBN 80-7169-341-3.

[2] McMANUS, F., J., WARD, A., R., ROBERTSON, V., J. The analgesic effects of interferential therapy on two experimental pain models: cold and mechanically induced pain. *Physiotherapy*. 1992, 95-102.

Termín zadání: 6.2.2012

Termín odevzdání: 18.5.2012

Vedoucí práce: doc. Ing. Milan Chmelař, CSc.

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce se věnuje vysvětlení dějů, ke kterým dochází při stimulaci tkání elektrickým proudem. K popisu jevů na molekulární a buněčné úrovni je využito významné analogie s elektrickými obvody. Modely membrány a buňky jsou nezbytné pro porozumění chování komplexnějších útvarů, jakými jsou tkáně a orgány. Značná pozornost je pak věnována objasnění podmínek elektrického dráždění, při nichž se dostaví odpověď stimulované oblasti. Dále je rozebrána problematika kumulativního účinku podprahové stimulace. Jsou nastíněny mechanismy obvyklých léčebných účinků elektroterapeutických metod. Rešerše poskytuje podklady pro praktickou část práce – návrh mikrostimulátoru. Zkoušky elektromagnetické kompatibility a elektrické bezpečnosti, provedené Institutem pro testování a certifikaci, a. s., ověřují vlastnosti zkoušeného zařízení a dodržení všech požadavků norem na konstruované zařízení. Mechanismus působení mikrostimulace na živý organismus je zkoumán experimentálně na koních ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou. K objektivnímu posouzení léčebného účinku mikrostimulace je poprvé využito měření s termodynamickými sondami. Pomocí miniaturních sond, umístěných na předních končetinách koně, jsou snímány změny tepelné aktivity, přičemž pouze jedna končetina je v bezprostřední blízkosti sondy stimulována, zatímco druhá je označena jako referenční. Srovnání a statistické vyhodnocení naměřených signálů by mohlo poskytnout detailnější pohled na tepelné změny uvnitř stimulované oblasti, které významně souvisí s prokrvením končetiny, a tím i s podporou redukce otoku. Průběh experimentu, který se zabývá vlivem mikrostimulace na otoky končetin koní, způsobených lehčími úrazy (tendinitidy, distorze aj.), je dokumentován formou fotografií, popř. videozáznamů, na základě nichž by bylo možné posoudit prospěšnost stimulace v dané aplikaci.

ABSTRACT

The theoretical part of the thesis deals with the explanation of the actions that occur during the stimulation of tissues with the electric current. A significant analogy with electrical circuits is used to describe the phenomena at the molecular and cellular level. The models of membrane and cell are necessary for understanding the behaviour of more complex structures, such as tissues and organs. A considerable attention is paid to the conditions of electrical stimulation which bring about response in the stimulated area. Next, the cumulative effect of the subthreshold stimulation is analysed. The mechanisms of common treatment effects of the electrotherapeutic methods are outlined. The research results in the practical part of the thesis – the design for a microstimulator. Properties of the microstimulator and compliance with standard requirements are verified by testing the electromagnetic compatibility and electrical safety, conducted by the Institute for testing and certification, JSC. The effects of microstimulation on living organisms are experimentally investigated on horses, in collaboration with the Veterinary and Pharmaceutical University. For the first time, thermodynamic sensors are used for the objective assessment of the microstimulation therapeutic effect. These miniature sensors are placed on the horse's front legs and monitor the changes in thermal activity while only one limb is really stimulated and the other is just considered as a reference. Comparison and statistical evaluation of the measured signals could provide a more detailed view of the thermal changes within the stimulated area, which is significantly related to blood circulation in limbs, and with the support of the reduction of edema. The course of the experiment which deals with the effect of microstimulation on edema of the horse's legs caused by minor injuries (tendinitis, sprains, etc.), is documented in photographs or videos that are significant for possible evaluation of the effectiveness of the stimulation in this application.

KLÍČOVÁ SLOVA

RC modely buňky, mikroproudová a vysokonapěťová pulzní terapie, podprahová stimulace, mikrosekundové a nanosekundové impulsy, terapie salvami impulsů, cytotoxicita elektrostimulace, norma ČSN EN 60601-1, termodynamická sensorika, algoritmus Longest Common Subsequences, prokrvení a otoky končetin koní.

KEYWORDS

RC cell models, Microcurrent and High-voltage pulsed current therapy, subthreshold stimulation, microsecond and nanosecond pulses, burst therapy, cytotoxicity of electrostimulation, EN 60601-1 Standard, thermodynamic sensor, Longest Common Subsequences algorithm, blood circulation and edema of the horse's legs.

TOBOLOVÁ, M. *Mikrostimulátor: diplomová práce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2012. 102 s. 14 příl. Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Milan Chmelař, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Mikrostimulátor jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....
podpis autorky

Poděkování

Především děkuji vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Milanu Chmelařovi, CSc. za odborné vedení, vstřícný přístup a pomoc s realizací funkčního vzorku mikrostimulátoru i s přípravami podkladů pro jednání etické komise o schválení projektu experimentů na koních. Dále děkuji vedení firmy HIT, s. r. o., Ing. Zdeňku Řezníčkovi, Ing. Miroslavě Řezníčkové a Ing. Michalu Řezníčkovi, za dlouhodobou spolupráci a materiální i technickou pomoc zejména při realizaci experimentu s termodynamickými senzory; MVDr. Radovanu Kabešovi a MVDr. Kristíně Žuffové za cenné rady z odborné veterinární praxe; doc. RNDr. Jaromíru Baštincovi, CSc. za veškerou pomoc se statistickým zpracováním dat; pracovníkům Institutu pro testování a certifikaci, a. s., Ing. Pavlu Vávrovi, Stanislavu Malinovi a Ing. Josefu Karasovi, za možnost provést zkoušky bezpečnosti mikrostimulátoru; RNDr. Jaromíru Kučerovi za IT pomoc s vytvořením programového vybavení pro měření v prostředí Linux a MUDr. Pavlu Červenkovu za odborné rady z lékařské praxe. Velký dík patří mé rodině a nejbližším za obrovskou morální podporu, všem majitelům koní, kteří se experimentů s nadšením zúčastnili, zvláště pak panu Vojtěchu Kocábovi za jezdeckou stáj Mistřice, paní Haně Svrčinové za JS Bzenec a Ing. Gabriele Štěpánové za stáj Omický Dvorek, a dalším lidem, kteří se podíleli na uskutečnění celé práce. Rovněž zde nemohu opomenout naše čtyřnohé koňské přátele, kterým patří dík za neuvěřitelnou ochotu, trpělivost a důvěru.

V Brně dne

.....
podpis autorky

OBSAH:

SEZNAM OBRÁZKŮ	8
SEZNAM TABULEK	10
1 ÚVOD DO ELEKTROTERAPIE	11
1.1 VYUŽITÍ ELEKTROTERAPIE	11
1.2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	11
2 OD ELEKTRODY K CÍLENÉ TKÁNI	12
2.1 ZÁKLADNÍ BUNĚČNÉ MECHANISMY	12
2.2 NÁHRADNÍ ZAPOJENÍ BUŇKY	12
2.3 NÁHRADNÍ SCHÉMA MEMBRÁNY	15
2.3.1 Elektrické změny na membráně	15
2.3.2 Mechanismus vzniku akčního napětí	16
2.4 ŠÍŘENÍ VZRUCHU VE TKÁNÍCH	17
3 REŽIMY ELEKTRICKÉ STIMULACE NERVOSVALOVÉHO ÚSTROJÍ	19
3.1 PRÁH PODRÁŽDĚNÍ	19
3.2 PODPRAHOVÁ STIMULACE	21
3.3 PRAHOVÁ STIMULACE	21
3.4 NADPRAHOVÁ STIMULACE	21
4 OBECNÉ MECHANISMY PŮSOBNÍ ELEKTROSTIMULACE	22
4.1 MECHANISMUS ELEKTRICKÉ STIMULACE NERVŮ A KOSTERNÍHO SVALSTVA	22
4.2 MECHANISMUS VLIVU ELEKTROSTIMULACE NA CÉVY	23
4.3 MECHANISMUS VZNIKU BOLEST-TIŠÍCÍHO ÚČINKU	23
4.4 MECHANISMUS ANTISPASTICKÉHO PŮSOBNÍ	24
5 ŠÍŘKA IMPULSU A JEHO VYUŽITÍ V TERAPII	25
5.1 MILISEKUNDOVÉ IMPULSY	25
5.2 MIKROSEKUNDOVÉ IMPULSY	25
5.2.1 Transkutánní elektrická neurostimulace (TENS)	25
5.2.2 Neuromuskulární (NMES) a Funkční elektrická stimulace (FES)	25
5.2.3 Mikroelektrostimulace (MET, MENS)	26
5.2.4 Vysokonapěťová terapie (HVPC)	29
5.3 NANOSEKUNDOVÉ IMPULSY	29
5.3.1 IRA antény	30
5.3.2 Elektroporace	30
6 TERAPIE SALVAMI IMPULSŮ („BURST“ TERAPIE)	31
6.1 TEORIE SKLÁDÁNÍ PODPRAHOVÝCH IMPULSŮ	31
6.2 APLIKACE	32
7 CYTOTOXICITA ELEKTROSTIMULACE	33
8 SPECIFIKACE MIKROSTIMULÁTORU	34
8.1 ZÁMĚR	34
8.2 BLOKOVÉ SCHÉMA MIKROSTIMULÁTORU	34
8.3 POŽADAVKY NA BEZPEČNOST PŘÍSTROJE A NORMY	36
9 NÁVRH MIKROSTIMULÁTORU	38
9.1 BLOK NAPÁJENÍ	38
9.1.1 Zdroj napětí	38
9.1.2 DC/DC měnič	38
9.2 SVĚTELNÉ SIGNALIZACE	42
9.2.1 Signalizace zapnutí přístroje	42
9.2.2 Signalizace nízkého napětí bateriového zdroje	42
9.2.3 Signalizace nabíjení bateriového zdroje	43

9.3	NASTAVENÍ PARAMETRŮ STIMULACE	43
9.3.1	<i>Generátor impulsů 100 kHz</i>	44
9.3.2	<i>Nastavení frekvence impulsů</i>	45
9.3.3	<i>Nastavení intenzity stimulace</i>	46
9.3.4	<i>Hradlování</i>	47
9.3.5	<i>Impulzní transformátor</i>	48
10	ZKOUŠKY MIKROSTIMULÁTORU.....	51
10.1	ELEKTRICKÁ BEZPEČNOST	51
10.1.1	<i>ČSN EN 60601-1 ed.2: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost</i>	52
10.1.2	<i>ČSN EN 60601-2-10: Zvláštní požadavky na bezpečnost nervových a svalových stimulatorů.</i>	55
10.2	ELEKTROMAGNETICKÁ SLUČITELNOST	56
10.2.1	<i>Měření vyzařovaného rušení</i>	56
10.2.2	<i>Odolnost</i>	56
11	EXPERIMENTÁLNÍ TESTOVÁNÍ ÚČINKŮ MIKROSTIMULACE	58
12	MONITOROVÁNÍ FYZIOLOGICKÉHO ÚČINKU MIKROSTIMULACE NA CÉVNÍ ŘEČIŠTĚ KONČETIN KONÍ	59
12.1	TERMODYNAMICKÁ SENZORIKA	59
12.1.1	<i>Pozitivně aktivní termodynamický senzor (Resistive ThermoDynamic Sensor – zkr. TDS).....</i>	60
12.1.2	<i>Návrh a realizace TDS</i>	61
12.2	TECHNICKÉ ZÁZEMÍ EXPERIMENTU	63
12.3	VÝBĚR POPULACE KONÍ.....	65
12.4	POPIS EXPERIMENTU	66
12.5	PŘEDZPRACOVÁNÍ DAT	68
13	STATISTICKÁ ANALÝZA NAMĚŘENÝCH DAT	69
13.1	ZÁKLADNÍ POPISNÁ STATISTIKA	69
13.2	KORELAČNÍ ANALÝZA	72
13.3	ANALÝZA ROZDÍLŮ REFERENČNÍCH A STIMULOVANÝCH SIGNÁLŮ	75
13.4	ANALÝZA PODOBNOSTI SIGNÁLŮ MEZI JEDNOTLIVÝMI MĚŘENÍMI	77
13.4.1	<i>Příprava dat</i>	77
13.4.2	<i>Analýza podobnosti křivek – algoritmus Longest Common Subsequences.....</i>	78
13.4.3	<i>Nemetrické vícerozměrné škálování (NMDS).....</i>	82
13.4.4	<i>Shluková analýza</i>	85
13.4.5	<i>Analýza zkrácení referenčních křivek v režimu R11</i>	86
13.4.6	<i>Analýza dat s redukcí chybných měření.....</i>	87
13.5	DISKUZE VÝSLEDKŮ	90
13.6	INTERPRETACE VÝSLEDKŮ.....	92
13.7	PROBLÉMY MĚŘENÍ A NÁVRH JEJICH ŘEŠENÍ.....	94
14	VLIV MIKROSTIMULACE NA REDUKCI OTOKŮ KONČETIN KONÍ	95
15	ZÁVĚR.....	97
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	98
	PŘÍLOHY	103

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zjednodušená struktura biologické buňky [13] (snímek získaný světelným mikroskopem).....	12
Obrázek 2: RC model biologické buňky převzat z [13].....	13
Obrázek 3: Zjednodušené schéma buňky, převzato ze zdroje [19].	13
Obrázek 4: Ekvivalentní schéma k popisu nabíjení membrány, k němuž dochází v rozsahu hodnot mezi relaxačními časy membrány a cytoplasmy (převzato z [19]).....	14
Obrázek 5: Náhradní schéma buňky odpovídající aplikaci impulsů delších než relaxační čas plazmatické membrány $\tau > \tau_m$ (převzato z [19])	14
Obrázek 6: Náhradní schéma buňky pro extrémně krátké impulsy, tj. kratší než relaxační čas cytoplasmy $\tau < \tau_{cp}$ (převzato z [19]).....	14
Obrázek 7: Náhradní elektrické schéma buněčné membrány [4]	15
Obrázek 8: Přibližné hodnoty rovnovážného napětí pro jednotlivé ionty [4]	15
Obrázek 9: Vznik rovnovážného napětí U_K na membráně selektivně propustné pro ionty K^+ [4].....	16
Obrázek 10: Vznik a průběh AN v závislosti na intenzitě stimulačního podnětu I_m [4]	17
Obrázek 11: Hoorweg-Weissova I-t křivka pro dva typy impulsů [9].....	19
Obrázek 12: Křivka závislosti prahového napětí na šířce impulsu získaná drážděním lýtkového svalu žáby (Data) ve srovnání se standardní křivkou (Blair, 1932) [12]	20
Obrázek 13: Závislost prahové amplitudy I impulsu na jeho šířce t_i [6].....	20
Obrázek 14: Závislost prahové amplitudy I impulsu na intervalu mezi impulsy t_{in} [6]	20
Obrázek 15: Prostorové rozložení a časový průběh membránového napětí nervového vlákna jako odpověď na podprahové (t_1) a nadprahové (t_2) dráždění [4];	21
Obrázek 16: Anterodromní šíření AN nervovým vláknem [4].....	22
Obrázek 17: Modelování formace nanopóru v membráně [19].....	30
Obrázek 18: Stimulace N-let salvami [49].....	31
Obrázek 19: Blokované schéma mikrostimulátoru	35
Obrázek 20: Blok napájení a světelné signalizace	38
Obrázek 21: Step-up mód měniče LT1111, převzato z [64]	39
Obrázek 22: Blokový diagram měniče LT1111 (převzato z [61])	39
Obrázek 23: Obvodové řešení nastavení výstupu.....	44
Obrázek 24: Náhradní schéma zapojení s transformátorem.....	48
Obrázek 25: Tvar impulsů na výstupu mikrostimulátoru	50
Obrázek 26: Funkční vzorek mikrostimulátoru se síťovým adaptérem	51
Obrázek 27: Příprava mikrostimulátoru ke kondicionování v klimatické komoře VCV4034	52
Obrázek 28: Značení mikrostimulátoru	53
Obrázek 29: Měření dotykového proudu a proudu unikajícího pacientem	54
Obrázek 30: Zkouška elektrické pevnosti.....	54
Obrázek 31: Zkouška měřením teplot částí mikrostimulátoru pro zjištění úrovně ochrany před nebezpečnými teplotami	54
Obrázek 32: Anténa ve stíněné bezodrazové komoře, pracoviště ITC Uherské Hradiště	56
Obrázek 33: Zkouška odolnosti vůči působení vnějšího elektromagnetického pole.....	57
Obrázek 34: Zkouška odolnosti proti elektrostatickému výboji vzduchovou (vlevo) a kontaktní metodou (vpravo)	57
Obrázek 35: Zkouška odolnosti proti magnetickému poli síťového kmitočtu	57
Obrázek 36: Výkonově teplotní charakteristika ideálního pozitivně aktivního TDS [75], [78].....	61
Obrázek 37: Schéma termodynamického zapojení TDS [75], [76].....	62
Obrázek 38: Ukázka hotových vzorků TDS navržených pro použití v různých aplikacích [76].....	62
Obrázek 39: Praktická realizace TDS pro měření na koních.....	63
Obrázek 40: Blokované schéma uspořádání experimentu	64
Obrázek 41: Měřicí aparatura	65
Obrázek 42: Anatomie cévního a nervového systému horní části končetiny koně [80]	67
Obrázek 43: Detail umístění sond na koni a fotografie z měření.....	67
Obrázek 44: Stimulace končetiny ve vzdálenosti cca 5 centimetrů nad sondou.....	68
Obrázek 45: Srovnání signálů z TDS umístěných na referenční (ref) a stimulované končetině (stim) u dvou koní (K01, K02) při režimu stimulace R00.....	69
Obrázek 46: Ukázka souhrnné statistiky dat REF (vlevo) a STIM (vpravo) u koně K01 v režimech R00, R01 a R10.	70
Obrázek 47: Poloviční maticový graf korelací REF signálů koní K01–K10 pro režim stimulace R00.....	73
Obrázek 48: Poloviční maticový graf korelací STIM signálů koní K01–K10 pro režim stimulace R00.....	74

Obrázek 49: Reprezentativní křivky všech režimů stimulace získané průměrováním dat 20 koní	78
Obrázek 50: Grafické srovnání REF (modrá) a STIM (červená) křivek režimu R00 alg. LCSS.	81
Obrázek 51: Srovnání REF křivek režimu R00 (modrá) a R10 (červená); vzdálenost $D = 0,02995$	81
Obrázek 52: Srovnání STIM křivek režimu R00 (modrá) a R10 (červená); vzd. $D = 0,0099834$	82
Obrázek 53: Scree plot PCA a vyznačení řezu pro stanovení počtu hlavních komponent	83
Obrázek 54: 2D škálovací diagram jako výsledek mnohorozměrného škálování a barevné rozlišení shluků podobných prvků (REF – zelený, STIM – červený)	84
Obrázek 55: Shepardův diagram pro zjištění kvality modelu NMDS	84
Obrázek 56: Stromový diagram (dendrogram) shluků vytvořených na základě matice vzdáleností	85
Obrázek 57: 2D škálovací diagram REF signálů režimu R11 a vyznačení odlehlých hodnot (červený shluk)	86
Obrázek 58: Dendrogram REF signálů režimu R11 a nalezení nejvíce odlišných měření (červené označení)	86
Obrázek 59: Scree plot pro určení počtu hlavních komponent po vyřazení měření K08 ref z režimu R11 ref.....	87
Obrázek 60: 2D škálovací diagram po vyřazení K08 ref z režimu R11 ref.....	88
Obrázek 61: Dendrogram po vyřazení K08 ref z režimu R11 ref.....	88
Obrázek 62: Scree plot pro určení hlavních komponent po vyřazení K03 ref a K08 ref z R11 ref.....	89
Obrázek 63: 2D škálovací diagram podobností objektů po vyřazení K03 ref a K08 ref z R11 ref	89
Obrázek 64: Dendrogram po odstranění K08 a K03.	90
Obrázek 65: Dendrogramy shlukové analýzy založené na Euklidovské vzdálenosti měřených dat.	91
Obrázek 66: Originální záznam měření koně K10 v režimu stimulace R01	92
Obrázek 67: Dlouhodobé měření s TDS se záznamem stimulace i všech vnějších vlivů.....	93

Seznam tabulek

<i>Tabulka 1: Tabulka Spearmanových koeficientů, charakterizujících vztahy mezi referenčními křivkami 10 koní.</i>	72
<i>Tabulka 2: Tabulka Spearmanových koeficientů, charakterizujících vztahy mezi stimulovanými křivkami 10 koní.</i>	73
<i>Tabulka 3: Výstup Wilcoxonova testu pro všechna párová měření v režimu stimulace R00</i>	76
<i>Tabulka 4: Výpočet podobnosti $s(a,b) = 4$</i>	79
<i>Tabulka 5: Matice vzdáleností jednotlivých průběhů</i>	82
<i>Tabulka 6: Numerický výstup PCA na průměrovaných datech</i>	83
<i>Tabulka 7: Matice vzdáleností po vyřazení měření K08 REF z režimu R11 ref.</i>	87
<i>Tabulka 8: Matice vzdáleností po vyřazení měření K08 ref a K03 ref z R11 ref.</i>	88

1 Úvod do elektroterapie

1.1 Využití elektroterapie

Postavení elektroterapie a elektrostimulace je v porovnání s ostatními metodami fyzikální terapie zcela výjimečné. Jejich použití totiž zdaleka nekončí např. jen rehabilitací, nýbrž má obrovský význam pro diagnostiku, léčbu a v neposlední řadě výzkum. Elektrostimulace našla uplatnění ve většině oborů klasické medicíny. Velký vývoj a pokrok zaznamenala v oblasti léčby snad všech orgánů a tkání, počínaje kardiostimulací a defibrilací přes stimulaci nervů a svalů, močového měchýře, žaludečního a střevního traktu až po neuroprotézy. Tímto však možnosti využití elektrického proudu v medicíně zdaleka nekončí, naopak se objevují stále další.

Bez použití elektrických metod i ve výzkumu a diagnostice bychom jen těžko pochopili základní metabolické procesy vlastního těla, neboť elektrické a magnetické impulsy jsou tělu naprosto přirozené. Podle reflexních okruhů v neuromuskulárním a dalších ústrojích vzniká nepřetržitý proud impulsů. Tento proud je vytvářen kruhy myotatických¹ reflexů, reflexní činností mozečku spojené s přemísťováním a zrychlováním pohybu částí našeho těla, dále činností vestibulárního aparátu, reagující na změny rovnováhy a na rotaci, a polohovými reakcemi [6]. Jak lze vidět, i když je tělo velmi komplexní systém, vykazuje dokonalou uspořádanost a precizní komunikaci na všech úrovních. Proto je možné využít k léčbě různých onemocnění i např. elektropunkturu².

1.2 Cíle diplomové práce

V souladu s oficiálním zadáním diplomové práce jsou stanoveny tyto cíle:

- 1) Popis mechanismů působení stimulace elektrickým proudem na všech úrovních živého organismu.
- 2) Rozbor léčebných účinků vybraných elektroterapeutických metod.
- 3) Problematika skládání podprahových impulzů.
- 4) Návrh bateriově napájeného mikrostimulátoru využívajícího kumulativního účinku podprahových impulzů.
- 5) Rozbor bezpečnostních předpisů, které musí navržený mikrostimulátor splňovat jako zdravotnický přístroj.
- 6) Experimentální testování účinků mikrostimulace na koních.

¹ Týkající se citlivosti svalu na změnu napětí.

² Aplikace elektrického proudu v jednom kožním bodě jehlovitou elektrodou, čímž napodobuje píchnutí jehlou v klasické akupunktuře.

2 Od elektrody k cílené tkáni

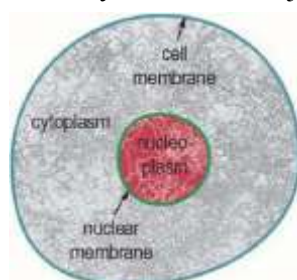
2.1 Základní buněčné mechanismy

Bez elektřiny, jako zdroje energie pro chod našich spotřebičů nejrůznějšího druhu, si současný svět vůbec neumíme představit. Avšak často si neuvědomujeme, že mnohem důležitější roli sehraává ve funkci našeho vlastního těla, v každém živém organismu. Jakémukoliv metabolickému pochodu, chemické reakci, ke kterým v našem těle dochází takřka nepřetržitě, předchází bioelektrický jev.

Nejjednodušší živou, plně funkční jednotkou, schopnou odpovědi na elektrický signál je buňka. Od okolního prostředí je oddělena membránou, která má zásadní vliv na přežití buňky. Membrána tvoří ochranný obal buňky, zprostředkovává komunikaci s vnějším prostředím a zajišťuje dopravu živin a jiných důležitých látek dovnitř buňky a zároveň odplavení metabolitů ven, čímž přispívá k zachování vnitřní rovnováhy [1]. Vzhledem k elektrickým vlastnostem buňky a jejímu chování byly vytvořeny modely buňky jako náhradní elektrické obvody, ve kterých lze aplikovat pravidla a zákony elektrotechniky. Umožňují tak snazší porozumění bioelektrickým dějům na této nejjednodušší úrovni.

2.2 Náhradní zapojení buňky

Skutečné prostředí v nitrobuněčném a mezibuněčném prostoru buňky (viz Obrázek 1) můžeme nahradit modelem elektrického obvodu, složeným z RC členů, jak uvádí Obrázek 2.

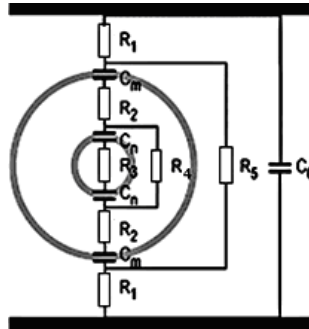


Obrázek 1: Zjednodušená struktura biologické buňky [13] (snímek získaný světelným mikroskopem)

Obrázek 2 znázorňuje jednoduchý RC model buňky s pouze jedinou vnitřní strukturou, jádrem (nucleus), které je stejně jako buňka obklopeno vlastní membránou. Index m označuje buněčnou membránu a n jadernou membránu. Z nevodivé podstaty membrány vyplývá její dominantní kapacitní vlastnost (C_m , C_n). Naopak cytoplasma³ a nukleoplasma⁴ představují vodné roztoky malých i velkých molekul, z elektrického hlediska jsou tedy velmi dobře vodivé, a proto jsou charakterizovány vodivostí, resp. odporem R . Podle tohoto modelu můžeme na buňku nahlížet jako na vodič obklopený izolační vrstvou a obsahující podstruktury (organely) s podobnými vlastnostmi. Kapacitní vlastnosti cytoplasmy a nukleoplasmy jsou v modelu zanedbány, stejně tak by mohla být vynechána i malá vodivost membrán. Použití takového modelu má však svá omezení a existují dvě situace, kdy jej použít nelze. Jednak jde o aplikaci impulsů kratších než dielektrický relaxační čas membrány a pak o aplikaci impulsů delších v porovnání s dobou relaxace cytoplasmy, resp. nukleoplasmy.

³ Základní hmota buňky, uvnitř které jsou jednotlivé organely.

⁴ Vnitřní obsah buněčného jádra.

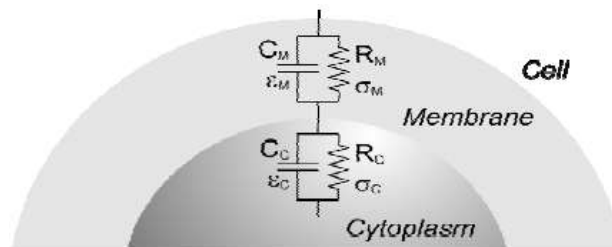


Obrázek 2: RC model biologické buňky převzat z [13]

Buňka je vložena mezi dvě elektrody. Paralelní zapojení odporu R_1 a kapacity C_0 charakterizuje elektrické vlastnosti prostředí, ve kterém se buňka nachází. Přírozně jím bývá extracelulární tekutina. Buněčná membrána je popsána kapacitou C_m . K ní paralelně zapojený rezistor R_5 představuje vodivost membrány, která však není její dominantní vlastností. Obdobným způsobem je popsána membrána jádra paralelní kombinací R_4 a C_n . Velmi dobrou vodivost intracelulárního obsahu buňky (cytoplasmu) charakterizuje rezistor R_2 , stejně tak R_3 pro vnitřní obsah jádra (nukleoplasmu).

Pro vysvětlení těchto specifických případů je vhodné uvažovat zjednodušený jednovrstvý model buňky, viz Obrázek 3 [19]. Hodnoty dielektrických konstant (relativních permitivit⁵ ϵ) a vodivostí (σ) buněčných membrán a cytoplasmu, mohou být zjištěny dielektrickou spektroskopií⁶ buněk. Typické hodnoty u savčích buněk jsou:

- a) pro buněčnou membránu $\epsilon_m \approx 10, \sigma_m \approx 10^5 \text{ S/m}$
- b) pro cytoplasmu $\epsilon_c \approx 80, \sigma_c \approx 1 \text{ S/m}$



Obrázek 3: Zjednodušené schéma buňky, převzato ze zdroje [19].

Paralelní zapojení kapacitoru C_m a rezistoru R_m představuje model membrány, charakterizující její vlastnosti – relativní permitivitu ϵ_m a vodivost σ_m . Obdobné zapojení prvků (C_c, R_c) platí i pro cytoplasmu s relativní permitivitou ϵ_c a vodivostí σ_c .

Ze vztahu (1) pro dielektrický relaxační čas τ_r můžeme vyvodit podrobnější informace o odporové nebo kapacitní složce membrány a cytoplasmu s ohledem na dobu působení elektrického pole τ a popsát tak dvě možné situace:

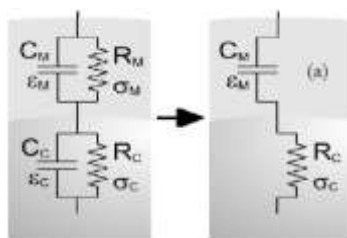
$$\tau_r = \frac{\epsilon}{\sigma} \quad (1)$$

- a) $\tau > \tau_r$, tj. trvání stimulačního impulsu τ je delší než $\tau_r \Rightarrow$ převažuje rezistivní složka
- b) $\tau < \tau_r$, tj. trvání stimulačního impulsu τ je kratší než $\tau_r \Rightarrow$ převažuje kapacitní složka

⁵ Veličina charakterizující vlastnosti dielektrika, pro izotropní prostředí je konstantou úměrnosti mezi intenzitou elektrického pole a elektrickou indukcí.

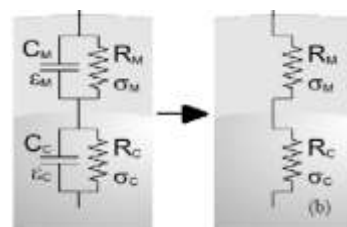
⁶ Moderní nedestruktivní metoda založená na nepřímém měření polarizace jako odezvy vzniklé po změně elektrického pole. Těžištěm zájmu je získání závislosti komplexní permitivity dané látky na frekvenci (tzv. dielektrické spektrum) a na dalších veličinách, jež měřené vlastnosti výrazně ovlivňují.

Pro lepší popis reakce buněk na elektrickou stimulaci impulsy různého trvání je vhodné obecné schéma buňky přepracovat vzhledem k dané situaci:



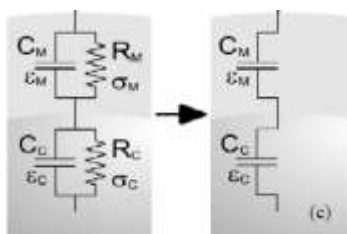
Obrázek 4: Ekvivalentní schéma k popisu nabíjení membrány, k němuž dochází v rozsahu hodnot mezi relaxačními časy membrány a cytoplasmy (převzato z [19])

Obrázek 4 představuje obdobu základního schématu a dobře se hodí k popisu vytváření pórů v buněčné membráně. Jak bylo zmíněno, použití schématu je však omezeno šířkou stimulačního impulsu vzhledem k relaxační době membrány. Platnost modelu je dána rozmezím přibližně od 1 ns do několika μs v závislosti na typu buňky.



Obrázek 5: Náhradní schéma buňky odpovídající aplikaci impulsů delších než relaxační čas plazmatické membrány $\tau > \tau_m$ (převzato z [19])

Obrázek 5 odpovídá situaci, kdy k buňce přivedeme impuls delší než je relaxační doba membrány (ϵ_m/σ_m). Kapacitní složka impedance membrány je zanedbána v porovnání se složkou odporovou a ekvivalentní obvod je tvořen dvěma rezistory R_M , R_C . Toto chování membrány nastává až pro impulsy delší než přibližně 10 μs , proto pro impulsy s trváním 100 μs a více lze kapacitní složku zanedbat úplně. Mimo to se u takto dlouhých impulsů začínají projevovat i výrazné tepelné účinky, které buňka eliminuje difúzí⁷.



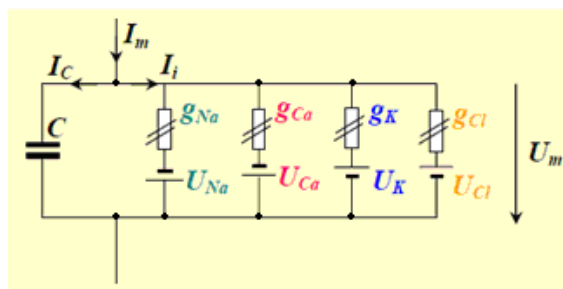
Obrázek 6: Náhradní schéma buňky pro extrémně krátké impulsy, tj. kratší než relaxační čas cytoplasmy $\tau < \tau_{cp}$ (převzato z [19])

Obrázek 6 ukazuje schéma pro případ aplikace velmi krátkých impulsů, kde rozložení elektrického pole určují spíše dielektrické vlastnosti buňky. Aby mohla být odporová složka impedance cytoplasmy zcela zanedbána, je potřeba použít šířku impulsu kratší ve srovnání s dielektrickým relaxačním časem cytoplasmy (ϵ_c/σ_c), a to platí pro hodnoty menší než 1 ns.

⁷ Samovolný pohyb molekul, iontů, micel apod. vlivem jejich tepelného pohybu směřující k rovnoměrnému rozptýlení v daném prostoru. Umožňuje výsledný pohyb látky z jednoho místa na druhé podle koncentračního spádu gradientu, tj. z místa vyšší koncentrace do místa s nižší koncentrací.

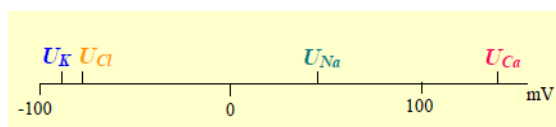
2.3 Náhradní schéma membrány

Podobně jako můžeme vytvořit RC model buňky, je možné sestavit i model samotné buněčné membrány (Obrázek 7), která má stěžejní roli při podráždění elektrickým proudem.



Obrázek 7: Náhradní elektrické schéma buněčné membrány [4]

Externě přivedený celkový membránový proud I_m je součtem kapacitního I_C a iontového proudu I_i . Jednotlivé iontové kanály jsou reprezentovány vodivostmi g_X iontů X (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^-) a jejich rovnovážnými napětími U_X . Výrazná kapacitní vlastnost membrány je opět vyjádřena kondenzátorem s kapacitou C .



Obrázek 8: Přibližné hodnoty rovnovážného napětí pro jednotlivé ionty [4]

Selektivní propustnost membrány je důležitou vlastností membrány pro regulaci pohybu všech látek z/do buňky. Vychází z hydrofobní povahy fosfolipidové dvojvrstvy, tvořící nevodivý základ struktury membrány. Pouze přítomné bílkovinné iontové kanály a přenašeče umožňují přenos iontů skrz ni a jsou přísně řízeny. Vodné prostředí, obklopující membránu, představuje vodivý roztok iontů a jejich tok přes membránu je měřitelný jako elektrický proud [1]. Membránu lze připodobnit kondenzátoru, tenké izolační vrstvě oddělující dvě vodivá prostředí, což je vyjádřeno kapacitou C . Vodivosti g_X v sérii se zdroji rovnovážného napětí U_X vyjadřují schopnost kanálů přenášet přes membránu ionty X . Symbol dvou čar u rezistorů signalizuje, že se nejedná o obyčejné nelineární vodivosti, neboť závisí na membránovém napětí U_m a vykazují setrvačné vlastnosti [3]. Pokud se napětí na membráně skokem změní, nereagují tyto vodivosti okamžitě, ale až s určitým zpožděním. Tuto napěťovou a časovou závislost vodivostí lze popsat diferenciálními rovnicemi.

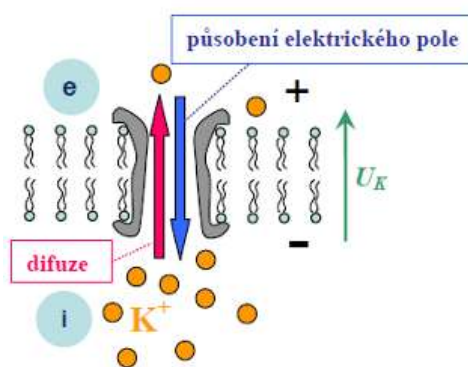
U modelu je potřeba počítat s předpokladem, že rovnovážné napětí je membránové napětí, při němž daným kanálem neprotéká elektrický proud, tzn. zastaví se pohyb náboje skrz membránu. Rovnovážné napětí pro každý iont je různé a jejich hodnoty lze vyčíslit (Obrázek 8). Toto napětí je spojeno s tendencí různých iontů soustředit se více uvnitř nebo vně buňky.

2.3.1 Elektrické změny na membráně

Pro vznik vnějších elektrických projevů jsou rozhodující především ionty draslíku K^+ a sodíku Na^+ . Obojí jsou aktivně přenášeny přes membránu v důsledku metabolických změn. Tři ionty Na^+ jsou transportovány ven z buňky výměnou za dva ionty K^+ do nitra buňky. Jde o mechanismus známý jako sodno-draselná pumpa. Výsledkem je nestejně rozložení náboje po stranách membrány. Zatímco uvnitř buňky převažují ionty K^+ a organické ionty, ve vnějším prostředí je vysoká koncentrace iontů Na^+ , vápníku Ca^{2+} a chlóru Cl^- . Působením difúzních sil mají ionty tendenci nastolit koncentrační rovnováhu. K^+ se snaží pronikat ven z buňky a Na^+ dovnitř, narazí však na nestejnou propustnost

membrány. Membrána se chová podobně jako usměrňovač toku elektrického proudu [14]. Usměrnjuje pohyb K^+ iontů membránou v obou směrech a směřuje k nastolení rovnováhy. Vnější usměrnění reguluje tok iontů ven z buňky, vnitřní usměrnění tok dovnitř.

Zatímco K^+ se mohou pohybovat téměř bez omezení, pro Na^+ je membrána v klidovém stavu takřka nepropustná. V důsledku toho dochází k přesunu pouze K^+ ven z buňky, kde vzniká převaha kladného náboje a projeví se vznikem elektrického pole s intenzitou působící proti směru pronikání dalších kladných iontů ven. Pohyb iontů ustane v okamžiku vyrovnání sil elektrického pole a koncentračního gradientu. V důsledku ztráty K^+ uvnitř buněk převažuje záporný náboj, zatímco vně buněk náboj kladný. Výsledkem této nerovnováhy nábojů jsou rozdílné potenciály po stranách membrány, vytvářející klidové membránové napětí, které se u živočišných buněk pohybuje v rozmezí -90 mV až -50 mV [4]. Buňka je v klidu svým napětím polarizována. Právě membránové napětí je velmi snadno ovlivnitelné vnějšími podněty (chemickými, mechanickými, elektrickými aj.).



Obrázek 9: Vznik rovnovážného napětí U_K na membráně selektivně propustné pro ionty K^+ [4]
e – extracelulární prostředí, i – intracelulární prostředí

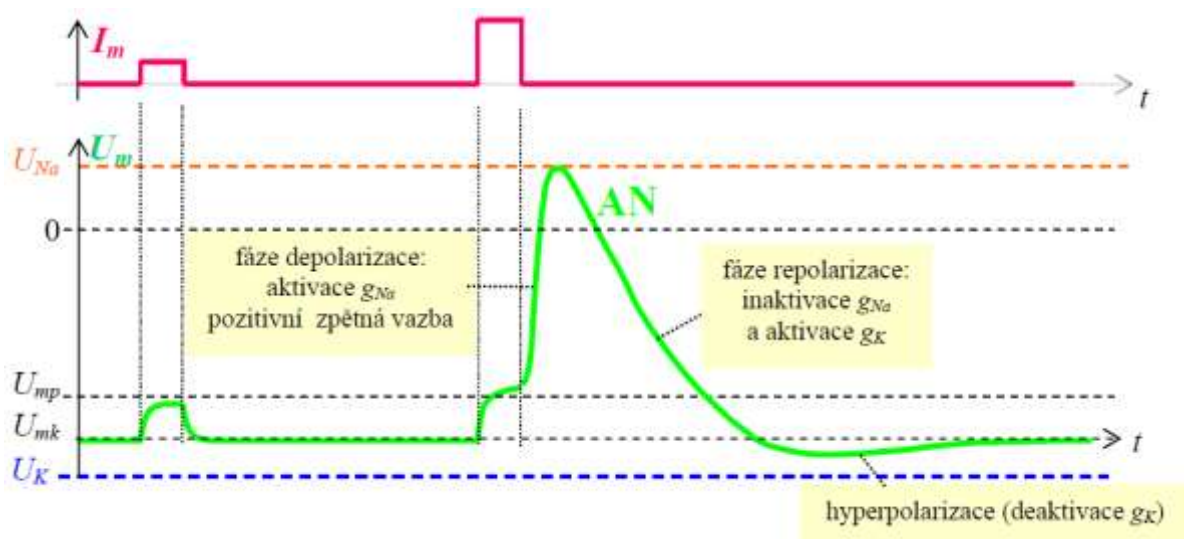
Iontové proudy směřující do buňky (I_{Na} , I_{Ca}) jsou nazývány zápornými a způsobují vzrůst membránového napětí, depolarizaci membrány. Naopak proudy směřující z buňky (I_K) jsou proudy kladnými a membránu repolarizují. Celkový membránový proud z vnějšího zdroje I_m je dán součtem kapacitního proudu I_C a iontového proudu I_i skrz kanály (jak naznačuje Obrázek 7). Výsledné membránové napětí má tendenci se ustálit na nějaké hodnotě a bude se nejvíce blížit rovnovážnému napětí toho iontu, pro který je v danou chvíli membrána nejvíce propustná. V klidu jde o rovnovážné napětí draslíku U_K , avšak pokud se vnějším podrážděním přechodně zvýší vodivost pro ionty s rovnovážným napětím opačné polarity (Na^+ , Ca^{2+}) tak, že několikanásobně převyší vodivost pro K^+ , pak se na membráně objeví napěťový impulz. Tímto způsobem vznikají impulzy akčního napětí jako odpověď na nadprahové podráždění [1], [4], [5].

2.3.2 Mechanismus vzniku akčního napětí

Kvantitativní popis vzniku akčního napětí objasnili a formulovali vědci Hodgkin a Huxley roku 1963 po provedení pokusů na axonu sépie [1], [4], [5]. Elektricky aktivní tkáň mohou v důsledku elektrických změn vygenerovat přechodný napěťový impulz, akční napětí (AN). Podrážděná buňka nebo podrážděná část u rozměrných buněk, jako je nervové vlákno, může být zdrojem podráždění pro své okolí.

Dostatečné podráždění zapříčiní otevření kanálů pro Na^+ a Ca^{2+} a ionty proudící dovnitř buňky způsobí depolarizaci membrány. Vlivem samovolné inaktivace těchto kanálů dochází po určité době

k zpětné repolarizaci, která je podpořena aktivací K^+ -kanálů a membránové napětí se vrací zpět k negativní hodnotě klidového stavu. Za repolarizací se může objevit dočasný hyperpolarizační překmit pod úroveň klidového membránového napětí v důsledku pomalé deaktivace K^+ -kanálů. Doba od začátku depolarizace až po opětovné obnovení polarizace se nazývá refrakterní a buňka není schopna reagovat na další dráždivé podněty. Zde je třeba rozlišit dvě stádia: absolutní refrakteritu, při níž nedojde k podráždění jakkoliv silným podnětem, a relativní refrakteritu na konci refrakterní fáze, při níž je dráždivost pouze snížena [6]. Doba refrakterity se liší u různých typů tkání stejně jako průběh AN. U nervových buněk je kratší než 1 ms, u buněk srdečního svalu je přibližně 0,2 s a u hladkého, případně u poškozeného příčné pruhovaného svalstva, jde o celé vteřiny [3].



Obrázek 10: Vznik a průběh AN v závislosti na intenzitě stimulačního podnětu I_m [4]

Podprahový impuls vyvolá sice vychýlení membránového napětí z klidové hodnoty U_{mk} , ale nepřekročí práh U_{mp} , potřebný pro vznik impulsu AN. Až silnější podnět zapříčiní depolarizaci membrány aktivací Na^+ -kanálů a napětí prudce vzroste k hodnotě blízké rovnovážnému napětí U_{Na} . Inaktivací Na^+ -kanálů a aktivací K^+ -kanálů se membrána repolarizuje zpět do svého klidového stavu ovšem s drobným překmitem (hyperpolarizací) pod úroveň klidového napětí z důvodu pomalejší deaktivace K^+ -kanálů.

2.4 Šíření vzruchu ve tkáních

Z hlediska elektrických vlastností vykazuje organismus značnou heterogenitu, která se projevuje různými elektrickými náboji, membránovými a akčními potenciály a dalšími jevy, které jsou charakteristické pro každou funkční strukturu systému. Typickým příkladem je vedení proudu membránou buňky, která má charakter impedance, a mimobuněčnou tekutinou, která je typickým vodičem druhého řádu [7], [9]. Z těchto vlastností se pak odvíjí vedení různých druhů proudu tkání.

Stejnoseměrný proud neměnné intenzity se šíří tkáněmi pohybem iontů, tzn. převážně mezibuněčnými prostory. Vedle toho proud střídavý je veden tkáněmi spíše jako proud posuvný, kdy se dipolární molekuly vázané ve struktuře tkání natačejí ve směru polarity elektrického pole. Míra schopnosti látky vést elektrický proud jako proud posuvný je vyjádřena permitivitou. Zatímco nízkým frekvencím proudu (< 1 kHz) kladou membrány velký odpor, vysokofrekvenční proud (> 100 kHz) snadněji překonává malý kapacitní odpor buněčných membrán a hovoří se o tzv. kapacitním přemostění membrány [3], [9]. Protékající proud se řídí Ohmovým zákonem, kde ale místo odporu R

figuruje impedance Z , která je vícesložková. Celková impedance tkáně je dána vektorovým součtem ohmického odporu R (rezistance) a rozdílu indukčního X_L (induktance) a kapacitního odporu X_C (kapacitance):

$$Z^2 = R^2 + (X_L - X_C)^2 \quad (2)$$

Vztah pro kapacitanci vyjadřuje frekvenční závislost impedance a vysvětluje tak zvyšující se průtok proudu s frekvencí:

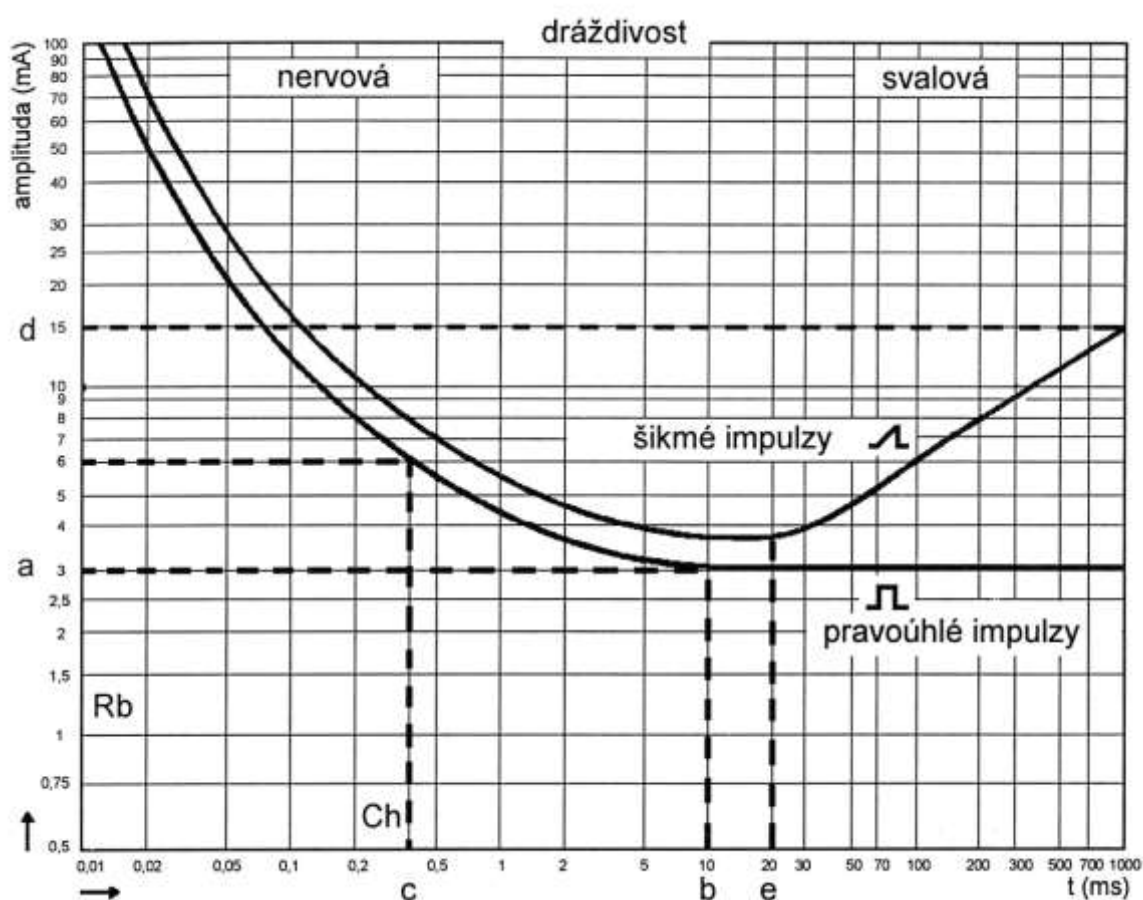
$$X_C = \frac{1}{2\pi \cdot f \cdot C} \quad (3)$$

Proud prochází tkáněmi cestou nejmenšího odporu, tedy podél nervových vláken, cév a mezibuněčnými prostory. Největší vodivost vykazuje likvor a krevní plazma, vodivost tukové tkáně je o řád menší, suché kůže o pět řádů a kostí až o sedm řádů. [9]

3 Režimy elektrické stimulace nervosvalového ústrojí

3.1 Práh podráždění

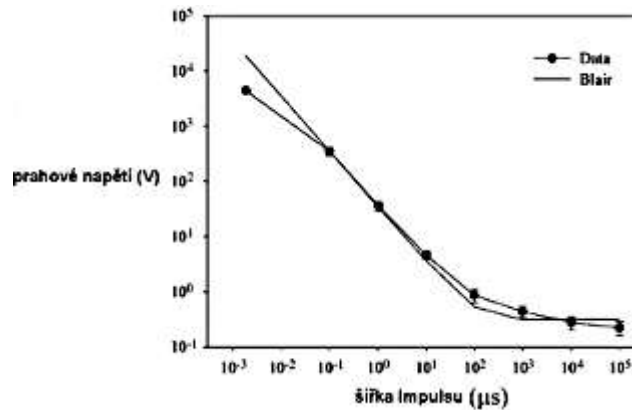
Ke vzniku AN nemusí dojít vždy, ale je vázán na mohutnost dráždicího podnětu. O tom, zda je impuls podprahový, prahový nebo nadprahový, rozhoduje jeho tvar, výška a doba trvání. Bylo zjištěno, že impulsy s delším trváním lze dosáhnout podráždění s nižší amplitudou než kratším impulsem a tyto poměry se navíc liší i s jejich tvarem. Graficky lze tuto závislost zobrazit Hoorweg-Weissovou křivkou, též zvanou I-t křivka, viz. Obrázek 11. Má přibližně tvar rovnoosé hyperboly posunuté ve směru svislé osy. Posun je konstantní a udává proudový práh podráždění pro nekonečně dlouhý stimulační impuls. Jde o tzv. reobázi. Zkracováním impulsu roste práh podráždění. Šířka impulsu, při které je práh podráždění roven dvojnásobku reobáze, se nazývá chronaxie [9].



Obrázek 11: Hoorweg-Weissova I-t křivka pro dva typy impulsů [9]

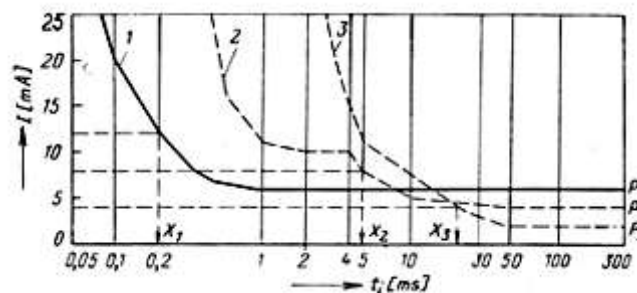
Rb – reobáze, Ch – chronaxie

Podobně jako proudový práh, lze měřit i práh napěťový. Křivka závislosti prahového napětí na šířce impulsu má však odlišný průběh, viz. Obrázek 12. Někdy je práh podráždění vhodné vyjádřit elektrickým nábojem prahového impulsu nebo energetickým obsahem impulsu [6].



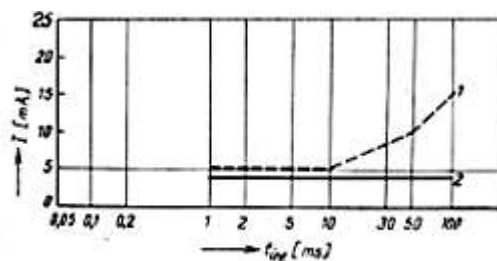
Obrázek 12: Křivka závislosti prahového napětí na šířce impulsu získaná drážděním lýtkového svalu žáby (Data) ve srovnání se standardní křivkou (Blair, 1932) [12]

Práh elektrického podráždění také souvisí s funkčním stavem svalů. V oblasti funkčně lépe vyvinuté struktury, např. pravá ruka člověka, nohy koně apod., je práh mnohem nižší [6]. Sledování změny prahu dráždivosti se využívá v elektrodiagnostice denervovaných svalů [9]. Narozdíl od zdravého svalu, degenerovaný nereaguje na krátké stimuly, což se na I-t grafu projeví posunem celé křivky doprava, k déle trvajícím impulsům (viz Obrázek 13).



Obrázek 13: Závislost prahové amplitudy I impulsu na jeho šířce t_i [6] (1 – normální stav, 2 – denervace svalu, 3 – další zhoršení funkčního stavu denervovaného svalu, P_1, P_2, P_3 – prahové hodnoty I)

Méně známé je měření závislosti amplitudy na intervalu mezi impulsy (viz Obrázek 14). U zdravého člověka tvoří přímku, avšak u denervovaného svalu zaznamenává přibližně exponenciální nárůst. Důvodem je, že při prodloužení mezery mezi impulsy dojde ke stahu až při větších proudech, jelikož se neuplatní sčítání podnětů [6]. Funkčním stavem nervosvalového ústrojí se zabývá elektromyografie⁸ (EMG).



Obrázek 14: Závislost prahové amplitudy I impulsu na intervalu mezi impulsy t_{iv} [6] (1 – denervovaný sval, při prodloužení intervalu stah nastane až při vyšším proudu; 2 – zdravý sval, závislost tvaru přímky neboť amplituda I se s prodlužováním intervalu nemění)

⁸ Záznam elektrické aktivity svalů pomocí elektrod. Používá se v neurologii v diagnostice různých svalových anervových poruch.

3.2 Podprahová stimulace

Podprahový dráždicí impuls na úrovni buňky nevyvolá výraznou změnu vodivosti iontových kanálů pro Na^+ a Ca^{2+} a membránové napětí se po podráždění rychle vrací zpět na klidovou hodnotu. Nevzniká tak impuls AN a nemůže dojít ani ke stahu svalu. Zdálo by se, že je tedy podprahová stimulace bezpředmětná. Při pokusech se však zjistilo, že přináší zvýšení pracovní schopnosti, ať už při dynamické nebo statické námaze [6]. Stimulace působí na eferentní⁹ soustavu, receptory jsou schopny reagovat na podráždění dlouhodobě a pomocí zpětné vazby mezi spinálními motorickými neurony se udržuje svalový tonus¹⁰ a trofické procesy na vyšší úrovni než v klidu. Toho lze využít v klinické praxi, zejména při snížení hybnosti. Zvláště u dětí s neurologickým onemocněním podprahová stimulace podporuje růst neuronů a vývin svalů [10], [11].

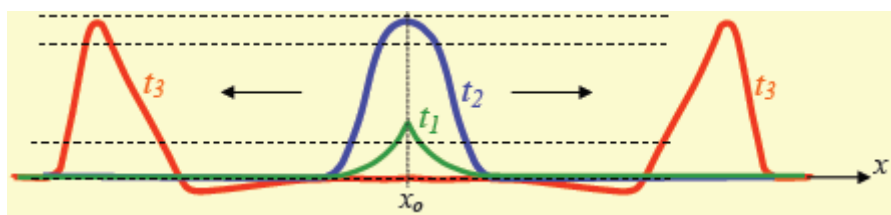
Jak bylo řečeno, práh podráždění záleží na kombinaci několika parametrů impulsu, nikoliv jen na jednom z nich. Impuls může být podprahový svou amplitudou, trváním či frekvencí. Např. krátce trvající velmi malé napěťové gradienty nevyvolají vznik AN, avšak mohou vyvolat vzruch buňky, pokud bude proud procházet po dlouhou dobu. Tyto polarizující proudy mohou být malé asi $5 \cdot 10^{-10}$ A [15].

3.3 Prahová stimulace

Při prahové stimulaci je již možné zaznamenat stah stimulovaného svalu. Účinek spočívá v eferentní stimulaci a navíc přímo ovlivňuje nervosvalovou strukturu. Využívá se u elektrické masáže, při níž stimulační impulsy vyvolávají fascikulární¹¹ záškuby svalových vláken, ale sval se nenapíná ani nedochází k pohybu v kloubu. Elektrická masáž zlepšuje funkční parametry svalu a může částečně nahradit pohybový trénink. [6]

3.4 Nadprahová stimulace

Při nadprahové stimulaci je stah stimulovaného svalu podstatně silnější než stah při prahovém režimu stimulace. Účinek působení je stejný jako u prahové stimulace s tím rozdílem, že ovlivnění nervosvalové struktury je silnější.



Obrázek 15: Prostorové rozložení a časový průběh membránového napětí nervového vlákna jako odpověď na podprahové (t_1) a nadprahové (t_2) dráždění [4]; podprahový impuls je příliš slabý, aby se šířil dál, proto dojde k jeho útlumu, zatímco odezva na nadprahový impuls AN (t_3) se šíří vláknem oběma směry bez útlumu.

⁹ Tj. vývodný. Eferentní nervy vedou podněty z centrální nervové soustavy do periferie, např. z míchy do svalů.

¹⁰ Napětí svalu, tj. síla stahu na jednotku průřezu. Tonus kosterního svalstva je řízen nervy a nervovými podněty z CNS, jejichž poruchy mohou tonus zvyšovat – hypertonus (např. u parkinsonismu), nebo snižovat – hypotonus (např. při přerušení nervu).

¹¹ Snopcovitý.

4 Obecné mechanismy působení elektrostimulace

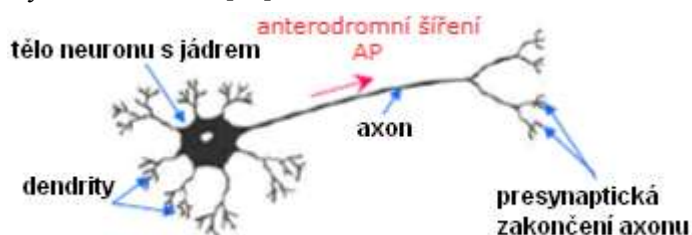
4.1 Mechanismus elektrické stimulace nervů a kosterního svalstva

I když se reakce tkání na elektrickou stimulaci liší, v principu spolu úzce souvisí, jak lze pozorovat u nervosvalových spojení. Specifickou reakcí kosterního svalstva na podráždění je její kontrakce. Svaly se skládají ze snopců svalových vláken, které jsou inervovány. Ke stahu dojde v okamžiku, kdy obdrží signál z nervové soustavy, zejména alfa-motorických neuronů míchy, nebo signál z neuronů, které byly uměle excitovány elektrickou stimulací [2].

Každý sval je inervován tonickými a fázickými neurony. Pouze jeden typ neuronu tvoří motorickou jednotku, proto přejímá i název a rozlišujeme tonická (rychlá) a fázická (pomalá) vlákna. Tonická vlákna se stahují pomaleji a uplatní se při dlouhodobé, nepřilíš intenzivní práci. Zkracování fázických vláken probíhá mnohem rychleji, mohou vytvářet silné tetanické stahy při vyšší frekvenci impulsů a rychleji se unavují [2]. Vysvětlení těchto rozdílů spočívá v odlišném prahu podráždění – tonické mají podstatně nižší práh podráždění než fázické [6].

Uměle vyvolaná kontrakce svalu může trvat déle a může se opakovat vícekrát než při spontánní aktivitě. Důvodem je rychlejší únava nervových center než svalů. Elektrickou stimulací lze navíc do práce zapojit všechna vlákna stimulovaného svalu, čehož běžnou aktivitou dosáhnout nelze [25], s výjimkou některých stresových stavů [6].

Nejcitlivější na podráždění elektrickou stimulací jsou motorická nervová zakončení v místech, kde větvení motorických axonů ztrácí myelin¹² [6]. Normálně se AN šíří anterodromně¹³, tedy postupuje dopředu po axonu k synapsi, tj. místu styku axonu jednoho neuronu s efektor¹⁴ nebo dalším neuronem. Tento způsob šíření je zajištěn refrakteritou každého úseku vlákna po proběhnutí AN [2]. Při přímém elektrickém dráždění svalových úseků bez nervů dorazí AN k synapsi¹⁵, kde podráždí zakončení motorických axonů, v nichž vznikne antidromní¹⁶ AN. Tento AN dospěje do místa rozvětvení nervových větví a v anterodromním směru dráždí svalová vlákna ve styčné ploše motorických zakončení [6]. S popsaným přenosem AN souvisí fakt, že axon má mnohem nižší práh podráždění než dendrity a tělo neuronu [15].



Obrázek 16: Anterodromní šíření AN nervovým vláknem [4]

¹² Lipidový obal nervových vláken axonů.

¹³ Fyziologické šíření vzruchu od těla neuronu po vodivém axonu k jeho zakončení.

¹⁴ Periferní tkáň, které přijímají nervové impulsy a reagují svalovou kontrakcí, sekrecí žláz či elektrickým výbojem.

¹⁵ Štěrbínové spojení mezi výběžkem nervové buňky neuronu a další nervovou buňkou, popř. svaem či žlázou. Uskutečňuje se zde přenos nervového vzruchu přivedeného jedním neuronem v podobě elektrických změn na buněčné membráně. Elektrické změny depolarizace vyvolají v zakončení neuronu uvolnění neurotransmiteru, který přejde přes synapsi a vyvolá opět elektrické změny na membráně následujícího neuronu, popř. svalu či žlázy. Další nervová buňka pak pokračuje ve vedení vzruchu, ve svalu dojde ke stahu, v žláze k sekreci.

¹⁶ Směřující opačně, než je normální, např. antidromní vedení impulsu axonem směrem k tělu nervové buňky.

4.2 Mechanismus vlivu elektrostimulace na cévy

O mechanismu vlivu elektrického proudu na cévy panují dohady. Jednou verzí je, že elektrostimulace ovlivňuje sympatickou¹⁷ část vegetativního¹⁸ nervového systému a dojde k vazodilataci¹⁹ s následnou hyperémií²⁰. Další možností je přímé působení elektrostimulace na vazomotorické²¹ nervy nebo cestou axonového reflexu. Vazodilatační účinek též podporuje uvolnění aktivně působících látek ve tkáních, např. histaminu a oxidu dusíku [27]. Fyziologický účinek je určen opakovacím kmitočtem, intenzitou proudu a dobou jeho působení. [6]

Vznik hyperémie způsobené stahem svalů lze připodobnit měření tlaku s nafukovací manžetou. Během fáze stahu svalu dojde k úplnému uzavření cév stlačením, při povolení svalu nastává prudké zesílení průtoku krve s následnou hyperémií, která je tím větší, čím silnější je stah svalu. Nezůstává pouze u dilatace svalových kapilár, ale šíří se i k velkým cévám stimulované oblasti. Tím dojde k lepšímu prokrvení jak svalů, tak i přilehlých tkání.

Při onemocnění se elektrostimulací rovněž zrychluje tok lymfy, zlepši se tím odvod toxických látek, zmenší se zánětlivost, odstraňuje se anoxie²² tkání, dojde k efektivnější výměně elektrolytů a regeneraci tkání. Vazodilatační účinek byl prokázán metodami kapilaroskopie²³, oscilografie²⁴, reografie²⁵, arteriografie²⁶, měřením teploty kůže a stanovením průtoku krve pomocí radioizotopů. [6]

4.3 Mechanismus vzniku bolest-tišícího účinku

Bolest je nepříjemným pocitovým projevem aktuálního nebo potenciačního poškození tkání. Může být různé povahy i intenzity a obvykle úzce koreluje s místem svého vzniku, proto je aplikace elektrostimulace neúčinnější v tomto místě. Podráždění, vyvolávající bolestivé pocity, přijímají receptory, volná nervová zakončení. Vedení informací z receptorů je zprostředkováno buď rychle vodivými A-delta vlákny (ostrá, dobře lokalizovatelná bolest) nebo pomalejšími nemyelinizovanými C vlákny (tupá, špatně lokalizovatelná bolest). Na úrovni zadních rohů míšních je informace modifikována a vedena dále do thalamu a do mozkové kůry [8].

Bolestivé impulsy lze na libovolném úseku této dráhy přenosu z periferie do centra přerušit např. anestetiky nebo narkotiky [6]. Z tohoto pohledu představuje elektrostimulace nejvíce fyziologické ticho bolesti, neboť v konečném důsledku vytváří impulsy, které potlačují či úplně blokují šíření bolestivých impulsů. Jde o tzv. *vrátkovou teorii tlumení bolesti*, která je neúčinnější při použití frekvence impulsů kolem 100 Hz. Další možností je humorální teorie bolesti, známá rovněž jako *endorfinová*. Drážděním C vláken proudem s nižší frekvencí 2 – 8 Hz a vyšší intenzitou se ve stimulované tkáni zvýší sekrece endorfinů a enkefalinů, látek s výrazným analgetickým účinkem [9].

¹⁷ Sympatický nervový systém, část autonomního nervstva.

¹⁸ Autonomní nervový systém (sympatikus, parasympatikus), řídí základní životní funkce nezávisle na naší vůli.

¹⁹ Rozšíření cév.

²⁰ Překrvení tkáně nebo orgánu.

²¹ Umožňující zúžit nebo rozšířit průsvit cévy.

²² Nedostatečné okysličení tkání.

²³ Mikroskopické vyšetření vlásečnic.

²⁴ Metoda zachycující graficky pulsaci na končetinách.

²⁵ Typ impedanční pletyzmografie, sledující změny elektrické vodivosti, které závisí na krevní náplni zkoumané oblasti.

²⁶ Rentgenové vyšetření tepen s užitím kontrastní látky.

Jinou možností vysvětlení tlumení bolesti je *teorie kódů*, která předpokládá, že informace z periferie do centra je přenášena ve formě kódu a výsledný pocit vzniká v mozku dekodováním [8].

4.4 Mechanismus antispastického působení

Myorelaxační účinek vykazují proudy nízkých frekvencí s nadprahově motorickou intenzitou [7], [8], [6]. Spasticitu je možné snížit několika způsoby. Buď se provádí stimulace jen spastických svalů, elektrogymnastika svalů-antagonistů²⁷ nebo pomocí „spřažených“ impulsů [8]. Nejefektivnější se zdá být poslední varianta. Vhodným umístěním elektrod a časovým posunutím elektrické stimulace můžeme zároveň stimulovat agonisty²⁸ i antagonisty. Účinek je pak dvojitý. Jednak dochází k útlumu motorických neuronů, které inervují spastické svaly, a jednak ke stimulaci antagonistů. Vzájemné vztahy mezi svaly agonisty a antagonisty se tak zlepšují a zajišťují lepší koordinaci pohybu [6].

²⁷ Působící opačně, protichůdně.

²⁸ Působící stejně.

5 Šířka impulsu a jeho využití v terapii

5.1 Milisekundové impulsy

Právě impulsy milisekundové používá většina klasických metod elektroterapie. Patří zde zejména nízkofrekvenční proudy – Leducův, Träbertův, Faradayův, diodynamické proudy a H-vlny. Jejich společné účinky jsou převážně analgetické a hyperemizační. Typický mechanismus působení souvisí také s jejich nízkou frekvencí (max. 1 kHz), která podpoří dráždění nervových vláken [7].

5.2 Mikrosekundové impulsy

Mikrosekundové trvání impulsů se volí tam, kde je potřeba použít podnět silnější intenzity. Mikrosekundový impuls, byť se silnou intenzitou, nevyvolá nepříjemné pocity do takové míry jako impuls o tři řády delšího trvání.

5.2.1 *Transkutánní elektrická neurostimulace (TENS²⁹)*

Mikrosekundové impulsy jsou typické pro TENS, která využívá intenzit nadprahově senzitivních nebo až na prahu tolerance (80 mA [20]). Název TENS je nepřesný a má spíše historický význam, neboť drtivá většina elektroterapeutických metod je prováděna transkutánně, avšak s jinými parametry impulsů. Z dosavadních výsledků se TENS jeví účinná zejména pro redukci chronické bolesti různého původu a přináší úlevu při pocitech úporného svědění, zvláště u hojících se popálenin. Účinky jsou vysvětlovány vrátkovou teorií, teorií kódů a endorfinovou teorií [7]. Předpokládá se, že TENS zvyšuje hladinu endorfinů, a tak může přinášet dočasnou úlevu. Dále stimuluje A-beta nervová vlákna, potlačující bolest, k překonání C vláken, nesoucích informaci o bolesti [20]. Bohužel při delší aplikaci dochází k adaptaci tkání, a to vyžaduje zvyšování intenzity [7]. Zde se nabízí řešení pomocí modulace šířky impulsů, která je prevencí přizpůsobení tkáně dráždivému stimulu. Zároveň se podpoří stimulace svalu, která přinese zvýšení krevního průtoku a snížení lokální anoxie v malých cévách (příčina bolesti) [24].

5.2.2 *Neuromuskulární (NMES³⁰) a Funkční elektrická stimulace (FES³¹)*

Mikrosekundové pulzy rovněž používají metody NMES a FES. Do značné míry jsou si velmi podobné s tím, že FES je již vysoce specializována pro řešení nervosvalové dysfunkce zejména použitím neuroprotéz. Prostřednictvím povrchových nebo vnitřních elektrod se aplikuje proud takových vlastností, aby vyvolal svalovou kontrakci. V současnosti je NMES doporučována pro léčbu celé řady zdravotních problémů jako je svalová atrofie³² a narušení motorického řízení spojeného s ortopedickým a neurologickým poškozením, inkontinence, léčba oběhových poškození, pohybové dysfunkce kloubů a potíží s držením těla, léčba otoků, zánětlivých projevů, pomalu se hojících ran a vředů [21].

²⁹ z angl. Transcutaneous Electrical NeuroStimulation

³⁰ z angl. NeuroMuscular Electric Stimulation

³¹ z angl. Functional Electric Stimulation

³² Regresivní zmenšení normálně vyvinutého svalu.

Zejména velký přínos představují neuroprotezy, které beze sporu zkvalitňují život lidí s vážnými pohybovými potížemi, např. po mrtvici a zranění míchy [21]. V souvislosti s takto postiženými pacienty byl řešen problém s umístěním elektrod do optimální polohy, neboť je těžké predikovat, které anatomické struktury budou aktivovány při dané pozici a elektrické konfiguraci. Navíc je potřeba zajistit stabilitu reprodukovatelnosti i po posunutí elektrod při pohybu. Řešení vedlo k vývoji multi-elektrodových matic, skládajících se z mnoha elementů, které mohou být individuálně aktivované pro vytvoření tzv. virtuální elektrody s libovolnou velikostí a umístěním (mechanismus dynamické adaptace) [22]. Nedávno byly s úspěchem vyzkoušeny i speciálně sestavené, komplexní tvary impulsů, např. kvazitrapezoidální, pro selektivní stimulaci nervových vláken, což přináší preciznější aktivaci svalů [23]. Problémem ale zůstává optimální nastavení parametrů pro dosažení požadované síly stahu svalu.

Různé kombinace stimulačních parametrů mají ve výsledku dost odlišnou sílu stahu, kterou je těžké odhadnout vzhledem k mnoha nejasnostem ve svalové fyziologii. Existují však metody, které tuto míru nejistoty částečně kompenzují. Jedná se o „feedback“ metody, adaptivní metody typu neuronové sítě nebo metoda hledání extrému. Poslední metoda byla velmi úspěšná v nalezení optimálních parametrů (100 μ s, 20 Hz, kladný pravoúhlý impuls) pro NMES čtyřhlavého stehenního svalu, při níž dojde k požadovanému ohnutí v kolenu [21].

NMES však zdaleka nemusí být použita jen pro léčbu svalových dysfunkcí. Krátkodobé cvičení s NMES se ukázalo jako velmi atraktivní nástroj pro zvýšení svalového výkonu u zdravých lidí i trénovaných atletů. Na druhou stranu je však znám vliv stimulace na svalovou únavu. Dalšími omezeními jsou bolest a nepříjemné pocity při stimulaci. I z hlediska zlepšení svalové kapacity, elektrostimulace není tak efektivní jako dobrovolné cvičení, i když dokáže zapojit svaly, které běžnou aktivitou zapojit nelze [25].

V rehabilitaci souvisí účinek NMES na sílu stahu s dávkou – silnější elektrický podnět vyvolá větší stah. Jsou zde však dvě omezení. Intenzita musí být podřízena úrovni, kterou pacient snese bez větších obtíží. Dalším limitujícím faktorem je svalová únavu, představující dočasnou ztrátu nebo snížení schopnosti generovat další silný stah vzhledem k předchozím kontrakcím. Únava způsobená NMES přichází rychleji než při volní činnosti. Při běžném cvičení se totiž do práce zapojí nejdříve svalová vlákna únavě rezistentní, a to s frekvencí nepřesahující 30 Hz, k udržení stahu pak stačí frekvence nižší. U NMES je však pořadí aktivace motorických jednotek buď náhodné, nebo začíná od vláken rychle se unavujících. Navíc pro dosažení kontrakce maximální síly pomocí NMES, je potřeba použít mnohem vyšší frekvenci, cca 50 – 80 Hz. Proto se objevila snaha nalézt optimální stimulační charakteristiky evokující silnou kontrakci při minimální svalové únavě a nepohodlí. Úspěšné řešení nabízí modulace impulsů do krátkých salv s použitím nižší frekvence (viz kap. 6.2) [26].

5.2.3 Mikroelektrostimulace (MET³³, MENS³⁴)

Mikroelektrostimulace je známá rovněž jako Mikroprroudová elektrická terapie, zkr. MET, nebo Mikroelektro-neurostimulace, zkr. MENS. Společné slovíčko „mikro“ napovídá, že jde o metodu, používající extrémně malých hodnot elektrických proudů blízkých se pouhé miliontině ampéru.

³³ z angl. Microcurrent ElectroTherapy

³⁴ z angl. MicroElectroNeuroStimulation

Podobné mikroampérové hodnoty je možné naměřit u každého z nás, resp. i u zvířat, neboť tvoří přirozené elektromagnetické pole organismu. Proto je tato metoda nazývána též Biostimulací.

Proudy pro MET jsou až 1000krát menší než u TENS a pod prahem vnímání, proto doba aplikace impulsů může být mnohem delší než u jiných metod, typicky kolem 0,5 sekundy, což je naopak 2500krát déle než u TENS. Dokonce jsou popsány lepší účinky MET při léčbě bolesti v porovnání s TENS. Může jít o bolest různého původu, neboť zároveň zmírňuje zánět, otok, rozvíjí pohybové možnosti, sílu a relaxaci svalů. Pozitivně se projevuje při léčbě bolestí hlavy, syndromu temporomandibulárního kloubu, neuropatie³⁵, artritidy³⁶, burzitidy³⁷ a tendinitidy³⁸. Zkušenosti poukazují na podpůrný efekt terapie u bolesti uší, krku, zubů, zánětu spojivek virového nebo alergického původu, post-herpetické neuralgie³⁹, vředů, spasticity po cévní mozkové příhodě aj. MET byla dokonce s úspěchem vyzkoušena k tlášení bolesti u pacientů s rakovinou hlavy a krku, a to i v případech, kdy byla bolest rezistentní na podání morfinu [20].

Asi největším a jedinečným přínosem MET je pozitivní vliv na hojení ran. Účinky MET vyplývají ze schopnosti malých proudů ovlivňovat buněčnou fyziologii a růst buňky. Zranění mění elektrický potenciál buněk poraněné tkáně. Poraněná tkáň má zpočátku vyšší elektrický odpor než okolní zdravá tkáň [27], [20]. Jakmile tok iontů narazí na větší rezistenci membrány, začne si hledat jinou cestu, a to cestu nejmenšího odporu, čímž docílí přemostění poraněné tkáně pomocí krevního oběhu. Obstrukce bioelektrického proudu omezuje krevní zásobení, tedy přívod kyslíku a dodání živin do tkáně, snižuje buněčnou kapacitanci a vede k celkovému oslabení hojení. V tkáni se hromadí metabolické odpadní produkty, vzniká lokální hypoxie a ischemie. Typickým indikátorem tohoto stavu je bolest [20].

Proces hojení vyžaduje účast adenosintrifosfátu (ATP), jenž slouží především k pokrytí veškerých energetických nároků buňky. Zraněná tkáň však trpí nedostatkem ATP. Neinvazivně a externě aplikovaný mikroproud napomáhá doplnit ATP a překonat impedanční bariéru narušené tkáně. Tím se významně podpoří obnovení homeostázy, doprava živin do poškozených buněk a odvod odpadních látek ven. Důležitým faktorem je zde intenzita proudu, neboť proud větší než 1000 μA produkci ATP snižuje. Největší kumulace ATP ve tkáních lze dosáhnout aplikací proudu v rozmezí 10 μA až 500 μA [34]. Zvýšená produkce ATP působením MET (až o 500% [20]) poskytuje energii, kterou tkáň potřebují pro celkovou regeneraci, tzn. syntézu nových proteinů, zejména formaci kolagenu, hlavní stavební prvek kůže, šlach, kostí, chrupavek a jiných pojivových tkání. Stejně jako u krevního oběhu je podpořen i tok lymfy. Všechny tyto procesy se spolu podílejí na výstavbě zdravé tkáně.

Kolem přesného mechanismu působení MET stále zůstává mnoho otazníků. Nejvíce se přiklání k variantě, že dochází k aktivaci signálních drah. Byly zkoumány možné principy vlivu na regeneraci tkání. Působením na syntázu oxidu dusičného N_2O_5 , která reguluje jeho produkci, je možné podpořit hojení šlach, neboť N_2O_5 se jej aktivně účastní [28]. MET zvyšuje koncentraci růstového faktoru $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) a růstového faktoru II podobného inzulinu, které jsou spojeny s proliferací buněk

³⁵ Blíže nespecifikované onemocnění nervů.

³⁶ Zánět kloubů.

³⁷ Zánět těhového vřáku.

³⁸ Zánět šlachy.

³⁹ Neuralgie (bolest nervového původu) v místě pásového oparu.

kostí [29]. Stimulace progenitorových⁴⁰ buněk urychluje proces endochondrální osifikace⁴¹ [30]. Důležitou roli může hrát i fáze buněčného cyklu, která má vliv na vnímání extracelulárních signálů. Např. buňky v G0 fázi (klidové) a G1 fázi (přípravné) mohou podstoupit dělení jen v případě, že obdrží specifické signály zvnějšku [1]. Právě MET může podpořit vstup buňky do aktivní fáze vedoucí k dělení.

Vedle příznivých účinků MET na buněčnou proliferaci a zvýšení syntézy DNA a proteinů [27], [32], se však objevuje podezření i na negativní dopad stimulace. Studie, zabývající se příznivými účinky MET, se zaměřila i na sledování úrovně apoptózy⁴² buněk, která je v procesu hojení nežádoucí. Pokus byl prováděn na kultuře koňských tenocytů in vitro. Výsledky poukazují na zásadní vliv intenzity použitého proudu a počtu aplikací na úroveň apoptózy buněk. Tenocyty vykazaly mnohem větší odolnost při stimulaci vyšší intenzitou (> 1 mA) po krátkou dobu, než opakované vystavení stimulaci proudem nižší intenzity (0,05 – 1 mA) [27]. I s přihlédnutím k tomuto faktu je MET největší nadějí pro regeneraci šlach u koní ve srovnání s jinými testovanými elektroterapeutickými metodami [36]. Právě šlachy jsou u závodních koní nejnáchylnější ke zranění, které má často přinejmenším trvalé následky. Tkáň šlach je typická špatnou hojivostí a místo plně funkční tkáně dochází k její náhradě podstatně nekvalitnější, vazivovou tkání. Ve studii [35] bylo oproti předchozí zařazeno i měření na živém koni a poukázalo na zásadní vliv umístění elektrod na končetinu koně na výsledek celé terapie.

Ve studii [37] je urychlující účinek MET na hojení ran vysvětlován jeho předpokládanou antioxidační vlastností. K léčbě pomocí MET byli určeni pacienti s diabetem, hypertenzí a nehojícími se ránami. V patogenezi těchto onemocnění hraje významnou roli oxidační stres, který může MET příznivě ovlivnit. Ještě lepšího výsledku v hojení ran bylo dosaženo kombinací MET s fytoterapií, konkrétně bylo použito extraktu z listu orchideje *Oncidium flexuosum*. Spojením příznivých účinků slabého elektrického proudu s antioxidačními, antibakteriálními, fungicidními a protizánětlivými vlastnostmi rostliny se terapie stává mnohem účinnější v porovnání nejen s kontrolní skupinou, ale i s terapiemi aplikovanými samostatně [31].

Netradičním způsobem byl otestován vliv MET na zánět tkáně, vyvolaný ultrafialovým zářením UVB. UV záření spouští uvolnění prostaglandinů a zánětlivých mediátorů, způsobujících zánětlivou reakci, kterou můžeme pozorovat na pokožce jako erytém (zčervenání) a změnu pigmentace. MET působí jako přesný antagonist UVB záření [32]. Výhodou této studie je, že testování bylo provedeno přímo na lidských subjektech. Převážná většina studií totiž využívá zvířecích modelů nebo buněčných kultur. Avšak vzhledem k tomu, že zvířata mají větší potenciál pro samohojení než lidé [20], je těžké závěry těchto studií s jistotou vztáhnout i na člověka.

Nečekaně pozitivního výsledku bylo dosaženo použitím MET k léčbě obezity [34]. Obézní ženy opakovaně absolvovaly cvičení se speciálně upravenými botami, generujícími mikroproudy. Po 4 týdnech byl vyhodnocen prokazatelný účinek na redukci hmotnosti a břišního tuku, ačkoliv krevní testy hladin jednotlivých typů cholesterolu neprokázaly žádný významný rozdíl mezi placebo a testovanou skupinou.

⁴⁰ Buňky stále schopné množit se a dát tak vznik dalším progenitorovým buňkám.

⁴¹ Postupná přeměna obou chrupavčitých konců diafýzy v kost.

⁴² Naprogramovaná buněčná smrt.

5.2.4 Vysokonapět'ová terapie (HVPC⁴³)

Vysokonapět'ová terapie aplikuje pulzní proud s nízkou intenzitou, krátkou dobou trvání (10 – 30 μ s), ale s napětím mnohem vyšším (až 500 V), čímž se vymyká ostatním elektroterapeutickým metodám. Přístroj pro HVPC musí pracovat v režimu konstantního napětí [7]. Zdroj napětí je schopen dodat velký proud, který by v případě poruchy časování výstupu mohl představovat značné nebezpečí. Proto zdroj napětí nesmí být ideální, ale musí mít vnitřní odpor. Velikost proudu, dopraveného do tkáně, dále závisí na impedanci rozhraní elektroda-kůže. Impedance vzrůstá s tím, jak elektrody vysychají nebo ztrácí kontakt s pokožkou, proud se snižuje a minimalizuje se tím možnost popálení kůže následkem vysoké proudové hustoty [22]. Intenzita stimulace je obvykle prahově až nadprahově motorická. Frekvence impulsů může být konstantní nebo modulovaná a přímo ovlivňuje sílu myorelaxačního a analgetického účinku [7]. HVPC má dále účinek vazodilatační, spojený s účinky na redukci otoku, regeneraci tkání a snižování bolesti [38]. HVPC nezůstává v pozadí ani v léčbě kožních ran, zejména dekubitálních vředů [39], žilních vředů [40] a tzv. diabetické nohy [41]. HVPC s trváním impulsů ještě kratším, řádově jednotky až stovky nanosekund, ale s intenzitou mnohem silnější, řádově v kilovoltech, má pak naprosto jiné využití (viz dále), založené na penetraci (pronikání) do živých buněk a permeabilizaci intracelulárních organel [18].

5.3 Nanosekundové impulsy

Výzkumy poslední doby se věnují zejména sledování účinků nanosekundových impulsů, neboť se ukázalo, že mohou být jedinečným nástrojem k vyvolání řady specifických buněčných odpovědí. Vedle elektroporace může jít o elektricky řízené uvolňování intracelulárního vápníku, dočasné blokování AN nervových vláken, aktivaci krevních destiček pro urychlení hojení ran a dokonce redukci tumoru [16], [19]. Tyto tzv. bioefekty závisí na poměrně silné intenzitě aplikovaného pole a trvání impulsu. Buněčné odpovědi na impuls šířky 100 ns nebo 1 ns se mohou velmi lišit. Rozdíl plyne z dielektrických vlastností buněk (viz kap. 2.2) a je spojen s časem potřebným pro reorientaci dipólů uvnitř systému, zvláště u ultrarychlých pulsací. Například voda má dielektrický relaxační čas kolem 8 ps. Podobné relaxační procesy doprovází i přerovnávání různých molekul lipidů uvnitř membrány. Po aplikaci impulsů s trváním mnohem delším než 1 ns, tedy u konvenčních typů elektrostimulací, systém přejde do ustáleného stavu. Při použití elektrických impulsů kratších než 1 ns není dostatek času pro kumulaci náboje či kompletní reorientaci dipólů uvnitř vodného média, resp. membránových uhlovodíků. Ultrarychlými pulsacemi je tedy možné měnit elektrické parametry biosystému, které jsou odlišné od těch v ustáleném stavu [16].

Existují tři hlavní důvody, proč se zabývat velmi krátkými průběhy impulsů:

- a) V tzv. přechodném režimu lze udržováním nerovnovážných dielektrických parametrů prostředí a aplikací silných elektrických polí dosáhnout silnější biologické odpovědi.
- b) Impulsy v nanosekundovém rozsahu umožňují posunout úroveň interakce elektrického pole s buňkou, a to z plazmatické membrány až k subcelulárním strukturám. K tomu je potřeba splnit požadavky na trvání impulsu. Pro savčí buňky vyhovují hodnoty kratší jak 1 ns.

⁴³ z angl. High Voltage Pulsed Current

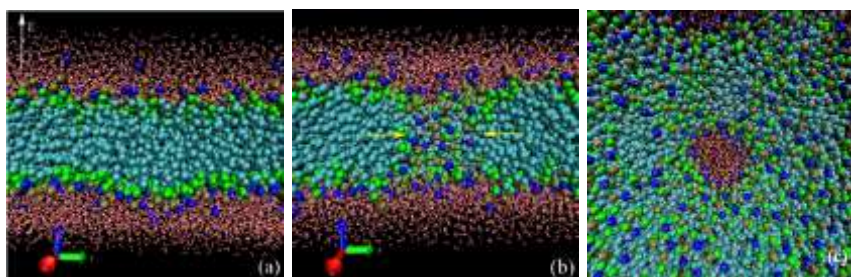
Možnost použití antén k vysílání ns-impulsů by mohlo být velkým přínosem, neboť používání kontaktních elektrod některé aplikace současné terapie značně omezuje. Účinek terapie závisí na velmi dobrém kontaktu elektrod s cílovou tkání a toho není vždy možné dosáhnout [18]. Antény by umožnily elektrickému poli proniknout do tkání, které nejsou snadno přístupné ani jehlovými elektrodami. Velmi perspektivní v tomto směru se jeví léčba nádorů [13], [16], [17], [18], [19].

5.3.1 IRA antény

Tzv. IRA antény (impulzní radiační antény) představují nový, neinvazivní způsob aplikace pulzního elektrického pole velké intenzity zejména pro léčbu rakoviny kůže. Generují sub-nanosekundové impulsy, které je možné s pomocí fokuzujících elektromagnetických čoček dopravit do tkáně s přesností na milimetry, čímž se redukuje poškození okolní zdravé tkáně. Pulzující elektrické pole způsobí smrštění buněk tkáně, až kompletní eliminaci melanomu. Používá se velmi vysoké napětí, řádově desítek kV. Sub-nanosekundové impulsy projdou do cytoplasmy snadněji než delší impulsy, neboť jejich nástupní hrana je mnohem kratší než čas potřebný pro nabití membrány (≈ 100 ns) [19]. Dlouhé impulsy naopak způsobí pouze nabití buněčné membrány podobně jako u kondenzátoru a elektrické pole mezi subcelulárními membránami bude téměř nulové pro silně izolační vlastnost vnější membrány.

5.3.2 Elektroporace

Jestliže amplituda impulsů překoná práh potřebný pro napěťové vrátkování iontových kanálů, ale s trváním kratším než nabíjecí doba plazmatické membrány, pak dochází k jevu zvaném elektroporace (EP). EP vytváří otvory v buněčné membráně, dovolující velkým molekulám proniknout membránou. Tím má EP důležité praktické využití v chemoterapii a genové inzerci. Umožňuje dopravu léků nebo nanočástic do buňky bez výrazného ohrožení buňky na životě. EP je reverzibilní, nicméně nepřiměřeně dlouhé udržování pórů v membráně může vést k apoptóze [13], [17], [19]. Mechanismus účinku pak lze přirovnat k zániku, který nastává po ozáření buněk ionizujícím zářením.



Obrázek 17: Modelování formace nanopóru v membráně [19]

(a) vystavení membrány působení el. pole s intenzitou $E = 0,5$ V/nm; počáteční rozložení membrány jako lipidové dvojvrstvy (polární části - zelené, nepolární řetězce – světle modré) s vodným prostředím okolo (červené)

(b) přeskupování molekul k vytvoření póru

(c) pohled shora na vzniklý pór

Pokud je nástupní hrana impulsu kratší než 10 ns, ionty v cytoplasmě nestihnou migrovat k plazmatické membráně a aplikované elektrické pole je schopno proniknout membránou a ovlivnit přímo intracelulární struktury. Může dojít k EP na subcelulárních membránách a lze manipulovat s intracelulárními strukturami, např. vložení modifikované DNA nebo likvidace rakovinných buněk [17], [12].

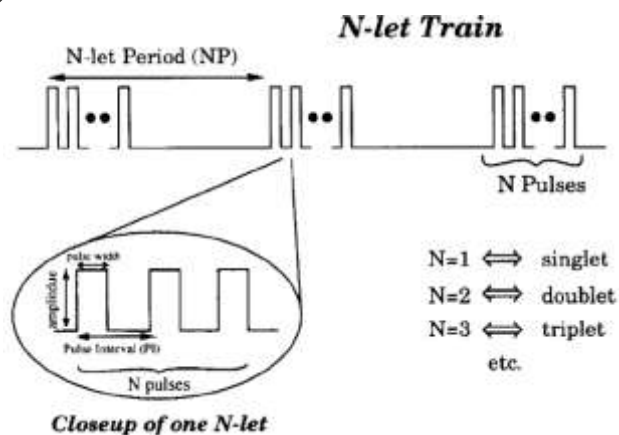
6 Terapie salvami impulsů („burst“ terapie)

V některých aplikacích se místo klasické stimulace jednotlivými impulsy s přesně stanovenou frekvencí, tvarem, šířkou a periodou osvědčily různé typy modulací (amplitudová, frekvenční) nebo použití několika stejných, obvykle podprahových, impulsů uspořádaných do řady (salvy, angl. *burst*, *train*), která se opakuje s nastavenou pracovní frekvencí.

6.1 Teorie skládání podprahových impulsů

Jako první předložil vysvětlení sumace podprahových impulsů Gildemeister ve 30. letech minulého století [42]. Stimulací střídavým proudem, který je uspořádán do salv impulsů s kHz-frekvencí, lze vyvolat subjektivní pocit, jenž velmi závisí na trvání celé salvy, tzn. na počtu cyklů v jedné salvě, ale také na frekvenci střídavého proudu. Frekvence proudu je velmi důležitá, neboť membrána nervového vlákna se chová jako usměřňovač [14] a s každým následujícím impulzem v salvě je vlákno blíže ke své prahové hodnotě. Prahu membrány je dosaženo v okamžiku, kdy sumace impulsů vyvrcholí v dostatečnou depolarizaci k vytvoření AN. Celkový počet AN pak odpovídá počtu salv [26].

Kvantitativní demonstrací tohoto efektu se zabývali Schwarz a Volkmer, kteří měřili změny membránového potenciálu izolovaných nervových buněk v závislosti na stimulaci impulsy s nosnou kHz-frekvencí uspořádanými do salv. Sumační efekt vyžaduje, aby impulsy po sobě následovaly dostatečně rychle tak, že membrána nebude mít mezi jednotlivými impulsy čas k zotavení. Pokud se tedy membrána nervového vlákna podrobí podprahové polarizaci a další pulsy série přicházejí v refraktorní fázi před tím, než se změny iontových koncentrací stačí vrátit do původního stavu, dochází ke sčítání těchto změn a vzniku impulsu AN. Depolarizace v důsledku sumace podprahových impulsů je očekávána na vyšších kHz-frekvencích [43]. Výhodou vysoké nosné frekvence je snadnější penetrace do tkání, lze upravit intenzitu modulací šířky salv a vedle toho i vlastní pracovní frekvenci salv. Obálku jedné salvy impulsů je možno chápat svým způsobem jako obdobu jednoho stimulačního impulsu při klasické elektroterapii. Tomu odpovídá i zjištění, že prahové napětí klesá s rostoucím počtem impulsů v jedné sérii, tj. s trváním salvy [26], podobně jako je tomu u stimulace klasickými impulsy (viz Obrázek 12).



Obrázek 18: Stimulace N-let salvami [49]

Jednu salvu tvoří řada N stimulačních impulsů. Každý impuls je popsán svou amplitudou (PA) a šířkou (PW). Perioda (PI) je interval mezi jednotlivými impulsy v řadě a může se měnit mezi různými salvami. N-let perioda (NP) je interval mezi začátky dvou následujících salv.

6.2 Aplikace

Velkým problémem u FES je brzká svalová únava. Jejím snížením se zabývala již celá řada studií a výsledky některých jsou dosti variabilní zejména vzhledem k různým parametrům testovaného proudu. Chování všech typů impulsů ještě zdaleka není zmapované. Jedna studie poukázala na dubletový, resp. tripletový efekt, v souvislosti s nelineární svalovou sumací [47]. Konvenční stimulaci s konstantními pulsy tak lze nahradit stimulací pulzujícími řadami ve dvou nebo třech salvách s následnými delšími klidovými intervaly. Dublety impulsů se u člověka vyskytují i přirozeně při pohybu, zvláště u balistických pohybů⁴⁴ a při třesu [49].

Nejznámější klinicky používanou metodou pro zpevnění svalů je tzv. ruský (Kotzův) proud, využívající sinusového střídavého proudu s frekvencí 2500 Hz, uspořádaného do salv s frekvencí 50 Hz a poměrem šířky impulsu : šířka mezery = 1:1. Některé studie však ukazují na podstatně nižší účinnost této terapie na sílu kontrakce ve srovnání s nízkofrekvenčním pulzním proudem [26]. Úroveň únavy, způsobenou kHz-proudem, lze účinně redukovat, neboť se ukázalo, že je vztažena k celkovému počtu impulsů spíše než k počtu salv [49]. Při srovnání dvou kHz-proudů se stejnou frekvencí salv 50 Hz, ale různým počtem impulsů v salvě, se projevil menší vliv na únavu při stimulaci s kratším trváním salvy (tzn. s méně cykly v salvě). Navíc výsledky studie [26] silně nasvědčují tomu, že u intenzit vyvolávajících silné svalové kontrakce, stačí k sumaci impulsů a vzniku AN pouze pár cyklů uvnitř salvy. Úroveň únavy klesá monotónně v rozsahu stimulačních frekvencí od 1 kHz k 10 kHz, neboť dochází k selektivnímu vyřazení rychlých nervových vláken a zůstává vyšší podíl pomalých vláken, které jsou únavě rezistentní [44].

U FES se obvykle používají impulsy konstantní frekvence a pro vytvoření silnějšího podnětu se zvyšuje pouze intenzita proudu. Sílu podnětu je třeba zvýšit z toho důvodu, že se sval dosavadní stimulací unavuje a nereaguje stále stejně. Nabízí se však efektivnější řešení v podobě skokově se měnící frekvence impulsů, popř. v kombinaci s modulací šířky impulsů [46]. Všechny studie ale zároveň důrazně upozorňují na to, že odpověď zdravých jedinců a pacientů s různým stupněm poškození svalů se velmi liší, proto stejný způsob stimulace nemusí mít zdaleka podobné výsledky u skupin pacientů s rozdílnou diagnózou.

Salvy mohou být tvořeny jak bifázickými, tak monofázickými impulsy. Co se týče FES, experimenty ukazují na nejlepší účinnost monofázických, pravoúhlých impulsů, neboť mají nejnižší práh pro vznik AN [48]. Velmi dobré výsledky terapie salvami impulsů byly zaznamenány v prevenci žilních trombóz⁴⁵ u ortopedických pacientů a pooperačních případů, kde dosáhla až třikrát větší účinnosti v porovnání s terapií jednotlivými impulsy [50]. Nové možnosti podprahové stimulace salvami impulsů se ukrývají v léčbě různých typů arytmií jako je komorová či síňová tachykardie [51]. V poslední studii provedené na srdcích morčat se salvou podprahových impulsů, aplikovanou katetrovými elektrodami zavedenými v endokardiu⁴⁶ levé komory, se podařilo velmi dobře blokovat komorovou tachykardii a dokonce zabránit pozdějšímu vzniku fibrilace komor. Terapie salvami impulsů má rovněž výrazný analgetický účinek, vysvětlovaný vrátkovou a endorfinovou teorií. Obrovskou výhodou terapie je fakt, že stimulací nedochází ke zjevné adaptaci tkání [7].

⁴⁴ Obvykle patologické, prudké, rychlé pohyby často horních končetin.

⁴⁵ Srážení krve v cévách v důsledku poruchy regulace hemostatických procesů.

⁴⁶ Srdeční nitroblána.

7 Cytotoxicita elektrostimulace

Bohužel elektrostimulace nevyvíká jen svými léčebnými účinky, ale mohou se objevit i negativní důsledky, související s aplikovanou dávkou, oblastí stimulace a dalšími podmínkami. Nežádoucí vlivy lze pozorovat už na úrovni buňky a mohou se rozšířit do celé tkáně v závislosti na tom, jak se buňky s možným poškozením dokáží vypořádat.

Elektrický proud podporuje buněčnou proliferaci, ale stejně tak ji může blokovat. Proudů vysokých intenzit mají za následek zjevné poškození tkání s následnou nekrózou⁴⁷, zatímco proudy s intenzitou nižší mohou stimulovat buňky k apoptóze [27]. Apoptóza sice nezpůsobuje zánětlivou reakci, může však být nežádoucím jevem např. při hojení ran (viz kap. 5.2.3).

K elektrostimulaci buňky dochází změnou přirozeného transmembránového potenciálu o pouhých 10 až 20 mV, zatímco elektroporace (typická pro μ s- a ms-impulsy) nastane v okamžiku, kdy transmembránové napětí překročí 0,2 – 1 V. Jedinečnost elektroporace, vzniklé v důsledku stimulace ns-impulsy s vysokou intenzitou, spočívá v možnosti manipulovat s buněčnou fyziologií. Krátké trvání impulsu současně s vyšším napětím má za následek efektivnější nabíjení membrán buněčných organel a jejich rychlejší rozpad. Tímto způsobem lze narušit vnitřní strukturu buňky bez poškození vnější membrány a zamezit tak vzniku zánětlivé reakce. U polí velmi silných intenzit (200 – 300 kV/cm) můžeme navíc očekávat další specifické mechanismy, jakými jsou elektrolyza⁴⁸, elektrodissociace⁴⁹, buněčná elektrodeformace nebo mechanický stres v důsledku termoelastické expanze [53].

Negativní projevy lze pozorovat např. u FES, pokud není dodržena nábojová rovnováha, neboť nadměrná akumulace náboje vede k elektrolyze spojené s rozpouštěním elektrod a poškozením tkání [48], [52]. Tento problém lze vyřešit několika způsoby: použitím kapacitních elektrod, stimulací proudově vyváženými bifázickými impulsy, u implantabilních aplikací použitím náboj-vyvažujících technik (např. salva krátkých impulsů po každé stimulaci) [52].

Objevují se také studie poukazující na možné poškození svalů. Varující je případ rhabdomyolýzy⁵⁰ u muže, který neuváženě používal elektronický svalový stimulátor [57]. Mechanismus poškození plyne z vlastní izometrické⁵¹ kontrakce svalu. Stah v důsledku stimulace může způsobit svalové poškození srovnatelné s tím, které vznikne nadměrnou volní aktivitou [55]. Nicméně stupeň poškození se zmírňuje s další vlnou stimulace stejně tak, jako se opakovaným tréninkem snižuje bolestivé přetažení svalů po jednorázovém cvičení. Základní mechanismus tohoto jevu není zcela objasněn, ale hovoří se o kombinaci nervové, mechanické a buněčné adaptace. Další vysvětlení nabízí přetváření extracelulární matrix [56], které bylo zaznamenáno po stimulaci. Po zotavení z počátečního poškození se matrix svým způsobem posílí a vytvoří si ochranu před dalším poškozením. Zdá se tedy, že vážné poškození elektrickou stimulací je možné odvrátit použitím podobné strategie jako k minimalizaci poškození z namáhavého cvičení. Otázkou zůstává, zda se zavedením příslušných opatření bude výsledek elektrostimulačního tréninku dostačující, protože mírné narušení svalu se pro dosažení svalové hypertrofie⁵² a zesílení svalu očekává [55].

⁴⁷ Odumření tkáně, obvykle se zánětlivou reakcí.

⁴⁸ Rozklad elektrolytu průchodem stejnosměrného elektrického proudu.

⁴⁹ Rozpad molekuly na kladné a záporné ionty vlivem vnějšího elektrického pole.

⁵⁰ Tělesný stav, při kterém dochází k rychlému rozkladu tkáně kosterního svalstva.

⁵¹ Zvýšení napětí ve svaly, aniž by došlo ke změně jeho délky.

⁵² Zbytnění.

8 Specifikace mikrostimulátoru

8.1 Záměr

Od objevení prvních pozitivních účinků elektroterapie uplynula řada let. Na výrobě elektrostimulátorů rozjela spousta firem velký byznys a jeden typ přístroje byl doporučován k léčbě takřka všeho. Zde ale může dojít k velkému omylu, neboť jak je zřejmé z předchozí rešerše, i změna jediného parametru stimulace může mít při terapii zcela jiný efekt. Nelze tedy vyloučit ani negativní vliv stimulace, kterému se doposud nepřikládala příliš velká důležitost. Pravděpodobně i z toho důvodu se začíná v poslední době pozornost upírat na podprahovou stimulaci.

Návrh mikrostimulátoru navazuje na výsledek předchozí bakalářské práce. Opět by mělo jít o malý, přenosný, bateriově napájený přístroj s jednoduchou obsluhou. Všechny tyto vlastnosti jej předurčují i pro domácí použití. Pro pacienta tím odpadá nutnost častého docházení do zdravotnického zařízení, ale terapii může podle pokynů lékaře provádět v domácím prostředí sám.

Použití přístroje by nemělo být omezeno pouze na elektroterapii lidí. Naopak, zejména vzhledem k zamýšlenému konstrukčnímu řešení by mohl být vhodný i pro terapii zvířat, zvláště těch, která jsou lekavá a neklidná, s čímž souvisí i jejich nepředvídatelné chování. Typickými představiteli jsou například koně. Těžko si představit, že by kůň po delší dobu trpělivě stál a snesl napevno připevněné elektrody, které jsou kabely spojené s vlastním generátorem impulsů, často ne zrovna malých rozměrů. Náhlý prudší pohyb zvířete pak může mít za následek přinejmenším vytržení kabelů z přístroje. Podobné situace vždy představují riziko, kdy je nejlépe stimulátor okamžitě oddálit. Většina postupů stimulace, standardních pro humánní elektroterapii, je tedy naprosto vyloučená.

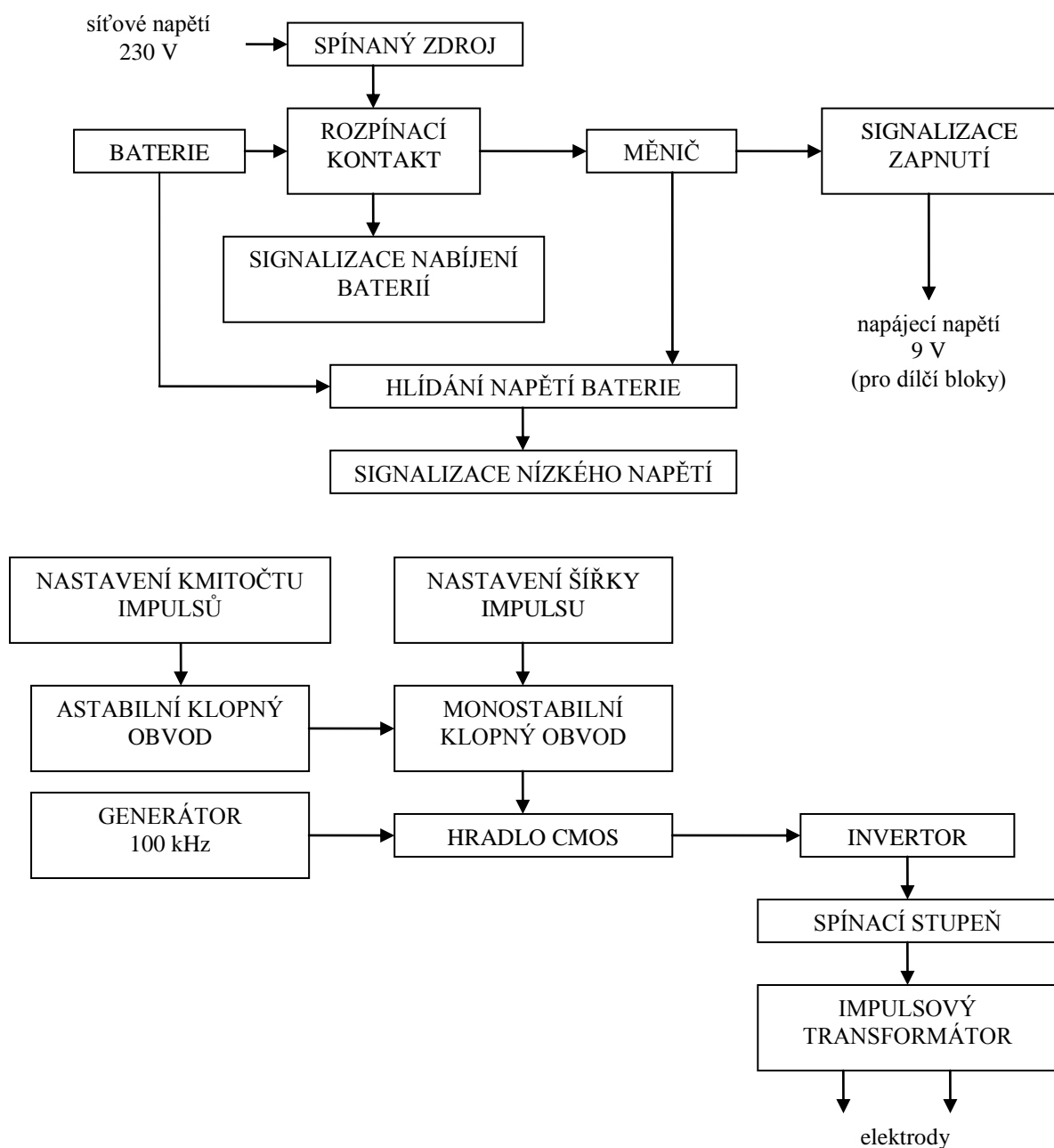
Představa parametrů stimulace vychází z předchozí rešerše. Jedná se o vysokonapěťový impuls s velmi krátkým trváním a velmi nízkou proudovou intenzitou. Snadnější průnik hlouběji do tkáně umožňuje právě vysoké napětí impulsu, které je však nutné kompenzovat dalšími parametry, aby dodaná zátěž nebyla nepřiměřená. Jak z výhodného hlediska konstrukčního, tak i terapeutického, se nabízí možnost využít k vytvoření zamýšleného impulsu kumulace podprahových impulsů. Výsledný impuls pak ve skutečnosti bude tvořen obálkou jedné salvy podprahových impulsů. Šířku stimulačního impulsu bude možné měnit počtem impulsů v salvě. Impulsy uvnitř salvy mají několikanásobně vyšší kmitočet než výsledné stimulační impulsy. Výhoda proudu s vysokým kmitočtem spočívá v mnohem snadnějším překonání odporové bariéry kůže. Mikrostimulátor s takto definovanými parametry stimulace by v sobě mohl skloubit výhody mikroelektrostimulace, vysokonapěťové terapie a „burst“ terapie.

8.2 Blokové schéma mikrostimulátoru

Blokové schéma stimulátoru sestává ze dvou navazujících celků. Jednak jde o část s napájením, a pak samotné obvodové řešení. Jako zdroj napětí jsou uvažovány dva NiMh akumulátory 1,2 V, zapojené v sérii, ze kterých má být pomocí DC/DC měniče získáno napětí 9 V, potřebné pro napájení přístroje. Volba velikosti akumulátorů je dále upřesněna podle celkové spotřeby přístroje a požadavku na jeho provozní dobu. Napětí baterií je hlídáno a nízký stav je včas světelně signalizován. Stejně tak je signalizováno jejich dobíjení a zapnutí přístroje. Dobíjení akumulátorů je

možné po připojení adaptéru, při němž dojde k vyřazení přístroje z činnosti. Rozpínací kontakt po dobu nabíjení zajistí, aby přístroj nebylo možné opět zapnout.

Vlastní parametry stimulace, frekvence a šířka stimulačního impulsu, jsou nastavitelné nezávisle na sobě v daném rozsahu pomocí astabilního a monostabilního klopného obvodu. Generátor vytváří řadu impulsů s frekvencí 100 kHz, které spolu s výstupem z monostabilního obvodu tvoří vstup do hradlovacího obvodu. Hradlo realizuje ořezání řady impulsů podle požadovaných parametrů výsledného impulsu, tj. šířky a frekvence nastavených klopnými obvody. Spínacím stupněm je pak řízen přenos impulsů do primárního vinutí impulsního transformátoru. Po transformaci napětí vznikne sada impulsů, jejichž obálka tvoří výsledný vysokonapěťový stimulační impuls. Výstup je přiveden pomocí elektrod k pacientovi.



Obrázek 19: Blokové schéma mikrostimulátoru

8.3 Požadavky na bezpečnost přístroje a normy

Zdravotnické elektrické přístroje díky své podstatě tvoří zvláštní skupinu elektrotechnických výrobků, jejichž vlastnosti, provedení a způsob použití jsou přísně hlídány. Na samotnou konstrukci zdravotnických přístrojů jsou kladeny neobvykle vysoké nároky ve srovnání s jinými elektrickými zařízeními, a to nejen na funkčnost. Člověk zde již nepředstavuje roli pouhé obsluhy, ale dochází k přímému kontaktu přístroje s člověkem, ať už z terapeutického nebo diagnostického hlediska.

Speciálními mezinárodními normami jsou jasně stanoveny požadavky na každé takové zařízení zejména pro zajištění bezpečnosti. U terapeutických zařízení, kde dochází k přímému ovlivnění pacienta výstupem přístroje, je hlídáno, aby terapeutický efekt maximálně převažoval nad možnými negativními účinky. Ty nelze často zcela eliminovat, nicméně je možné vhodnými opatřeními přispět k jejich minimalizaci. U diagnostických zařízení naopak není hlavním cílem zasahovat do vnitřního prostředí pacienta, ale co nejšetrnější cestou získat informace o jeho zdravotním stavu, které jsou jinými metodami jen těžko zjistitelné, pokud vůbec.

Stěžejními dokumenty, které jsou závazné pro všechny elektrické přístroje, používající se ve zdravotnictví, jsou Nařízení vlády č. 336/2004 Sb., stanovující technické požadavky na zdravotnické prostředky, a ČSN EN 60601-1 ed. 2:2007 (36 4801) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 1: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost. Podle povahy a použití přístroje pak existují speciální normy, které doplňují normu základní a upravují konkrétní parametry každého typu zařízení. Tyto zvláštní normy stanovují požadavky, které jsou tak specifické, že stojí nad požadavky hlavní normy. Běžně dochází k aktualizacím norem, jejich změnám nebo doplnění, a je na výrobci zdravotnického přístroje, aby si aktuální specifické požadavky platné normy pohlídal.

Na elektroterapeutické zařízení, které je předmětem této práce, se mohou vztahovat požadavky těchto doplňujících norem:

ČSN EN 60601-2-10:2001 (36 4800) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 2-10: Zvláštní požadavky na bezpečnost nervových a svalových stimulátorů

ČSN EN 60601-1-11:2011 (36 4801) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 1-11: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost – Skupinová norma: Požadavky na zdravotnické elektrické přístroje a zdravotnické elektrické systémy používané v prostředí domácí zdravotní péče

ČSN EN 60601-1-2 ed. 2:2008 (36 4801) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 1-2: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost – Skupinová norma: Elektromagnetická kompatibilita – Požadavky a zkoušky

ČSN EN 60601-1-6 ed. 3:2010 (36 4801) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 1-6: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost – Skupinová norma: Použitelnost

ČSN EN 55011 ed. 3:2010 (33 4225) Průmyslová, vědecká a lékařská zařízení – Charakteristiky vysokofrekvenčního rušení – Meze a metody měření

Pro bezproblémové porozumění a zajištění jednoznačnosti jsou úvodem každé normy vysvětleny základní pojmy a termíny, které se v dalším textu vyskytují.

Cílem práce je vytvořit přístroj pro ambulantní účely, tedy malý a přenosný, vhodný i pro domácí použití a aplikaci na zvířatech. Dá se tak předpokládat, že s ním do styku přijde zejména populace laiků, kteří budou s pravidly používání přístroje sice seznámeni, ale nebude na jejich správné počinání dále dohlíženo (např. nemocničním personálem). Z těchto důvodů je potřeba zajistit

maximální ochranu a bezpečnost pacienta už samotnou konstrukcí přístroje a předejít tak vzniku nebezpečných situací.

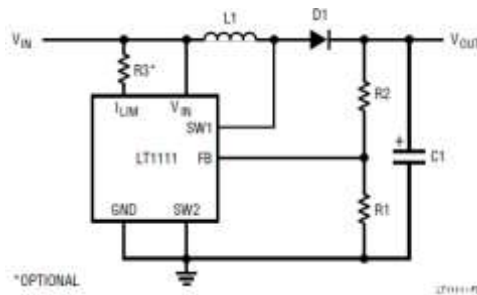
Základní ochrana před úrazem síťovým proudem bude spočívat v konstrukci přístroje s vnitřním zdrojem energie, tzn. se zabudovaným akumulátorem. Dobíjení zdroje připojením adaptéru je lépe zajistit proti spuštění přístroje, např. oddělovacím kontaktem, který při zasunutí koncovky adaptéru do zdířky přístroje vyřadí přístroj z provozu. Co se týče klasifikace přístroje, bude tak přístroj zařazen do třídy lékařských zařízení s vlastním zdrojem energie.

Stejně jako u každého jiného zdravotnického zařízení je i zde samozřejmostí zvýšit informovanost uživatele a bezpečnost při manipulaci pomocí světelné signalizace (zapnutí přístroje, nízké napětí baterie, nabíjení).

Vzhledem k uvažované vysoké napěťové amplitudě impulsu je pro maximální zajištění ochrany při terapii zamýšleno hned několik opatření. Jednak použití malých soustředných elektrod bude vymezovat oblast působení stimulatoru, čímž se maximálně sníží riziko průchodu elektrického proudu nežádoucími oblastmi lidského těla (např. přes srdce). Dále velmi krátké trvání impulsů (desítky mikrosekund) a nízký opakovací kmitočet zamezí dodání větší zátěže, než by mohlo být pro pacienta únosné.

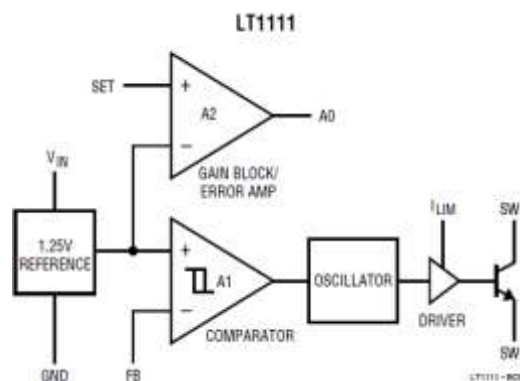
Samotné normy se pak zaměřují zejména na testování přístroje, jeho popis a značení, obsah příložené průvodní dokumentace a podrobného návodu k použití. Dokumentace musí zahrnovat technický popis přístroje, návod k obsluze, klasifikaci příložných částí (BF, CF), výstražná upozornění a varování s vysvětlením [58]. Návod k použití musí vedle požadavků hlavní normy obsahovat mj. informace o tvaru výstupního impulsu a doporučenou velikost elektrod dle [59], dále kontaktní informace na výrobce, výstražná a bezpečnostní oznámení, doplňkové požadavky na zdroj elektrické energie a na popis přístroje, spouštěcí postup přístroje, hlášení přístroje, čištění, dezinfekci a sterilizaci, údržbu a ochranu životního prostředí dle [60].

Povinností výrobce je navíc vypracovat dokumentaci řízení rizika dle přílohy C normy ČSN EN ISO 14971. Riziková analýza zdravotnického prostředku podává informace o všech možných rizicích, ke kterým může v souvislosti s používáním přístroje dojít, a přiřazuje jim úroveň závažnosti.



Obrázek 21: Step-up mód měniče LT1111, převzato z [64]

Podrobnější vysvětlení nabízí blokové schéma měniče, viz Obrázek 22. Výhodou tohoto uspořádání je velmi nízký proudový odběr. Přepínání je zahájeno až v okamžiku, kdy napětí zpětné vazby na vývodu FB poklesne pod referenční úroveň. Napětí na vývodu FB, přivedené přes odporový dělič (R1, R2), je srovnáno s pevně nastaveným referenčním napětím 1,25 V. Jestliže napětí na FB poklesne pod tuto mez, komparátor A1 sepne oscilátor, který pracuje s frekvencí přepínání 72 kHz. Zesilovač DRIVER zesílí signál z komparátoru natolik, aby mohl být řízen výstup tranzistoru. Přepínáním se postupně akumuluje výstupní napětí. Jakmile napětí na odezvě FB dosáhne dostatečné velikosti (zde 9 V), dojde k rozpojení A1 a činnost oscilátoru se zastaví. Pokud je výstup komparátoru příliš malý, oscilátor a všechny obvody s vyššími proudovými nároky jsou vypnuty. Proudový odběr se tak sníží na klidovou úroveň pouhých 300 μ A. Doba sepnutí a vypnutí oscilátoru je pevně nastavena na 7 μ s pro každou z nich. Mezi vývody I_LIM a V_IN je zapojen rezistor R3, který určuje maximální spínací proud. Jestliže tento proud přesáhne nastavenou hodnotu, cyklus přepínání se předčasně ukončí.



Obrázek 22: Blokový diagram měniče LT1111 (převzato z [61])

Operační zesilovač A2 může být využit jako ukazatel nízkého napětí bateriového zdroje. Funguje jako komparátor referenčního napětí 1,25 V na invertujícím vstupu zesilovače a napětí baterie, přivedené přes odporový dělič na neinvertující vstup prostřednictvím vývodu SET.

Pro požadovanou funkci měniče je nutné vhodně určit hodnoty prvků zapojeného obvodu.

Výběr diody D2

Dioda D2 musí být vybrána s ohledem na tři základní parametry: rychlost spínání, úbytek napětí v propustném směru a zbytkový proud v závěrném směru [61]. Nejlépe vyhovuje Schottkyho dioda 1N5818, rovněž doporučena výrobcem měniče, a to vzhledem k velmi rychlému spínání, malému úbytku napětí při sepnutí a nízkému zbytkovému proudu po vypnutí [65].

Výběr cívky L1

DC/DC měnič řídí akumulaci energie jako magnetického toku v indukční cívce a uvolnění této energie do zátěže. Aby měnič fungoval jako účinný přenašeč energie, musí cívka splňovat určité podmínky. Jednak by indukčnost cívky měla být dostatečně nízká, aby i v krátké době a při velmi malých hodnotách vstupního napětí byla schopna pojmout potřebné množství energie. Zároveň by však indukčnost měla být dostatečně velká, aby v případě vysokých hodnot vstupního napětí a delší době sepnutí nedošlo k přesycení cívky. Ve „step-up“ režimu vytváří rozdíl mezi vstupem a výstupem právě výkon generovaný cívkou. Jeho velikost je dána součinem napětí na cívce a maximálního proudu, který bude odebírán ze zdroje:

$$P_{L1} = (U_{vyst} + U_{D2} - U_{vst(min)}) \cdot I_{vyst} = (9,0 + 0,5 - 2,2) \cdot 0,0163 = 0,119 \text{ W} = 119 \text{ mW}, \quad (4)$$

kde U_{vyst} je požadované výstupní napětí 9 V, U_{D2} dopředné napětí na Schottkyho diodě (pro 1N5818 je rovno 0,5 V [61]), $U_{vst(min)}$ minimální využitelné napětí baterií (2,2 V) a I_{vyst} je maximální odebíraný proud, jehož velikost byla zjištěna experimentálně (16,3 mA) [62].

Energie, kterou má cívka v každém cyklu vydat, musí být větší nebo rovna podílu výkonu cívky P_{L1} a kmitočtu přepínání f_{osc} :

$$E_{L1} \geq \frac{P_{L1}}{f_{osc}} \quad \frac{P_{L1}}{f_{osc}} = \frac{119 \text{ mW}}{72 \text{ kHz}} = 1,6 \cdot 10^{-6} = 1,6 \mu\text{J} \quad E_{L1} \geq 1,6 \mu\text{J} \quad (5)$$

Sepnutím obvodu začne cívkou protékat proud velikosti měnící se s časem podle rovnice (6):

$$I_{L1}(t) = \frac{U_{vst}}{R} \cdot \left(1 - e^{-\frac{R \cdot t}{L1}} \right), \quad (6)$$

kde U_{vst} je napětí na vstupu měniče, R součet ekvivalentního odporu spínače (obvykle 0,8 Ω při 25 $^{\circ}\text{C}$ [61]) a stejnosměrného odporu cívky (0,2 Ω). Známe-li dobu sepnutí měniče $t = 7 \mu\text{s}$, pak lze podle rovnice (7) zjistit špičkovou hodnotu proudu cívkou $I_{L1(peak)}$ pro vstupní napětí U_{vst} a specifickou indukčnost $L1$, vhodně určenou podle Tabulky 1 katalogového listu [61]. Pro minimální hodnotu odebíraného proudu kolem 10 mA je doporučena cívka s indukčností 47 μH .

$$I_{L1(peak)}(t = 7 \mu\text{s}) = \frac{U_{vst}}{R} \cdot \left(1 - e^{-\frac{R \cdot t}{L1}} \right) = \frac{2,4}{0,8 + 0,2} \cdot \left(1 - e^{-\frac{(0,8+0,2) \cdot 7 \cdot 10^{-6}}{47 \cdot 10^{-6}}} \right) = 332 \text{ mA} \quad (7)$$

Podle rovnice (8) lze dosazením za $I_{L1(peak)}$ zjistit hodnotu energie cívky na konci spínací fáze:

$$E_{L1} = \frac{1}{2} L1 \cdot (I_{L1(peak)})^2 = \frac{1}{2} \cdot 47 \cdot 10^{-6} \cdot 0,332^2 = 2,59 \mu\text{J} \quad (8)$$

Na základě srovnání výsledné energie z rovnice (8) s požadavkem podmínky (5), tj. $2,59 \mu\text{J} > 1,6 \mu\text{J}$, můžeme konstatovat, že vybraná indukčnost cívky je pro naši aplikaci vyhovující a měnič bude schopen dodat potřebný proud při požadovaném napětí, což zajistí integrovaná regulační smyčka. Navíc je splněno i doporučení, aby hodnota špičkového proudu dosahovala nejvýše 1 A [61]. Vyšší proudy by mohly způsobit přesycení jádra tlumivky a nižší účinnost.

Výběr kondenzátoru C8

Kondenzátor se stejně jako cívka významně podílí na vysoké účinnosti převodu napětí. Špatná volba kondenzátoru může mít za následek snížení účinnosti nebo výrazné zvlnění výstupu. Nevyhovující je použití běžně dostupných a laciných hliníkových elektrolytických kondenzátorů, neboť mají nepřijatelné hodnoty ekvivalentního sériového odporu (ESR) a ekvivalentní sériové indukčnosti (ESL). Na základě doporučení výrobce byl vybrán tantalový elektrolytický kondenzátor s extrémně nízkou hodnotou ESR a hodnotou kapacity 10 μF podle Tabulky 1 katalogového listu [61].

Výpočet děliče R11, R18

V okamžiku sepnutí vnitřního tranzistoru měniče se na cívce objeví rozdílové napětí $U_{vst} - U_{ke(sat)}$ a cívkou začne protékat proud

$$I_{L1(peak)}(t = 7\mu\text{s}) = \frac{U_{vst} - U_{ke(sat)}}{L1} \cdot t = \frac{2,4 - 0,4}{47 \cdot 10^{-6}} \cdot 7 \cdot 10^{-6} = 297\text{mA},$$

(9)

kde $U_{ke(sat)}$ je napětí mezi kolektorem a emitorem při saturaci. Po vypnutí spínače se mění polarita cívky a proud protéká diodou D1 do kondenzátoru C8. Napětí z cívky je kontrolováno prostřednictvím zpětné vazby, vedoucí přes odporový dělič R11 a R18 k vývodu FB měniče. Celý cyklus je řízen závislostí na velikosti předem nastaveného výstupního napětí U_{vyst} :

$$U_{vyst} = U_{FB} \cdot \left(1 + \frac{R11}{R18}\right)$$

(10)

$$\text{Odtud } \frac{R11}{R18} = \frac{U_{vst}}{U_{FB}} - 1 = \frac{9}{1,25} - 1 = 6,2,$$

kde U_{FB} je referenční napětí nastavené na hodnotu 1,25 V. Aby byl odporový dělič dostatečně tvrdým zdrojem pro zpětnovazební vstup, je uvažován proud I_R děličem 100krát větší než proud odebíraný z děliče $I_{FB} = 70\text{ nA}$ [64]:

$$I_R = 100 \cdot I_{FB} = 100 \cdot 70 \cdot 10^{-9} = 7\mu\text{A}$$

(11)

Z Ohmova zákona pak určíme odpor děliče R:

$$R = \frac{U_R}{I_R} = \frac{9}{7 \cdot 10^{-6}} = 1,3\text{M}\Omega$$

(12)

Pro odpor děliče dále platí:

$$R = R11 + R18$$

(13)

Hodnoty R11 a R18 pak zjistíme dosazením do rovnic (10), (12) a (13):

$$R11 = 1,1\text{ M}\Omega \quad R18 = 180\text{ k}\Omega$$

Na správnost hodnot rezistorů R11 a R18 je kladen velký důraz, neboť na nich závisí přesné nastavení výstupního napětí. Podle vzorce (10) lze výpočet hodnot ověřit. Pro zadané hodnoty odporu by výstupní napětí dosahovalo velikosti pouhých 8,88 V. Při korekci tohoto nedostatku zvýšením hodnoty rezistoru R11 na 1,2 M Ω , nabude výstupní napětí až 9,58 V, což rovněž není žádoucí. Pro precizní nastavení hodnoty 9 V je proto k rezistoru R11 sériově zapojen odporový trimr R19.

9.2 Světelné signalizace

9.2.1 Signalizace zapnutí přístroje

Provoz zařízení je indikován rozsvícením zelené diody LED1. Byl vybrán typ HLMP-1790, který poskytuje vysokou účinnost i při nízkém provozním proudu [66]. Hodnotu předřazeného rezistoru zjistíme z Ohmova zákona:

$$R26 = \frac{U_{vyst} - U_{LED1}}{I_{LED1}} = \frac{9 - 2,7}{0,002} = 3,15k\Omega \approx 3,3k\Omega, \quad (14)$$

kde U_{LED1} je napětí LED diody (2,7 V) a I_{LED1} proud diodou (2 mA).

9.2.2 Signalizace nízkého napětí bateriového zdroje

Signalizace nízkého napětí baterie je důležitým blokem, který nás včas upozorní na nutnost dobít vnitřního zdroje. Pro tuto funkci je využita komponenta integrovaného obvodu měniče LT1111 (viz Obrázek 22). Tvoří ji operační zesilovač A2, plnící roli komparátoru, jenž porovnává napětí baterie na neinvertujícím vstupním vývodu SET s referenčním napětím 1,25 V na invertujícím vstupu. S výstupem komparátoru A0 je pak přes odporový dělič (R16 a R17) a tranzistor Q1 spojena červená LED dioda, typu HLMP-K150.

Pro správnou indikaci je potřeba vhodně zvolit hodnoty rezistorů R13, R14 a R12. Podle doporučení výrobce je hodnota R14 stanovena na 33 k Ω , obdobně u R12 na 1,6 M Ω pro zajištění nízké hystereze komparátoru a zabránění problikávání diody. Předřazený tranzistor typu PNP (BC556) stabilizuje proud diodou. Rezistor R17 je zvolen jako 10 k Ω a rezistor R15 dopočítáme:

$$R15 = \frac{U_{vyst} - U_{ke(sat)} - U_{LED2}}{I_{LED2}} = \frac{9 - 0,08 - 1,6}{0,001} = 7,4k\Omega \approx 7,6k\Omega, \quad (15)$$

kde U_{vyst} je napětí na výstupu měniče, $U_{ke(sat)}$ napětí mezi kolektorem a emitorem tranzistoru při saturaci, U_{LED2} napětí LED diody (1,6 V) a I_{LED2} proud diodou (1 mA).

Pro zjištění hodnoty rezistoru R13 podle rovnice (16) zbývá určit chybějící hodnotu R16.

$$R13 = \frac{U_{VB} - U_{ref}}{\frac{U_{ref}}{R14} - \frac{U_{vyst} - U_{ref}}{R17 + R16 + R12}}, \quad (16)$$

kde U_{VB} je napětí téměř vybité baterie (2,2 V) a U_{ref} je referenční napětí komparátoru.

Hodnotu rezistoru R16 vypočteme opět z Ohmova zákona:

$$R16 = \frac{U_{vyst} - U_{be(sat)} - U_{ke(sat)}}{I_{Q1}} = \frac{9 - 0,75 - 0,06}{9,1 \cdot 10^{-5}} = 90k\Omega \quad (17)$$

kde $U_{be(sat)}$ je napětí báze-emitor tranzistoru Q1 a I_{Q1} celkový proud tranzistorem, který je součtem proudu rezistorem R17 I_{R17} a proudu bázi tranzistoru $I_{b(sat)}$ při saturaci:

$$I_{Q1} = I_{R17} + I_{b(sat)} = \frac{U_{be(sat)}}{R17} + \left(\frac{I_k \cdot s}{\beta} \right) = \frac{0,75}{10000} + \frac{1 \cdot 10^{-3} \cdot 2}{125} = 9,1 \cdot 10^{-5} \text{ A} = 91 \mu\text{A} \quad (18)$$

kde I_k je proud kolektorem (roven I_D 1,6 V), β proudový zesilovací činitel a s činitel nasycení (zvoleno $s = 2$).

Nyní jsou již k dispozici všechny potřebné hodnoty a můžeme dosadit do rovnice (16) pro výpočet rezistoru R13. Hodnota je upravena podle dostupnosti hodnoty v odporové řadě.

$$R13 = \frac{2,2 - 1,25}{\frac{1,25}{33 \cdot 10^3} - \frac{9 - 1,25}{10 \cdot 10^3 + 9 \cdot 10^4 + 1,6 \cdot 10^6}} = 28537 \Omega \approx 27 \text{ k}\Omega$$

9.2.3 Signalizace nabíjení bateriového zdroje

Nabíjecí akumulátory budou uloženy do pouzdra uvnitř přístroje. Běžný uživatel by k nim neměl mít přístup vyjma případu, kdy použije k otevření krytu přístroje nástroj, což není doporučeno. K dobíjení vnitřního zdroje bude sloužit dodaný adaptér, splňující požadavky bezpečnosti. Aby připojení přístroje do sítě nepředstavovalo nepřijatelné riziko a ohrožení uživatele, musí být zavedena příslušná opatření.

Pro připojení konektoru adaptéru bude v krytu přístroje vestavěna napájecí zástrčka typu jack s rozpínacím kontaktem. Rozpínací kontakt hraje zásadní roli pro bezpečné napájení. Zapnutí přístroje bude po připojení konektoru adaptéru blokováno a je tedy prevencí úrazu síťovým proudem. Zapojení uvádí Obrázek 20. Po celou dobu napájení bude svítit červená kontrolka LED3. Hodnotu předřazeného rezistoru R24 zjistíme z Ohmova zákona:

$$R24 = \frac{U_{DCIN} - U_{LED3}}{I_{LED3}} = \frac{5 - 2,7}{0,01} = 230 \Omega, \quad (19)$$

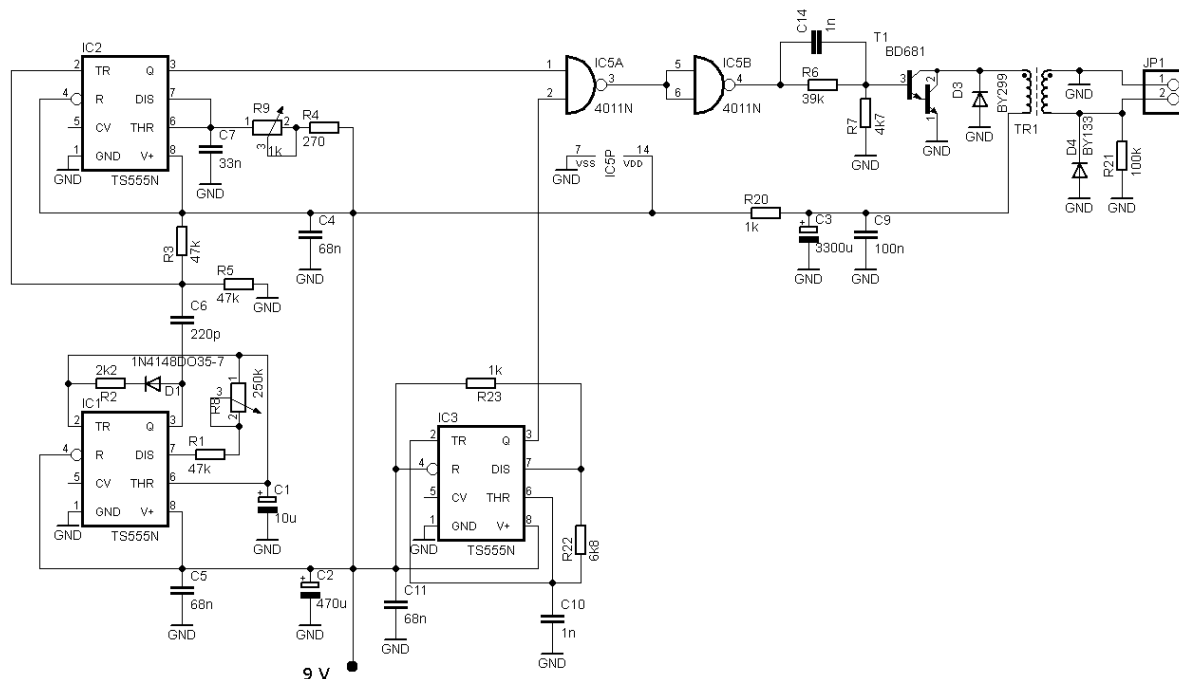
kde U_{DCIN} je napětí na svorkách připojeného spínaného zdroje, U_{LED3} napětí na světelné diodě LED3 a I_{LED3} je uvažovaný proud diodou (10 mA).

$$R25 = \frac{U_{DCIN} - U_{vst(max)} - U_{D5}}{I_{DCIN}} = \frac{5 - 3,0 - 0,6}{0,08} = 17,5 \Omega \approx 15 \Omega, \quad (20)$$

kde $U_{vst(max)}$ je napětí baterií ihned po dobíjení, U_{D5} napětí na diodě D5, I_{DCIN} standardní nabíjecí proud (80 mA).

9.3 Nastavení parametrů stimulace

Ke generování nosných impulsů a nastavení frekvence a šířky impulsů využijeme integrovaného obvodu TS555. Tato CMOSová verze klasického časovače NE555 má několikanásobně nižší vlastní spotřebu a je tak ideální pro použití v bateriově napájeném zařízení. Časovač se obvykle zapojuje ve dvou odlišných režimech: jednak jako generátor impulsů s definovanou opakovací frekvencí a šířkou (astabilní režim) nebo jako časový zpoždovač výstupu (monostabilní režim).



Obrázek 23: Obvodové řešení nastavení výstupu

9.3.1 Generátor impulsů 100 kHz

Pro generování řady impulsů s nosnou frekvencí 100 kHz využijeme astabilního zapojení obvodu TS555, označeno IC3 ve schématu. Princip spočívá v nabíjení a vybíjení kondenzátoru C10 mezi prahovými úrovněmi 1/3 a 2/3 napájecího napětí. Nastavení tohoto cyklu závisí na hodnotách rezistorů R22 a R23. Kondenzátor se nabíjí přes oba rezistory, ale vybíjí se pouze přes rezistor R22. Přepínání těchto dvou jevů je řízeno vnitřním tranzistorem časovače v závislosti na okamžitém napětí na kondenzátoru C10. Dosažením horního prahu napětí se nabíjení kondenzátoru ukončí, neboť tranzistor sepne a kondenzátor se přes něj začne vybíjet. Vybíjením se napětí na kondenzátoru postupně snižuje. Dosažením úrovně spodního prahu se tranzistor rozezne a zahájí se nabíjení. Cyklickým nabíjením a vybíjením kondenzátoru získáme na výstupu přibližně obdélkový průběh napětí, tedy sekvenci impulsů se stanovenou šířkou a mezerou. Pro nastavení kmitočtu impulsů 100 kHz je potřeba vhodně stanovit hodnoty rezistorů. Šířku impulsu a mezery lze jednoduše odvodit ze vztahů pro nabíjení a vybíjení kondenzátoru. Pro šířku impulsu t_i a mezery t_m pak platí:

$$t_i = 0,693 \cdot (R23 + R22) \cdot C10 \quad (21)$$

$$t_m = 0,693 \cdot R22 \cdot C10 \quad (22)$$

Protože perioda T je dána součtem šířek t_i a t_m

$$T = t_i + t_m = 0,693 \cdot (2 \cdot R22 + R23) \cdot C10, \quad (23)$$

můžeme frekvenci oscilace vyjádřit jako

$$f = \frac{1}{T} = \frac{1,44}{(R23 + 2 \cdot R22) \cdot C10}. \quad (24)$$

Zvolíme-li t_i a t_m v poměru 1:1, pak platí:

$$t_i = t_m = \frac{T}{2} = \frac{1/f}{2} = \frac{1/10^5}{2} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ s} = 5 \mu\text{s} \quad (25)$$

Dále volíme velikost kondenzátoru $C10 = 1 \text{ nF}$ a dosazením známých hodnot do vztahů (22) a (23) získáme velikosti rezistorů $R22$ a $R23$, které upravíme podle dostupnosti v odporové řadě:

$$R22 = \frac{t_m}{0,693 \cdot C10} = \frac{5 \cdot 10^{-6}}{0,693 \cdot 10^{-9}} = 7215 \Omega \approx 6k8 \quad (26)$$

$$R23 = \frac{T}{0,693 \cdot C10} - 2 \cdot R22 = \frac{10^{-5}}{0,693 \cdot 10^{-9}} - 2 \cdot 6800 = 830 \Omega \approx 1k \quad (27)$$

9.3.2 Nastavení frekvence impulsů

Obdobným způsobem jako generátor nosné řady impulsů je zapojen i blok IC1, kterým bude možné měnit frekvenci výsledné salvy impulsů. Jedná se opět o astabilní režim časovače TS555, ovšem upravený pro možnost kontinuální změny poměru $t_i : t_m$, jímž bude frekvence dána.

Podobně jako v předcházející bakalářské práci [62] bude frekvence nastavitelná v rozsahu přibližně 0,5 – 3 Hz. V závislosti na tom je potřeba vypočítat hodnoty rezistorů $R1$, $R2$ a potenciometru $R8$, který umožňuje nastavit libovolnou frekvenci z tohoto rozsahu. Dioda $D2$ má úkol napěťově řízeného spínače a odděluje rezistory $R1$ a $R2$ tak, aby nabíjení kondenzátoru $C1$ probíhalo pouze přes rezistor $R2$. Z obecné rovnice (28) pro nabíjení kondenzátoru $C1$ přes rezistor $R2$:

$$U_C(t) = U_V \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{R2 \cdot C1}} \right) + U_{C0} \cdot e^{-\frac{t}{R2 \cdot C1}} \quad (28)$$

můžeme vyjádřit šířku impulsu t_i , dosadíme-li za U_{C0} počáteční napětí kondenzátoru ($1/3 U_{vyst} = 3 \text{ V}$), za U_V napětí na výstupu obvodu TS555 (zjištěno měřením 8,8 V [62]) a za U_C napětí na konci nabíjení v okamžiku t_i

$$\frac{2}{3} U_{vyst} = 8,8 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t_i}{R2 \cdot C1}} \right) + \frac{1}{3} U_{vyst} \cdot e^{-\frac{t_i}{R2 \cdot C1}}$$

a postupně upravíme na tvar:

$$t_i = 0,728 \cdot R2 \cdot C1 \quad (29)$$

Obdobně z rovnice pro vybíjení kondenzátoru z hodnoty $2/3 U_{vyst}$ na $1/3 U_{vyst}$ můžeme vyjádřit vztah pro šířku mezery t_m :

$$U_C = U_{C0} \cdot e^{-\frac{t_m}{R1 \cdot C1}}$$

$$\frac{1}{3} U_{vyst} = \frac{2}{3} U_{vyst} \cdot e^{-\frac{t_m}{R1 \cdot C1}} \quad (30)$$

$$t_m = 0,693 \cdot R1 \cdot C1$$

(31)

Hodnotu kondenzátoru stanovíme jako $C1 = 10 \mu\text{F}$. Dále požadovaný rozsah frekvencí závisí jen na hodnotách rezistorů $R1$, $R2$. Pro frekvenci $f = 3 \text{ Hz}$ je perioda $T = 333 \text{ ms}$, kterou rozdělíme na šířku impulsu $t_i = 15 \text{ ms}$ a šířku mezery $t_m = 318 \text{ ms}$. Úpravou rovnic (29) a (31) pak získáme vhodné hodnoty rezistorů.

$$R2_{3\text{Hz}} = \frac{t_i}{0,728 \cdot C1} = \frac{0,015}{0,728 \cdot 10^{-5}} = 2,1\text{k}\Omega \approx 2,2\text{k}\Omega$$

$$R1_{3\text{Hz}} = \frac{t_m}{0,693 \cdot C1} = \frac{0,318}{0,693 \cdot 10^{-5}} = 45\text{k}\Omega \approx 47\text{k}\Omega$$

Pro nejnižší uvažovanou frekvenci $0,5 \text{ Hz}$ ($T = 2 \text{ s}$) zůstává šířka impulsu stejná a změní se pouze šířka mezery $t_m = 1985 \text{ ms}$.

$$R2_{0,5\text{Hz}} = \frac{t_i}{0,728 \cdot C1} = \frac{0,015}{0,728 \cdot 10^{-5}} = 2,1\text{k}\Omega \approx 2,2\text{k}\Omega$$

$$R1_{0,5\text{Hz}} = \frac{t_m}{0,693 \cdot C1} = \frac{1,985}{0,693 \cdot 10^{-5}} = 286\text{k}\Omega \approx 270\text{k}\Omega$$

Pro plynulé nastavení frekvence v požadovaném rozmezí slouží potenciometr $R8$ ($250 \text{ k}\Omega$), zapojený sériově s rezistorem $R1$.

9.3.3 Nastavení intenzity stimulační

Jak bylo zmíněno v kapitole 6.1, intenzitu stimulační jako sílu podnětu lze nastavit i jinými způsoby než zvýšením proudové či napěťové amplitudy impulsů. Intenzitu stimulační můžeme rovněž nastavit například modulací šířky salv impulsů, kterou bude mikrostimulátor využívat.

K nastavení šířky výsledných impulsů je opět použit obvod TS555 s označením IC2 ve schématu, zapojený tentokrát v monostabilním režimu. V takovém případě pracuje obvod jako jednorázový generátor se dvěma vstupy. Jedním je samotný spouštěč (Trigger, vývod 2) a druhým je vstup 6 s definovaným prahovým napětím. Šířka výstupního impulsu je určena hodnotami RC členu $R4$, $R9$ a $C7$. Důležitou roli hraje vnitřní komparátor obvodu 555, který v klidovém stavu uchovává kondenzátor $C7$ vybitý. Jestliže však napětí na vstupu komparátoru překročí prahovou hodnotu $1/3 U_{\text{vyst}}$, překlopením se spustí časovač. Kondenzátor se začne nabíjet přes rezistor $R4$ a potenciometr $R9$ do dosažení hodnoty $2/3 U_{\text{vyst}}$. Poté se obvod opět přepne do původního stavu a kondenzátor se vybití. Monostabilní zpožďovací stupeň setrvává v tomto stabilním stavu, dokud se na vstupu spouštěče neobjeví další záporný impuls.

Spínání monostabilního klopného obvodu je řízeno přes derivační RC člen výstupním signálem z předchozího astabilního klopného obvodu, nastavujícího frekvenci impulsů. Spouštěcí impulsy mají tvar záporných derivačních špiček a musí mít mnohem kratší trvání než výstup monostabilního obvodu. Hodnoty kondenzátoru $C6$ a rezistorů $R3$, $R5$ jsou zvoleny vzhledem k tomu, že strmota hran impulsů z astabilního obvodu není přesně známa. Následným měřením je pak ověřena funkčnost. Hodnota kondenzátoru je zvolena 220 pF . Napěťový dělič, tvořený rezistory $R3$ a $R5$,

nastavuje klidové napětí spouštěče na vyšší hodnotu než $1/3 U_{vyst}$. Aby byl příčný proud děličem větší než vstupní proud komparátoru, jsou zvoleny hodnoty $R3 = R5 = 47 \text{ k}\Omega$.

Vztah (33) mezi šířkou výstupního impulsu monostabilního obvodu a hodnotami $R4$ a $C7$, uváděný v katalogovém listu [68], získáme ze základní rovnice pro nabíjení kondenzátoru (32):

$$U_C = U_{vyst} \left(1 - e^{-\frac{t_i}{R4.C7}} \right) \quad (32)$$

$$\frac{2}{3} U_{vyst} = U_{vyst} \left(1 - e^{-\frac{t_i}{R4.C7}} \right)$$

$$t_i = 1,1.R4.C7 \quad (33)$$

Šířka bude měnitelná v rozsahu $10 - 50 \mu\text{s}$. Zvolíme-li velikost kondenzátoru $C7$ 33 nF , dopočítáme úpravou rovnice (33) potřebné hodnoty rezistoru $R4$ pro nastavení požadovaného rozsahu:

$$t_i = 10 \mu\text{s} \quad R4 = \frac{t_i}{1,1.C7} = \frac{10^{-5}}{1,1.33.10^{-9}} = 275 \Omega \approx 270 \Omega$$

$$t_i = 50 \mu\text{s} \quad R4 = \frac{t_i}{1,1.C7} = \frac{50.10^{-6}}{1,1.33.10^{-9}} = 1377 \Omega \approx 1 \text{ k}\Omega$$

Vedle rezistoru $R4$ (270Ω) bude sériově zařazen potenciometr $R9$ ($1 \text{ k}\Omega$), který plynule nastaví intenzitu stimulace.

9.3.4 Hradlování

Z generátoru $IC3$ získáme řadu impulsů s frekvencí 100 kHz . Tato sekvence impulsů tvoří základ stimulační salvy, tj. skupinky několika impulsů. Ta přichází s vlastní šířkou a několikanásobně nižší frekvencí, jež budou nastavitelné ovládacími prvky přístroje. K realizaci salv z řady impulsů použijeme CMOSový integrovaný obvod $HCF4011B$, sestávající ze čtyř dvou-vstupových hradel typu $NAND$. Proti klasickým TTL hradlům nabízí CMOSová konstrukce výhody v podobě nižšího napájecího proudu a schopnosti pracovat ve větším rozsahu napájecího napětí ($3 - 15 \text{ V}$) a je tedy možné je napájet ze stejného zdroje jako ostatní části přístroje.

Pro naše účely stačí využít pouze dvou vnitřních logických obvodů. Na vstup 1 prvního hradla je přiveden signál z monostabilního obvodu $TS555$ ($IC2$), definujícího šířku i frekvenci salvy, a na vstup 2 je přiveden výstup z generátoru impulsů ($IC3$). Hradlo realizuje logickou operaci $NAND$. Pouze ve chvíli, kdy se na obou vstupech objeví logická 1, tzn. generovaný impuls má být součástí salvy, dostaneme na výstupu hradla logickou 0. Pro správnou funkci tranzistoru je nutné tento výstup invertovat. K tomu je využito další hradlo integrovaného obvodu se vstupy 5, 6 a výstupem 4, kterým je řízeno spínání tranzistoru $BD681$.

Vzhledem k vysoké frekvenci spínání je pro řízení vybíjení akumulované energie z kondenzátoru $C3$ ($3300 \mu\text{F}$) do primárního vinutí transformátoru použit Darlingtonův tranzistor $BD681$. Pro odstranění vlivu vstupní kapacity tranzistoru je předřazen kompenzovaný dělič, sestávající z rezistorů $R6$, $R7$ a kondenzátoru $C14$. Antiparalelně k tranzistoru je zapojena ochranná dioda $BY299$.

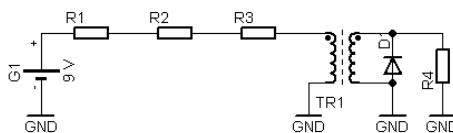
9.3.5 Impulzní transformátor

Zde uvedený návrh transformátoru uvažoval původní aplikaci ve verzi mikrostimulátoru bez skládání výsledného terapeutického impulsu. Tento teoretický návrh tvoří základ pro skutečně realizovaný transformátor pro zmíněný typ stimulace, jehož parametry byly upraveny podle praktického měření zkušební vzorku, viz dále. Při návrhu impulzního transformátoru si stanovíme jeho základní vlastnosti a podmínky, které je pro úspěšný výpočet nutné zohlednit:

napěťový zdroj	$U_1 = 9 \text{ V}$
výstupní napěťové impulsy	$U_2 = 1000 \text{ V}$
uvažovaná impedance pacienta	$R_p = 10 \text{ k}\Omega$
šířka terapeutického impulsu	$\delta T = 50 \text{ }\mu\text{s}$
maximální pokles temene impulsu	$p = 5\%$
účinnost	$> 70\%$

Ještě před konkrétními výpočty parametrů transformátoru je potřeba vybrat vhodný typ jádra dostupný na trhu. Za tímto účelem byl kontaktován výrobce Ferroxcube, který nabízí široký sortiment pro konstrukci transformátorů. Na materiál pro nízkovýkonové impulsní transformátory jsou kladeny požadavky vysoké permeability⁵³, nízké hystereze⁵⁴ pro zachování tvaru impulsu a nízké citlivosti na stejnosměrnou předmagnetizaci [73]. Pro impulsní aplikace jsou výrobcem doporučovány materiály s různou hodnotou magnetické indukce při nasycení B_{sat} . Pro naši aplikaci bylo vybráno feritové jádro, typu RM z materiálu 3C90 s B_{sat} 470 mT a konstantou AL 3300 nH.

Dále je vhodné vytvořit si náhradní schéma obvodu s transformátorem, viz Obrázek 24. Rezistor R1 představuje vnitřní odpor zdroje napětí G1, rezistor R2 pak odpor primárního vinutí a R3 odpor sekundárního vinutí. Diody D1 má ochrannou funkci transformátoru a rezistor R4 charakterizuje impedanci pacienta.



Obrázek 24: Náhradní schéma zapojení s transformátorem

Vzorem pro návrh transformátoru byl postup uvedený v [74]. Abychom získali alespoň 70%-ní účinnost transformátoru, musí být úbytek napětí ΔU_1 na primárním vinutí zatíženého transformátoru:

$$\Delta U_1 = U_1 \cdot 0,3 = 9 \cdot 0,3 = 2,7 \text{ V} \quad (34)$$

Pro převod transformátoru n pak platí:

$$n = \frac{U_2}{U_1 - \Delta U_1} = \frac{1000}{9 - 2,7} = 158 \quad (35)$$

Úbytek napětí vzniká na vnitřním odporu R_1 zdroje napětí a na rezistanci obou vinutí R_2 a R_3 . Celkový odpor je pak dán jejich součtem:

⁵³ Míra magnetizace materiálu jako odpověď na vnější magnetické pole.

⁵⁴ Nevratná změna magnetické indukce nebo magnetizace spojená se změnou intenzity magnetického pole.

$$R_c = R_1 + R_2 + R_3 = \frac{\Delta U_1}{n \cdot I_2} = \frac{2,7}{158,0,1} = 0,17 \Omega, \quad (36)$$

kde I_2 je odhadovaná proudová zátěž transformátoru ($I_2 = U_2/R_p$).

Výchozí podmínkou pro úspěšný návrh transformátoru je platnost následujícího výrazu pro indukční tok Φ_c jádrem vinutí:

$$\Phi_c = (U_1 - \Delta U_1) \cdot \delta T = N_1 \cdot B \cdot S_j, \quad (37)$$

kde N_1 je počet závitů na primárním vinutí, S_j průřez jádra [m^2] a B magnetická indukce definovaná jako polovina magnetické indukce materiálu jádra při nasycení $B = B_{sat}/2 = 0,235 \text{ T}$. Hodnoty prvků první poloviny výrazu známe, proto hodnota indukčního toku cívkou Φ_c je:

$$\Phi_c = (U_1 - \Delta U_1) \cdot \delta T = (9 - 2,7) \cdot 50 \cdot 10^{-6} = 3,15 \cdot 10^{-4} \text{ Wb}$$

Vzhledem k platnosti rovnice (37) můžeme odvodit indukčnost L_{1A} jako:

$$L_{1A} = \frac{N_1 \cdot B \cdot S_j}{I_{m1 \max}} = \frac{3,15 \cdot 10^{-4}}{0,1 \cdot I_{1 \max}} = \frac{3,15 \cdot 10^{-4}}{0,1 \cdot n \cdot I_2} = \frac{3,15 \cdot 10^{-4}}{0,1 \cdot 158,0,1} = 1,99 \cdot 10^{-4} \text{ H}, \quad (38)$$

kde $I_{m1 \max}$ je špičkový magnetický proud primárního vinutí [A] (10% celkového špičkového proudu $I_{1 \max}$ primárním vinutím). Pro tvar přenášeného impulsu musí velikost indukčnosti také splňovat:

$$L_{1B} = \frac{100 \cdot \delta T \cdot R}{p} = \frac{100}{p} \cdot \delta T \cdot \frac{R_c \cdot \frac{R_p}{n^2}}{R_c + \frac{R_p}{n^2}} = \frac{100}{5} \cdot 50 \cdot 10^{-6} \cdot \frac{0,17 \cdot \frac{10000}{(158)^2}}{0,17 + \frac{10000}{(158)^2}} = 1,20 \cdot 10^{-4} \text{ H} \quad (39)$$

kde R je paralelní kombinací zatěžovacího odporu R_p a odporu R_c . Za hodnotu indukčnosti L_1 se zvolí větší z hodnot, vypočtených rovnicemi (38) a (39), tj. $L_1 = 1,99 \cdot 10^{-4} \text{ H}$. Počet závitů primáru s danou indukčností určíme ze vztahu (40):

$$N_1 = \sqrt{\frac{L_1}{AL}} = \sqrt{\frac{1,99 \cdot 10^{-4}}{3300 \cdot 10^{-9}}} = 8z, \quad (40)$$

kde AL [nH] je konstanta vybraného typu jádra. Pak můžeme určit i počet závitů sekundárního vinutí pomocí převodního poměru:

$$N_2 = N_1 \cdot n = 1264z \quad (41)$$

Dále je potřeba ověřit, zda se daný počet závitů vejde do prostoru okénka pro navinutí. K dispozici byl měděný drát o průměru 0,21 mm (d_1) a 0,12 mm (d_2). Tenší z nich se použil pro vinutí sekundární. Vybraný typ jádra disponuje efektivním průřezem 63 mm^2 a plochou okénka 30,9 mm^2 [73]. Průřezy pro primární S_{v1} a sekundární vinutí S_{v2} při použití zmíněných drátů zjistíme následně:

$$S_{v1} = \frac{N_1}{a_v} \cdot \frac{\pi \cdot d_1^2}{4} = \frac{8}{0,5} \cdot \frac{3,14 \cdot (0,21 \cdot 10^{-3})^2}{4} = 0,55 \text{ mm}^2 \quad (42)$$

$$S_{v2} = \frac{N_2}{a_v} \cdot \frac{\pi \cdot d_2^2}{4} = \frac{1264}{0,5} \cdot \frac{3,14 \cdot (0,12 \cdot 10^{-3})^2}{4} = 28,57 \text{ mm}^2 \quad (43)$$

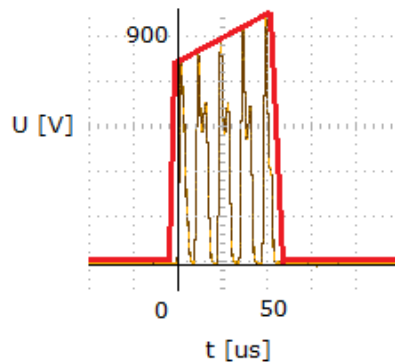
kde a_v je zvolená hodnota činitele vinutí (0,5), d_1 a d_2 jsou použité průměry drátů. Celková potřebná plocha okénka S_v je dána součtem $S_{v1} + S_{v2} = 29,12 \text{ mm}^2$.

Nyní nám zbývá ověřit jak početně, tak praktickým měřením s pomocí osciloskopu, zda parametry navrženého transformátoru jsou vyhovující. Sloučením a úpravou rovnic (37) a (42) dodatečně spočteme požadovaný průřez jádra S_j pro námi vypočtené hodnoty jako:

$$S_j = \sqrt{\frac{1,6 \cdot \pi \cdot d_1^2 \cdot \Phi_c}{2 \cdot a_v \cdot B}} = \sqrt{\frac{1,6 \cdot 3,14 \cdot (0,21 \cdot 10^{-3})^2 \cdot 3,15 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot 0,5 \cdot 0,235}} = 17,23 \text{ mm}^2 \quad (44)$$

Efektivní průřez jádra je několikanásobně vyšší než potřebný průřez jádra S_j , tím vybrané jádro vyhovuje. Porovnáme-li dále potřebnou plochu okénka S_v se skutečnou plochou okénka jádra, obě vinutí by měla rozměry okénka respektovat. Bohužel ale není k dispozici příliš velká prostorová rezerva, se kterou je vhodné počítat vzhledem k tomu, že každá řada závitů je prokládána izolačním papírem. Ve skutečnosti však bylo možné počet závitů vinutí ještě redukovat vzhledem k novému principu stimulace kumulativním skládáním podprahových impulsů, které jsou generovány s mnohem vyšší frekvencí. Dlouhý impuls, u kterého pokles temene závisí na indukčnosti, je nahrazen řadou krátkých impulsů, u nichž rychlý pokles v důsledku snížení indukčnosti nevádí a naopak se zvýší účinnost přenosu energie transformátorem. Znásobením počtu impulsů se tedy sníží potřebná indukčnost transformátoru, a tím i počet závitů sekundárního vinutí.

Funkčnost transformátoru byla ověřena praktickým měřením a záznamem tvaru výstupních impulsů, viz Obrázek 25.



Obrázek 25: Tvar impulsů na výstupu mikrostimulátoru. Záznam získaný z praktického měření s osciloskopem. Červeně je naznačen výstupní terapeutický impuls jako obálka řady impulsů.

K vylepšení mikrostimulátoru by nepochybně přispělo také naprogramování jednočipového mikrokontroléru (např. Motorola Nitron), který by zcela nahradil zapojení s časovači 555 a ještě zmenšil rozměry stimulátoru. Bohužel tuto variantu již nebylo možné realizovat z důvodu časového omezení i rozsahu diplomové práce, která dále směřovala především k praktickému ověřování terapeutických účinků mikrostimulace.

10 Zkoušky mikrostimulátoru

Experimentální část diplomové práce se zabývá sledováním účinků mikroimpulzní stimulace. Protože bude měření provedeno na živých objektech, je kladen velký důraz na bezpečnost stimulace, tedy prevenci rizika vzniku nebezpečných situací a ohrožení objektu měření. Nejlepším způsobem, jak nezávisle a objektivně posoudit splnění náročných požadavků norem, je otestování zařízení podle předepsaných postupů. Tímto jsou pověřeny pouze laboratoře státních zkušeben, autorizovaných Úřadem pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (ÚNMZ).

Zkouškami mikrostimulátoru se zabýval Institut pro testování a certifikaci, a. s. Pro testování bylo dodáno následující zařízení (viz Obrázek 26):

- A) Mikrostimulátor – funkční vzorek s označením MST-11
- B) Síťový adaptér Mean Well, model GPSU06E-1.



Obrázek 26: Funkční vzorek mikrostimulátoru se síťovým adaptérem

Testy byly provedeny akreditovanou zkušební laboratoří č. 1004.3, specializující se na zkoušky klimatické, mechanické, elektromagnetické slučitelnosti a elektrické bezpečnosti. V souladu s vybranými normami, uvedenými v kap. 8.3, byly na zařízení provedeny zkoušky elektrické bezpečnosti a elektromagnetické slučitelnosti. Průběh zkoušek a výsledky jsou shrnuty v protokolech, které jsou k připojení v rámci přílohy na CD médiu.

10.1 Elektrická bezpečnost

Zkoušky elektrické bezpečnosti byly provedeny podle všeobecných požadavků základní normy ČSN EN 60601-1 ed.2:2007 a zvláštních požadavků na bezpečnost nervových a svalových stimulátorů dle ČSN EN 60601-2-10:2001+A1:2002, opr.1:2008. V následujícím textu jsou zmíněny nejdůležitější body těchto norem, které se na zkoušené zařízení vztahují a podle nichž proběhly příslušné zkoušky.

10.1.1 ČSN EN 60601-1 ed.2: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost

Dle kapitoly 4, *Všeobecné požadavky*, jsou kontrolovány záznamy dokumentace řízení rizika (nezbytná funkčnost, předpokládaná životnost aj.), požadavky na konstrukci přístroje, jeho součástí a napájení. Přístroj by měl být testován za podmínek jedné poruchy a musí být navržen tak, aby zůstal bezpečný nebo případné vzniklé riziko bylo přijatelné. K výběru poruch, které budou testovány, slouží dokument vypracované rizikové analýzy (viz Příloha C).



Obrázek 27: Příprava mikrostimulátoru ke kondicionování v klimatické komoře VCV4034

Kapitola 5, *Všeobecné požadavky na zkoušení ME přístrojů*, se zaměřuje na definici typových zkoušek, okolních podmínek při testování (teplota, vlhkost, atmosférický tlak) a pořadí zkoušek. Před měřením dotkových proudů, proudů unikajících pacientem a zkouškami elektrické pevnosti je potřeba celý ME (z angl. medical electrical) přístroj podrobit kondicionování ve vlhku (48 hodin při vlhkosti 93% a teplotě 26 °C), viz Obrázek 27. Na základě prohlídky přístroje a náhledu do průvodní dokumentace se identifikují příložené a přístupné části.

Kapitola 6, *Klasifikace ME přístrojů a ME systémů*, posuzuje zařízení zejména z hlediska ochrany před úrazem elektrickým proudem. Mikrostimulátor je klasifikován jako ME přístroj s vnitřním napájením. Příložené části nesou označení CF, které představuje nejvyšší stupeň ochrany pacienta před úrazem elektrickým proudem. Zajišťuje se zvýšeným oddělením od ostatních přístupných částí přístroje a omezuje se tak velikost průtoku proudu pacientem. Přístroj musí být přizpůsoben režimu trvalého provozu, tzn. po 15 minutách provozu u jednoho pacienta jej bude možné okamžitě použít u následujícího pacienta (dle ČSN EN 60601-2-10 [59]). Testovaného zařízení se netýkají způsoby sterilizace a ochrana před škodlivým vniknutím vody nebo pevných těles.

Kapitola 7, *Identifikace, značení a dokumentace ME přístroje*, kontroluje použitelnost uvedených údajů, čitelnost a trvanlivost značení. Štítek mikrostimulátoru musí obsahovat identifikaci výrobce, označení modelu, stanovená napájecí napětí, značení pro připojení k napájecí síti a označení příložené části příslušným symbolem podle normy (viz Obrázek 28). Značení uvnitř přístroje pak obsahuje údaje o typu baterie a způsobu jejího vložení a o typu a hodnotách pojistek. Důsledně je kontrolováno značení ovládacích prvků a barvy světelných návěstí. Veškerý technický popis přístroje je nezbytnou součástí průvodní dokumentace (viz Příloha B). Ta dále zahrnuje podrobný návod k použití, uvedení kontraindikací a omezení, spojených s používáním přístroje, informace o čištění a

údržbě přístroje a ochraně životního prostředí. Podle [59] musí dále obsahovat informace o výstupním impulzu (tvar, kmitočet, trvání, maximální amplituda) a použitých elektrodách. Důležitá jsou rovněž upozornění na rizika, spojená s použitím stimulátoru zejména u pacientů s implantovaným elektronickým zařízením nebo provozu stimulátoru v blízkosti jiných elektrických terapeutických přístrojů, kdy může dojít k vzájemnému ovlivňování činnosti.

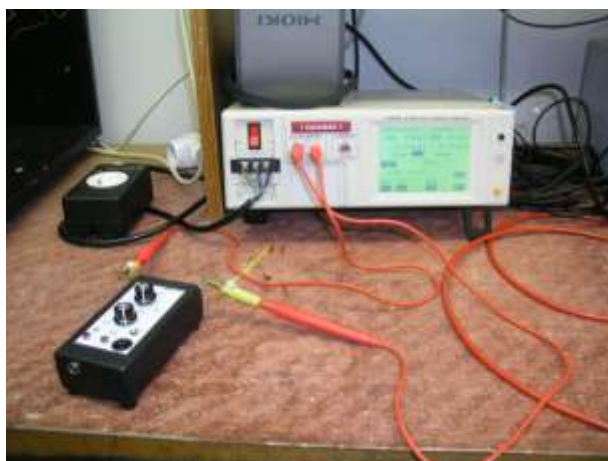


Obrázek 28: Značení mikrostimulátoru

Kapitola 8, *Ochrana před elektrickými nebezpečími způsobenými ME přístrojem*, se zabývá pravidly ochrany před úrazem elektrickým proudem. Ověřuje splnění požadavků souvisejících s napájecím zdrojem a jeho připojením. Uvedená omezení napětí, proudu nebo energie dodané pacientovi se netýkají proudů, které mají při normálním použití vyvolat fyziologický účinek. V tomto případě jsou kontrolovány všechny části přístupné dotyku, na nichž by se mohl objevit nežádoucí unikající proud. Povolené hodnoty unikajících proudů a pomocných proudů pacientem jsou vymezeny příslušnými tabulkami normy, ale zásadně platí, že efektivní hodnota unikajícího proudu nesmí překročit 10 mA za normálního stavu nebo při jedné poruše. To se ověřuje měřením podle zkušebních schémat. Pro měření dotykového proudu a proudu unikajícího pacientem se na izolační kryt přístroje těsně přiloží kovová fólie. Proudů jsou měřeny mezi výstupem přístroje a fólií (viz Obrázek 29). Dále je zahrnuta kontrola izolace. Elektrická pevnost se ověřuje přivedením stanovených úrovní zkušebního napětí na výstupní elektrody po dobu 1 minuty za požadovaných podmínek (viz Obrázek 30). U zkoušky pevnosti krytu přístroje bylo použito zkušební střídavé napětí 1000 V a u síťového adaptéru 3000 V. Kryt byl rovněž testován z hlediska mechanické pevnosti a tepelné odolnosti vtlakováním kuličky při teplotě 75 °C. Zkoušeného zařízení se týká také kontrola povrchových cest a vzdušných vzdáleností a prostředky pro elektrické odpojení obvodů od napájecí sítě.



Obrázek 29: Měření dotykového proudu a proudu unikajícího pacientem



Obrázek 30: Zkouška elektrické pevnosti

V souladu s kapitolou 10, *Ochrana před nebezpečími z nežádoucího a nadměrného záření*, byla potvrzena neškodnost světelných LED diod jako jediného zdroje záření v přístroji.

Podle kapitoly 11, *Ochrana před nadměrnými teplotami a jinými nebezpečími*, byla provedena zkouška, zda při normálním provozu přístroje nedosáhnou jeho části teplot, jež by překročily povolené hodnoty, nebo nezpůsobí překročení teploty povrchů zkušebního kouta nad 90 °C (viz Obrázek 31).



Obrázek 31: Zkouška měřením teplot částí mikrostimulátoru pro zjištění úrovně ochrany před nebezpečnými teplotami

Kapitola 12, *Přesnost ovládacích prvků a přístrojů a ochrana před nebezpečným výstupem*, posuzuje použitelnost těchto prvků, míru ochrany před nebezpečným výstupem a indikaci parametrů souvisejících s bezpečností.

Kapitola 13, *Nebezpečné situace a poruchové stavy*, se zaměřuje na specifické nebezpečné situace (emise, deformace krytu) a stavy při jedné poruše (přehřátí transformátoru uvnitř přístroje).

Podle kapitoly 15, *Konstrukce ME přístroje*, proběhla kontrola uspořádání ovládacích prvků a indikátorů. Dále mikrostimulátor podstoupil zkoušku mechanické pevnosti (působením stálé síly 250N po dobu 5 s), zkoušku volným pádem z výšky 5 cm a zkoušku odstranění vnitřního pnutí výlisků (při zvýšené teplotě 70 °C po dobu 7 hodin). Předmětem testování byl rovněž vnitřní transformátor, který musí být chráněn proti přehřátí v případě zkratu (zkouška zkratem) nebo přetížení kteréhokoliv výstupního vinutí (zkouška přetížením). Z hlediska prevence proti vnitřním zkratům musí být vinutí transformátoru dostatečně izolována, což posoudí zkouška elektrické pevnosti.

Požadavky kapitoly 17, *Elektromagnetická kompatibilita ME přístrojů a ME systémů*, představují specifickou oblast testování, proto je pro ni vypracován zvláštní protokol a současně se jí věnuje samostatný odstavec 10.2 této práce.

Kapitoly 9 (Ochrana před mechanickými nebezpečími u ME přístrojů a ME systémů), 14 (Programovatelné elektrické zdravotnické systémy) a 16 (ME systémy) se na mikrostimulátor jako zkoušené zařízení nevztahují.

10.1.2 ČSN EN 60601-2-10: Zvláštní požadavky na bezpečnost nervových a svalových stimulátorů

Vedle několika doplnění v předchozí kapitole je z normy ČSN EN 60601-2-10 potřeba zmínit požadavky tří následujících kapitol.

Podle kapitoly 46, *Selhání lidského činitele*, se zkouškou prověřuje, zda vlivem špatné manipulace s elektrodami přístroje nedojde ke vzniku nebezpečné situace. Elektrody zapnutého stimulátoru, s parametry nastavenými na maximálních hodnotách, jsou po dobu 10 minut nechány v rozpojeném stavu a následně jsou zkratovány po dalších 5 minut. Po zkoušce přístroj musí splňovat všechny požadavky normy.

V souladu s kapitolou 50, *Přesnost provozních údajů*, je kontrolováno řízení výstupu stimulátoru od minima do maxima. Je nutné zabránit situaci, kdy i s nejmenším přírůstkem výstupu vznikne nepřiměřený stimul. Dále se měřením zjišťuje, zda se nastavené parametry stimulace při specifikovaném rozsahu zatěžovacích impedancí neodchylují o více než $\pm 30\%$. Ovládací prvky mikrostimulátoru mění parametry stimulace plynule, nikoliv po diskrétních krocích, čímž výrazně přispívá k bezpečnosti stimulace.

Kapitola 51, *Ochrana před nebezpečným výstupem*, se zaměřuje na odchylky napájecího napětí, blokování a indikaci výstupu a omezení výstupních parametrů. Vzhledem k tomu, že mikrostimulátor je bateriově napájen, nedochází k ovlivnění výstupu vlivem odchylek napájecího napětí. Možné přesahy přípustných hodnot výstupního proudu jsou ověřeny měřením.

Mikrostimulátor splňuje všechny požadavky výše uvedených předpisů a dokladem toho je zkušební protokol č. 3343/11 (viz Příloha E a Příloha N).

10.2 Elektromagnetická slučitelnost

Každé elektrické zařízení se může stát zdrojem rušivého vyzařování a ovlivňovat tak činnost ostatních zařízení ve svém blízkém okolí, a to nežádoucím způsobem. Mikrostimulátor může například ovlivnit funkci implantovaného kardiostimulátoru a v krajním případě tak ohrozit pacienta na životě. Obdobně nesmí dojít k nežádoucímu ovlivnění činnosti mikrostimulátoru jiným zařízením. Ověření, zda nedochází k nadměrnému vzájemnému ovlivňování stimulatoru a jeho okolí, se provádí měřením ve stíněné bezodrazové komoře s příslušnou aparaturou (viz Obrázek 32).



Obrázek 32: Anténa ve stíněné bezodrazové komoře, pracoviště ITC Uherské Hradiště

10.2.1 Měření vyzařovaného rušení

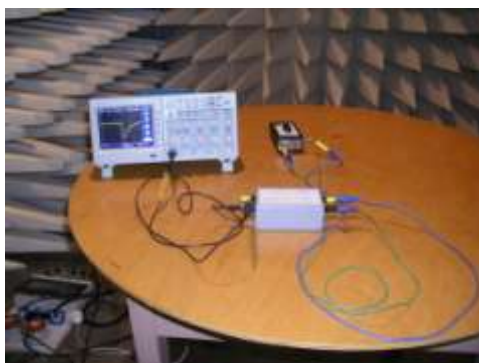
V průběhu zkoušky byl mikrostimulátor v provozním režimu stimulace s parametry nastavenými na maximum. K aplikačním elektrodám byla připojena náhradní impedance lidského těla. Zařízení je dle normy ČSN EN 60601-1-2 posuzováno jako zařízení skupiny 2 plnící požadavky normy ČSN EN 55011 (CISPR11), třídy B. Nejdříve byly měřeny úrovně vyzařovaného pole, které produkuje zařízení do prostoru v pásmu kmitočtů ($30 \div 1\,000$) MHz. Měrný přijímač s detektorem peak byl připojen k měřicí anténě. Úrovně vyzařovaného elektromagnetického pole byly měřeny pro horizontální (H) i vertikální (V) polarizaci měřicí antény. Dále bylo provedeno měření emisí harmonického proudu a měření omezování kolísání napětí a flikru v síti.

10.2.2 Odolnost

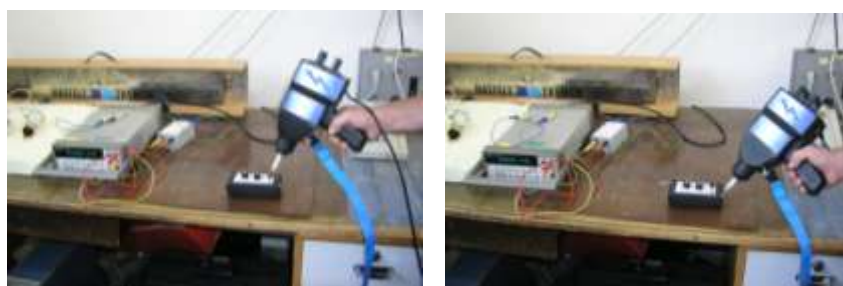
Při požadovaných zkušebních úrovních vnějších vlivů musí mikrostimulátor plnit požadavky ČSN EN 60601-1-2 pro přístroje, které nejsou určeny k udržování životních funkcí. Nesmí tedy dojít ke změně tvaru a amplitudy výstupního impulsu a LED diody na panelu musí správně signalizovat nastavený provozní režim. Pro zkoušky odolnosti byl mikrostimulátor v provozním režimu stimulace s parametry na maximálních hodnotách umístěn na dřevěném stole. Na připojené náhradní impedanci lidského těla se osciloskopem monitoroval výstupní impuls, viz Obrázek 33.

Byly provedeny *zkoušky odolnosti proti elektrostatickému výboji*, jednak vzduchovou metodou na nevodivý povrch zařízení a kontaktní metodou na vodivé části (viz Obrázek 34). Následovala *zkouška odolnosti proti elektromagnetickému poli* a *zkouška odolnosti vůči magnetickému poli síťového kmitočtu*, při níž byl mikrostimulátor umístěn ve výšce 0,1 m nad referenční zemní plochou, na nekovovém podkladě výšky 0,8 m. Indukční cívka s průměrem 1 m, buzená

z autotransformátoru, vytvořila magnetické pole, které bylo aplikováno ve všech osách zařízení (viz Obrázek 35).



Obrázek 33: Zkouška odolnosti vůči působení vnějšího elektromagnetického pole



Obrázek 34: Zkouška odolnosti proti elektrostatickému výboji vzduchovou (vlevo) a kontaktní metodou (vpravo)

Dále musí být stimulátor schopen provozu ve vysokofrekvenčním poli, které může vytvářet krátkovlnné terapeutické zařízení. Současně nesmí dojít k odchýlení tvaru vlny více než o 10% kteréhokoliv z jeho parametrů (amplituda, trvání, kmitočet). Zda je stimulátor dostatečně chráněn, bylo ověřeno zkouškou s přivedeným výkonem 2,5 W při kmitočtu 27 MHz. Stimulátor byl při zkoušce umístěn na kovové desce, s níž byly vodivě spojeny všechny přístupné vodivé části přístroje.



Obrázek 35: Zkouška odolnosti proti magnetickému poli síťového kmitočtu.

Podle výsledků zkoušek mikrostimulátor splňuje požadavky výše uvedených předpisů a dokladem toho je zkušební protokol č. 3670/11 (viz Příloha D, Příloha N).

Závěry provedených zkoušek dokládají, že testovaný funkční vzorek mikrostimulátoru s označením MST-11 vyhovuje všem požadavkům norem kladených na zdravotnická zařízení a na základě toho může používat mezinárodní označení shody **CE**.

11 Experimentální testování účinků mikrostimulace

Prvotní testování vlivu jakéhokoliv typu léčby bývá obvykle zahájeno na nižších formách života jako jsou buňky a tkáňové kultury. Cílem je snaha předcházet fatálním následkům neznámé terapie, např. možné toxicitě zkoumaných chemických látek, nebo může být přímo záměrem studie pozorování reakce dané kultivace na látku nebo fyzikální podnět. Teprve po prokázání relativní neškodnosti a převahy příznivých účinků nad negativními se přistupuje k aplikaci na vlastním živém organismu (zvířata, lidé). Z tohoto pohledu však mikrostimulace představuje odlišný typ terapie. Nejde primárně o chemickou formu terapie, nicméně chemické reakce organismu, vznikající sekundárně při aplikaci, jsou očekávány. Aktivní forma energie má fyzikální původ, neboť se jedná o působení elektrického proudu, jak bylo popsáno v rešeršní části práce. Vzhledem k několika možným typům mechanismu působení vyžaduje otestování mikrostimulace pokud možno komplexní systém, nikoliv jen jeho část ve forma tkáně či orgánu. Mohou být shrnuty důležité aspekty hovořící pro bezproblémové použití mikrostimulace přímo u živého organismu:

1. Nejde o invazivní ani bolestivou formu terapie.
2. Nezasahuje závažným způsobem do přirozených podmínek prostředí zkoumaného objektu.
3. Mikrostimulátor je vlastním návrhem i konstrukcí přizpůsoben pro bezpečné použití na živém organismu (soustředné elektrody, bateriové napájení).
4. Parametry stimulace (šířka impulsu, amplituda a frekvence) jsou nastavitelné v rozumných mezích.
5. Označení **CE**, které mikrostimulátor získal na základě provedených zkoušek bezpečnosti, je uznávaným dokladem toho, že zařízení je konstruováno v souladu s příslušnými normami, obsahuje prostředky k prevenci vzniku nepřiměřeného rizika a zajišťuje maximální ochranu před vznikem nebezpečných situací.

Výše zmíněné vlastnosti terapie měly rozhodující význam pro etickou komisi, která posuzovala žádost o povolení experimentů na velmi specifických a ne zcela obvyklých zvířatech pro testování, jakými jsou koně. Prvořadým zájmem etické komise je, aby zvířata v experimentu pokud možno netrpěla vůbec, nebo co nejméně v porovnání s předpokládanou diagnostickou výtežností. Neopomenutelným kladem navrženého experimentu je také nepotřebnost použití analgezie a dále skutečnost, že kůň může být po experimentu využíván majitelem obvyklým způsobem.

Na základě udělení oficiálního písemného souhlasu odborné etické komise pro ochranu zvířat a následně i Ministerstva školství (viz Příloha F, Příloha I) mohly být ve spolupráci s Klinikou chorob koní Veterinární a farmaceutické univerzity Brno provedeny dva projekty pokusů na živých koních:

- Projekt pokusu č. 61/2011: Sledování terapeutického účinku mikroimpulzní stimulace na zánětlivé otoky končetin koní.
- Projekt pokusu č. 62/2011: Sledování vlivu mikroimpulzní stimulace na prokrvení končetiny koně.

Oba projekty jsou tematicky propojeny a předpokládá se, že jejich výsledky se budou vzájemně doplňovat, neboť úspěšná redukce otoku úzce souvisí právě s podporou krevního řečiště (viz kap. 4.2).

12 Monitorování fyziologického účinku mikrostimulace na cévní řečiště končetin koní

Snahou tohoto experimentu je objektivní posouzení, zda a jakým způsobem může mikroimpulzní stimulace ovlivnit prokrvení končetiny. Jak bylo naznačeno v kapitole 4.2, prokrvení končetin se dá měřit různými metodami, avšak ne všechny jsou stejně spolehlivé a šetrné k pacientovi. S výjimkou kapilarometrie a invazivního zobrazení řečiště je většina vyšetřovacích technik založena na nepřímém měření prokrvení, např. sledování změn elektrické impedance vyšetřované oblasti v závislosti na změně objemu krve mezi elektrodami u impedanční reopletysmografie nebo změn frekvence ultrazvuku rozptýleného anatomickými strukturami u Dopplerovy sonografické metody.

Nepřímé metody se více prosadily vzhledem ke své neinvazivnosti a minimálnímu diskomfortu pacienta, ovšem na úkor přesnosti a spolehlivosti výsledků. Do této skupiny můžeme zařadit rovněž termodynamické metody zjišťování prokrvení založené na měření teploty kůže. Obvykle se využívají teploměry pracující na principu termočlánku nebo teploměry odporové. Zjistitelná teplota je základní fyzikální veličinou pro popis a monitorování stavu termodynamických systémů a je výsledkem mezi přívodem tepla do podkoží a jeho výdejem do okolí. Teplota je stavová veličina a poskytuje objektivní informaci jen v případě, že je tento stav ustálený [75]. K ustálení systému však nedochází náhle, ale je důsledkem předcházejících změn aktivity systému. Z tohoto pohledu lze mít o výpovědní přesnosti metody zjišťování prokrvení na základě měření teploty určité pochybnosti, neboť krevní řečiště je dynamický systém, o jehož stabilitě setrvání v jednom stavu po dobu několika sekund můžeme těžko hovořit. Krev v cévách živého organismu podléhá neustálému koloběhu, který je řízen aktivitou srdce jako tlakové pumpy. Výhodnější by tedy byla možnost měřit přímo změny tepelné aktivity systému jako příčiny změny teplotních poměrů v systému, které vedou k nastolení nové bilanční rovnováhy. Problematikou termodynamické sensoriky a možnostmi její aplikace se zabývá tým řešitelů z firmy HIT s. r. o., Nedachlebice, a Ústavu mikroelektroniky FEKT VUT. Speciálně pro účel měření tepelných změn souvisejících s prokrvením končetin u koní byly navrženy a vyrobeny termodynamické sondy, jejichž podrobnějšímu popisu věnuje pozornost následující kapitola, neboť jde o zařízení poměrně nové, nacházející své uplatnění v mnoha moderních aplikacích.

12.1 Termodynamická sensorika

Průkopníkem termodynamické sensoriky v ČR je firma HIT, s. r. o. (Hybrid Integrated Technologies) se sídlem v Nedachlebicích, která se zabývá výzkumem, vývojem a aplikacemi snímačů založených na principu bilanční energetické rovnováhy. Tento způsob snímání, jako zatím jediný, umožňuje vyhodnotit nepatrné teplotní rozdíly blízké nule, a proto nachází aplikace všude tam, kde ostatní dosud běžně používané senzory selhávají.

Obecně je snímání tepelných toků v neustálených termodynamických soustavách v současné době nahrazováno měřením teplot, což představuje omezení v rozlišovací schopnosti a nejistotách. Systémy pro snímání teploty jsou vázány na předem definovanou stupnici a vzhledem ke konečné převodní citlivosti je dán také funkční rozsah použití. *Aktivní termodynamický systém*, tj. obsahující nejméně jeden vlastní *termoaktivní prvek* (obecně topidlo nebo chladidlo), může být popsán teplotou jako stavovou veličinou pouze v případě, kdy se nachází v *ustáleném stavu*. Toho může být dosaženo

v konečném čase v případě, že aktivity všech termoaktivních prvků systému setrvávají dlouhodobě na konstantní hodnotě. Tepelný tok přes libovolnou plochu vnitřního řezu je pak konstantní a systém setrvává ve stabilizované bilanční rovnováze. Tento stav je porušen změnou aktivity libovolného termoaktivního prvku soustavy a změní se na *stav neustálený*. Pokud po určité době přejde systém do nového ustáleného stavu s novou rovnováhou, můžeme říct, že došlo k *přechodovému ději* mezi dvěma po sobě následujícími odlišitelnými ustálenými stavy. Další možností je *přechodný děj*, kdy jsou dva po sobě následující ustálené stavy mezi sebou neodlišitelné a systém se po vychýlení vrací k výchozí rovnováze. V těchto neustálených případech je teplota nepřímým popisem chování systému, neboť se zpožděním naznačuje pouze trend změny poměrů v systému, vzniklý v důsledku předchozích změn aktivity uvnitř či vně systému [75], [79].

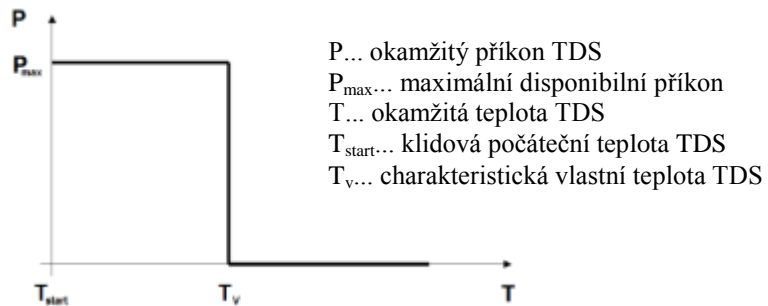
Paradoxem je, že i jednotkový přechodový děj po jednotkové změně aktivity je popisován exponenciální závislostí teploty na čase, k jejímuž ustálení však v konečném čase nedojde. Za ustálený stav je tedy považována situace, kdy se teplota ustálí na hodnotě, která je od předchozí hodnoty vzhledem k necitlivosti snímače neodlišitelná. Podobně jsou těžko odlišitelné zdroje aktivity, které představují pravou příčinu změny monitorovaného systému. Těmto problémům se prakticky předchází použitím více snímačů teploty nebo vhodným umístěním senzoru do bezprostřední vzdálenosti od známého zdroje aktivity v systému. Jako mnohem efektivnější řešení problému s měřením teplotních závislostí se nabízí změna principu metody monitorování, nejlépe její úplná náhrada za sledování příčin změny stavu termodynamických systémů, tzn. tepelných aktivit, nikoliv stavového důsledku reprezentovaného teplotou [75].

12.1.1 Pozitivně aktivní termodynamický senzor (Resistive ThermoDynamic Sensor – zkr. TDS)

Výsledkem řešení nedostatků teplotního měření je termodynamický senzor, navržený a vyrobený firmou HIT, s. r. o. Snahou autorů bylo do reálného termodynamického systému začlenit prvek, který by umožnil monitorovat soustavu jak během ustálených, tak neustálených stavů. Jestliže má takový termoaktivní prvek objektivně popisovat změny probíhající v systému, musí být sám na stavu okolního systému nezávislý. Toho lze docílit umělým udržováním prvku v trvale rovnovážném stavu, který je charakterizován jeho konstantní teplotou. Prvek musí být schopen vlastní tepelnou aktivitou kompenzovat svou interaktivitu s měnící se okolní termodynamickou soustavou. Lze tedy shrnout vlastnosti ideálního termodynamického senzoru:

1. TDS je sám termoaktivním prvkem monitorované soustavy.
2. TDS je trvale udržován v ustáleném stavu, tzn. na konstantní teplotě.
3. TDS sám tepelně interaguje s bezprostředním okolím monitorované soustavy.
4. Vlastní tepelnou interakci plně a trvale kompenzuje vlastní termoaktivitou.

Vlastní aktivita TDS a interaktivita s jeho bezprostředním okolím musejí mít shodnou hodnotu, ale opačných znamének. Vlastní termoaktivitu senzoru lze tedy chápat jako odezvu na změnu prostředí a jejím monitorováním získáme přehled o tepelných dějích v okolní soustavě. Skutečně měřitelnou elektrickou veličinou je pak okamžitý příkon senzoru, který je potřeba k jeho udržení v rovnovážném stavu, tzn. na konstantní teplotě. Výkonově teplotní charakteristika takového pozitivně termoaktivního senzoru by měla vyhovovat průběhu křivky, viz Obrázek 36.



Obrázek 36: Výkonově teplotní charakteristika ideálního pozitivně aktivního TDS [75], [78]

Podle uvedené charakteristiky má ideální TDS výchozí klidovou teplotu T_{start} nižší než jemu vlastní pracovní teplotu T_v , na kterou se po zapnutí díky okamžitému maximálnímu možnému příkonu P_{max} rychle dostane a setrvává na ní. Jakmile je pracovní teploty senzoru dosaženo, příkon se přizpůsobí okamžité spotřebě závislé na jeho interakci s bezprostředním okolím. Tím je TDS uveden do ustáleného stavu. Pokud je rovněž monitorovaná termodynamická soustava v rovnovážném stavu, ustálí se příkon na konstantní hladině. Dojde-li však k jakémukoliv vychýlení soustavy z rovnováhy, bude se do okamžiku nastolení nové rovnováhy měnit hodnota interakce s TDS, jejíž vliv bude TDS okamžitě kompenzovat vlastní aktivitou (opačného znaménka), a výsledné změny budou měřitelné formou okamžitého příkonu, který je potřeba pro udržení TDS na konstantní teplotě. Senzor může být vyveden ze svého rovnovážného stavu pouze tehdy, když není schopen kompenzovat změny okolí snížením nebo zvýšením příkonu v možném rozsahu od 0 do P_{max} . Pak se TDS nachází v neustáleném stavu a příkon jako měřená veličina přestává nést věrohodnou informaci o chování systému. Naopak v rozsahu příkonů $P \in \langle 0, P_{max} \rangle$ TDS objektivně popisuje okamžitý stav monitorované soustavy.

12.1.2 Návrh a realizace TDS

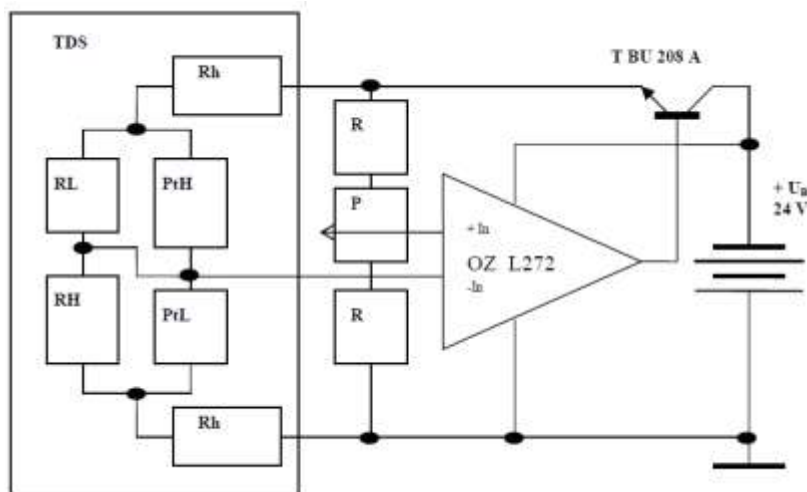
Konstrukce TDS se odvíjí od konkrétní aplikace, v níž bude použit, tzn. od vlastností reálné termodynamické soustavy. Platí několik obecných zásad:

- 1) Charakteristická teplota senzoru musí být vyšší než maximální teplota dosažitelná v monitorovaném termodynamickém systému v místě instalace.
- 2) Maximální příkon senzoru musí zajistit jeho vyhřátí na pracovní teplotu i při nejnižší možné teplotě dosažitelné v místě instalace.
- 3) Vnější termodynamické zapojení musí mít nejlepší možnou citlivost jednak na signál senzoru a také na výkonovou ztrátu pouzdra výkonného prvku zapojení, který dodává senzoru energii.
- 4) Převodní citlivost a zpoždění odezvy úzce souvisí s umístěním senzoru vzhledem ke zdroji aktivity, která má být monitorována.

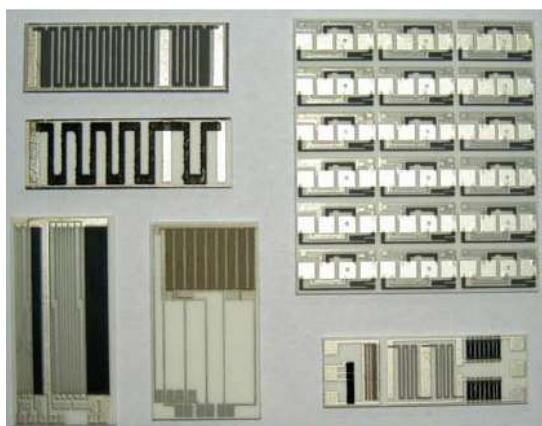
Pro experiment prováděný na koních byl navržen TDS s parametry a komponentami speciálně upravenými pro účel měření (viz Obrázek 39) a je realizován hybridní technologií tlustých vrstev. Přesné schéma zapojení je vlastnictvím výrobce TDS a na jeho přání nebude v práci zveřejněno. Pro základní představu o principu metody však postačí schéma termodynamického zapojení TDS, jak uvádí Obrázek 37.

Vlastní termodynamický senzor je tvořen dvěma stejnými topnými rezistory R_h a antiparalelní kombinací asymetrických teplotně závislých rezistorů P_{tH} a P_{tL} a teplotně nezávislých rezistorů R_H a

R_L [75], [76]. V tomto zapojení pracuje TDS jako velmi přesný senzor rozdílu teploty od jeho vlastní. Pracovní teplota senzoru může být nastavena potenciometrem P. Operační zesilovač L272 řídí výkon dodávaný tranzistorem BU208 A s maximálním zesílením rozdílového signálu, který je dán vstupy $-In$ a $+In$. Celá soustava je napájena napětím U_B 24 V. Podrobnější popis systému nalezneme např. v [79]. Ukázkou praktických realizací senzorů pro různé aplikace uvádí Obrázek 38.



Obrázek 37: Schéma termodynamického zapojení TDS [75], [76]



Obrázek 38: Ukázka hotových vzorků TDS navržených pro použití v různých aplikacích [76]

Navržený termodynamický senzor, jak byl ve zkratce popsán, umožňuje komplexní monitorování energetické aktivity v libovolném termodynamickém systému. Termodynamika je prakticky všude kolem nás a sami jsme součástí termodynamického systému, který vlastní činností ovlivňujeme. Díky svým vlastnostem, zejména mimořádné citlivosti, TDS postupně nachází uplatnění v řadě průmyslových, elektrochemických, biotechnologických i nano-aplikacích, u nichž ostatní metody podávají buď nedostatečné výsledky či zcela selhávají [77]. Můžeme zmínit např. monitorování HIRF, tj. výskytu nebezpečných intenzit elektromagnetických polí na draku letounu, v kokpitu a kabelážích, sledování dokončení procesu kvašení jogurtových kultur, rozpoznání nepatrného množství vody v oleji (např. olejové náplně motorů), rozpoznání přetržení jednotlivých nanovláken z několika stovek při jejich výrobě a předvídání mechanických poruch ložisek velkých čerpadel pro chlazení atomových elektráren.



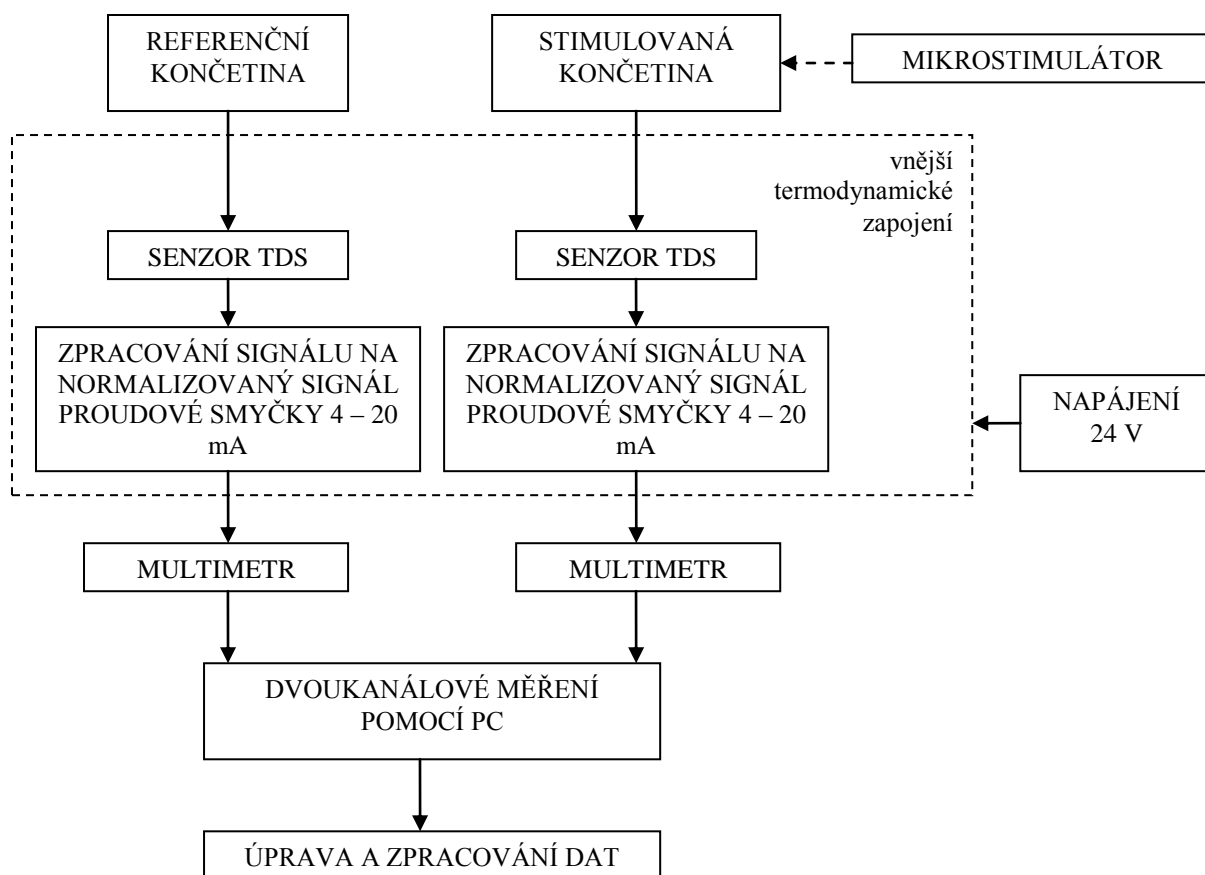
Obrázek 39: Praktická realizace TDS pro měření na koních

12.2 Technické zázemí experimentu

Technické vybavení pro provedení uvedeného experimentu sestává z následujících zařízení:

typ zařízení	označení
Mikroimpulzní stimulátor	MST-11
Napájecí zdroj HIT UNAZ 24 V (3 W)	008
Napájecí zdroj HIT UNAZ 24 V (3W)	009
Termodynamický senzor HIT BZO-TR	001
Termodynamický senzor HIT BZO-TR	002
Digitální multimetr VA 18B	VA100813351/01037
Digitální multimetr VA 18B	VA100813378/01166
Notebook Toshiba Satellite A200	87350001K
kabeláž	

Schematický popis celé měřicí soustavy uvádí Obrázek 40, skutečné uspořádání pak Obrázek 41. Soustava je navržena pro párové měření signálů pomocí TDS z obou předních končetin, přičemž pouze jedna končetina je stimulována, zatímco druhá označena jako referenční. Na každou přední končetinu koně je pomocí manžety upevněna termodynamická sonda, aby těsně přiléhala na kůži, ale zároveň nevytvářela nepříjemný tlak. Manžetu tvoří pružný pásek s upevněním na suchý zip se sondou zabudovanou přímo v pásku. Suchý zip je zvolen zejména z bezpečnostních důvodů, neboť představuje rychlý způsob odepnutí sond např. při polekání koně. Spojení sond s vnějším termodynamickým zapojením zajišťují prodlužovací kabely zakončené tahem snadno rozpojitelnými 9-ti kolíkovými konektory Canon. Opět jde o preventivní opatření, které slouží k okamžitému odpojení sond od celé měřicí aparatury v případě nepředvídaného chování koně. Zabráni se tak přinejmenším zpřetrhání kabelů či poškození sondy.



Obrázek 40: Blokové schéma uspořádání experimentu

Změna tepelné aktivity TDS je zpracována do podoby elektrického signálu, který je měřitelný připojenými multimetry. Aby mohl být proveden kontinuální záznam signálů, byl hledán typ multimetru, který by umožnil přenos dat přímo do počítače. Pro potřeby tohoto měření byl vybrán digitální multimetr V&A, typ VA 18B, disponující optickým USB rozhraním pro propojení s PC. Pro komunikaci s PC byl součástí příslušenství k multimetru rovněž software PC-LINK, umožňující jak záznam hodnot do textového souboru, tak grafické vykreslení hodnot v čase online, ale vzhledem k mnoha nedostatkům nemohl být pro měření využit. Podle výrobce je program univerzálně použitelný pro verze Windows98SE a vyšší, nicméně nebylo možné jej spustit ve Windows 7 a nebyl rovněž plně kompatibilní se starší verzí Windows XP, kde docházelo k častému výpadku programu. Nevýhodou byla také nutnost paralelního spuštění programu pro dva multimetry, což nebylo prakticky realizovatelné ve stejném okamžiku. Dále se objevil problém s velmi netradičním formátem časové osy, který nebylo možné zpracovat žádným známým způsobem v sadě MS Excel. Z toho důvodu byl speciálně pro účel experimentu vytvořen program DOUBLEMETER pro systém LINUX Ubuntu, verze Oneiric 11.10. Program umožňuje dvoukanálové měření v konzolovém prostředí. Na výstupu tak dostáváme průběžné hodnoty obou signálů snímané ve stejném časovém okamžiku, což je důležité pro pozdější správné zpracování a porovnání dat. Výstup programu je automaticky ukládán do textového souboru.



Obrázek 41: Měřicí aparatura (horší kvalita snímku zapříčiněna prašným prostředím stáje)

12.3 Výběr populace koní

Měření proběhlo v období únor–březen 2012 v délce 4 týdnů ve stájích Zlínského a Jihomoravského kraje. Veškerá data jsou vedena jako anonymní a každému koni byl přiřazen písmeno-číselný kód Kxx. Do experimentu byli zařazeni dospělí koně bez omezení pohlaví, tj. klisny, hřebci i valaši, ve věku 5 až 22 let. Pro co nejlepší homogenitu výběrové populace byli přednostně vybíráni zejména koně plemene český teplokrevník. Avšak neméně důležitým kritériem zařazení koně do experimentu byla jeho vyrovnaná povaha a ochota po dobu měření klidně stát, což bohužel není samozřejmostí u celé řady koní. Český teplokrevník tvoří v experimentu početnou skupinu 15 jedinců, dále byli zařazeni tři teplokrevní kříženci a dva angličtí plnokrevníci. Tato volba je zdůvodněna v následujícím odstavci zejména v souvislosti s vlastní historií tohoto plemene.

Český teplokrevník (ČT) je léty prochované plemeno. Nejstarší předci ČT byli španělského a orientálního původu a ve 20. století k výraznému zušlechtění plemene přispěl vysoký podíl krve anglického plnokrevníka. Tak vznikla základní linie anglického polokrevníka, která má u nás zastoupení kmenů Przedswit, Furioso a North Star. Ke zvýšení mohutnosti koně pro práci v tahu byli použiti oldenburští hřebci. Vzhledem k pozdější měnící se povaze využití koní spíše pro jezdecké účely, bylo upuštěno od robustního typu teplokrevníka a za účelem zvyšování sportovní výkonnosti ČT se začali do plemenitby zařazovat také koně hanoverského, holštýnského a trakénského plemene a pro oživení původních znaků se na křížení ve velkém podílu opět anglický plnokrevník [80], [81]. Z tohoto pohledu v sobě český teplokrevník směšuje vlastnosti hned několika typů koní a nejedná se o ryze čisté plemeno, jakým je právě anglický plnokrevník, který má jen několik málo společných předků. Na druhou stranu ale český teplokrevník stále obsahuje vysoký podíl právě anglické krve. Proto by zařazení kříženců a plnokrevných jedinců nemělo experimentu nijak uškodit, ani zanést významné zkreslení do výsledků měření, ale naopak může podpořit variabilitu testované populace.

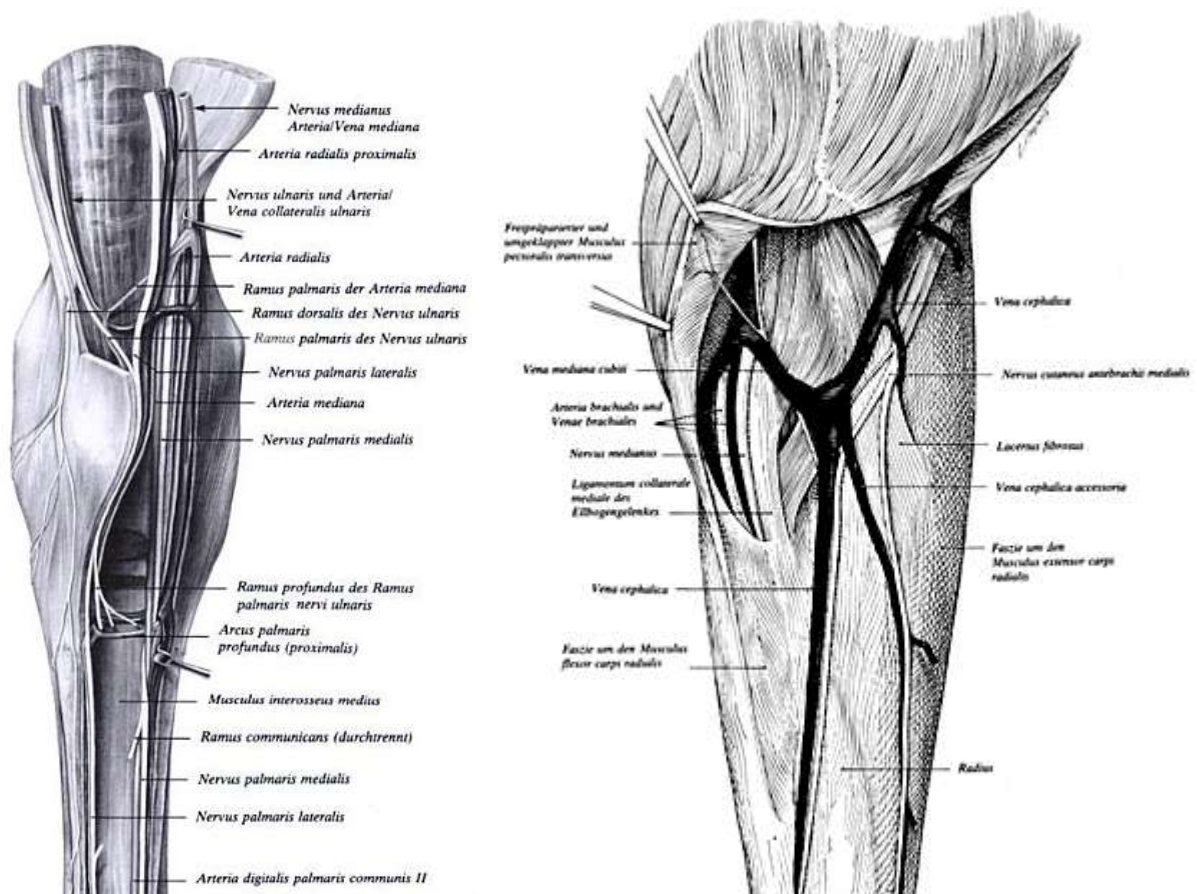
12.4 Popis experimentu

Lokalizace sond na končetině je zvolena hned z několika důvodů. Ačkoliv nejlépe prokrvenou oblastí je především spodní část končetiny, blíže kopytu, sondy jsou umístěny těsně nad kolenem koně (viz Obrázek 43). Jde o oblast průchodu několika hlavních cév a nervových drah přední končetiny, konkrétně *arteria mediana*, *vena mediana*, *vena cephalica*, *nervus medianus*, *nervus cutaneus antebrachii medialis* a *nervus radialis* (viz Obrázek 42). Žíly jsou na končetině hmatatelné a u některých jedinců mohou být dokonce viditelné pouhým okem, zvláště po namáhavé práci. Vzhledem ke kabelovému propojení čidel a vnějšího zapojení je téměř nemožné umístit sondy v dolní polovině končetiny. I při menším ustoupení koně do strany, je rádius posunu mnohem větší než v oblasti paže koně. Chvilé nepozornosti asistující osoby, která hlídá koně a drží prodlužovací kabely sond, může vést k předčasnému přerušení kontaktů, a tím ke znemožnění probíhajícího měření. V horším případě může kůň kabely přišlápnout nebo se zbytečně vylekat, jestliže v důsledku neodpojení kontaktů dojde k popotáhnutí měřicího zařízení směrem k němu.

Se všemi těmito situacemi je nutné při měření počítat, neboť kůň je velmi vnímavý a plaché zvíře. Jakýkoliv podnět, neznámý zvuk, dokonce i nepatrnou změnu svého prostředí, např. nový objekt v boxu či výběhu, dokáže rozpoznat velmi rychle a vnímá jej velmi intenzivně. Teprve poté, co se svým způsobem přesvědčí o bezpečí svém i členů stáda, nové podmínky přijme. Stresovou situaci ale přirozeně řeší útekem. Vzniku nervozity koně, která se nepochybně na měření negativně podepíše, se snažíme předejít klidným a vstřícným přístupem. Koni poskytneme prostor k seznámení se s pro něj novým prostředím a umožníme mu důkladné očichání přístrojů (v nezapnutém stavu). Obvykle pak kůň dokáže při měření trpělivě stát. Často však není možné zcela klidové podmínky po celou dobu měření dodržet, neboť provoz ve stáji i venku lze ovlivnit jen stěží, stejně jako reakci koně na ně. Tímto způsobem pak vzniká řada artefaktů a chyb v měření, které není snadné postihnout.

Jako první byly na očištěné přední nohy koně připevněny samotné sondy, k nim poté prodlužovací kabely spojující sondy se zbývající aparaturou a následně byly přístroje zapnuty. Po nějakou dobu bylo třeba nechat sondy ustálit a přizpůsobit se teplotě kůže. Není však možné očekávat setrvání na jedné konstantní hodnotě, neboť děje uvnitř končetiny mají dynamický charakter. Při výrazném uskočení hodnot z oblasti střední hodnoty (cca 12 mA) měřitelného rozsahu, kolem níž je citlivost sond nejvyšší, je pak možné tuto hladinu nastavit manuálně pomocí trimru na panelu vnějšího zapojení TDS.

Po ustálení sond, které se dá charakterizovat jako oscilace hodnot kolem nějaké střední hodnoty a nedochází již k prudším výkyvům, bylo zahájeno vlastní měření. Výstup programu DOUBLEMETER byl pozorovatelný online přímo na obrazovce PC. Šlo o párové měření, kdy ve stejném okamžiku byly sejmuty hodnoty z obou multimetrů, tj. signály z obou končetin. Jeden sloupec hodnot tedy patřil signálu ze sondy, umístěné na referenční končetině, druhý sloupec hodnot pak signálu ze sondy na končetině stimulované. K jedné z končetin, označené za stimulovanou, byly po dobu 30 sekund přiloženy elektrody mikrostimulátoru v provozním režimu stimulace, a to ve vzdálenosti cca 5 centimetrů nad připevněnou sondou (viz Obrázek 44). Po uplynutí 30 sekund byla stimulace ukončena a mikrostimulátor odstraněn, měření však pokračovalo přibližně dalších 130 sekund. Po měření následovala krátká pauza, kdy si kůň mohl přešlápnout a opět se vyčkalo na případné ustálení sond před zahájením dalšího měření. Stejným postupem byly změřeny další průběhy avšak pro jiný režim stimulace.



**Obrázek 42: Anatomie cévního a nervového systému horní části končetiny koně [80]
 Vlevo: dorzální (zadní) pohled na koleno levé končetiny
 Vpravo: mediální (ze střední roviny) pohled na paži koně**



Obrázek 43: Detail umístění sond na koni a fotografie z měření



Obrázek 44: Stimulace končetiny ve vzdálenosti cca 5 centimetrů nad sondou

Celkem byly na každém koni provedeny čtyři měření pro čtyři režimy stimulace, nastavitelné na mikrostimulátoru. Šlo o kombinace minimální a maximální úrovně intenzity a frekvence. Jednotlivé režimy byly pracovně označeny písmeno-číselným kódem Rxx, kde $x = 0/1$. První číslice kódu označuje nastavení intenzity a druhá číslice nastavení frekvence. Vznikly tak celkem 4 možné kombinace stimulací, které byly u koně aplikovány v tomto pořadí:

- 1) R00 – min. intenzita, min. frekvence
- 2) R01 – min. intenzita, max. frekvence
- 3) R10 – max. intenzita, min. frekvence
- 4) R11 – max. intenzita, max. frekvence

Dobu, po kterou měření na koni probíhalo, bylo nutné přizpůsobit reálným možnostem. Ideální představou je samozřejmě provést měření co nejdéle, např. v řádech desítek minut, které by pomohlo nejlépe odlišit jevy zapříčiněné stimulací od jiných vlivů probíhajících na pozadí. Kůň je však zvíře, kterému nelze vysvětlit, aby dobu potřebnou pro měření nehnutě stálo. U laboratorních zvířat je situace jiná, neboť se běžně tento problém řeší podáním anestézie. Ta je však v tomto experimentu jednoznačně vyloučena. Je tedy nutné zvolit kompromis mezi dobou, po kterou je kůň ochoten v rámci možností klidně stát, a dobou, kterou potřebujeme ke změření dat s pokud možno nejlepší výpovědní hodnotou.

12.5 Předzpracování dat

Program DOUBLEMETER ukládal surová data v podobě textového souboru `.csv`. V MS Excel proběhlo ořezání a úprava křivek na stejnou výchozí úroveň před stimulací (slícování signálů), aby mohl být lépe posouzen její efekt srovnáním stimulované a referenční křivky. Výsledné průběhy mají délku 120 sekund s počátečním intervalem stimulace v délce 30 sekund. Bohužel však program nepracoval se stejným vzorkovacím krokem u každého měření. Pro další zpracování je však vhodné mít všechna data ve stejném časovém měřítku. Nedostatek byl odstraněn jednoduchou úpravou pomocí skriptu vytvořeného v programovém prostředí MATLAB. Úprava spočívala v interpolaci hodnot signálů vzhledem k nové časové ose s drobněji nastaveným krokem 0,2 s. K interpolaci byla vybrána metoda kubických Hermitovských polynomů (PCHIP – Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomial), neboť zachovává monotónnost a tvar křivek. Časově sjednocené referenční a stimulované průběhy byly shrnuty do tabulek pro každý typ stimulace a ty sloužily jako podklad pro statistickou analýzu.

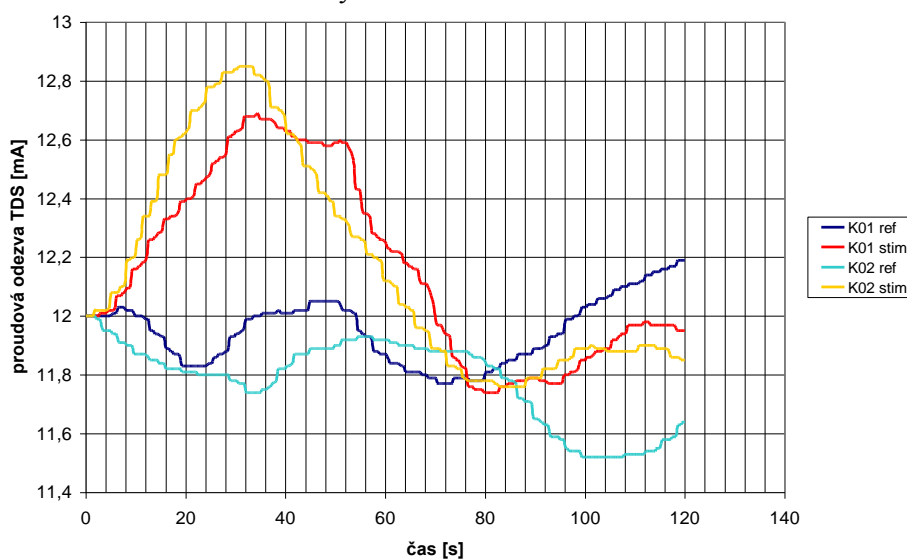
13 Statistická analýza naměřených dat

Důvodem provedení celého experimentu je nalezení odpovědi na otázku, zda existuje fyziologický účinek mikrostimulace na cévní řečiště, který způsobí prokazatelnou změnu v distribuci tepelné energie stimulované oblasti, zaznamenanou termodynamickými senzory. S odpovědí nám může pomoci statistická analýza naměřených referenčních a stimulovaných křivek, zaznamenávajících nepatrné tepelné změny uvnitř stimulované oblasti končetiny. Statistická analýza si klade za cíl odpovědět na následující otázky:

- Existuje významný rozdíl mezi signálem z referenční a stimulované končetiny, který by poukazoval na zjevný vliv mikrostimulace na distribuci krve v cévním řečišti a s tím související tepelné změny?
- Prokáže-li se rozdíl mezi referenčním a stimulovaným signálem u jednotlivých měření, lze očekávat naopak jistou podobnost všech referenčních, resp. stimulovaných křivek koní mezi sebou u všech měření?

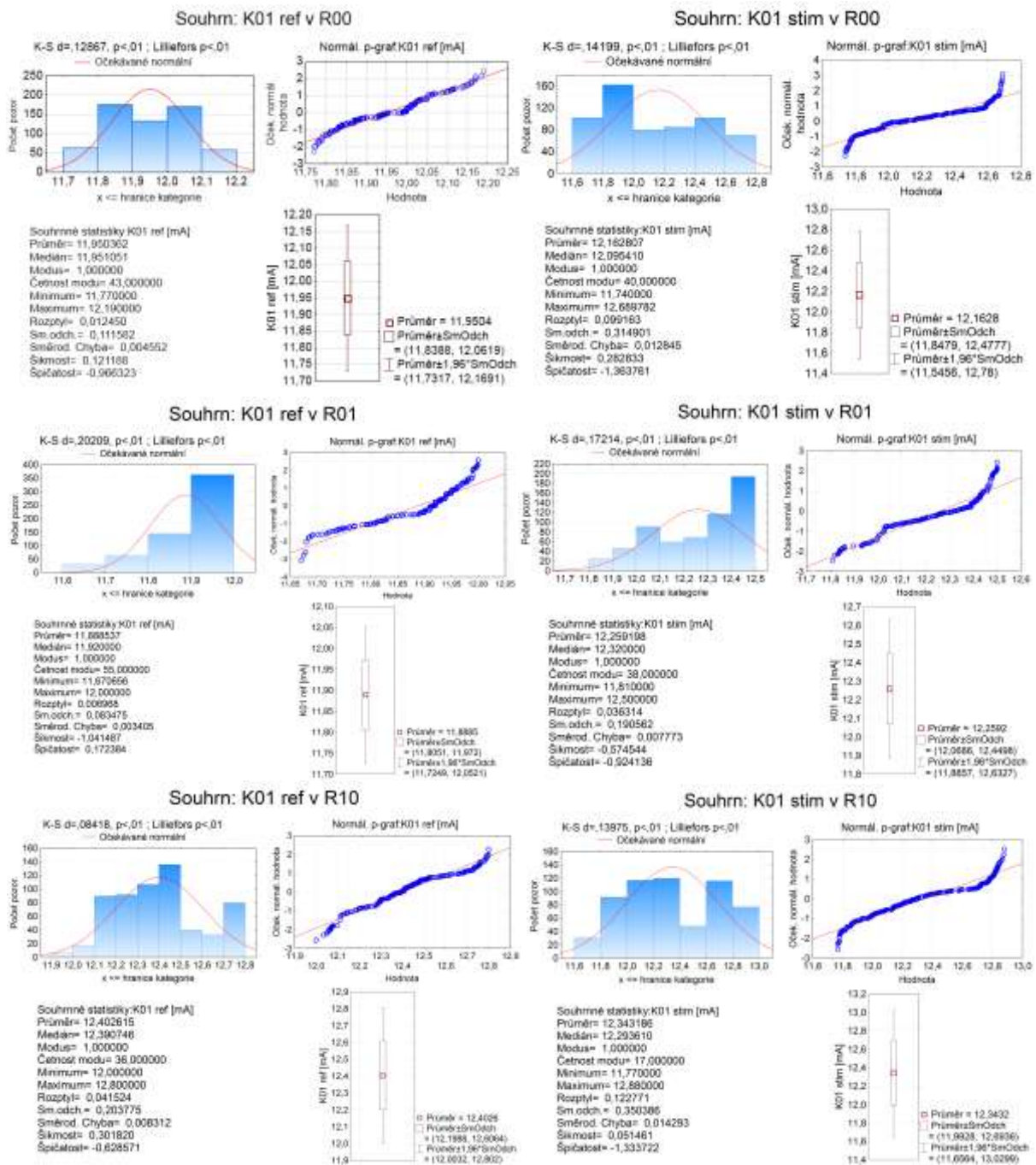
13.1 Základní popisná statistika

První informaci o povaze naměřených dat bylo možné získat po jejich vykreslení do *XY grafu*, tedy ve formě časové závislosti odezvy TDS z referenční a stimulované nohy u každého koně. Grafickou ukázkou křivek uvádí Obrázek 45. Jedná se o srovnání záznamů měření u dvou koní. Při zblžném pohledu na graf zaujme výrazný nárůst signálu TDS v období stimulace, které se projevilo i u drtivé většiny stimulovaných průběhů ostatních koní, zatímco referenční průběhy se chovají zcela náhodně. To by mohlo poukazovat na to, že stimulace skutečně nějakým způsobem ovlivňuje vnitřní prostředí stimulované oblasti končetiny, a tato změna se promítne v signálu z TDS. K objektivnějšímu posouzení dat tato informace sice nestačí, ale poskytuje základní představu o tom, co data sdělují, zda obsahují pro nás cennou informaci, kterou má význam dále sledovat, zkoumat a vyhodnocovat. Na základě grafického srovnání referenčních (dále zkratka REF) a stimulovaných křivek (dále zkratka STIM) se můžeme domnívat, že se od sebe vzájemně liší. Toto tvrzení však není podloženo a jeho věrohodnost mohou odhalit až statistické testy.



Obrázek 45: Srovnání signálů z TDS umístěných na referenční (ref) a stimulované končetině (stim) u dvou koní (K01, K02) při režimu stimulace R00

K hodnocení naměřených dat byl použit statistický software STATISTICA, verze 10. Prvním krokem zpracování jakýchkoliv podkladů pro analýzu je jejich identifikace a základní popis. Pro počáteční představu o vlastnostech dat je vhodné provést jejich grafickou reprezentaci a číselný popis, spočívající ve výpočtu základních numerických charakteristik. Obrázek 46 představuje popisné charakteristiky dvojice signálů REF a STIM naměřených na jednom z koní. Nejvíce nám o struktuře dat napoví grafické znázornění pomocí histogramu, normálního pravděpodobnostního a krabicového grafu. Těmito metodami kontrolujeme rozdělení dat a jejich předpoklady a snadno nalezneme i odlehle hodnoty.



Obrázek 46: Ukázka souhrnné statistiky dat REF (vlevo) a STIM (vpravo) u koně K01 v režimech R00, R01 a R10.

Uvnitř vlevo: nahoře – histogramy proměnných, dole – popisné statistiky

Uvnitř vpravo: nahoře – normální pravděpodobnostní graf, dole – krabicový graf

Histogram znázorňuje četnosti jednotlivých hodnot dané proměnné a červená křivka reprezentuje ideální normální rozdělení dat. U všech případů je zřejmé, že data normálně rozložená nejsou a potvrzují to také hodnoty *testů normality* v záhlaví grafu. Kolmogorov-Smirnovův test (K-S) je neparametrický test pro srovnání reálného a teoretického rozložení dat a Lillieforsův test je jeho modifikací pro srovnání dat s ideálním normálním rozložením. Při K-S. testu se hodnotí rozdíl kumulativních četností obou rozložení. Nulová hypotéza zní, že se četnosti obou rozložení liší jen minimálně, neboli že rozložení experimentálních dat je identické s normálním. Pokud je hodnota testovacího kritéria t větší než kritická hodnota testu D , pak můžeme nulovou hypotézu zamítnout. Kritická hodnota je dána vzorcem (45) [83]:

$$D(p = 5\%) = \frac{1,36}{\sqrt{n}} \quad \text{pro } n > 40 \quad (45)$$

kde n je celkový počet prvků, zde časových vzorků ($n = 601$). U všech případů jsou hodnoty testovacího kritéria větší než kritická hodnota $D = 0,05$ a můžeme na 5%-ní hladině významnosti vyloučit nulovou hypotézu normality naměřených dat. K dokreslení této situace slouží *normální pravděpodobnostní graf*, vyjadřující vztah mezi každou skutečnou hodnotou na ose x a očekávanou hodnotou normálního rozložení na ose y . Pro normální rozdělení dat je typické těsné přimknutí hodnot k červené linii.

Výborným prostředkem pro zjištění centrální tendence hodnot proměnné je *krabicový graf* s anténami. Díky vyznačení směrodatných odchylek se hodí rovněž pro porovnání rozptylu. Vedle toho z něj můžeme posoudit i zešikmení a přítomnost odlehlých hodnot [84].

Najít jednotnou charakteristiku pro popis rozdělení všech měření není prakticky možné. Řada z nich vykazovala bimodalitu, různý typ šikmosti (často log-normální rozdělení) a extrémní hodnoty. Zde je však potřeba opatrnosti, protože extrémní a odlehlé hodnoty obvykle chápeme jako něco nežádoucího a řada softwarů se je snaží potlačit. V našem případě naopak nabývají na důležitosti pro interpretaci. Měřený signál se v čase stále mění a výchyly lze očekávat. Pak je naším úkolem rozeznat přítomnost významné změny od skutečné chyby v měření (způsobené např. špatným kontaktem sondy a kůže).

Popisné charakteristiky, se kterými běžně statistika pracuje (viz Obrázek 46 vždy dole vlevo), nemají pro následující zkoumání dat podstatný význam. Vzhledem k tomu, že data mají povahu časových řad a nevykazují normalitu, není vhodná jejich další analýza na základě klasických popisných statistik, jakými jsou průměr nebo rozptyl. Reprezentovat celou časovou řadu jedním průměrem není zcela objektivní, neboť v časovém úseku při stimulaci u STIM signálu může být průměr zcela jiný než na konci signálu. Právě faktor času je zde pro nás velmi důležitý, jelikož přesně zachovává sekvenci změn, které nesou užitečnou informaci a které by náhradou za průměr v signále zcela zanikly.

Ne-normální rozložení dat lze řešit dvojím způsobem. Může se provést transformace dat (např. logaritmická, odmocninová, mocinná) jako legitimní úprava vedoucí k normalitě rozložení či k homogenitě rozptylu, anebo může být použita neparametrická statistika [84]. Transformace však není vhodná pro každé rozložení dat a ne vždy je jejím výsledkem rozložení, které by usnadnilo popis a práci s daty, jak se ukázalo i v tomto případě. Proto jsou pro další analýzu zvoleny postupy neparametrických metod.

13.2 Korelační analýza

Na grafickou a numerickou reprezentaci dat je vhodné navázat analýzou přibližných vztahů mezi proměnnými. Míra asociace dvou proměnných se nazývá korelace [84]. Korelační analýza nám poskytne předběžnou informaci o tom, které proměnné spolu více či méně souvisí a zda má smysl se těmito vztahy hlouběji zabývat. Pro měření korelace byla navržena řada koeficientů, nejpoužívanější Pearsonův, Spearmanův a Kendallův. Jejich použití se odvíjí od typu dat.

Vzhledem k nenormálnosti rozložení je pro popis vztahů mezi proměnnými použit *Spearmanův pořadový korelační koeficient*, který nepředpokládá linearitu očekávaného vztahu nebo normální rozdělení proměnných. Spearmanův koeficient je neparametrickou obdobou Pearsonova (parametrického) korelačního koeficientu s tím rozdílem, že koreluje pořadí jednotlivých měření obou proměnných, nikoliv původní hodnoty. Zachycuje tak obecně rostoucí nebo klesající vztahy a je rezistentní vůči odlehlým hodnotám. Spearmanův korelační koeficient r_s se pro danou dvojici proměnných X a Y , nabývajících hodnot x_i a y_i , spočte podle vzorce (46) [84]:

$$r_s = 1 - \frac{6 \cdot \sum D_i^2}{n(n^2 - 1)}, \text{ kde } D_i \text{ je rozdíl pořadí } R_x \text{ a } R_y \text{ hodnot } x_i \text{ a } y_i, n \text{ je počet hodnot } x_i, \text{ resp. } y_i. \quad (46)$$

Podrobnější výpočet korelačního koeficientu, který zjišťuje míru vztahu mezi referenčními signály dvou koní, uvádí Příloha H. Koeficient r_s nabývá hodnot z intervalu $(-1; 1)$. Pokud $r_s = 0$, jsou proměnné nekorelované. Čím blíže je hodnota k hranicím intervalu, tím silnější je vztah mezi proměnnými. Pokud je $|r_s| = 1$, pak párové hodnoty (x_i, y_i) vytvářejí funkci obecně sestupné nebo vzestupné tendence. Pod velikostí koeficientu si můžeme představit sílu vztahu mezi zkoumanými proměnnými. Interpretace však není jednoznačná a doporučují se provést další charakteristiky.

Vzhledem k počtu proměnných není možné uvést kompletní tabulky a maticové grafy korelací, které byly získány jako výstup statistického softwaru. Zejména grafická reprezentace korelací v podobě maticového grafu je kvůli omezení plochy pro vykreslení velmi špatně čitelná. Proto jsou dále demonstrovány korelace pouze na části dat, ostatní výsledky jsou k nalezení v příloze na CD.

Tabulka 1: Tabulka Spearmanových koeficientů, charakterizujících vztahy mezi referenčními křivkami 10 koní.

Označené korelace, pro něž platí $|r| > 0,7$, jsou považovány za významné.

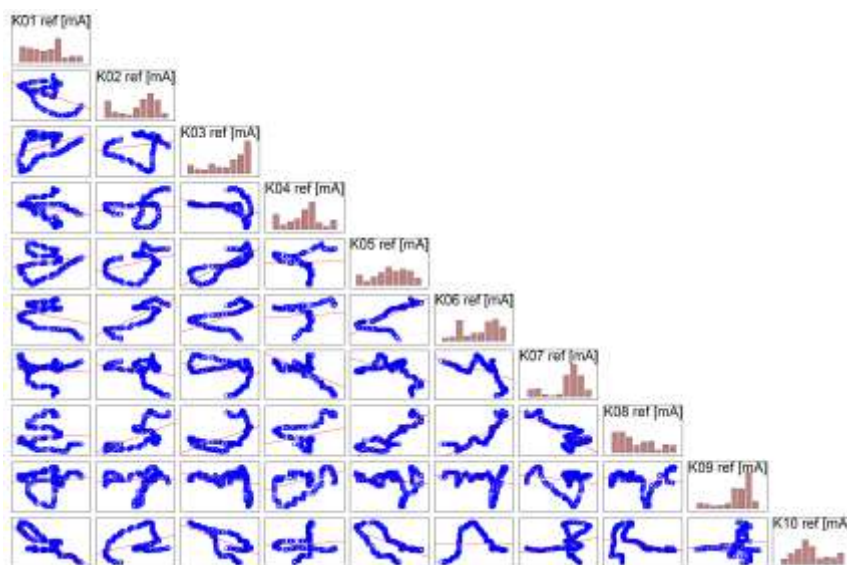
Spearmanovy korelace signálů REF v režimu R00										
	K01 ref	K02 ref	K03 ref	K04 ref	K05 ref	K06 ref	K07 ref	K08 ref	K09 ref	K10 ref
K01 ref	1	-0,335	0,242	-0,372	0,229	-0,201	-0,025	-0,108	0,106	-0,730
K02 ref	-0,335	1	0,174	0,156	0,302	0,600	-0,115	0,566	0,255	0,412
K03 ref	0,242	0,174	1	-0,396	0,790	0,647	-0,118	0,649	-0,287	-0,416
K04 ref	-0,372	0,156	-0,396	1	0,036	0,216	-0,613	0,150	0,287	0,018
K05 ref	0,229	0,302	0,790	0,036	1	0,780	-0,311	0,868	-0,035	-0,564
K06 ref	-0,201	0,600	0,647	0,216	0,780	1	-0,451	0,938	-0,091	-0,056
K07 ref	-0,025	-0,115	-0,118	-0,613	-0,311	-0,451	1	-0,351	-0,105	0,210
K08 ref	-0,108	0,566	0,649	0,150	0,868	0,938	-0,351	1	-0,031	-0,165
K09 ref	0,106	0,255	-0,287	0,287	-0,035	-0,091	-0,105	-0,031	1	-0,082
K10 ref	-0,730	0,412	-0,416	0,018	-0,564	-0,056	0,210	-0,165	-0,082	1

Tabulka 2: Tabulka Spearmanových koeficientů, charakterizujících vztahy mezi stimulovanými křivkami 10 koní.

Označené korelace, pro něž platí $|r| > 0,7$, jsou považovány za významné.

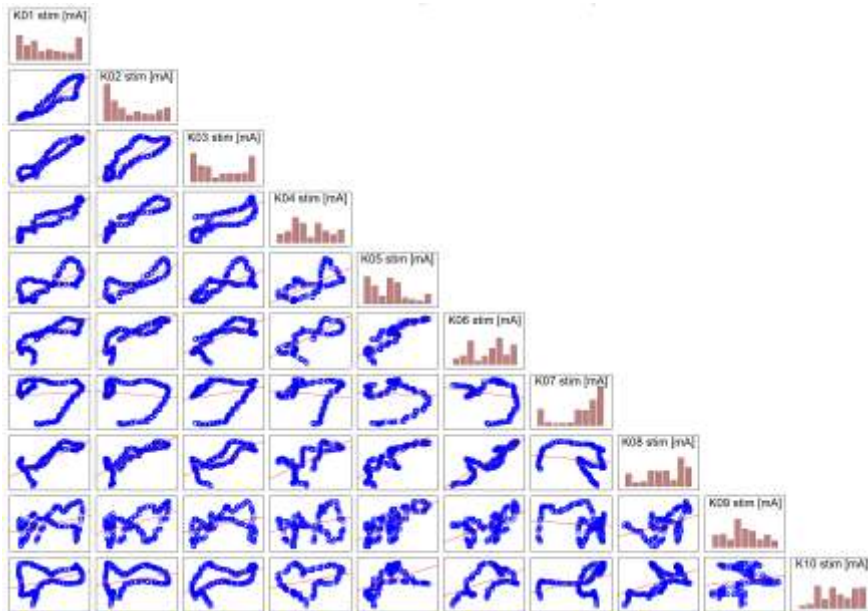
Spearmanovy korelace signálů STIM v režimu R00										
	K01 stim	K02 stim	K03 stim	K04 stim	K05 stim	K06 stim	K07 stim	K08 stim	K09 stim	K10 stim
K01 stim	1	0,957	0,909	0,932	0,664	0,785	0,179	0,745	0,336	0,343
K02 stim	0,957	1	0,821	0,929	0,684	0,847	-0,038	0,777	0,395	0,205
K03 stim	0,909	0,821	1	0,843	0,716	0,754	0,430	0,709	0,356	0,618
K04 stim	0,932	0,929	0,843	1	0,695	0,773	0,045	0,706	0,266	0,303
K05 stim	0,664	0,684	0,716	0,695	1	0,880	0,106	0,802	0,670	0,585
K06 stim	0,785	0,847	0,754	0,773	0,880	1	-0,037	0,855	0,623	0,430
K07 stim	0,179	-0,038	0,430	0,045	0,106	-0,037	1	-0,115	-0,094	0,592
K08 stim	0,745	0,777	0,709	0,706	0,802	0,855	-0,115	1	0,487	0,431
K09 stim	0,336	0,395	0,356	0,266	0,670	0,623	-0,094	0,487	1	0,211
K10 stim	0,343	0,205	0,618	0,303	0,585	0,430	0,592	0,431	0,211	1

Tabulka 1 a Tabulka 2 mají podobu symetrické matice tvořené korelačními koeficienty, které popisují vzájemné vztahy jednotlivých proměnných mezi sebou. Na diagonále nabývají korelace maximální možné hodnoty 1, neboť jde o korelaci identických signálů. Tabulka 1 znázorňuje korelace referenčních signálů naměřených na koních K01 až K10 a obdobně Tabulka 2 je naplněna hodnotami korelací stimulovaných signálů pro stejné koně. Pro zvýraznění významných korelací byla použita hranice $|r_s| > 0,7$, neboť hodnoty vyšší již můžeme považovat za ukazatele dobré asociace mezi proměnnými [84]. Často nám ale samotné číslo příliš nenapoví o skutečné podobě vztahu dvou proměnných a rovněž z číselné hodnoty neodhalíme možné zkreslení vztahu díky přítomnosti odlehle hodnoty. Nenahraditelným pomocníkem pro ověření korelací je jejich grafické znázornění formou maticového grafu, viz Obrázek 47 a Obrázek 48.



Obrázek 47: Poloviční maticový graf korelací REF signálů koní K01–K10 pro režim stimulace R00

Na diagonále grafů se nacházejí histogramy jednotlivých proměnných. Dvourozměrné bodové grafy pak znázorňují hodnoty vztahu mezi každým párem proměnných, které tvoří hlavní osy x, y grafů. Jestliže body vytvářejí v prostoru rozpoznatelný shluk tvaru, který může být dobře proložen červenou křivkou, představující idealizovaný lineární vztah proměnných, pak s vysokou pravděpodobností je mezi nimi úzká vazba.



Obrázek 48: Poloviční maticový graf korelací STIM signálů koní K01–K10 pro režim stimulace R00

Ze srovnání grafů i tabulek korelačních koeficientů je zřejmé, že referenční signály mají mezi sebou mnohem slabší vztahy než signály stimulované, a to v jakémkoliv režimu stimulace (viz přílohy). Tento fakt si zatím bez důkazu vysvětlujeme tím, že referenční signály jsou podstatně stochastičtější ve srovnání se signály stimulovanými, u nichž je absolutní náhodnost procesu pravděpodobně eliminována jedním společným faktorem, tj. stimulací. Z toho důvodu jsou si stimulované signály mnohem více podobné, ať se jedná o kterýkoliv režim stimulace.

Závěr korelační analýzy má spíše informativní charakter. Ani silný korelační koeficient totiž neposkytuje úplný popis dat. Korelační analýzou však byla získána představa o tom, jakým směrem se dále v testování ubírat a které vztahy proměnných je vhodné hlouběji zkoumat.

13.3 Analýza rozdílů referenčních a stimulovaných signálů

Poté, co jsme získali přibližný přehled o vlastnostech dat z měření, můžeme přistoupit ke statistickému testování, které by nám mělo pomoci nalézt odpověď na první otázku položenou v úvodu kapitoly 13. Úkolem je tedy porovnat mezi sebou odezvy TDS z referenční a stimulované končetiny u každého koně a zjistit, zda je mezi nimi prokazatelný rozdíl. Velmi důležitou fází, která nesmí být podceňena vzhledem k validitě výsledků, je výběr vhodného statistického testu s ohledem na vlastnosti testovaných dat.

Jak vyšlo najevo z předchozí popisné statistiky, data nemají normální rozdělení. Tím můžeme jednoznačně zavrhnout použití parametrických testů, které mají jisté předpoklady o rozdělení vstupních dat (obvykle normální). To předurčuje data k analýze *neparametrickým* testem. Dalším hlediskem je počet vzorků, které vstupují do analýzy. Chceme-li srovnat signál REF a STIM, jde pouze o *dva výběry*. Posledním rozhodujícím parametrem je *párový design* experimentu vzhledem k tomu, že měříme u každého koně současně na dvou končetinách, ve stejném místě a se snahou dodržet stejné podmínky s jediným rozdílem, že jedna končetina je po krátkou dobu stimulována. Shrňeme-li výše zmíněné vlastnosti měřených dat, pak hledáme neparametrický dvouvýběrový test pro párové hodnoty. Nabízí se tak řešení Wilcoxonovým testem.

Wilcoxonův test testuje nulovou hypotézu, že mají data dvou zkoumaných souborů společný základ, tzn. že mezi referenční a stimulovanou křivkou není významný rozdíl a jejich mediány jsou shodné. Test nepracuje přímo s hodnotami dat, ale s diferencemi párových hodnot zkoumaných souborů, tzn. diference v okamžiku t je $dif(t) = ref(t) - stim(t)$. Nulové diference se dále neuvažují a ostatním je přiděleno pořadí bez ohledu na znaménko. Poté se sečte pořadí kladných rozdílů a pořadí záporných rozdílů. Menší z těchto dvou hodnot se označí jako T a je srovnána s kritickou hodnotou testu. Kritická hodnota má pro větší počet hodnot přibližně normální rozdělení s parametry $No(\mu, \sigma)$, kde střední hodnota $\mu \in \mathbb{R}$ a rozptyl $\sigma > 0$ [83]. Normovanou testovací statistiku Z zjistíme podle (47):

$$Z = \frac{T - \mu}{\sigma} = \frac{T - \frac{m(m+1)}{4}}{\sqrt{\frac{m(m+1)(m+2)}{24}}}, \text{ kde } m \text{ je počet nenulových hodnot diferencí.}$$

(47)

Pro hladinu významnosti 5% ($\alpha = 0,05$) nabývá kritická mez hodnot $\pm 1,96$. Pokud se hodnota Z realizuje v kritickém oboru $(-\infty; -1,96) \cup \langle 1,96; +\infty)$, pak zamítáme nulovou hypotézu shody obou souborů hodnot, tj. referenční a stimulované křivky. Ukázkou výsledků Wilcoxonova testu shody párových měření REF a STIM pro každého koně v režimu stimulace R00 uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Výstup Wilcoxonova testu pro všechna párová měření v režimu stimulace R00

Wilcoxonův párový test (Režim stimulace R00)				
Označené testy jsou významné na hladině $p < 0,05$				
	Počet - platných	T	Z	p-hodn.
K01 ref & K01 stim	588	36034,00	12,26	0,00
K02 ref & K02 stim	588	4906,00	19,81	0,00
K03 ref & K03 stim	597	775,00	20,98	0,00
K04 ref & K04 stim	566	12477,50	17,40	0,00
K05 ref & K05 stim	600	0,00	21,22	0,00
K06 ref & K06 stim	588	919,00	20,78	0,00
K07 ref & K07 stim	595	3855,00	20,21	0,00
K08 ref & K08 stim	599	0,00	21,20	0,00
K09 ref & K09 stim	574	6877,00	19,02	0,00
K10 ref & K10 stim	599	7470,00	19,44	0,00
K11 ref & K11 stim	570	15288,00	16,79	0,00
K12 ref & K12 stim	592	13716,50	17,78	0,00
K13 ref & K13 stim	597	0,00	21,16	0,00
K14 ref & K14 stim	600	75375,50	3,47	0,00
K15 ref & K15 stim	566	2033,00	20,09	0,00
K16 ref & K16 stim	582	73818,50	2,71	0,00
K17 ref & K17 stim	598	2357,50	20,62	0,00
K18 ref & K18 stim	582	1316,00	20,57	0,00
K19 ref & K19 stim	599	2497,00	20,61	0,00
K20 ref & K20 stim	579	77716,00	1,54	0,12

Z výsledků je patrné, že se signály z referenční a stimulované končetiny u všech koní s výjimkou jednoho významně liší. U koně K20 test nevyvrátil možnou shodu REF a STIM křivek. Otázkou je, co je příčinou tohoto odlišného výsledku; zda ve skutečnosti nedošlo u koně k žádnému prokazatelnému fyziologickému účinku nebo šlo jen o chybu při měření. Obdobné výsledky byly získány po provedení testu i pro ostatní režimy stimulace, viz Příloha N. Z celkového počtu 80 párových měření bylo nalezeno 7 měření, u nichž není možné nulovou hypotézu shody dat jednoznačně zamítnout. I přesto Wilcoxonův test prokázal významný rozdíl mezi STIM a REF křivkou u drtivě většiny měření. Další otázkou je, zda závěr Wilcoxonova testu dobře charakterizuje naměřená data, neboť jeho rozhodování je založeno na srovnání středních hodnot (mediánů), které pro stochastické signály není zcela vhodné.

13.4 Analýza podobnosti signálů mezi jednotlivými měřeními

Jestliže Wilcoxonův test dospěl k závěru, že mezi REF a STIM křivkami u každého koně je zřejmý rozdíl, můžeme si dále položit otázku, zda se výrazně neliší také referenční, resp. stimulované, křivky všech koní v každém režimu stimulace. Jinými slovy je naším úkolem odhalit možnou podobnost jednotlivých typů křivek (REF nebo STIM) napříč měřeními v rámci každého režimu stimulace. Základní představu o vztazích signálů jsme získali z předchozí korelační analýzy. V klasické analýze se dále přistupuje k testům porovnávajících více nezávislých vzorků. Vzhledem k nenormálnímu rozdělení dat je jedinou možností zvolit Kruskal-Wallisův test, který je neparametrickou obdobou F-testu u jednoduché analýzy rozptylu [84]. Nulová hypotéza testu předpokládá, že mediány jednotlivých skupin jsou stejné. Zde ovšem narážíme na již zmíněný problém neadekvátního popisu časové řady pomocí střední hodnoty, kterou medián bezesporu je. Ve srovnání s běžnými, časově nezávislými daty, pro které byl test vytvořen, vykazují časové křivky mnohem větší variabilitu, způsobenou jak vlastnostmi samotného zvířete (impedance kůže), tak nejrůznějšími vlivy na měření (pohyb). V takovém případě jsou podmínky testu příliš omezující. Proto byl hledán adekvátní způsob zpracování dat.

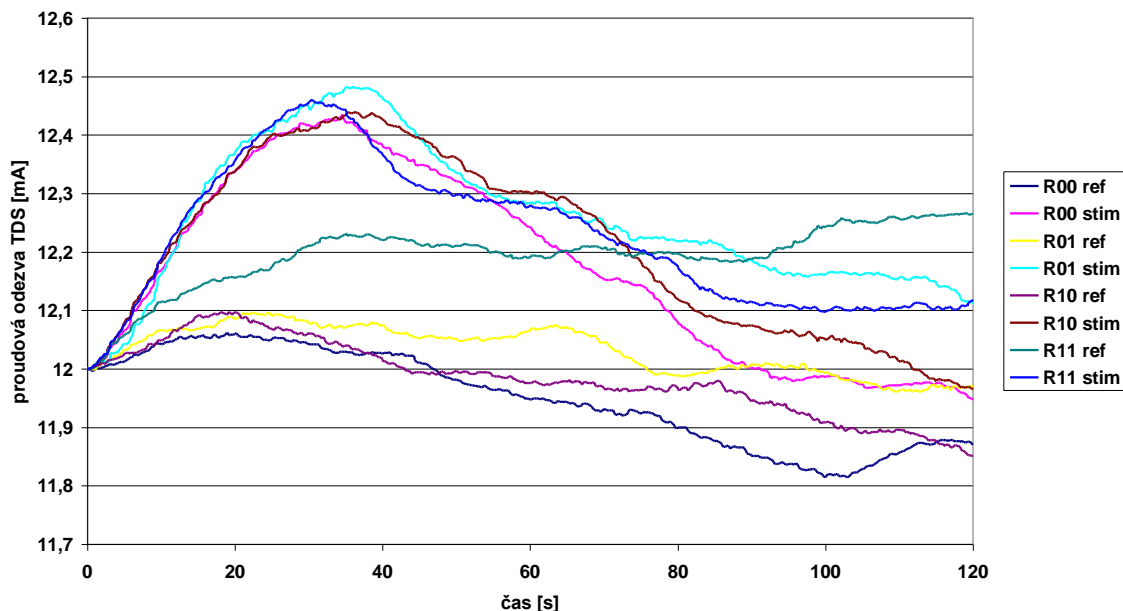
Časové řady obecně vznikají spojením trendové, sezónní, cyklické a náhodné složky (šum) [85]. Obvykle lze tyto složky dekomponovat, zvláště analyzovat a na základě toho vytvořit model časové řady k předvídání nadcházející situace. Tohoto přístupu se využívá běžně v ekonomii, např. k predikci míry nezaměstnanosti v nadcházejícím roce na základě sledovaného vývoje v předchozích letech. Tyto přístupy opět nejsou pro zkoumání naměřených dat, jakožto biologických signálů, přínosné. Naším zájmem je spíše hodnocení tvaru křivek REF a STIM a nalezení významných odlišností, které by mohly více prozradit o možném vlivu stimulace na cévní řečiště ve smyslu tepelných změn.

Základní myšlenkou dalšího zpracování dat je nalezení vzájemných podobností signálů, na základě nichž by bylo možné data rozdělit do skupin a popsat vztahy jak mezi skupinami, tak i uvnitř nich. Realizace tohoto postupu analýzy by mohla vést k závěru, který bude lépe vystihovat charakter měřených dat, a bude jím možné nahradit klasické postupy statistického testování.

13.4.1 Příprava dat

Prvním krokem je opět předpříprava dat, a to do podoby, která bude srozumitelná, méně početně náročná a jednoduše interpretovatelná. Zkoumat podobnosti mezi každou dvojicí signálů délky 600 hodnot je velmi náročný a zdlouhavý proces a dokonce je možné, že vzhledem ke zkreslení několika signálů v důsledku těžce postižitelných a redukovatelných vlivů může v konečném důsledku dojít ke zkreslení celého výsledku analýzy. Proto se zdá výhodnější zaujmout jiný postoj, spočívající ve vytvoření reprezentativních průběhů REF a STIM signálu průměrováním signálů všech koní v rámci každého režimu stimulace. Jde o adekvátní úpravu dat, používanou v teorii zpracování signálů, kdy v každém časovém okamžiku sečteme příslušné hodnoty signálů od všech koní. Kumulací průběhů se náhodné složky signálu (typicky šum) navzájem eliminují, zatímco složka společná všem signálům se ve výsledném signálu zvýrazní. Takovou složku by měl ve STIM signálech představovat právě efekt stimulace.

Reprezentativní REF a STIM křivky pro každý režim stimulace byly získány zprůměrováním všech 20 dostupných hodnot měření v každém časovém okamžiku. Průběhy uvádí Obrázek 49. U STIM signálů se průměrováním více zviditelní jejich vzestupná tendence po dobu stimulace končetiny a všechna rušení, ke kterým mohlo v důsledku jiné svalové aktivity u některých koní dojít, se navzájem odečítají. Výsledný průběh REF signálů, které nebyly vědomě v průběhu měření ovlivňovány, má stále náhodný charakter v podobě oscilování kolem vlastní střední linie.



Obrázek 49: Reprezentativní křivky všech režimů stimulace získané průměrováním dat 20 koní

13.4.2 Analýza podobnosti křivek – algoritmus Longest Common Subsequences

I jen na základě zběžného prohlédnutí předchozího grafu se zdá užitečné zaměřit se na analýzu dat, která bude podobnost, resp. odlišnost sekvencí hodnotit právě z hlediska tvaru křivek. Tím se dostáváme k možnosti alternativního řešení pomocí podobnostních funkcí, které prostřednictvím vzdálenosti dvou časových řad dokáží vyjádřit jejich podobnost.

Typickou podobnostní funkcí je *Euklidovská metrika*, která je oblíbená zejména pro svou jednoduchost výpočtu založeného na Pythagorově větě. Avšak metoda použitá jako podobnostní model není realistická, neboť u zašuměných dat rychle klesá její účinnost a je velmi citlivá na rozdílný rozsah hodnot vstupních dat [86], [87]. Navíc předpokládá lineární mapování j -tého prvku jedné časové řady na j -tý prvek druhé časové řady a neuvažuje možnost, že podobné tvary mohou mít odchylku v zarovnání podle časové osy. Mnohem praktičtější je přístup algoritmu *borcení časové osy* (DTW – Dynamic Time Warping). Ten umožňuje manipulaci s časovou osou ve smyslu natahování či zužování tak, aby podobné oblasti časových řad byly na sobě správně namapované a vzdálenost mezi nimi byla co nejmenší [88]. Bohužel i tento algoritmus skýtá nevýhody co se týče citlivosti na zašuměná data, neboť spojuje naprosto všechny body sekvencí včetně odlehlých hodnot, které pak zkreslí skutečnou vzdálenost sekvencí [87].

Alternativní řešení uvedených nedostatků poskytuje algoritmus dynamického programování založený na hledání nejdelších podobných řetězců v sekvencích, odtud i jeho název *Longest Common SubSequences* (LCSS) [87]. Základní myšlenkou algoritmu je srovnat dvě sekvence tak, že je možné je v čase roztáhnout, ale nesmí dojít k přeskupování pořadí prvků s tím, že některé z nich pak mohou

zůstat nemapovány. Původně je model LCSS navržen pro mapování diskretních hodnot. Tvoří podstatu např. algoritmu pro srovnávání genetických sekvencí různých živočišných druhů, u nichž hledá nejdelší podobné úseky kódů a zároveň zachovává mutační změny v podobě delece a inserce. Na jednoduchém příkladu srovnání genetických kódů $a = ATCTGAT$, $b = TGCATA$ lze naznačit základní princip algoritmu LCSS. Pro sekvence se vytvoří skórovací tabulka pro ohodnocení shody/neshody $s_{i,j}$ prvků (viz Tabulka 4) a pro nalezení cesty správného zarovnání sekvencí. Plnění tabulky se řídí následujícím pravidlem pro i -tý prvek sekvence a a j -tý prvek sekvence b [89]:

$$s_{i,j} = \max \begin{cases} s_{i-1,j} \\ s_{i,j-1} \\ s_{i-1,j-1} + 1 \quad \text{pokud } a(i) = b(j) \end{cases} \quad (48)$$

Pokud se dva prvky shodují, přičte se k předchozímu diagonálnímu prvku hodnota +1. V případě neshody se doplní prvek zleva nebo shora s větší hodnotou. Přitom u každého prvku musí být zřejmé, ze kterého směru pochází, což naznačíme šipkou. Pokud se hodnoty shora i zleva shodují, pak zaznamenáme obě cesty a při zpětném trasování zvolíme jednu z nich (zde upřednostněna cesta shora). Tímto způsobem dosáhneme konce tabulky. Zpětné trasování pak začíná od maximálního prvku v posledním řádku tabulky a pokračuje v protisměru šipek, které nás provedou cestou zarovnání k začátku sekvencí (levý horní roh tabulky).

Tabulka 4: Výpočet podobností $s(a,b) = 4$

$a(i) \setminus b(j)$		T	G	C	A	T	A
	0	0	0	0	0	0	0
A	0	0	0	0	1	1	1
T	0	1	1	1	1	2	2
C	0	1	1	2	2	2	2
T	0	1	1	2	2	3	3
G	0	1	2	2	2	3	3
A	0	1	2	2	3	3	4

Na základě nalezené cesty v podobnostní tabulce zarovnáme sekvence a zjistíme delece, inserce a společné body. Podobnost sekvencí $s(a,b) = 4$ a jejich společným řetězcem (LCSS) je TCTA.

```

      √  ↘  ≥  ↘  ≥  √  ↘
a:   A  T  -  C  -  T  G  A
      |  |  |  |
b:   -  T  G  C  A  T  -  A
  
```

Pro srovnání časových řad jako spojitých signálů bylo potřeba základní algoritmus modifikovat pomocí parametrů ε a δ , jak uvádí [87]. Máme-li dvě časové řady A , B délek n a m , je postup výpočtu podobnosti LCSS následující:

$$LCSS_{\delta,\varepsilon}(A, B) = \begin{cases} 0 & \text{pokud } A \text{ nebo } B \text{ jsou prázdné} \\ 1 + LCSS_{\delta,\varepsilon}(\text{head}(A), \text{head}(B)) & \text{pokud } |a_n - b_m| < \varepsilon, |n - m| \leq \delta \\ \max(LCSS_{\delta,\varepsilon}(\text{head}(A), B), LCSS_{\delta,\varepsilon}(A, \text{head}(B))) & \text{jinak} \end{cases} \quad (49)$$

kde $\text{head}(A)$, resp. $\text{head}(B)$, je časová řada, která vznikne vypuštěním posledního záznamu z řady A , resp. B . Konstanta δ omezuje flexibilitu mapování v rámci časové osy a konstanta ε je tolerančním prahem mapování řad v prostoru. S pomocí těchto parametrů je realizován filtrační krok, který vede k rychlejšímu nalezení částí sekvencí, které jsou v těsném vztahu, a zároveň odstranění příliš vzdálených částí, které by zbytečně prodlužovaly výpočet. Na základě parametrů je vytvořena obálka (MBE – Minimum Bounding Envelope) jedné ze srovnávaných sekvencí, např. B . Obálka představuje těsné okolí sekvence B s horní a spodní hranicí, mezi nimiž je užitečné zkoumat podobnost B s druhou sekvencí A . Zasahuje-li část sekvence A do obálky sekvence B , jsou si v této oblasti blízké, proto jsou body tohoto úseku srovnány a namapovány. Výsledkem je podobnost LCSS, jejíž hodnota závisí na délce porovnávaných sekvencí. LCSS může nabývat hodnot z intervalu 0 až 1, tj. od absolutní nepodobnosti až k úplné identitě sekvencí. LCSS může být vyjádřena i v podobě vzdálenosti sekvencí $D_{\delta,\varepsilon}$ podle rovnice (50). Interpretace je přesně opačná, neboť nulovou vzdálenost mají sekvence identické.

$$D_{LCSS}(A, B) = 1 - \frac{LCSS_{\delta,\varepsilon}(A, B)}{\min(n, m)} \quad (50)$$

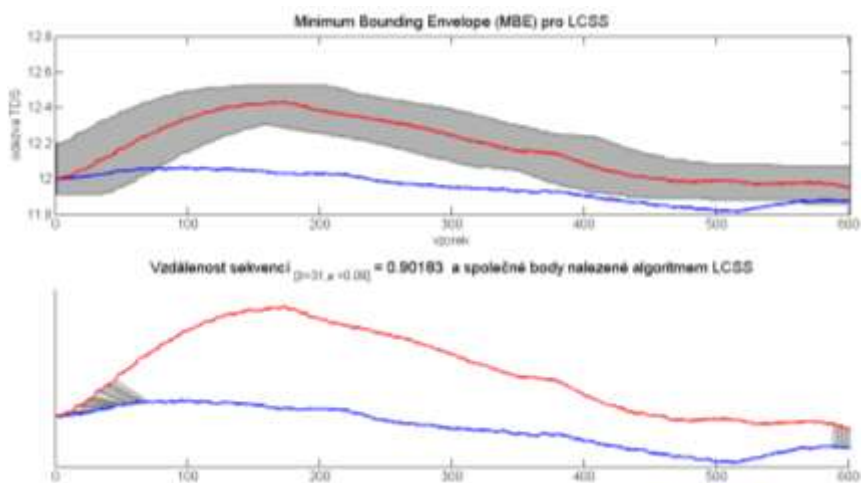
Autory [87] byl pro programové prostředí MATLAB vytvořen kód základního LCSS algoritmu, který je možné upravit a použít pro vlastní účely při splnění podmínky zachování poznámky o původnosti. Kód byl přepracován a doplněn do podoby, kterou uvádí Příloha L, a umožňuje souhrnné zpracování libovolného počtu sekvencí.

Zdrojový kód má 4 části: hlavní skript nazvaný LCSS načítá hodnoty reprezentativních průběhů R00 až R11 (ref/stim) z příslušné tabulky, očekává zadání parametrů delta a epsilon, vyvolává funkci `LCS.m`, která si dále volá funkci `createEnvelope.m`, a `LCSSgraf.m`. Podrobný popis jednotlivých kroků je uveden přímo ve zdrojovém kódu.

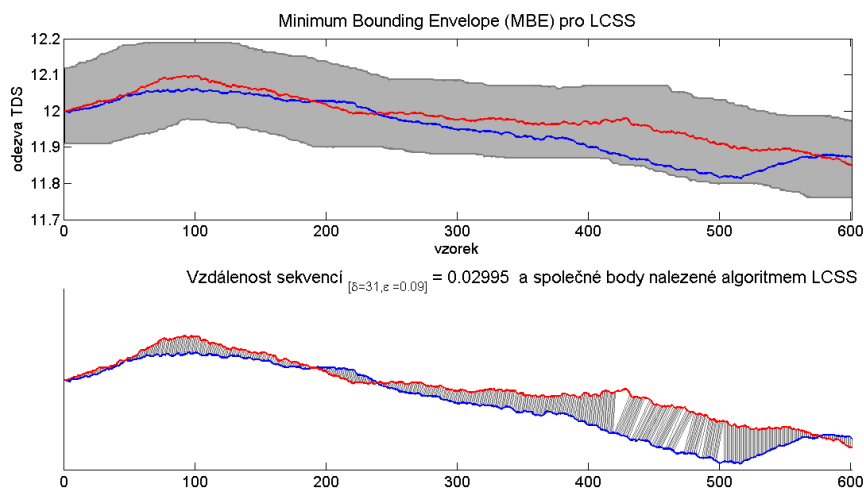
Funkce `LCS.m` realizuje skutečný algoritmus hledání společných subsekvencí dvou časových řad A , B . Pro každý prvek $a(i)$ časové řady A se vytvoří kolem prvku řady B $b(j)$ horizontální okno s rozměry danými parametrem delta. Horizontální okno je rozšířeno vertikálně pomocí parametru epsilon. Pokud je vzdálenost $|a(i) - b(j)| \leq \text{epsilon}$, pak $a(i)$ patří do obálky blízkého okolí $b(j)$ a prvky jsou si podobné. Pro zaznamenání podobnostních skóre prvků je vytvořena tabulka `LCStable` a zároveň je zaznamenávána pomocí tabulek `prevx` a `prevy` pozice prvku, ze kterého vzejde další prvek. Po nalezení podobnosti `lcs` se zjistí vzdálenost sekvencí a zpětným trasováním se hledají společné body sekvencí pro jejich nejlepší namapování.

Funkce `LCSSgraf.m` realizuje předchozí výstup graficky. Znázorňuje vztah páru sekvencí dvojím způsobem, viz Obrázek 50. První graf naznačuje princip algoritmu LCSS pomocí vytvořené

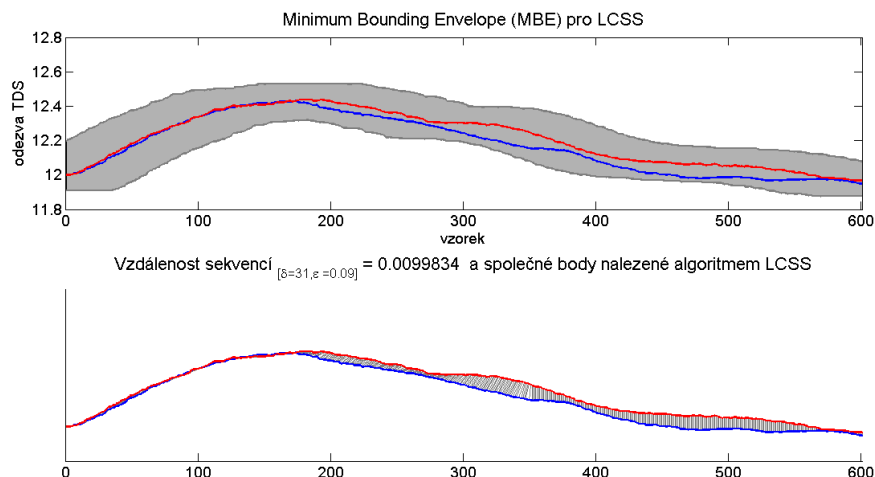
obálky MBE kolem jedné ze sekvencí (červené). Tam, kde dojde k překryvu obálky s druhou sekvencí (modrou), můžeme čekat podobnost. Body této společné oblasti pak mohou být pro názornost spojeny tak, jak ukazuje druhý graf. Obrázek 50 zaznamenává srovnání STIM (červené) a REF (modré) sekvence u režimu R00. Soudě podle grafů i vypočtené vzdálenosti 0,90 jsou si sekvence velmi málo podobné. Vedle toho Obrázek 51 a Obrázek 52 znázorňují srovnání dvou sekvencí stejného typu, u nichž byla naopak nalezena podobnost vysoká (viz nízké hodnoty vzdáleností). Výsledky velmi závisí na správném nastavení parametrů ϵ a δ . Hodnotu parametru δ je vhodné zvolit s ohledem na délku sekvence, nejlépe v rozsahu 5–20% její délky. Větší hodnota představuje větší obálku kolem sekvence, tzn. větší prostor pro hledání podobnosti, a tím menší přesnost při odhadu podobnosti [87]. Stanovili jsme nejpřísnější mez 5 %, která činí 31 vzorků sekvence. Parametr ϵ může být jakékoliv reálné číslo z intervalu 0 až 1 a doporučuje se jeho velikost kolem hodnoty $std/2$ (polovina směrodatné odchylky) srovnávané sekvence [87]. Aby nemusela být pro každý pár sekvencí tato hodnota přepočítávána, byla navržena heuristicky $\epsilon = 0,09$ tak, aby nedošlo k nesprávnému označení dvou blízkých (ale nikoliv stejných) sekvencí za zcela identické, neboť stejně jako δ se podílí na ploše obálky sekvence.



Obrázek 50: Grafické srovnání REF (modrá) a STIM (červená) křivek režimu R00 alg. LCSS. Nahore: Šedá oblast definuje obálku (MBE) STIM křivky pro hledání podobnosti s křivkou REF. Dole: Namapování společných bodů sekvencí (šedé spojnice). Vzdálenost sekvencí $D = 0,90183$



Obrázek 51: Srovnání REF křivek režimu R00 (modrá) a R10 (červená); vzdálenost $D = 0,02995$



Obrázek 52: Srovnání STIM křivek režimu R00 (modrá) a R10 (červená); vzd. D = 0,0099834

Hlavním výstupem programu je tabulka vzdáleností všech dvojic sekvencí, tzv. *asociační matice* (viz Tabulka 5). Můžeme ji chápat jako obdobu korelační matice, neboť je taktéž symetrická a nabývá hodnot 0 až 1. Měřítkem vztahu mezi sekvencemi jsou však jejich vzdálenosti. Maximální hodnoty dosahují ty z nich, které jsou naprosto odlišné, naopak identické mají hodnotu nulovou. Platí zde symetrie, tzn. že vzdálenost sekvence A od B je stejná jako B od A. Další neopomenutelnou vlastností matice je semimetrika jejích prvků, tj. pro prvky matice neplatí trojúhelníková nerovnost a nelze je náležitě uspořádat v metrickém prostoru (klasickém systému souřadnic) [86].

Tabulka 5: Matice vzdáleností jednotlivých průběhů

	R00 ref	R00 stim	R01 ref	R01 stim	R10 ref	R10 stim	R11 ref	R11 stim
R00 ref	0	0,9018	0,3710	0,9201	0,0300	0,9218	0,8586	0,9301
R00 stim	0,9018	0	0,5008	0,3594	0,5923	0,0100	0,6639	0,2812
R01 ref	0,3710	0,5008	0	0,9151	0,0516	0,6323	0,7837	0,9201
R01 stim	0,9201	0,3594	0,9151	0	0,9101	0,2762	0,4493	0,0083
R10 ref	0,0300	0,5923	0,0516	0,9101	0	0,8636	0,8037	0,9185
R10 stim	0,9218	0,0100	0,6323	0,2762	0,8636	0	0,7022	0,0765
R11 ref	0,8586	0,6639	0,7837	0,4493	0,8037	0,7022	0	0,4376
R11 stim	0,9301	0,2812	0,9201	0,0083	0,9185	0,0765	0,4376	0

Uvedená tabulka vzdáleností je vstupem pro následující metody analýzy, které byly vybrány s přihlédnutím k výše uvedeným vlastnostem asociační matice. Jednají se o nemetrické vícerozměrné škálování (nonmetric multidimensional scaling) a shlukovou analýzu (cluster analysis).

13.4.3 Nemetrické vícerozměrné škálování (NMDS)

Cílem NMDS je vytvořit euklidovskou reprezentaci pozorovaných vzdáleností mezi objekty metrické i semimetrické matice. Nesnaží se zachovat přesné vzdálenosti mezi objekty, ale prezentovat objekty v malém počtu rozměrů, ideálně dvou či třech, které je však potřeba zvolit předem.

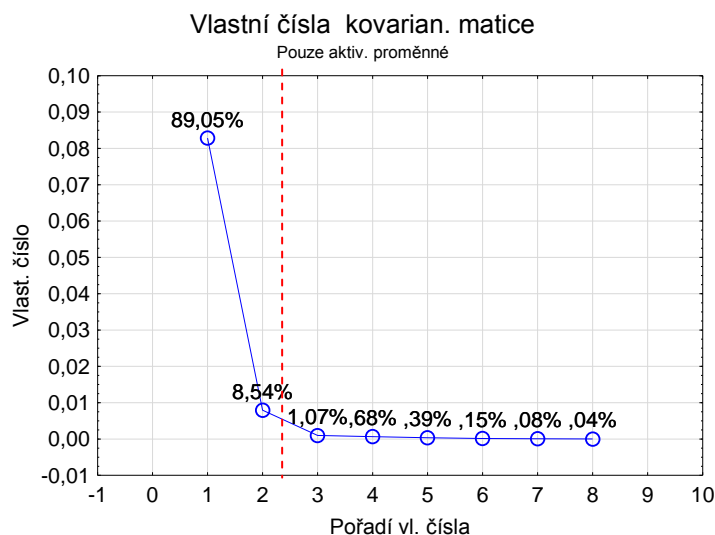
S výběrem vhodného počtu os nám pomůže analýza hlavních komponent (PCA – principal component analysis), vycházející z asociační matice kovariancí (sdílený rozptyl proměnných) nebo korelací původních dat, tj. zprůměrovaných časových průběhů. Jelikož jsou proměnné ve stejných

jednotkách a podobného významu, můžeme jako vstup PCA zvolit kovarianční matici dat. Samotná PCA pak spočívá ve výpočtu vlastních čísel matice, na základě nichž jsme schopni určit počet hlavních komponent (os), které dokáží vysvětlit největší podíl variability původních dat, viz Tabulka 6. Největší podíl celkového rozptylu dat (97,58 %) vysvětlují první dvě vlastní čísla, které charakterizují významné komponenty 1 a 2 pro reprezentaci dat.

Tabulka 6: Numerický výstup PCA na průměrovaných datech

Vlastní čísla kovarianční matice a související statistiky				
pořadí vl. čísla	vl. číslo	% celk. rozptylu	Kumulativ. vl. číslo	Kumulativ. %
1	0,082817	89,05174	0,082817	89,0517
2	0,007938	8,53576	0,090755	97,5875
3	0,000991	1,06549	0,091746	98,6530
4	0,000637	0,68445	0,092382	99,3374
5	0,000358	0,38515	0,092741	99,7226
6	0,000142	0,15320	0,092883	99,8758
7	0,000077	0,08292	0,092960	99,9587
8	0,000038	0,04130	0,092999	100,0000

PCA má nejen numerický, ale i grafický výstup v podobě tzv. scree plotu vlastních hodnot, viz Obrázek 53, který rovněž slouží k určení počtu komponent. Na ose x jsou seřazené komponenty a na ose y příslušná vlastní čísla. Podle tvaru křivky považujeme za významné komponenty do místa, kde prudký pokles hodnot u následujících komponent ustane, tj. 2 dimenze.

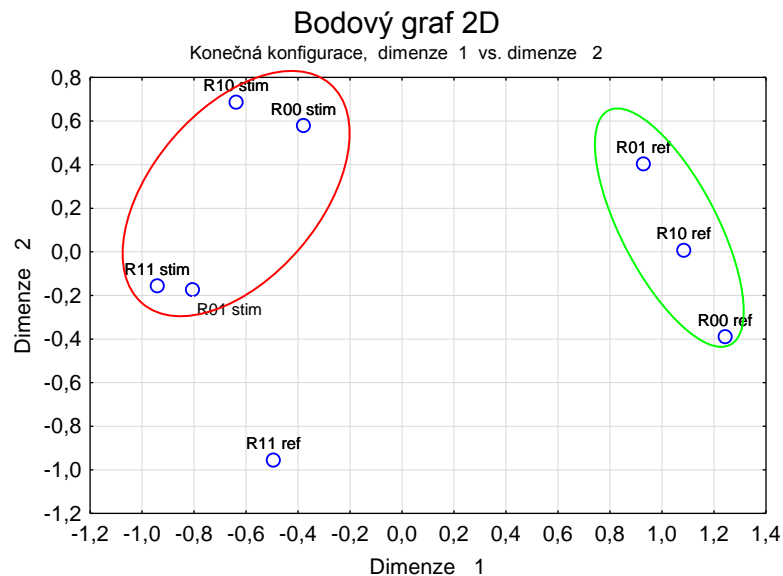


Obrázek 53: Scree plot PCA a vyznačení řezu pro stanovení počtu hlavních komponent

Na základě PCA víme, že data můžeme reprezentovat ve dvourozměrném prostoru. Výsledkem NMDS jsou vypočtené souřadnice všech objektů pro nové dvě osy euklidovského prostoru a lze vytvořit subjektivní mapu relativního rozmístění objektů v této rovině, viz Obrázek 54. Daný 2D škálovací diagram je výsledkem iteračního algoritmu, který provádí minimalizaci účelové funkce a hledá optimální sestavu vypočtených vzdáleností, tedy způsob jak vysvětlit vstupní matici dat ve 2D prostoru [86]. V prostoru grafu je potřeba orientovat se především podle dimenze 1, která vysvětluje

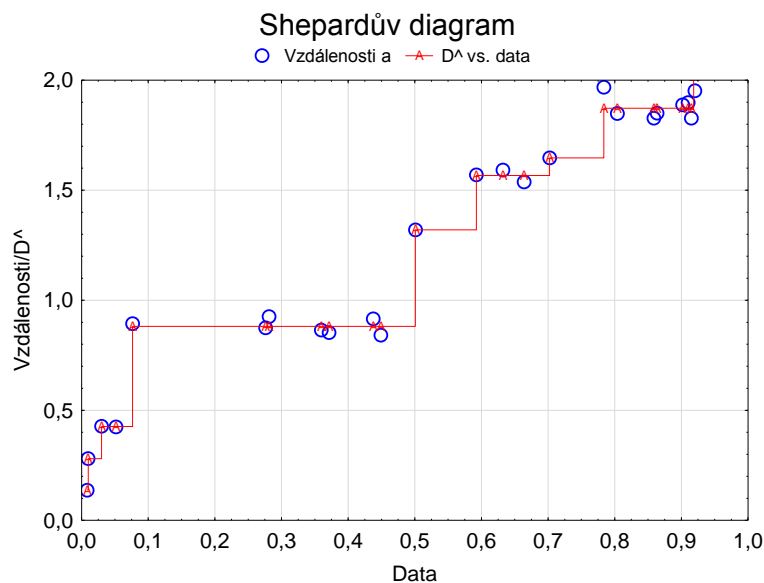
89 % variability dat. Zřejmá je hranice oddělující referenční signály od stimulovaných, které jsou jakoby uspořádány v menší shluky. Rozdělení se tedy nejeví zcela náhodné, nicméně R11 ref má velmi málo společného s oběma skupinami a bližší vztah má spíše ke skupině stimulací.

Jestliže se jeden z referenčních signálů přiřadil ke stimulovaným, vzniká zde podezření, že ve skutečnosti mezi skupinami REF a STIM žádný rozdíl neexistuje. Proto je potřeba nejprve prověřit věrohodnost modelu NMDS a poté přistoupit k další analýze.



Obrázek 54: 2D škálovací diagram jako výsledek mnohorozměrného škálování a barevné rozlišení shluků podobných prvků (REF – zelený, STIM – červený)

Vztah původního (osa x) a redukováného (osa y) prostoru graficky vyjadřuje Shepardův diagram, viz Obrázek 55. Schodovitá křivka představuje spojitou monotónní transformaci hodnot skutečných vzdáleností [90]. Reprodukované vzdálenosti (modré body) leží poměrně těsně u křivky, což značí dobrou kvalitu modelu NMDS.



Obrázek 55: Shepardův diagram pro zjištění kvality modelu NMDS (červená křivka – transformace skutečných vzdáleností; modré body – reprodukované vzdálenosti)

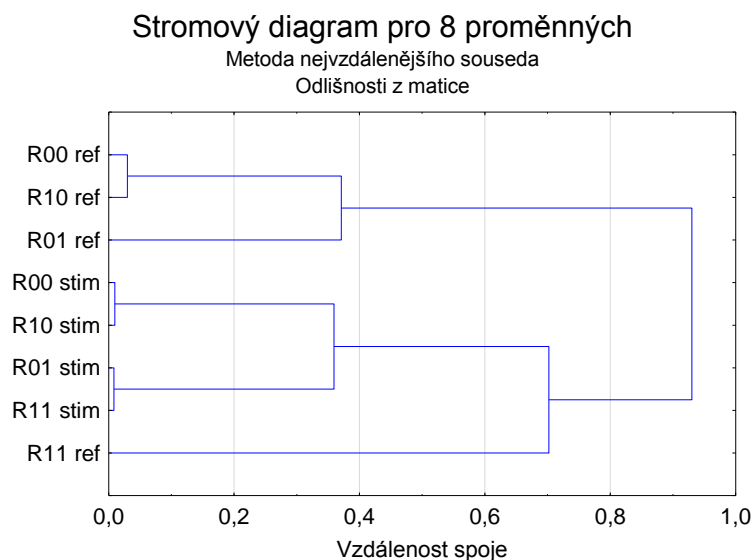
13.4.4 Shluková analýza

Mnohorozměrné škálování slouží jako příprava podkladů pro shlukovou analýzu (SA), která realizuje skutečné rozřídění objektů do skupin. SA pomáhá najít skrytou strukturu v datech anebo potvrdit očekávané rozdělení souboru dat do tříd (REF x STIM). Cílem shlukovacího algoritmu je seskupit blízké objekty do několika skupin tak, aby uvnitř skupin byla podobnost maximální a mezi skupinami naopak co nejmenší.

Vstupem SA je opět matice vzdáleností založená na LCSS. Pro shlukování je vybrán klasický postup hierarchického aglomerativního shlukování, který pracuje se vzdálenostmi samostatných objektů, z nichž postupně sestavuje skupiny tvořící hierarchickou strukturu. Důležitým krokem je volba shlukovacího algoritmu. Pro své výhodné vlastnosti byla vybrána *metoda nejvzdálenějšího souseda* (complete-linkage clustering), neboť vytváří poměrně kompaktní shluky navzájem dobře oddělené. Shluky jsou spojovány na základě největší vzdálenosti mezi objekty shluků [86].

Výstupem SA je dendrogram neboli struktura tvarem připomínající strom, vytvořený postupným spojováním objektů, viz Obrázek 56. Strom začíná vlevo osmi větvemi (objekty). V každém kroku se spojí dvě větve na úrovni, která odpovídá vzdálenosti vzniklého spoje (vodorovná osa) a je aktualizována matice vzdáleností. Nejprve byly vytvořeny dvojice R01 stim a R11 stim (nejmenší vzdálenost), pak R00 stim a R10 stim, R00 ref a R10 ref. Dále se sloučily dvojice stimulovaných signálů. Ke zmíněné dvojici referencí se připojil i R01 ref. Posledním připojeným k již kompaktnímu shluku stimulovaných signálů byl objekt R11 ref, který má největší vzdálenost od všech ostatních.

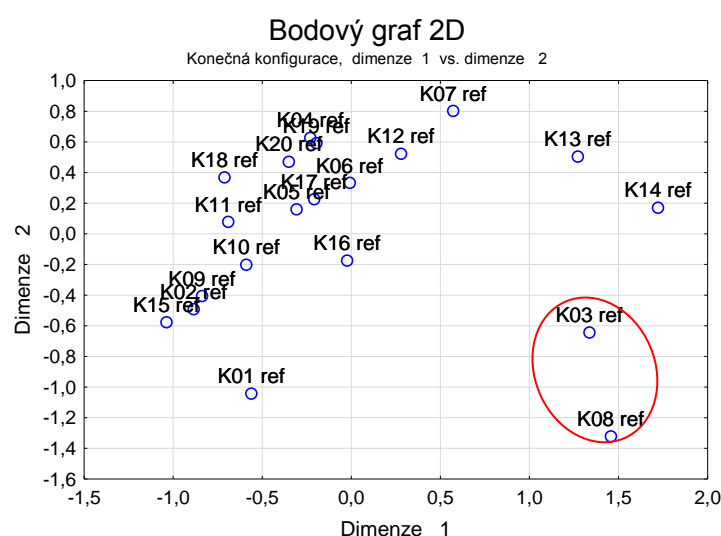
Jinými slovy SA potvrdila domněnku pravděpodobnosti vytvoření skupin, která vznikla na základě 2D škálovacího diagramu metodou NMDS. Nyní se nabízí zásadní otázka, zda-li je poslední objekt připojen správně nebo u něj došlo ke zkreslení, kvůli němuž byl přiřazen ke špatnému shluku. Pokud by byl R11 ref objekt připojen do skupiny ostatních STIM objektů správně, pak nemůžeme s jistotou říct, že mezi STIM a REF je skutečně rozdíl, tedy že stimulace způsobuje významnou změnu v prokrvení. Naopak, odhalíme-li zkreslení daného signálu a po jeho odstranění dojde k přiřazení objektu do společné skupiny s ostatními REF objekty, je vysoká pravděpodobnost, že REF a STIM jsou od sebe dobře rozlišitelné.



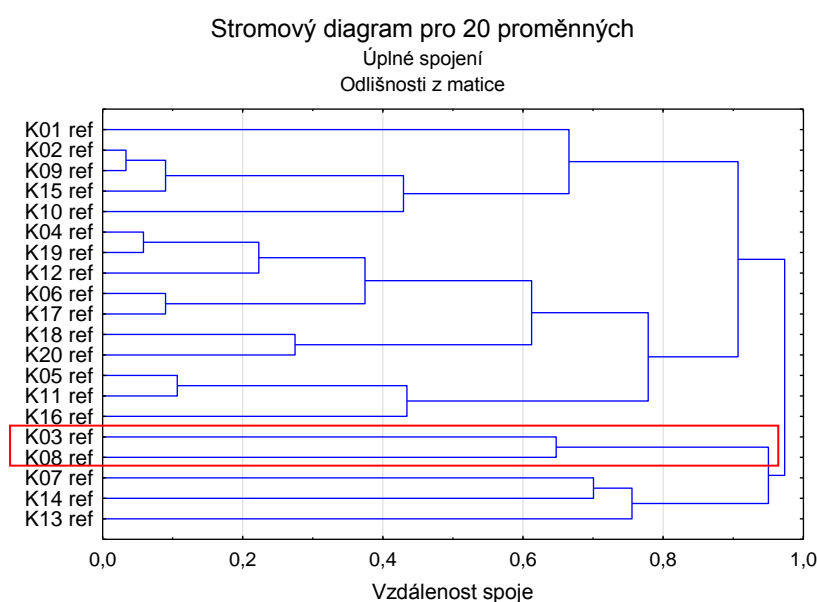
Obrázek 56: Stromový diagram (dendrogram) shluků vytvořených na základě matice vzdáleností

13.4.5 Analýza zkreslení referenčních křivek v režimu R11

Měření v režimu stimulace R11 bylo v pořadí čtyř zmíněných až poslední, proto se dá největší chybovost očekávat. Koně již delší dobu stáli na místě a začínali být nervózní. Objevovalo se mnohem více artefaktů než u předchozích měření nejčastěji z důvodu pohybu končetiny koně. Nyní je otázkou, zda můžeme odhalit přítomnost zkreslujících měření mezi referencemi v režimu R11. K tomu účelu dobře poslouží opět NMDS a SA kompletní sady REF křivek naměřených u všech 20 koní v tomto režimu. Na základě originálních dat byla algoritmem LCSS vytvořena matice vzdáleností jako vstup pro NMDS a SA. Ve 2D škálovacím diagramu (Obrázek 57) můžeme velmi dobře rozeznat shluk dat na levé straně grafu a odlehle hodnoty vpravo dole. S nejvyšší pravděpodobností jsou to právě měření na koních K03 a K08, které nejvíce zkreslují výsledek. O tom se přesvědčíme ještě pohledem do vytvořeného dendrogramu, viz Obrázek 58, kde pozorujeme skutečně největší vzdálenost zmíněných dvou měření od všech ostatních.



Obrázek 57: 2D škálovací diagram REF signálů režimu R11 a vyznačení odlehlejších hodnot (červený shluk)



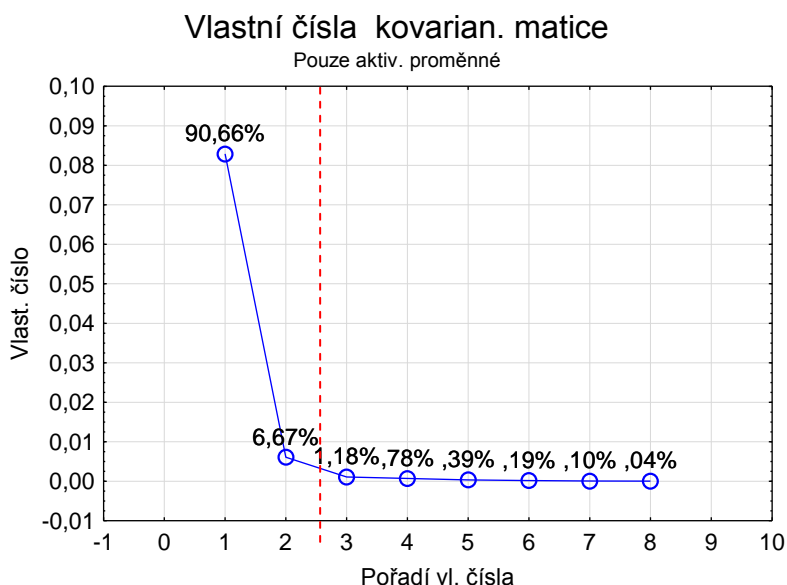
Obrázek 58: Dendrogram REF signálů režimu R11 a nalezení nejvíce odlišných měření (červené označení)

13.4.6 Analýza dat s redukcí chybných měření

Jestliže byly nalezeny případy, které mohly způsobit výrazné zkreslení celkových výsledků, nezbývá než je z měření eliminovat a následně porovnat výsledky před a po jejich vyřazení z analyzovaných dat. Redukce dat však nemůže proběhnout najednou, neboť chceme zachovat pokud možno co nejvíce původních dat. Proto postupně vyřazujeme měření, u kterých byla chybovost největší. Po prohlédnutí skutečných časových signálů REF naměřených na koních K03 a K08 se větší zkreslení jeví u záznamu koně K08. Proto jej jako první z dat vyřadíme a provedeme opět všechny potřebné statistiky, počínaje výpočtem nové matice vzdáleností (Tabulka 7). Po zjištění počtu hlavních os grafickou cestou PCA (Obrázek 59) přistoupíme k vlastní analýze metodou NMDS a SA.

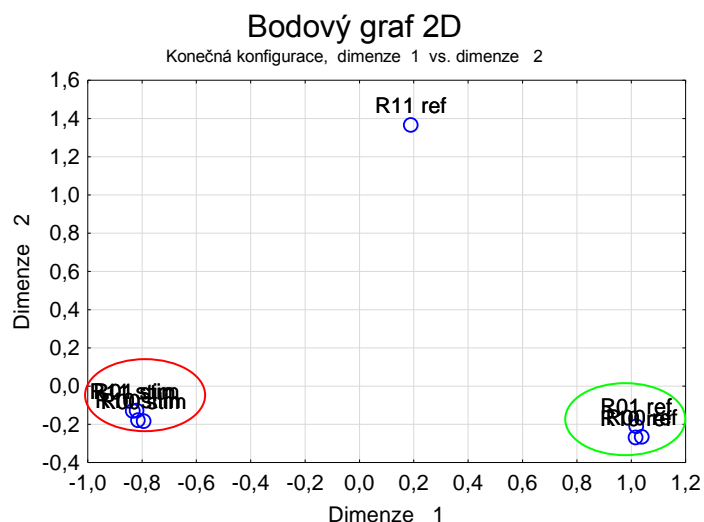
Tabulka 7: Matice vzdáleností po vyřazení měření K08 REF z režimu R11 ref

	R00 ref	R00 stim	R01 ref	R01 stim	R10 ref	R10 stim	R11 ref	R11 stim
R00 ref	0	0,9018	0,3710	0,9201	0,0299	0,9217	0,7870	0,9301
R00 stim	0,9018	0	0,5008	0,3594	0,5923	0,0099	0,6805	0,2811
R01 ref	0,3710	0,5008	0	0,9151	0,0515	0,6322	0,4758	0,9201
R01 stim	0,9201	0,3594	0,9151	0	0,9101	0,2762	0,6189	0,0083
R10 ref	0,0299	0,5923	0,0515	0,9101	0	0,8635	0,7670	0,9184
R10 stim	0,9217	0,0099	0,6322	0,2762	0,8635	0	0,6455	0,0765
R11 ref	0,7870	0,6805	0,4758	0,6189	0,7670	0,6455	0	0,4958
R11 stim	0,9301	0,2811	0,9201	0,0083	0,9184	0,0765	0,4958	0

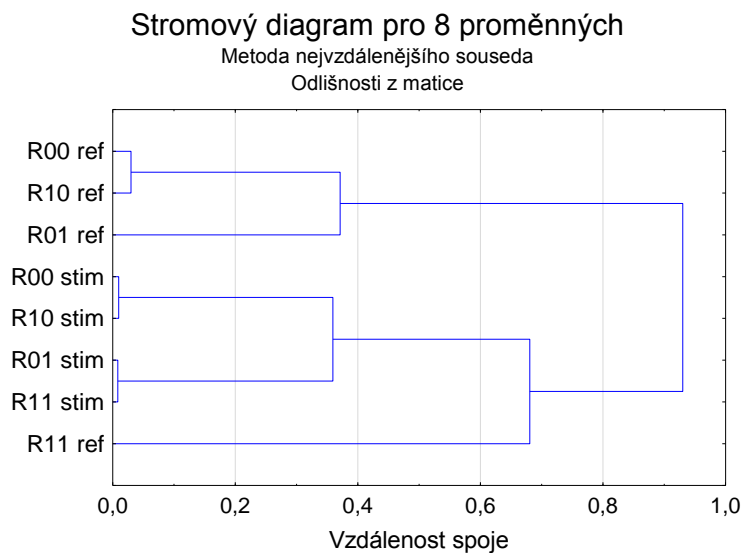


Obrázek 59: Scree plot pro určení počtu hlavních komponent po vyřazení měření K08 ref z režimu R11 ref

Ve 2D škálovacím diagramu (Obrázek 60) se orientujeme opět podle dimenze 1, neboť vysvětluje nejvíce variability, konkrétně 90,66 %. Je zřejmé, že STIM a REF signály vytvořily výrazněji oddělené skupinky a prvky uvnitř nabyly těsnějších vztahů, čímž se ovšem více vyčlenil signál R11 ref. Nyní lze s těžší rozhodnout o jeho zařazení k jedné ze dvou skupin narozdíl od předchozí analýzy, kdy byl blíže ke STIM signálům. Po dalším přezkoumání pomocí SA dojde ve značné vzdálenosti přece jen k přiřazení prvku opět ke STIM shluku, viz Obrázek 61.



Obrázek 60: 2D škálovací diagram po vyřazení K08 ref z režimu R11 ref



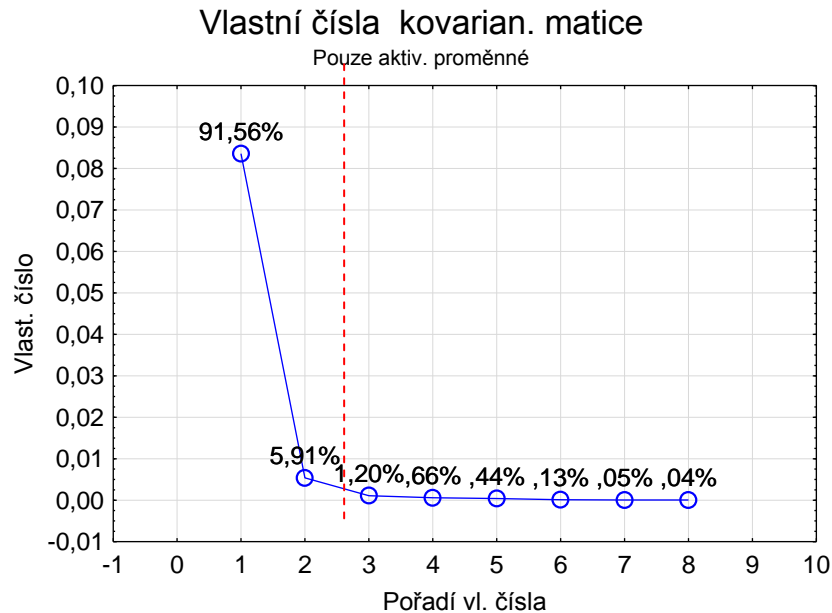
Obrázek 61: Dendrogram po vyřazení K08 ref z režimu R11 ref

V dalším kroku tedy můžeme vyloučit i druhé, pravděpodobně chybové, měření REF signálu na koni K03 v režimu R11 a pozorovat, zda tato změna podstatně ovlivní uspořádání dat. Nutností je znova přepočítat příslušnou matici vzdáleností prvků (Tabulka 8) a dále provést kompletní analýzu jako v předchozích krocích.

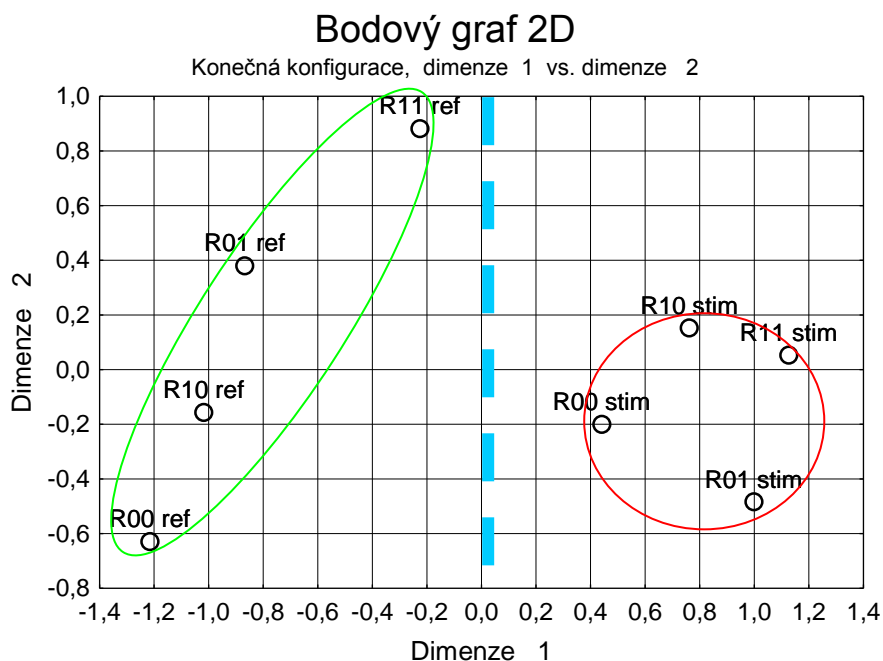
Tabulka 8: Matice vzdáleností po vyřazení měření K08 ref a K03 ref z R11 ref

	R00 ref	R00 stim	R01 ref	R01 stim	R10 ref	R10 stim	R11 ref	R11 stim
R00 ref	0	0,9018	0,3710	0,9201	0,0299	0,9217	0,7071	0,9301
R00 stim	0,9018	0	0,5008	0,3594	0,5923	0,0099	0,5574	0,2811
R01 ref	0,3710	0,5008	0	0,9151	0,0515	0,6322	0,1264	0,9201
R01 stim	0,9201	0,3594	0,9151	0	0,9101	0,2762	0,7603	0,0083
R10 ref	0,0299	0,5923	0,0515	0,9101	0	0,8635	0,5607	0,9184
R10 stim	0,9217	0,0099	0,6322	0,2762	0,8635	0	0,5490	0,0765
R11 ref	0,7071	0,5574	0,1264	0,7603	0,5607	0,5490	0	0,5274
R11 stim	0,9301	0,2811	0,9201	0,0083	0,9184	0,0765	0,5274	0

Podle scree plotu, viz Obrázek 62, můžeme data interpretovat ve dvoudimenzionálním prostoru. Porovnáme-li schopnost první dimenze vysvětlit variabilitu dat před vyřazením objektů K03 a K08 ref a po něm, pak vzrostla o 2,51 %. Ve 2D škálovacím diagramu (viz Obrázek 63) je patrný náznak rozložení všech objektů do dvou shluků. Ke stejnému rozdělení do dvou shluků dospěla i následující SA. Ve vytvořeném dendrogramu (Obrázek 64) můžeme detailněji porovnat vzdálenosti jednotlivých objektů.



Obrázek 62: Scree plot pro určení hlavních komponent po vyřazení K03 ref a K08 ref z R11 ref

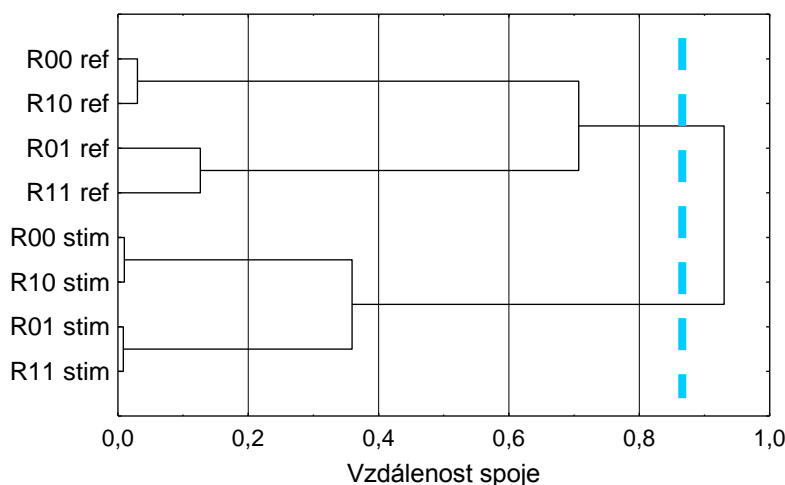


Obrázek 63: 2D škálovací diagram podobností objektů po vyřazení K03 ref a K08 ref z R11 ref (jednoznačné oddělení shluků v prostoru podle dimenze 1 je znázorněno světle modrým řezem)

Stromový diagram pro 8 proměnných

Metoda nejvzdálenějšího souseda

Odlíšnosti z matice



Obrázek 64: Dendrogram po odstranění K08 a K03.

Světle modrý řez naznačuje vhodné místo pro rozdělení dvou největších shluků REF a STIM

13.5 Diskuze výsledků

Cílem uvedené statistické analýzy bylo především odpovědět na dvě stěžejní otázky položené v úvodu kapitoly 13. Postupy zpracování a zkoumání dat bylo potřeba pečlivě zvážit, neboť naměřená data jsou svým způsobem atypická pro použití metod klasické testové statistiky. Jedná se o biologické signály, které se v čase spojitě mění a nemůžeme je v celém rozsahu popsat prostou střední hodnotou.

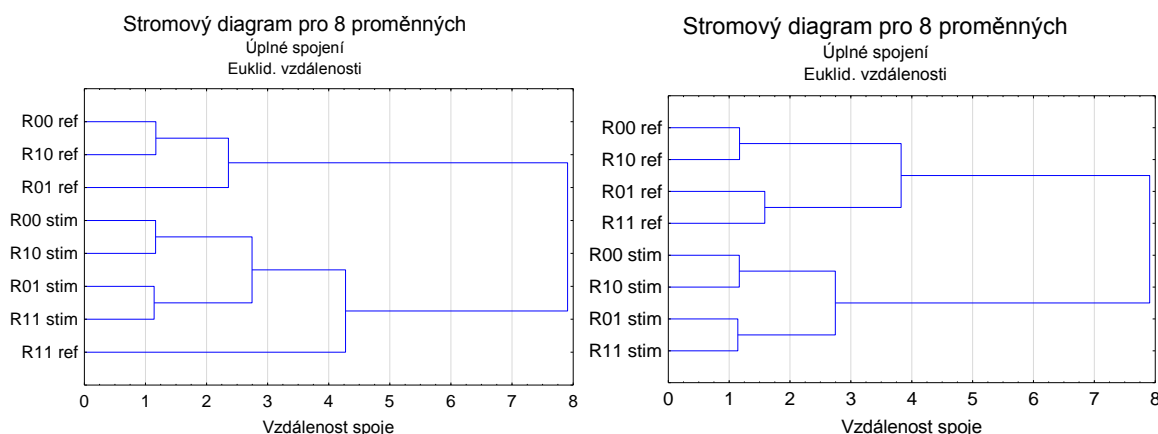
Pokud se na signály podíváme z pohledu statistiky jako na časové průběhy, do značné míry se rozchází náš cíl analýzy s typickým cílem analýzy časových řad často vedoucí k predikci hodnot (v ekonomii). Ani provedené korelace a Wilcoxonův test rozdílu mezi REF a STIM signály nebyl pro zodpovězení našich otázek zcela dostačující. Při hledání vhodné metodiky zpracování dat bylo rovněž zváženo srovnání signálů ve frekvenční oblasti s použitím Fourierovy transformace nebo vlnkové transformace, které však nepřineslo podstatnou informaci. Postup experimentu se do značné míry podobá metodice funkční magnetické rezonance, při níž se snímá hemodynamická odezva mozku jako reakce na neuronální aktivitu, tj. specifický stimulační podnět. Pro analýzu těchto časových signálů se používají mj. postupy regresní analýzy, kdy je vytvořen model hemodynamické odezvy především v závislosti na stimulační sekvenci. Bohužel ani tento postup nebylo možné použít. Nelze totiž dosáhnout tepelné odezvy v rychlosti, která je téměř okamžitá u odpovědi mozku na příslušný stimul, aby došlo k výrazné korelaci se skutečným průběhem stimulační sekvence.

Zásadní význam pro celou analýzu má tedy tvar naměřených signálů a další zkoumání se zakládalo na hledání podobnosti sekvencí vzájemně mezi sebou. Vzhledem k mnohým výhodám byl zvolen způsob srovnání křivek algoritmem Longest Common Subsequences. Počítá s možností, že se u srovnávaných křivek může objevit stejný úsek i s časovým zpožděním a zároveň není nutností namapovat všechny prvky obou křivek, což by nutně vedlo i ke spojení odlehlých hodnot. Algoritmus mapuje pouze srovnatelné prvky a ostatní ignoruje, proto jej lze použít i u silně zašuměných dat. Výsledkem byla matice vzdáleností jednotlivých REF a STIM křivek napříč všemi čtyřmi režimy. Asociační matici, která reprezentuje celou sadu dat, již bylo možné podrobit metodám statistické

analýzy vícerozměrných dat. Na základě mnohorozměrného škálování a shlukové analýzy, zkoumající podobnost/vzdálenost objektů, můžeme zvážit odpovědi na obě úvodní otázky současně.

Při analýze matice vzdáleností původních dat byl jeden z referenčních signálů (R11 ref) přiřazen do skupiny stimulovaných. Tím vzniklo podezření, že jsou buď v datech referenčního signálu přítomny případy, které jej značně zkreslují, nebo jsou si referenční i stimulované signály skutečně natolik podobné a nemůžeme tvrdit, že stimulace má prokazatelný vliv na tepelné změny končetiny. V tom okamžiku však nebylo možné vyloučit ani jednu z možností bez provedení další analýzy. Stejnými metodami (NMDS, SA) byly prozkoumány vzájemné vztahy referenčních signálů všech koní v daném režimu R11 a nalezena dvě měření, která s největší pravděpodobností mohla případné zkreslení způsobit. Postupnou eliminací pouhých těchto 2 měření ze všech 20 se dospělo k naprosto jinému výsledku. Ve 2D prostorové reprezentaci vznikly dvě dobře oddělené skupiny, které bychom mohli nazvat podle objektů, které obsahují, tj. referenční a stimulovaná.

K podobným výsledkům jako při použití algoritmu LCSS bychom dospěli i klasickou shlukovou analýzou na původních datech s využitím Euklidovské vzdálenosti mezi objekty. Ta byla provedena na samotný závěr spíše pro doplnění a srovnání výsledků obou algoritmů. Zdá se, že LCSS skutečně poskytuje přesnější interpretaci vztahů mezi měřeními, neboť ve srovnání s dendrogramy, založenými na Euklidovské vzdálenosti (Obrázek 65), zobrazuje mnohem těsnější vazby objektů.



Obrázek 65: Dendrogramy shlukové analýzy založené na Euklidovské vzdálenosti měřených dat. Vlevo: dendrogram původních dat. Vpravo: dendrogram po vyřazení K03 a K08 ref z R11 ref

Provedená statistická analýza identifikovala významný rozdíl mezi stimulovanými a referenčními signály, a to nejen Wilcoxonovým testem, který považujeme v tomto případě za méně přesný, ale také mnohorozměrným škálováním a shlukovou analýzou. Tento výsledek byl podpořen důkazem významné podobnosti referenčních, resp. stimulovaných, signálů u všech koní v rámci každého režimu stimulace Rxx a dokonce napříč všemi režimy.

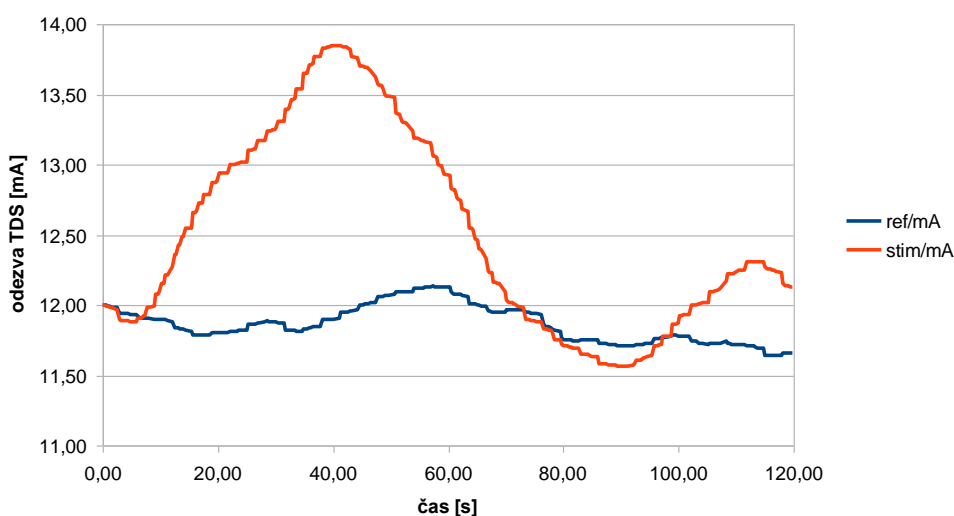
Obecně byl v každém kroku analýzy shluk stimulací (červeně značený) mnohem kompaktnější v porovnání se shlukem referencí (zelený). Tomu nasvědčuje i provedená korelační analýza, která našla několikanásobně více významných vztahů u stimulovaných signálů. Největší podíl by na tom mohla mít zcela náhodná povaha měřeného referenčního signálu, který je více než stimulovaný ovlivněn jakýmkoliv vnějšími i vnitřními vlivy při měření, tudíž i veškerými chybami, ke kterým mohlo dojít. Tvar stimulovaného signálu s nejvyšší pravděpodobností souvisí s právě probíhající mikrostimulací. Ačkoliv se zdá, že některé dvojice signálů v rámci vytvořených shluků jsou si bližší, bez dalšího zkoumání na větším souboru dat není v tuto chvíli možné vyvodit smysluplný závěr.

13.6 Interpretace výsledků

Co se týká interpretace samotných křivek, pak na základě statistické analýzy lze konstatovat, že signály naměřené pomocí TDS na stimulované končetině s vysokou pravděpodobností zachycují změnu tepelné aktivity v důsledku působení samotné mikrostimulace. Pohledem na vykreslené časové křivky STIM lze pozorovat prudší nárůst amplitudy v úseku trvajícím 30 s, tj. po dobu probíhající stimulace. Tato poměrně pravidelně se opakující odezva nebyla přítomná u REF signálů, u nichž stimulace neprobíhala vůbec. Jejich obvykle sinusový průběh s menší výchylnou ve srovnání se STIM signály je v této fázi těžko interpretovatelný a vyžadoval by další měření.

Obecně rostoucí tendence křivky signálu TDS je charakteristická pro narůstající termoaktivitu snímaného systému, konkrétně zvýšení tepelného toku a ohřev. Podrobné zkoumání přesného mechanismu působení mikrostimulace na stimulovanou oblast podle křivek TDS není možné nyní realizovat, neboť je záležitostí dlouhodobějšího výzkumu vyžadující i znalosti veterinárního lékaře a může tak být předmětem další práce. I přesto se můžeme na základě vlastností stimulace pokusit vyvodit alespoň jednoduchou představu o možných účincích mikroimpulzní stimulace. V následujícím textu se omezíme pouze na popis mechanického působení mikrostimulace na cévy, nikoliv na poměrně složité lokální změny metabolické, které spadají již do velmi specifického biochemického výzkumu.

Vzhledem k relativně nízké frekvenci salv impulsů bychom primární účinek mikrostimulace na cévy očekávali v jejich vazodilataci [6]. Zde však nesmíme opomenout účinek vysokého napětí terapie, který by měl způsobovat spíše vazokonstrikci [91]. Dalším faktorem je také šířka salvy impulsů, s jejíž velikostí roste i síla dráždicího podnětu. Ať už bychom přikládali větší důležitost účinku nízké frekvence nebo vysokému napětí stimulace, v konečném důsledku skutečně bude hrát největší roli následná vazodilatace. I při větším podráždění nemůže vazokonstrikce trvat dlouho a po jejím odeznění se cévy mohutně dilatují. I zde platí fakt, že reakce každého koně na stimulaci může být velmi individuální. To lze pozorovat na stimulovaných křivkách TDS. U některých koní se s přiložením elektrod náhle objevil krátký záskok signálu k nižším hodnotám a teprve poté začal prudce stoupat, viz Obrázek 66. Tento jev by mohl poukazovat na krátký okamžik vazokonstrikce cév, ať už v důsledku psychického působení stimulace na koně a strnutí končetiny, nebo skutečného počátečního účinku stimulace na cévy.

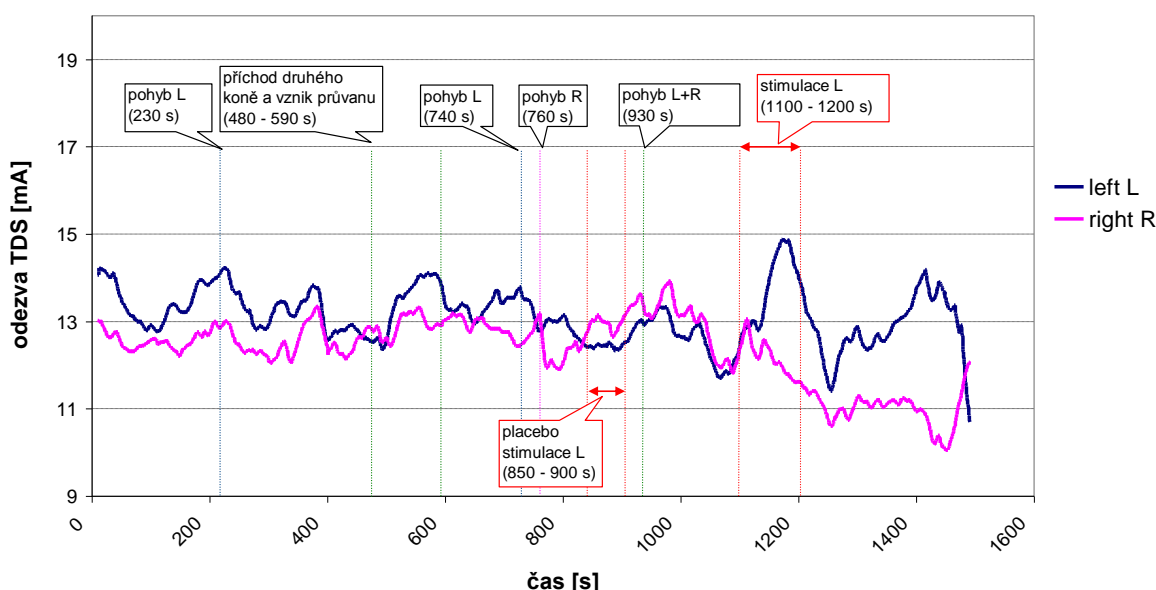


Obrázek 66: Originální záznam měření koně K10 v režimu stimulace R01

Účelem spojení vyššího napětí s vyšší frekvencí nosných impulsů je snaha proniknout hlouběji do tkání, nikoliv jen ovlivnit podkožní struktury. Naše představa je taková, že dojde k ovlivnění nejen periferních nervových zakončení a drobných cév, ale také větších arteriol a žil (viz umístění stimulatoru a sond). Jev vazodilatace spočívá v okamžitém rozšíření průsvitu cév, usnadnění průtoku krve a vyúsťuje v celkovou hyperémii nejen stimulované oblasti, ale také přilehlého okolí [2]. Větší prokrvení oblasti je nepochybně doprovázeno i jejím oteplením, které je zjistitelné termodynamickým senzorem. Postupné oteplování oblasti v důsledku hyperémie pak lze srovnat se stoupajícím trendem stimulované křivky po přiložení elektrod. Po odstranění elektrod se růst po chvíli zastavil a následně signál začal klesat.

Bohužel z krátkých měření, které byly použity pro statistickou analýzu, není zřejmé, jak se situace vyvíjela dál, tj. zda se po odeznění stimulace hyperémie udržela, resp. postupně mizela. Tento jev by byl pravděpodobně charakterizován periodickým kolísáním signálu tak jako u referenčního, ovšem na vyšší úrovni. Proto byl na jednom z klidnějších koní pořízen dlouhodobý záznam o délce 25 minut, který zachycuje také veškeré pozorovatelné vnější i vnitřní podmínky měření, a slouží k posouzení, zda vliv stimulace nemůže být ve skutečnosti vzhledem k vysoké citlivosti sond překryt jiným rušením (viz Obrázek 67).

25-ti minutový záznam měření s TDS umístěnými na levé (L) a pravé (R) noze koně



Obrázek 67: Dlouhodobé měření s TDS se záznamem stimulace i všech vnějších vlivů

Obrázek 67 zobrazuje opět signály ze dvou TDS umístěných na pravé (R, fialová) a levé (L, modrá) přední noze. Počátek záznamu odpovídá okamžiku spuštění celé měřicí aparatury a ukazuje ustalování sond. Signály nejsou slícované a projevuje se nestejná přístrojová chyba obou multimetrů, která je však v tolerančních mezích. I přesto spolu křivky tvarově korelují. Vlivy, které byly při měření postřehnutelné, jsou zaznamenány v horní části grafu vzhledem k časové ose. Mimo to byla provedena klasická a také placebo stimulace s přiloženým, ale nezapnutým stimulatorem. Z porovnání všech amplitud, které byly způsobeny ať už vznikem průvanu ve stáji, pohybu končetiny, placebo nebo skutečnou stimulací, se jeví výchylka při skutečné stimulaci prokazatelně nejvýraznější a i po odeznění stimulace se signál udržoval na vyšších hodnotách.

13.7 Problémy měření a návrh jejich řešení

Realizace výše popsaného experimentu s sebou nesla řadu problémů, které bylo nutné řešit, aby se co nejlépe předešlo nesprávným výsledkům. Už samotný objekt měření, kůň, je zdrojem nejrozličnějších chyb, často těžko postižitelných. Jako u každého jiného zvířete nelze ani u koně dosáhnout při měření absolutního klidu bez použití speciálních veterinárních přípravků, které však jednomyslně odmítáme. Každý pohyb končetiny zvířete pak může představovat vznik rušivého artefaktu v signálu. S tím souvisí problém vysoké citlivosti sond, v níž můžeme vidět jak výhody, tak nevýhody. Pravděpodobně by po snížení dané úrovně citlivosti byla odezva sondy delší a snímání tepelných toků by bylo o to méně přesné. Na druhou stranu sondy byly schopny zaznamenat jakoukoliv tepelnou změnu způsobenou pohybem končetiny nebo nepatrnou změnu vnějšího okolí, jakou je průvan. Tyto jevy sice mohly do jisté míry přispět ke zkreslení signálů, ale jak ukazuje dlouhodobý záznam výše, efekt stimulace by neměly zcela zastínit.

S dobrými výsledky každého experimentu také velmi souvisí prostředí, v jakém jsou data získávána. V souvislosti s pojmem „pokus na zvířatech“ se nám často vybaví sterilní prostředí laboratoří, které zajišťuje nejen optimální podmínky pro účely měření, ale také naprosto stejné podmínky pro jednotlivé pokusy. Proto chybná měření vznikají pouze ojediněle, např. nedodržením stejného postupu práce apod. Zdálo by se ideální zajistit za tímto účelem pro koně zvláštní box, čistý a uzavřený, bez jakéhokoliv zdroje rozptýlení. Je však potřeba si uvědomit, že by celý manévr měl s vysokou pravděpodobností úplně opačný efekt. Podmínky by sice byly příhodnější pro měření, ale nikoliv pro koně samotného, který by přirozeně v cizím prostředí bez jediné známky přítomnosti ostatních členů stáda propadl stresu a velmi znervózněl. V případě experimentů na živých koních tedy nemůže být o zajištění podobných podmínek vůbec řeč. Obvykle se tedy jednalo o prostory jezdecké stáje, což je místo pro experiment dosti nezvyklé až extrémní, vzhledem k vysoké prašnosti, průvanu a řadě dalších pro koně rušivých a těžko vyloučitelných faktorů, při kterých ne vždy lze dosáhnout absolutního klidu koně. I přes to však jde o prostředí, které je pro koně přirozené, cítí se v něm bezpečně a o to ochotněji snáší veškerou manipulaci.

Stejně jako u člověka, nevyhneme se ani u zvířete psychickému působení celého experimentu. Jde však o věc velmi individuální, protože i u koní se najdou flegmatictí jedinci stejně tak jako jedinci, které znepokojí sebemenší maličkost. Kůň koně je velmi citlivá a dokonce se tvrdí, že kůň je jedno z nejcitlivějších zvířat na elektrický proud. V okamžiku přiložení sond či elektrod mikrostimulátoru může kůň z překvapení ztuhnout, v místě aplikace napnout svaly, znervóznět nebo zatřást kůží, jako by odháněl hmyz. Zohlednit je potřeba také fakt, že na živém koni nelze měřit jinak, než při jeho stání, neboť jen minimální část svého života stráví kůň vleže. Svaly končetin koně jsou tak udržovány v trvalém tonu a i menší změnu napětí svalu, jako je přenesení váhy z jedné nohy na druhou, můžeme stěží zaznamenat, ačkoliv se na měření může podepsat.

Pokud se jedná o nedostatky přístrojového vybavení experimentu, pak by bylo vhodné doplnit program pro dvoukanálové snímání hodnot multimetrů o grafické rozhraní. Přímé vykreslování signálu v závislosti na čase by jednoznačně usnadnilo rozpoznání ustálení sond a identifikaci vhodného okamžiku pro zahájení stimulace. Jelikož byly hodnoty pozorovatelné pouze na obrazovce počítače, bylo ustálení sond do značné míry odhadováno. Další měření s jiným režimem stimulace tak mohlo začít dříve, než došlo k opětovnému ustálení systému, tedy i sond, po předchozím měření. I to může být příčinou zkreslení signálů.

14 Vliv mikrostimulace na redukci otoků končetin koní

Závěr předchozího experimentu 62/2011 poskytl objektivní zjištění fyziologického účinku mikrostimulace prostřednictvím monitorování tepelných změn uvnitř stimulované končetiny pomocí termodynamických sond umístěných na kůži. Paralelně s tímto experimentem probíhala pilotní studie sledování možného terapeutického účinku mikrostimulace na redukci otoků končetin koní. Právě léčba otoků s podporou krevní cirkulace úzce souvisí.

Do pokusu byli zahrnuti koně bez omezení plemene či věku. Avšak společným rysem a zároveň předpokladem pro zařazení jedince do experimentu byla zjevná přítomnost akutního otoku na jedné z končetin. Jednalo se o otoky způsobené lehčími úrazy jako jsou distorze, kopnutí jiným koně a tendinitidy. Bolestivé otoky v mnoha případech doprovází napadání na zraněnou končetinu (kulhání) či úplné odmítání chůze.

Otok je typickým průvodním jevem akutního zánětu. Dochází k narušení polopropustné vlastnosti cév, která normálně umožňuje prostup vody, solí a jiných nízkomolekulárních látek do tkání, ale naopak zadržuje uvnitř větší molekuly, jakými jsou bílkoviny. Při zánětu se cévní stěna stane propustnou i pro proteiny, které se dostávají do okolní tkáně, naruší rovnováhu osmotických tlaků mezi intersticiem a plazmou a v tkáni se hromadí tekutina. Vedle toho se zvyšuje i lymfatická drenáž, která tuto tekutinu nestačí odvádět. [92]

S problémem oteklých končetin se potýkají chovatelé koní zdaleka nejčastěji, neboť právě nohy jsou u koně nejzranitelnější oblastí vzhledem k povaze jeho využití pro sportovní účely i tažnou práci. Vedle řádného ošetření případných ran se obvykle vyžadují klidové podmínky, vyřazení koně z denního provozu, často i ze stáda. Specifikovat přesnou dobu, za kterou se tímto způsobem může končetina zcela zahojit, není jednoduché. Podle názorů chovatelů koní, trpících např. opakovanými záněty šlach doprovázených otoky, se úplné zahojení dostavuje za týden i více. Není však vyloučeno zhoršení stavu zejména při nedodržení klidového režimu či dalším úrazu.

Do studie nebyli zařazení koně s otoky infekčního původu, které je nutno řešit podáním antibiotik. Bohužel je tento typ otoku od předchozího v počáteční fázi (cca 2 dny) těžce rozpoznatelný. Z toho důvodu byli dva koně ze studie po dvou dnech aplikace elektrostimulace vyloučeni, neboť se stav nelepšil. Aplikovaný Priessnitzův zapařovací obklad následně prokázal přítomnost zánětu, způsobeného mikroorganismy, a byla nasazena řádná léčba antibiotiky.

Sehnat dostatečný počet koní pro účely experimentu, který probíhá tzv. v terénu, je nelehký úkol. Majitelé koní obvykle vyčkávají, jak se zranění vyvine a veterináře volají až po nějaké době v případě, že se stav koně nezlepší, či naopak dojde ke zhoršení. V tom okamžiku však může být na použití mikrostimulace pozdě, neboť jak platí u každého typu léčby, nejlepší výsledek přináší včasný zásah a podchycení prvních příznaků onemocnění. Z toho důvodu není možná spolupráce s veterinárním lékařem, od něhož chovatel očekává poskytnutí okamžitého, praxí ověřeného ošetření, které navrátí jeho koně co nejdříve do sportovní kondice. Tehdy není pro zkoušení nových léčebných metod a postupů prostor.

Informace o možnosti účastnit se probíhajícího experimentu byly mezi majiteli koní šířeny osobně a dále formou vytvořených plakátků pro stáje v okolí Brna a Uherského Hradiště. Ke zvýšení informovanosti a důvěryhodnosti celé akce přispěly vytvořené webové stránky, kde byly umístěny

také videa a fotografie dokumentující průběh léčby s použitím mikrostimulace u koně, který se studie již účastnil.

Obdobně, jako je tomu u každého výzkumu nově testované metody na lidech či domácích zvířatech, je nutné mít písemné podklady účasti subjektu v experimentu. Pro majitele zúčastněných koní byl vystaven formulář informovaného souhlasu (viz Příloha J), dokládající jeho seznámení s postupy a cíly experimentu, s možnými problémy a také podmínkami ochrany osobních dat. Vlastnoručním podpisem majitel souhlasil s účastí svého koně ve studii, s uveřejněním a použitím výsledku studie. Veškerá naměřená data jsou dále poskytována a zveřejňována pouze jako anonymní, tj. pod číselným kódem v rámci experimentu.

Celkem bylo dokumentováno devět případů s otoky výše uvedeného původu. U každého byla vedena písemná dokumentace obsahující pravděpodobnou příčinu úrazu, popis postižené oblasti, lokalizace a rozsah otoku, popis použitých parametrů a doby stimulace, chování koně při stimulaci a vývoj situace v průběhu následujících dní. Celý experiment je dokumentován formou fotografií a videozáznamů, zajišťujících vhodný a průkazný materiál pro hodnocení efektivity mikrostimulace. Obojí je k dispozici v přílohách. U všech koní probíhala terapie 1x denně v délce maximálně 30 minut pokud možno až do úplného ustoupení potíží. Nejdelší zaznamenaná doba léčby činila 4 dny, nejčastěji se však značné zlepšení dostavilo už po 2 dnech terapie.

Obrazová a videozáznamová dokumentace byla předložena nezávislému veterinárnímu lékaři ke krátkému posouzení výsledků. Podle jeho slov působí mikrostimulace s největší pravděpodobností analgeticky a protizánětlivě. Nelze ale dále vyvodit obecnější závěr, který by vyžadoval účast několikanásobně více podobných případů. Krátké shrnutí výsledků vedoucího pokusu uvádí Příloha L. Alespoň přibližný mechanismus, jakým mikrostimulace působí na edematickou oblast, však můžeme vydedukovat na základě výsledků předchozího experimentu, tj. monitorování cirkulace krve stimulovanou oblastí. Elektrické impulsy ovlivňují permeabilitu cév, zvyšují mobilitu proteinů, krevních buněk a lymfy, a tím mohou značně urychlit absorpci edematické tekutiny [62].

15 Závěr

Úvodní teoretická část diplomové práce se podrobně věnuje rozboru účinků elektrických impulsů na nejjednodušší buněčné úrovni. Tyto poznatky jsou důležité k následnému pochopení rozdílů v mechanismu působení impulsů s různou šířkou a intenzitou. Rešerše zásadně přispěla k představě návrhu mikrostimulátoru a parametrů stimulace, založené na teorii skládání podprahových impulsů.

Při konstrukci funkčního vzorku mikrostimulátoru byly respektovány náročné požadavky norem zejména na bezpečnost jeho použití vzhledem k plánovaným experimentům na zvířatech. Splnění všech náležitostí dokládají protokoly provedených zkoušek bezpečnosti a elektromagnetické kompatibility, na základě nichž může funkční vzorek mikrostimulátoru využívat značení **CE**.

Stěžejní praktická část práce se věnuje experimentálnímu zkoumání použití mikrostimulace u koní. Na základě monitorování tepelných toků pomocí termodynamických senzorů byl v rámci pokusu č. 62/2011 statisticky prokázán fyziologický účinek mikrostimulace, spočívající v podpoře krevní cirkulace stimulované oblasti.

Náznak možného pozitivního terapeutického účinku mikrostimulace byl získán v rámci pilotní studie, pokusu č. 61/2011, sledujícím vliv mikrostimulace na redukci otoků končetin koní způsobených lehčími úrazy.

Oba zmíněné experimenty nemohou poskytnout výsledky rozsahu a váhy skutečných klinických studií, ale jsou chápány spíše jako první krok vedoucí k realizaci podrobnějších výzkumných projektů.

Seznam použité literatury

- [1] ALBERTS, B. et al. *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky*. Druhé vydání, Praha: Espero Publishing, 2005. 740 s. ISBN 80-902906-2-0.
- [2] SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. *Atlas fyziologie člověka*. Šesté vydání, Praha: Grada Publishing, 2004. 448 s. ISBN 80-247-0630-X.
- [3] VRÁNA, V. *Elektrické vlastnosti organismů*. První vydání, Praha: SNTL, 1974. 234 s. Číslo publikace 412-33464.
- [4] ŠIMURDA, J. *Bioelektrické jevy* (skripta). Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno, 2007. 72 s.
- [5] PLONSEY R.; BARR, R. C. *Bioelectricity: A quantitative approach*. Třetí vydání, New York: Springer, 2007. 531 s. ISBN 978-0-387-48864-6.
- [6] VRÁNA, M.; UŤAMYŠEV R. I. a kol. *Elektronické přístroje pro stimulaci orgánů a tkání*. První vydání, Praha: SNTL, 1984. 320 s. Typové číslo L26-B3-IV-31/52420.
- [7] PODĚBRADSKÝ, J.; VAŘEKA, I. *Fyzikální terapie I*. První vydání, Praha: Grada Publishing, 1998. 264 s. ISBN 80-7169-661-7.
- [8] PODĚBRADSKÝ, J.; VAŘEKA, I. *Fyzikální terapie II*. První vydání, Praha: Grada Publishing, 1998. 176 s. ISBN 80-7169-661-7.
- [9] CAPKO, J. *Základy fyziatrické léčby*. První vydání, Praha: Grada Publishing, 1998. 396 s. ISBN 80-7169-341-3.
- [10] WAUGAMAN, W. A.; SCHRADER, CH. B. Optimal current model from surface electrodes. *Proceedings of the 33rd Conference on Decision and Control*, 1994, p. 4112 – 4113.
- [11] WAUGAMAN, W. A.; SCHRADER, CH. B. A two dimensional electrode current density model for subthreshold electrical stimulation. *Systems, Man, and Cybernetics*, 1994, vol. 3, p. 2294 – 2299.
- [12] ROGERS, W. R. et al. Strength-Duration curve for an electrically excitable tissue extended down to near 1 nanosecond. *IEEE Transactions on plasma science*, 2004, vol. 32, no. 4, p. 1587 – 1599.
- [13] SCHOENBACH, K. H. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proceedings of the IEEE*, 2004, vol. 92, no. 7, p. 1122 – 1137.
- [14] SABAH, N. Rectification in biological membranes. *IEEE Engineering in medicine and biology*, 2000, p. 106 – 113.
- [15] RANCK, J. B. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: A review. *Brain Research*, 1975, vol. 98, p. 417 – 440.
- [16] JOSHI, R. P.; HU, Q. Case of applying subnanosecond high-intensity, electrical pulses to biological cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2011, vol. 58, no. 10, p. 2860 – 2866.
- [17] ALTUNC, S. Subnanosecond pulsed-power generated electric fields for cancer treatment. *Nuclear & Plasma Sciences Society*, 2009, p. 34 – 38.
- [18] SCHOENBACH, K. H. et al. The effect of intense subnanosecond electrical pulses on biological cells. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2008, vol. 36, no. 2, p. 414 – 422.
- [19] SCHOENBACH, K. H. et al. Bioelectric effects of intense nanosecond pulses. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 2007, vol. 14, no. 5, p. 1088 – 1109.

- [20] MERCOLA, J. M.; KIRSCH, D. L. The basis for microcurrent electrical therapy in conventional medical practice. *Journal of Advancement in Medicine*, 1995, vol. 8, no. 2, p. 107 – 120.
- [21] STEGATH, K. et al. An extremum seeking method for non-isometric neuromuscular electrical stimulation. *Systems, Man and Cybernetics*, 2007, p. 2528 – 2532.
- [22] XU, Q. et al. A programmable multi-channel stimulator for array electrodes in transcutaneous electrical stimulation. *Complex Medical Engineering*, 2011, p. 652 – 656.
- [23] FANG, Z. P.; MORTIMER, J. T. Selective activation of small motor axons by quasitrapezoidal current pulses. *IEEE Transactions on Rehabilitation Engineering*, 1991, vol. 38, p. 168 – 172.
- [24] TANNENBAUM, J. Apparatus and method for controlling pain by transcutaneous electrical stimulation. *United States Patent 4233986*, 1980.
- [25] GONDIN, J. et al. Is high-frequency neuromuscular electrical stimulation a suitable tool for muscle performance improvement in both healthy humans and athletes? *European Journal of Applied Physiology*, 2011, p. 2473 – 2487.
- [26] LAUFER, Y.; ELBOIM, M. Effect of burst frequency and duration of kilohertz-frequency alternating currents and of low-frequency pulsed currents on strength of contraction, muscle fatigue, and perceived discomfort. *Physical Therapy*, 2008, vol. 88, p. 1167 – 1176.
- [27] LIN, Y.; VAN WEEREN P. R. et al. Effect of microcurrent electrical tissue stimulation on equine tenocytes in culture. *American Journal of Veterinary Research*, 2006, vol. 67, no. 2, p. 271 – 276.
- [28] MURRELL, G. A. et al. Modulation of tendon healing by nitric oxide. *Inflammation Research*, 1997, vol. 46, p. 19 – 27.
- [29] ZHUANG, H. et al. Electrical stimulation induces the level of TGF- β 1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, vol. 237, p. 225 – 229.
- [30] AARON, R. K.; CIOMBOR, D. M. Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. *Journal of Orthopaedic Research*, 1996, vol. 14, p. 582 – 589.
- [31] DE GASPI F. O. et al. Effects of the topical application of hydroalcoholic leaf extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (*Orchidaceae*) and Microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, vol. 2011, art. ID 950347, 9 p.
- [32] LEE, J. et al. The effects of microcurrents on inflammatory reaction induced by ultraviolet irradiation. *Journal of Physical Therapy Science*, 2011, vol. 23, no. 4, p. 693 – 696.
- [33] GOSSRAU, G. et al. Microcurrent transcutaneous electric nerve stimulation in painful diabetic neuropathy: A randomized placebo-controlled study. *Pain Medicine*, 2011, vol. 12, p. 953 – 960.
- [34] PARK, R. et al. The effect of wearing shoes generating micro-currents on body composition and blood lipid concentrations of overweight females. *Journal of Physical Therapy Science*, 2011, vol. 23, no. 2, p. 177 – 180.
- [35] LIN, Y.; VAN WEEREN, P. R. et al. The influence of electrode placement on effective field strength in the equine superficial digital flexor tendon: a preliminary study for the evaluation of micro-current as a potential therapy for tendon healing in the horse. *American Journal of Veterinary Research*, 2005, p. 55 – 66.
- [36] VAN WEEREN, P. R. Life is movement: Physical therapy as a necessary tool in equine rehabilitation. *Proceedings of Voorjaarsdagen*, 2007, p. 253 – 255.

- [37] LEE, B. Y. et al. Ultra-low microcurrent in the management of diabetes mellitus, hypertension and chronic wounds: Report of twelve cases and discussion of mechanism of action. *International Journal of Medical Sciences*, 2010, vol. 7, no. 1, p. 29 – 35.
- [38] KARNES, J. et al. High-voltage pulsed current: Its influence on diameters of histamine-dilated arterioles in hamster cheek pouches. *Archives of physical and rehabilitation*, 1995, vol. 76, no. 4, p. 381 – 386.
- [39] KLOTH, L.C.; FEEDAR, J. A. Acceleration of Wound Healing with High Voltage, Monophasic, Pulsed Current. *Physical Therapy*, 1988, vol. 68, no. 4, p. 503 – 508.
- [40] FRANEK, A.; POLAK, A.; KUCHARZEWSKI, M. Modern application of high voltage stimulation for enhanced healing of venous crural ulceration. *Medical Engineering & Physics*, 2000, vol. 22, no. 9, p. 647 – 655.
- [41] BURDGE, J. J.; HARTMAN, J. F.; WRIGHT, M. L. A retrospective study of highvoltage, pulsed current as an adjunctive therapy in limb salvage for chronic diabetic wounds of the lower extremity. *Ostomy Wound Manage*, August 2009, vol. 55, no. 8, p. 30-38.
- [42] GILDEMEISTER, M. Zur theorie des elektrischen Reizes. V. Polarisation durch Wechselströme. Berichte über die Verhandlungen der Sächsischen Akademie der Wissenschaften zu Leipzig. *Mathematisch–Physische Klasse*, 1930, vol. 81, p. 303–313.
- [43] WARD, A. R.; ROBERTSON, V. J.; IOANNOU, H. The effect of duty cycle and frequency on muscle torque production using kilohertz frequency range alternating current. *Medical Engineering & Physics*, 2004, vol. 26, p. 569 – 579.
- [44] SZECSI, J. et al. Low-frequency rectangular pulse is superior to middle frequency alternating current stimulation in cycling of people with spinal cord injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2007, vol. 88, p. 338 – 345.
- [45] McLODA, T. A.; CARMACK, J. A. Optimal burst duration during a facilitated quadriceps femoris contraction. *Journal of Athletic Training*, 2000, vol. 35, no. 2, p. 145 – 150.
- [46] KESAR, T.; CHOU, L.; BINDER-MACLEOD, S. A. Effects of stimulation frequency versus pulse duration modulation on muscle fatigue. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, 2008, vol. 18, no. 4, p. 662 – 671.
- [47] RIENER, R.; DORGAN, S. J.; SCHMIDT, G. Nonlinear summation in muscles of normal subjects and paraplegic patients: Measurements and simulation. *18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Amsterdam 1996.
- [48] KACZMAREK, P. et al. Investigation of the relationship between stimulus parameters and a human muscle contraction force during stimulation of the gastrocnemius muscle. *Artificial Organs*, 2009, vol. 34, no. 2, p. 126 – 135.
- [49] KARU, Z. Z.; DURFEE, W. K.; BARZILAI, A. M. Reducing muscle fatigue in FES applications by stimulating with N-let pulse trains. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 1995, vol. 42, no. 8, p. 809 – 817.
- [50] POWELL, J. H et al. Parameter selection and electrode placement of neuromuscular electrical stimulation apparatus. *United States Patent 5358513*, 1994.
- [51] SALAMA, G.; KANAI, A.; EFIMOV, I. R. Subthreshold stimulation of Purkinje fibers interrupts ventricular tachycardia in intact hearts. Experimental study with voltage-sensitive dyes and imaging techniques. *Circulation Research*, 1994, vol. 74, p. 604 – 619.
- [52] SOOKSOOD, K.; STIEGLITZ, T.; ORTMANN, M. An active approach for charge balancing in functional electrical stimulation. *IEEE Transactions on biomedical circuits and systems*, 2010, vol. 4, no. 3, p. 162 – 170.

- [53] PAKHOMOV, A. G. et al. Characterization of the cytotoxic effect of high-intensity, 10-ns duration electrical pulses. *IEEE Transactions on plasma science*, 2004, vol. 32, no. 4, p. 1579 – 1586.
- [54] XUFEL, Modeling the effect of electric pulse on cells and experimental research. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 2008, p. 880 – 883.
- [55] NOSAKA, K. et al. Muscle damage induced by electrical stimulation. *European Journal of Applied Physiology*, 2011, vol. 111, p. 2427 – 2437.
- [56] MACKEY, A. L. et al. Sequenced response of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle. *The FASEB Journal*, 2011, vol. 25, no. 6, p. 1943 – 1959.
- [57] GUARASCIO, P.; LUSI, E. A.; SOCCORSI, F. Electronic muscular stimulator: a novel unsuspected cause of rhabdomyolysis. *British Journal of Sports Medicine*, 2004, vol. 38, p. 505 – 507.
- [58] ČSN EN 60601-1, ed. 2:2007 (36 4801) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 1: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost
- [59] ČSN EN 60601-2-10:2001 (36 4800) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 2-10: Zvláštní požadavky na bezpečnost nervových a svalových stimulátorů
- [60] ČSN EN 60601-1-11:2011 (36 4801) Zdravotnické elektrické přístroje – Část 1-11: Všeobecné požadavky na základní bezpečnost a nezbytnou funkčnost – Skupinová norma: Požadavky na zdravotnické elektrické přístroje a zdravotnické elektrické systémy používané v prostředí domácí zdravotní péče
- [61] KÁBRT, J. *Lexicon medicum*. První vydání, Praha: Avicenum, 1988. 736 s. ISBN 08-063-88.
- [62] TOBOLOVÁ, M. *Mikroimpulzní stimulace a její léčebné využití ve fyziotrické léčbě: bakalářská práce*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, 2010. 50 s., 2 příl.
- [63] GP ReCyko+ New Generation Rechargeable Battery [online]. 2012 [cit. 2012-02-24]. Dostupné z WWW: <<http://www.gprecyko.com/en/pdf/recyko.pdf>>.
- [64] Data sheet DC/DC měniče LT1111, Linear Technology. Dostupné z WWW: <<http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/lineartechnology/1111fd.pdf>>.
- [65] Data sheet Schottkyho diody 1N5818, General Semiconductor. Dostupné z WWW: <http://www.datasheetcatalog.com/datasheets_pdf/1/N/5/8/1N5818.shtml>
- [66] Data sheet LED diody HLMP 1700-1790, QT Optoelectronics. Dostupné z WWW: <<http://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/view/35237/QT/HLMP-1790.html>>.
- [67] Data sheet PNP tranzistoru BC556, Philips. Dostupné z WWW: <http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/philips/BC556_557_3.pdf>.
- [68] Data sheet CMOSového časovače TS555, ST Microelectronics. Dostupné z WWW: <http://www.datasheetcatalog.org/datasheets/90/307373_DS.pdf>.
- [69] Data sheet diody FDLL4148, Fairchild semiconductor. Dostupné z WWW: <<http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/fairchild/FDLL4148.pdf>>.
- [70] Data sheet tranzistoru BD433, ST Microelectronics. Dostupné z WWW: <<http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/stmicroelectronics/4127.pdf>>.
- [71] Data sheet diody BY299, Semtech electronics. Dostupné z WWW: <http://www.datasheetcatalog.org/datasheets/90/118724_DS.pdf>.
- [72] Data sheet diody STTH112/A/U, ST Microelectronics. Dostupné z WWW: <<http://www.datasheetcatalog.org/datasheet/stmicroelectronics/9343.pdf>>.

- [73] Katalog Ferroxcube: Soft Ferrites and Accessories. Dostupné z WWW: <<http://www.ferroxcube.com/appl/info/HB2009.pdf>>.
- [74] FAKTOR, Z. *Transformátory a tlumivky pro spínané napájecí zdroje*. Praha: BEN – technická literatura, 2002. 240 s. ISBN 80-86056-91-0.
- [75] ŘEZNÍČEK, Z.; SZENDIUCH, I.; ŘEZNÍČEK, M. *Termodynamická sensorika - Nový pohled na monitorování termodynamických systémů*. Brno: NOVAPRESS s. r. o., 2007, 22 s.
- [76] ŘEZNÍČEK, Z. et al. Thick Film Sensor for Temperature Balanced Process Monitoring. *In Proceedings IMAPS 2007*. San Jose: IMAPS USA, 2007. p. 250 – 255. ISBN: 0-930815-82-3.
- [77] TVAROŽEK, V., VAVRINSKÝ, E., ŘEZNÍČEK, Z. Novel approach in ratiometric technique of sensing. *Journal of Electrical Engineering*, 2007, vol. 58, no. 2, p. 98-103.
- [78] ŘEZNÍČEK, Z. et al. Thick film double thermodynamic sensor system. *In ESTC 2008 2nd Electronics System-Integration Technology Conference 1st-4th September 2008, Greenwich, London, UK*. Anglie: 2008. p. 1301 – 1304. ISBN 987-1-4244-2813-7.
- [79] ŘEZNÍČEK, M. *Optimalizovaný termodynamický senzor na bilančním principu: diplomová práce*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, 2008. 67 s.
- [80] HENDRICKS, B. L.; DENT, A. A. *International Encyclopedia of Horse Breeds*. Norman: University of Oklahoma Press, 2007. 486 s. ISBN 978-0-8061-3884-8.
- [81] ŠTRUPL, J. *Chov koní*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1983. 416 s. ISBN 07-044-83-04.
- [82] STASHAK, T. S.; WISSDORF, H. *Adams' Lahmheit bei Pferden*. Čtvrté vydání, Schlütersche, 2007. 910 s. ISBN 978-3-7944-0219-9.
- [83] BAŠTINEC, J. *Pravděpodobnost, statistika, operační výzkum*. In 5th Didactic Conference in Žilina with international participation, CD-ROM. Žilina, FPV ŽU. 2008. ISBN 978-80-8070-862-7.
- [84] HENDL, J. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a metaanalýza dat*. Druhé opravené vydání, Praha: Portál, 2006. 583 s. ISBN 80-7367-123-9.
- [85] TOMÁŠ, J.; ZAPLETAL, J. *Úvod do analýzy časových řad: elektronická skripta UMEL VUT Brno*. Brno 2003. Dostupné z WWW: <http://www.umel.feec.vutbr.cz/VIT/images/pdf/studijni_materialy/bc/Casove_rady_S.pdf>.
- [86] HARUŠTIAKOVÁ, D.; JARKOVSKÝ, J.; LITTNEROVÁ, S.; DUŠEK, L. *Vícerozměrné statistické metody v biologii*. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2012. 111 s. ISBN 978-80-7204-791-8.
- [87] VLACHOS, M. et al. Indexing multi-dimensional time-series with support for multiple distance measures. *In Proceeding of 9th SIGKDD, 2003*, Washington, DC, p. 216 - 225.
- [88] PUŠKÁR, P. *Podobnostní vyhledávání v časových řadách: diplomová práce*. Brno: Fakulta informatiky, Masarykova univerzita, 2010. 64 s.
- [89] JONES, N. C.; PEVZNER, P. A. *An Introduction to Bioinformatics Algorithms*. Cambridge: MIT Press, 2004. 435 s. ISBN 0-262-10106-8.
- [90] MELOUN, M.; MILITKÝ, J.; HILL, M. *Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech*. Praha: Academia, 2005. 449 s. ISBN 80-200-1335-0.
- [91] MOHR, T.; AKERS, T. K.; WESSMAN, H. C. Effect of high voltage stimulation on blood flow in the rat hind limb. *Physical Therapy*, 1987, vol. 67, no. 4, p. 526 – 533.
- [92] KAŇKOVÁ, K. et al. *Patologická fyziologie pro bakalářské studijní programy*. Brno: Vydavatelství MU, 2007. 165 s. ISBN 978-80-210-3112-8.

Přílohy

PŘÍLOHA A SCHÉMA ZAPOJENÍ

PŘÍLOHA B PRŮVODNÍ DOKUMENTACE A NÁVOD K OBSLUZE MIKROIMPULZNÍHO STIMULÁTORU MST-11

PŘÍLOHA C RIZIKOVÁ ANALÝZA

PŘÍLOHA D TITULNÍ LIST PROTOKOLU Č. 3670/11 O ZKOUŠCE ELEKTROMAGNETICKÉ SLUČITELNOSTI MIKROIMPULSNÍHO STIMULÁTORU MST-11

PŘÍLOHA E TITULNÍ LIST PROTOKOLU Č. 3343/11 O ZKOUŠCE ELEKTRICKÉ BEZPEČNOSTI MIKROIMPULSNÍHO STIMULÁTORU MST-11

PŘÍLOHA F VYJÁDŘENÍ ETICKÉ KOMISE K PROJEKTU POKUSU 62/2011

PŘÍLOHA G FORMULÁŘ INFORMOVANÉHO SOUHLASU K PROJEKTU 62/2011

PŘÍLOHA H KORELAČNÍ ANALÝZA

PŘÍLOHA I VYJÁDŘENÍ ETICKÉ KOMISE K PROJEKTU POKUSU 61/2011

PŘÍLOHA J FORMULÁŘ INFORMOVANÉHO SOUHLASU K PROJEKTU POKUSU 61/2011

PŘÍLOHA K OBRAZOVÁ DOKUMENTACE PROJEKTU 61/2011

PŘÍLOHA L VYJÁDŘENÍ VETERINÁRNÍHO LÉKAŘE K VÝSLEDKŮM PROJEKTU 61/2011

PŘÍLOHA M ALGORITMUS LONGEST COMMON SUBSEQUENCES (LCSS) ZDROJOVÝ KÓD PRO MATLAB

PŘÍLOHA N CD MÉDIUM

Příloha B Průvodní dokumentace a návod k obsluze mikroimpulzního stimulátoru MST-11

PRŮVODNÍ DOKUMENTACE A NÁVOD K OBSLUZE

MIKROIMPULZNÍ STIMULÁTOR

MST-11



Vyrobena v rámci Diplomové práce Bc. Marie Tobolové
na Ústavu biomedicínského inženýrství VUT Brno a s podporou HIT s. r. o., Nedachlebice

Důležité informace

Před prvním použitím přístroje si pečlivě přečtěte tuto průvodní dokumentaci.

Uživatelé, kteří vykazují některou z následujících vlastností, by měli použití mikroimpulzního stimulatoru konzultovat se svým ošetřujícím lékařem:

- a) jsou aktuálně v procesu léčby pod lékařským dohledem,
- b) srdeční choroby,
- c) těhotenství,
- d) epilepsie,
- e) implantovaný kardiostimulátor,
- f) implantovaný defibrilátor.

Varování

Přístroj by neměly používat děti a nesvéprávné osoby, je potřeba zajistit zodpovědný dozor.

Pokud u Vás používání přístroje vyvolává nepříjemné pocity, okamžitě přestaňte přístroj používat a potíže konzultujte s ošetřujícím lékařem.

Nepřikládejte elektrody do úst a na krk v oblasti velkých tepen.

Nepřikládejte elektrody na jakékoliv vodivé kovové předměty jako jsou náušnice a náhrdelníky.

Pokud přístroj nepoužíváte, vždy jej vypněte.

Přístroj nepoužívejte v místech s vysokou vlhkostí nebo při koupání.

Přístroj nepoužívejte současně s jiným elektrickým terapeutickým zařízením.

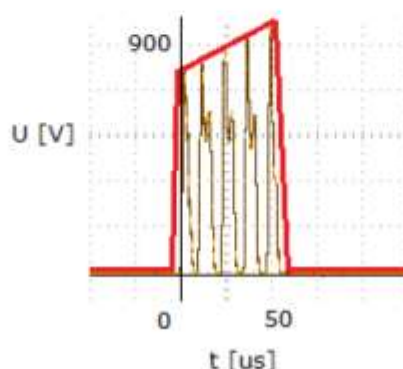
Při zjištění jakékoliv závady na přístroji, kontaktujte výrobce.

Pro nabíjení vnitřního zdroje používejte pouze nabíječku dodanou s přístrojem.

1 Mikroimpulzní stimulace

Elektroterapie je jednou z progresivních metod fyziatrie. Léčebný nástroj zde představuje elektrická energie, jež je do těla pacienta dopravována pomocí elektrod z terapeutických elektrických přístrojů. Elektrický proud je obecně považován za nebezpečný nástroj a přímý kontakt s ním doprovází řada obav. Mikroimpulzní stimulace však používá intenzitu proudu, frekvenci a šířku impulsu v takovém poměru, že žádné riziko nehrozí, vyjma těch, způsobených nesprávnou obsluhou přístroje či nepozorností (viz odstavce Důležité informace a Varování této dokumentace).

Mikroimpulzní stimulátor generuje více, velmi krátkých impulsů, jejichž kumulací vzniká výsledný úzký napěťový hrot. Tvar impulsu je naznačen na následujícím obrázku jako průběh napětí U ve voltech vzhledem k časové ose t v mikrosekundách:



Obrázek 1: Tvar impulsu

Hlavní výhodou úzkého profilu impulsu je snadnější průnik do těla pacienta, k čemuž přispívá také poměrně vysoká hodnota napětí. Toto napětí je tedy potřeba vhodně kompenzovat ostatními parametry tak, aby bylo zajištěno bezpečné použití přístroje:

- Velmi krátké trvání impulsů, řádově desítky mikrosekund, a nízká opakovací frekvence zamezují dodání větší zátěže, než by mohlo být únosné.
- Bateriové napájení přístroje je prevencí úrazů síťovým proudem. Zároveň je při nabíjení vnitřního zdroje zajištěno vyřazení přístroje z provozu.
- Malé soustředné elektrody přesně vymezují oblast působení elektrostimulátoru, tj. aplikace impulsů. Snižuje se tak riziko průchodu elektrického proudu nežádoucími oblastmi lidského těla.

Šířka impulsů a jejich frekvence opakování jsou hlavními parametry, které lze obsluhou či uživatelem nastavit pomocí příslušných knoflíků pro individuální potřeby.

Terapeutický efekt nízké frekvence impulsů spočívá v buzení svalové aktivity, která podpoří žilní návrat krve a lymfatický systém v místě zranění. Zvýšení krevního a lymfatického toku vede ke snížení bolestivosti díky rychlejšímu odplavení toxinů a chemikálií, které bolest v místě zranění způsobují. Lymfatický systém pak může pracovat mnohem efektivněji a výrazně se podíli na redukci otoku a stimulaci procesu hojení.

2 Popis a technické parametry

2.1 Klasifikace stimulatoru

Přístroj MST-11 je zařazen do třídy lékařských zařízení s vlastním zdrojem energie.

Z hlediska stupně ochrany před úrazem elektrickým proudem jsou elektrody zařízení MST-11 klasifikovány jako příložná část typu CF.

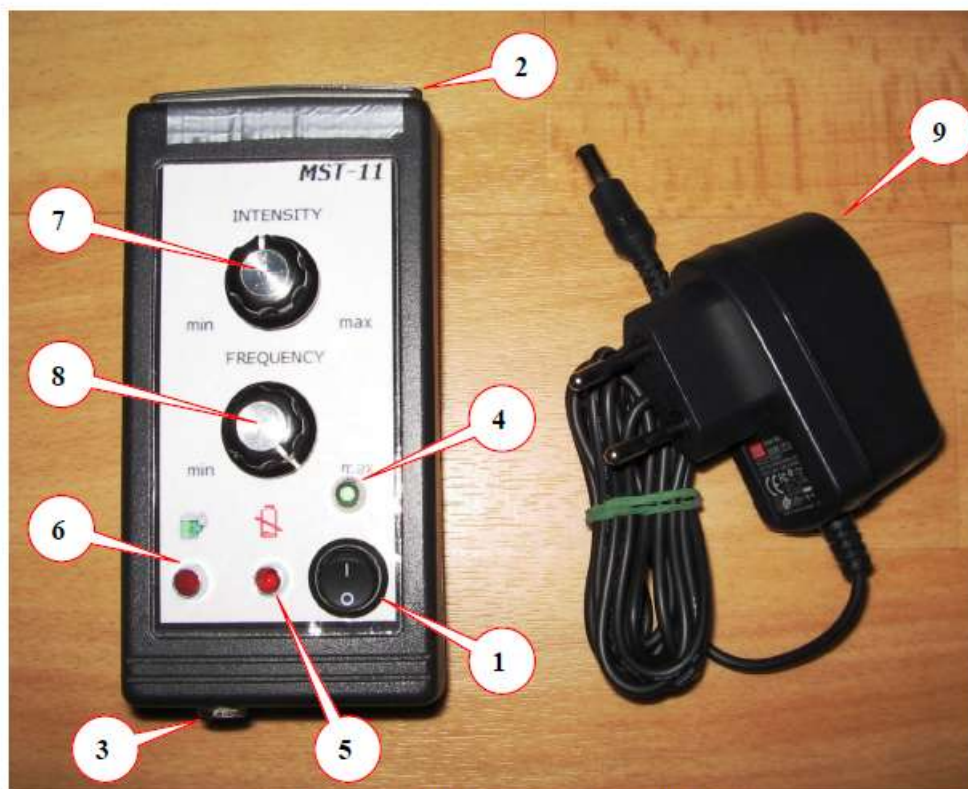
2.2 Technické parametry

Název	Mikroimpulzní stimulátor
Model	MST-11
Rozměry	130 x 68 x 37 mm (délka / šířka / výška)
Hmotnost	220 g
Napájení	DC 2,4 V (2 x NiMh AAA GP ReCyko 1,2 V)
Nabíjení	DC 5 V (napáječ Mean Well GPSU06E-1)
Výstupní frekvence	0,5 – 3 Hz
Šířka impulsů	10 – 50 μ s
Výstupní napětí	Max. 1000 V v nezatíženém stavu
Typ elektrod	nerez ocel, soustředné 6 x 2,5 cm
Životnost elektrod	Bez omezení
Životnost baterií	Podle výrobce až 1000 nabíjecích cyklů

Vlastnosti napáječe Mean Well GPSU06E-1:

- síťové napětí 230 V +-10%
- výstupní napětí 5 V naprázdno
- výstupní proud 1 A
- odebíraný proud max. 0,2 A
- hmotnost 120 g

2.3 Popis přístroje a jeho součástí



Obrázek 2: Přístroj s příslušenstvím

- (1) Spínač I/O (1 – zapnuto, 0 – vypnuto)
- (2) Elektrody
- (3) Vstup pro napáječ
- (4) Signalizace zapnutí přístroje
- (5) Signalizace nízkého napětí baterie
- (6) Signalizace nabíjení baterie
- (7) Otočné tlačítko „INTENSITY“ pro nastavení intenzity impulsů
- (8) Otočné tlačítko „FREQUENCY“ pro nastavení frekvence impulsů
- (9) Napáječ Mean Well GPSU06E-1



Obrázek 3: Pohled na přístroj zespodu

2.4 Likvidace přístroje

Tento přístroj, jeho části a baterie nemohou být likvidovány běžným způsobem jako domácí odpad. Likvidace se musí řídit místními nařízeními pro likvidaci podobných zařízení.

3 Obsluha přístroje

3.1 Použití elektrod

Oblasti kůže, kde budou přikládány elektrody, je vhodné otřít navlhčenou žínkou pro odstranění nečistot a kožního mazu.

Přikládejte vždy jen čisté elektrody. Lze je očistit tamponem navlhčeným vodou či dezinfekčním přípravkem. Pozor na vnik kapaliny do přístroje! Elektrody je potřeba očistit po každém použití.

3.2 Doporučený postup aplikace

Přístroj uvádíme do provozu sepnutím knoflíku I/O do polohy I. Zapnutí přístroje je signalizováno rozsvícením zelené led diody umístěné nad vypínačem. Parametry stimulace se nastavují přístrojovými otočnými knoflíky INTENSITY a FREQUENCY. Před zapnutím přístroje se ujistíme, zda jsou nastaveny na nejnižších možných hodnotách, tj. poloha MIN. Protože citlivost a reakce jsou u každého pacienta odlišné, je nutné k nastavení terapie přistupovat rovněž individuálně.

Doba trvání aplikace není konstantní, mění se podle diagnózy a citlivosti pacienta. Zpravidla se začíná delšími intervaly cca 30 minut a v závislosti na průběhu léčby se podle potřeby postupně snižují. Během terapie se poloha elektrod přibližně po každých 2 minutách mění, přičemž se umístění elektrod na stejné (nebo velmi blízké) místo může opakovat.



Obrázek 4: Příklad aplikace

3.3 Nastavení stimulace

Intenzita

Intenzita odpovídá zvolené šířce impulsu, kterou knoflíkem INTENSITY ve skutečnosti nastavujeme. Čím širší impuls zvolíme, tím intenzivnější pocit se při terapii dostaví. Intenzitu zvyšujeme otáčením po směru hodinových ručiček od polohy MIN do MAX. Počáteční intenzitu je potřeba nastavit tak, aby pacientovi nezpůsobovala nepříjemné pocity. Je vhodné, aby si pacient intenzitu zvolil sám.

Frekvence

Opakovací frekvenci impulsů lze nastavit pomocí otočného knoflíku FREQUENCY. Frekvence je nastavitelná v rozsahu 0,5 Hz až 3 Hz, a to po směru hodinových ručiček od polohy MIN k MAX.

3.4 Kontraindikace

Především pacienti s implantovaným kardiostimulátorem, defibrilátorem, epileptici a těhotné ženy by se měli používání stimulatoru vyvarovat.

Elektrody se nesmí přikládat těsně za ucho a na krk v oblasti velkých tepen, protože přiložení elektrod v těchto místech může vyvolat prudké snížení tlaku a způsobit pacientovi nevolnost.


3.5 Čištění a dezinfekce


Povrch přístroje se čistí vlhkým hadříkem. V případě většího znečištění je možné použít roztoku se saponátem. Zásadně se vyvarujte použití jakéhokoliv rozpouštědla!

Části, které přicházejí do styku s pokožkou, tj. elektrody, se dezinfikují vhodnými dezinfekčními prostředky. Elektrody je potřeba očistit po každém použití alespoň navlhčeným hadříkem.


Pozor na vnik kapaliny do přístroje!

3.6 Baterie

Mikroimpulzní stimulátor je bateriově napájený. Nízký stav baterie indikuje červená kontrolka označená symbolem . V takovém případě je potřeba přístroj okamžitě připojit k síti pomocí přiloženého napáječe nejméně na 10 hodin. Je doporučeno přístroj nabíjet přes noc.

Baterie může být dobita pouze pomocí napáječe dodaného spolu s přístrojem. V průběhu nabíjení svítí červená kontrolka označená symbolem . Při nabíjení je přístroj automaticky vyřazen z provozu z důvodu prevence úrazu síťovým proudem.

Mikroimpulzní stimulátor MST-11 byl vyroben v rámci Diplomové práce
Bc. Marie Tobolové
na Ústavu biomedicínského inženýrství VUT Brno
a s podporou firmy HIT s. r. o., Nedachlebice
Brno 2011

Kontakt na výrobce:
Marie Tobolová
Kostelany nad Moravou 242
686 01 Kostelany nad Moravou


RIZIKOVÁ ANALÝZA ZDRAVOTNICKÉHO PROSTŘEDKU

dle ČSN EN ISO 14971

Přístroj: **Mikroimpulzní stimulátor**

Typ: ***MST-11***

Firma: Ústav biomedicínského inženýrství
VUT Brno

Seznam členů týmu: Bc. Marie Tobolová
doc. Ing. Milan Chmelář, CSc.
Ing. Zdeněk Řezníček

Datum vydání: 31. 8. 2011

OBSAH:

1	Obecný popis zařízení dle přílohy C normy ČSN EN ISO 14971, kapitola C.2.1.....	3
2	Vyhodnocení bodů přílohy C normy ČSN EN ISO 14971.....	4
3	Specifikace možných nebezpečí a přiřazení relativního rizika.....	6
	C.2.3 R1.....	6
	C.2.4 R2.....	6
	C.2.5 R3.....	6
	C.2.8 R4.....	6
	C.2.9 R5.....	6
	C.2.14 R6.....	6
	C.2.15 R7.....	6
	C.2.16 R8.....	6
	C.2.17 R9.....	7
	C.2.18 R10.....	7
	C.2.20 R11.....	7
	C.2.25 R12.....	7
	C.2.31 R13.....	7

1 Obecný popis zařízení dle přílohy C normy ČSN EN ISO

Mikroimpulzní stimulátor MST-11 je zařízení pro elektroterapii. Generuje úzké, vysokonapěťové impulsy, které jsou s nízkou frekvencí vpravovány do těla pacienta pomocí přiložených nerezových elektrod. Impulsy je buzena svalová aktivita, podporující žilní návrat a lymfatický systém v místě zranění. Rychlejší odplavení toxinů vede ke zmírnění bolesti a stimulovaný lymfatický systém přispívá k redukcí otoku a podpoře procesu hojení.

MST-11 je vyroben jako malé, přenosné, bateriově napájené zařízení jak pro ambulantní účely, tak především pro domácí použití. Z hlediska klasifikace je zařazen do třídy zdravotnických zařízení s vlastním zdrojem energie a s elektrodami jako příložnou částí typu CF.

Pozn.: Přístroj je v dalším textu označován jako zdravotnický prostředek, zkratkou ZP.

2 Vyhodnocení bodů přílohy C normy ČSN EN ISO 14971

Bod č.	Typ nebezpečí	Specifikace ZP za normálních, nebo nevhodných podmínek
C.2.2	Je ZP určen k implantaci?	Není.
C.2.3	Je ZP určen ke styku s tělem pacienta nebo jiných osob?	Ano, dochází ke kontaktu s pokožkou pacienta pomocí povrchových elektrod.
C.2.4	Které materiály nebo složky jsou použity ve ZP nebo jsou s ním používány, nebo s ním přicházejí do styku?	Nerezové elektrody, plastový obal. Všechny materiály jsou běžně používány v podobných aplikacích a při správné manipulaci považovány za bezpečné. Nejsou použity materiály živočišného původu.
C.2.5	Je pacientovi dodávána nebo odebírána energie?	Ano, pacientovi je dodávána energie v podobě krátkých elektrických impulsů.
C.2.6	Jsou pacientovi podávány nebo odebírány nějaké látky?	Ne, pacientovi nejsou dodávány ani odebírány žádné látky.
C.2.7	Jsou ZP zpracovány biologické materiály k jejich následnému opakovanému použití, transfuzi nebo transplantaci?	Ne.
C.2.8	Je ZP dodáván sterilní, nebo je určen ke sterilizaci uživatelem, nebo jsou použitelné jiné mikrobiologické postupy?	ZP není dodáván jako sterilní. ZP je určen k opakovanému použití.
C.2.9	Je ZP určen k tomu, aby byl uživatelem běžně čištěn a dezinfikován?	Ano, ZP je čištěn a dezinfikován uživatelem dle návodu k obsluze.
C.2.10	Je ZP určen k tomu, aby měnil prostředí pacienta?	Ne.
C.2.11	Jsou prováděna měření?	Ne.
C.2.12	Poskytuje ZP vyhodnotitelné údaje?	Ne.
C.2.13	Je ZP určen k použití ve spojení s jinými ZP, léčivy nebo jinými lékařskými technikami?	Ne.
C.2.14	Dochází k nežádoucímu uvolňování energie nebo látek?	Ano, výstupní napětí může přesáhnout toleranční mez pacienta.
C.2.15	Je ZP citlivý na vlivy prostředí?	Ano, není vhodné ZP vystavovat extrémním teplotním a vlhkostním podmínkám a je třeba zabránit vniknutí kapaliny dovnitř přístroje.
C.2.16	Ovlivňuje ZP prostředí?	Může vzniknout elektromagnetické rušení.
C.2.17	Používají se společně se ZP významné spotřební materiály nebo příslušenství?	Ano, napáječ Mean Well GPSU06E-1 dodaný spolu se ZP.

C.2.18	Je nutná údržba nebo kalibrace?	Běžná údržba ZP uživatelem spočívá v čištění elektrod po každém použití.
C.2.19	Je součástí ZP programové vybavení?	Ne.
C.2.20	Má ZP omezenou dobu použitelnosti?	Doba použitelnosti je odvozena od životnosti baterií, které jsou vyměnitelné.
C.2.21	Existují nějaké oddálené účinky nebo účinky dlouhodobého použití?	Oddálené nežádoucí účinky nejsou známy.
C.2.22	Jakými mechanickými silami bude ZP namáhán?	ZP nebude namáhán žádnými mechanickými silami.
C.2.23	Co určuje životnost ZP?	Životnost ZP je určena použitým vnitřním bateriovým zdrojem (cca 1000 nabíjecích cyklů).
C.2.24	Je ZP určen na jedno použití?	Ne.
C.2.25	Je nutné bezpečné vyřazení ZP z provozu nebo jeho likvidace?	Ano, s vyřazeným ZP zacházet jako s elektrickým odpadem.
C.2.26	Vyžaduje instalace nebo použití ZP zvláštní školení nebo speciální dovednosti?	Ne, je vyžadováno pouze zacházení podle návodu k použití.
C.2.27	Jak budou poskytnuty informace o bezpečném použití?	Informace jsou zahrnuty v návodu k obsluze.
C.2.28	Bude nutno vytvořit nebo zavést nové výrobní postupy?	Ne.
C.2.29	Závisí úspěšné použití ZP rozhodujícím způsobem na lidských faktorech, jako je uživatelské rozhraní?	Ne.
C.2.30	Používá ZP poplachový systém?	Ne.
C.2.31	Jakým způsobem (jakými způsoby) by mohl být ZP záměrně chybně použit?	K chybnému použití ZP může dojít v důsledku nedodržení varování a kontraindikací uvedených v průvodní dokumentaci ke ZP.
C.2.32	Uchovává ZP údaje, které mají rozhodující význam pro péči o pacienta?	Ne.
C.2.33	Je ZP zamýšlen jako pojízdny nebo přenosný?	Ano, ZP je zamýšlen jako přenosný.

3 Specifikace možných nebezpečí a přiřazení relativního rizika

V následující tabulce jsou zachyceny možné nebezpečné situace spojené s použitím ZP. Každá situace je popsána relativním rizikem R_i , stanoveným jako nebezpečí s určitou úrovní závažnosti, které se může vyskytnout s danou pravděpodobností.

Nepřijatelné riziko 

Přijatelné riziko 

Kvalitativní úrovně závažnosti

Semikvantitativní úrovně pravděpodobnosti

	Zanedbatelná	Malá	Vážná	Kritická	Katastrofická
Velmi častá					
Pravděpodobná					
Občasná	R10	R6			
Velice malá	R4, R5, R8	R1, R3	R7		
Nepravděpodobná	R2, R12	R11	R9	R13	

C.2.3 R1

ZP je určen ke kontaktu s pokožkou pacienta pomocí povrchových elektrod.

C.2.4 R2

Všechny materiály, použité ve ZP, jsou běžně používány v podobných aplikacích a při správné manipulaci považovány za bezpečné. Nejsou použity materiály živočišného původu.

C.2.5 R3

Pacientovi je dodávána energie v podobě krátkých elektrických impulsů.

C.2.8 R4

ZP není dodáván jako sterilní a není pro sterilizaci přizpůsoben. ZP je určen k opakovanému použití a je pouze nutné jej dezinfikovat vhodnými prostředky.

C.2.9 R5

ZP je určen pro čištění a dezinfekci, které může provádět uživatel dle přiloženého návodu k obsluze.

C.2.14 R6

Výstupní napětí může přesáhnout toleranční mez pacienta.

C.2.15 R7

ZP je citlivý na vlivy prostředí – není vhodné jej vystavovat extrémním teplotním a vlhkostním podmínkám a je třeba zabránit vniknutí kapaliny dovnitř přístroje.

C.2.16 R8

ZP může ovlivnit prostředí v důsledku vzniku elektromagnetické rušení.

C.2.17 R9

Společně se ZP je dodáván napáječ Mean Well GPSU06E-1, který je určený výhradně pro napájení vnitřního bateriového zdroje ZP.

C.2.18 R10

Běžná údržba ZP uživatelem je potřebná a spočívá v čištění elektrod po každém použití podle návodu.

C.2.20 R11

Doba použitelnosti ZP se odvíjí od životnosti baterií, tj. udávaných 1000 nabíjecích cyklů. Dosluhující baterie je možné nechat vyměnit přímo u výrobce ZP.

C.2.25 R12

S vyřazeným ZP je nutné zacházet jako s elektrickým odpadem.

C.2.31 R13

K chybnému použití ZP může dojít v důsledku nedodržení varování a kontraindikací uvedených v průvodní dokumentaci ke ZP.

Příloha D Titulní list protokolu č. 3670/11 o zkoušce elektromagnetické slučitelnosti mikroimpulsního stimulátoru MST-11

	INSTITUT PRO TESTOVÁNÍ A CERTIFIKACI, a.s. zkušební laboratoř elektrických výrobků Sokolovská 573 686 01 Uherské Hradiště	 
---	---	--

ZKUŠEBNÍ LABORATOŘ č. 1004.3

akreditovaná Českým institutem pro akreditaci, o. p. s.

Číslo protokolu: 3670/11

Počet výtisků: 2

Číslo výtisku: 2

ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

**o zkoušce elektromagnetické slučitelnosti
mikroimpulsního stimulátoru MST-11**




.....

Měřicí technik a autor protokolu:

Ing. Josef Karas


.....

Vedoucí zkušební laboratoře:

Ing. Pavel Vávra

Datum vydání: 6. 10. 2011

Rozdělovník: Divize 4 Elektro
Marie Tobolová

výtisk č. 1

výtisk č. 2

Počet listů: 7

Počet příloh: 0

Příloha E Titulní list protokolu č. 3343/11 o zkoušce elektrické bezpečnosti mikroimpulsního stimulátoru MST-11

	INSTITUT PRO TESTOVÁNÍ A CERTIFIKACI, a.s. zkušební laboratoř elektrických výrobků Sokolovská 573 686 01 Uherské Hradiště	 
---	---	--

ZKUŠEBNÍ LABORATOŘ č. 1004.3

akreditovaná Českým institutem pro akreditaci, o. p. s.

Číslo protokolu: 3343/11

Počet výtisků: 2

Číslo výtisku: 2

ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

**o zkoušce elektrické bezpečnosti
mikroimpulsní stimulátor MST-11**


.....


Měřicí technik a autor protokolu:

Stanislav Malina


.....

Vedoucí zkušební laboratoře:

Ing. Pavel Vávra

Datum vydání: 8. 12. 2011

Rozdělovník: Institut pro testování a certifikaci, a.s.
Marie Tobolová

výtisk č. 1
výtisk č. 2

Počet listů: 42
Počet příloh: 3

Příloha F Vyjádření etické komise k projektu pokusu 62/2011

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
Palackého 1-3, 612 42 Brno, tel. 541562771

MVDr. Radovan Kabeš
vedoucí pokusu
VFU Brno
Palackého 1-3
612 42 Brno

V Brně dne 19. 9. 2011

Věc: Schválení projektu pokusu č. 62/2011

V souladu s § 18 odst. 6 písm. b) zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů Vás informuji, že Váš projekt pokusu byl schválen odbornou komisí na ochranu zvířat a byl odeslán na Ministerstvo školství.

V souladu s § 18 odst. 7 zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů Vás informuji o tom, že projekt pokusu byl schválen MŠMT a odborná komise Vám **uděluje povolení provádět tento pokus.**


Zahájení pokusu oznamte odesláním e-mailu na adresu chloupekp@vfu.cz, doubekj@vfu.cz a místně příslušné KVS (v Brně na adresu d.obratilova.kvsb@svscr.cz) nejpozději v den zahájení pokusu s uvedením následujících údajů:

Název pokusu:
Vedoucí pokusu:
Číslo projektu pokusu:
Datum zahájení pokusu:

Ukončení pokusu oznamte nejpozději 7 dnů po ukončení pokusu na adresu chloupekp@vfu.cz s uvedením následujících údajů:

Název pokusu:
Vedoucí pokusu:
Číslo projektu pokusu:
Datum ukončení pokusu:
Druh a počet použitých zvířat:

Neoznámení změny údajů v projektu pokusů týkající se změny vedoucího pokusu, změny druhu použitých zvířat, zákroku na zvířatech, manipulace se zvířaty a změny místa pokusu příslušnému státnímu orgánu se považuje za provádění pokusu bez povolení.


Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.
předseda odborné komise

Příloha: Projekt pokusu č. 62/2011

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
ODBORNA KOMISE NA OCHRANU ZVÍŘAT
Palackého 1/3 612 42 Brno

Č.: 62/2011

**ŽÁDOST O POVOLENÍ
POUŽITÍ ZVÍŘAT PRO PROJEKT POKUSŮ**

Žadatel: VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Název pokusu:

Sledování vlivu mikroimpulzní stimulace na prokrvení končetiny koně.

Druh a počet zvířat:

Druh	Předpokládaný počet	Skutečně použito
Kůň	12	

Vedoucí pokusu:

Radovan Kabeš, MVDr.; č.osv. V/2/2006/15

Vyplňujte jen bílé kolonky!

Žádost vyplňujte na počítači; kolonky se zvětší automaticky podle množství textu.

Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. b) zákona č. 246/1992 Sb.):

PROJEKT POKUSŮ č. 62-2011	
podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat	
1. Identifikace osoby provozující uživatelské zařízení:	
Žadatel - název právnické osoby nebo jméno a příjmení fyzické osoby, která zařízení provozuje	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
IČ	62157124
RČH	CZ 62760113
Adresa sídla nebo místa podnikání žadatele (včetně PSČ a okresu)	Palackého 1-3, 612 42 Brno
Statutární orgán žadatele - jméno, příjmení, titul	Vladimír Večerek, Prof. MVDr. CSc. MBA
2. Číslo rozhodnutí o udělení akreditace a doba jeho platnosti	45620/2008-17210 Platnost do 6.3.2014
3. Vedoucí pokusu - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.	Radovan Kabeš, MVDr.; č.osv. V/2/2006/15
Zástupce vedoucího pokusu (je-li ustanoven) - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.	Mária Patschová, MVDr.; č. osv. V/1/2007/12
4. Osoba odpovědná za péči o zvířata v uživatelském zařízení - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.	Jaroslav Doubek, prof. MVDr., CSc., č. osvědčení 0005/95 – M 186
5. Osoba, která řídí činnost odborné komise uživatelského zařízení - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.	Petr Chloupek, Doc. MVDr. Ph.D. č. osvědčení: 0014/96 – M14
6. Název úkolu studie, případně označení grantu	Sledování vlivu mikroimpulzní stimulace na prokrvení končetiny koně.
7. Charakteristika cílů studie s uvedením konkrétního očekávaného přínosu, včetně charakteristiky aplikovaných látek, nebo zařazení látek do indikačních skupin, s výjimkou výstupní kontroly šarží látek	Cílem je objektivně pomocí termodynamické metody zjistit, zda se mikroimpulzní stimulace významně podílí na změnách v prokrvení končetiny.
8. Podle § 15 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. bude pokus proveden za účelem (odpovídající zařazení označte křížkem (x) do prázdného políčka):	
a) odvrácení nebo prevence nemoci, zdravotních poruch a jiných anomálií nebo jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin, včetně výroby a zkoušení jakosti, účinnosti a neškodnosti léčiv, látek nebo výrobků	<input checked="" type="checkbox"/>
b) provádění diagnostiky nebo léčby onemocnění, zdravotních poruch nebo jiných anomálií a jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin	<input type="checkbox"/>
c) zjišťování, vyhodnocování, řízení nebo modifikace fyziologických stavů u člověka, zvířat nebo rostlin	<input type="checkbox"/>
d) ochrany životního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí anebo zvířat	<input type="checkbox"/>
e) provádění výuky, pokud účelu nelze dosáhnout jinak	<input type="checkbox"/>
f) zachování nebo rozmnožování živého materiálu pro vědecké účely	<input type="checkbox"/>
g) provádění vědeckého výzkumu	<input type="checkbox"/>
h) konání soudního řízení	<input type="checkbox"/>

62-2011

9.	<p>Metodické postupy práce se zvířaty</p> <p>V experimentu budou na obě přední končetiny koně umístěny dvě miniaturní termodynamické sondy, snímající velmi malé změny tepelné aktivity, resp. tepelný tok. Pouze na jednu končetinu (např. levou) bude po krátkou dobu (řádově jednotky minut) působeno mikroimpulzním stimulatorem, druhá končetina (např. pravá) je brána jako referenční ke stimulované. Signály z obou sone budou zpracovány, srovnány a statisticky vyhodnoceny.</p> <p>Termodynamická sonda je vyrobená firmou HIT, s. r. o. Jde o pasivní zařízení, které neinvazivně snímá tepelný tok uvnitř končetiny z povrchu kůže a je speciálně upraveno pro účely měření jak z hlediska bezpečnosti, tak citlivosti. Mikroimpulzní stimulator, který je vlastním předmětem zkoumání, je bateriově napájené zařízení malých rozměrů. Generuje impulsy dosahující v nezatiženém stavu 750 V. Vyšší napětí je kompenzováno vhodným nastavením šířky a frekvence impulsů, čímž je zamezeno dodání větší zátěže, než by bylo únosné. Impulsy mají velmi krátké trvání řádově desítky mikrosekund a opakovací frekvenci 1 – 3 Hz. Proudový obvod se uzavírá mezi soustřednými elektrodami, které přesně vymezují oblast aplikace impulsů a zabraňují průchodu elektrického proudu nežádoucími oblastmi. Samotné bateriové napájení přístroje neumožňuje vznik sekundárního obvodu (např. přes srdce) a je tedy prevencí úrazů síťovým proudem. Mikroimpulzní stimulator splňuje podmínky pro získání certifikátu bezpečnosti Institutu pro testování a certifikaci.</p> <p>Vzhledem k tomu, že v obou experimentech bude pracováno s koňmi soukromých majitelů, bude každé měření doloženo informovaným souhlasem majitele konkrétního koně.</p>
10.	<p>Prohlášení navrhovatele o průkazu nezbytnosti pokusu nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusu ukládá, včetně zdůvodnění, proč nelze pokus na zvířeti nahradit alternativními metodami</p> <p>Vzhledem k povaze experimentu není možná jeho realizace alternativním způsobem, tzn. počítačový model, tkáňové kultury apod.</p>
11.	<p>Zdůvodnění volby druhu, plemene, kmene a kategorie zvířat, jejichž využití je plánováno, s uvedením parametrů jejich kvality</p> <p>K experimentu budou použiti koně plemene český teplokrevník ve věku od 1 roku do 15 let obou pohlaví, přičemž nebudou používány gravidní klisny.</p>
12.	<p>Původ pokusných zvířat, s uvedením evidenčních údajů chovného a dodavatelského zařízení vč. RČH</p> <p>Teplokrevní koně v majetku: AGRI-M, Mistřice Omický dvorek, Omice Školní hospodářství, Staré Město u Uh. Hradiště JK Hrubšice, Ivančice – Hrubšice</p>
13.	<p>Zdůvodnění počtu zvířat, jejichž využití je plánováno, za stanovené časové období</p> <p>Pro experiment bude použito 12 koní, což je minimální počet vyhovující metodice statistického ověření hypotézy.</p>
14.	<p>Způsob značení zvířat v pokusu</p> <p>Zvířata zařazená do pokusu budou identifikována způsobem obvyklým v chovu koní tzn. popis exteriéru, výžety, RFID čip.</p>
15.	<p>Způsob znečitlivění, případně podání bolesti utišujících prostředků nebo opatření ke snížení bolesti</p> <p>Povaha experimentu nevyžaduje analgézi</p>
16.	<p>Umístění zvířat během pokusu nebo u volně žijících zvířat místo pokusu</p> <p>AGRI-M, Mistřice Omický dvorek, Omice Školní hospodářství, Staré Město u Uh. Hradiště JK Hrubšice, Ivančice – Hrubšice</p>
17.	<p>Časový plán jednotlivých fází pokusu na zvířatech, včetně data jeho ukončení</p> <p>Provedení experimentu je plánováno v období 1. 9. 2011 až 30. 5. 2012</p>
18.	<p>Úroveň operačního vybavení a způsob pooperační péče</p> <p>Experiment bude prováděn přímo v uvedených chovech a kromě specifické instrumentace popsané v bodě 9 nevyžaduje žádné další vybavení. Nepředpokládá se nutnost pooperační péče.</p>
19.	<p>Způsob naložení se zvířaty po ukončení pokusu</p> <p>Zvířata budou majiteli využívána obvyklým způsobem</p>
20.	<p>Způsob kontroly dodržování předpisů k ochraně zvířat</p> <p>Zahájení pokusu bude předem oznámeno KVS a odborné komisi uživatelského zařízení</p>
21.	<p>Uvedení zdravotního rizika pro další zvířata a pro zaměstnance</p> <p>Nepředpokládá se jiné riziko než běžné spojené s manipulací s velkými zvířaty.</p>
22.	<p>Veterinární podmínky pokusu stanovené podle zvláštních právních předpisů</p>
23.	<p>Zdůvodnění opakování zákroků na zvířatech (je-li s ním počítáno)</p>
24.	<p>Údaj o úrovni podmínek správné laboratorní praxe (je-li to požadováno zvláštními právními předpisy)</p>
25.	<p>Stanovisko orgánu ochrany přírody v případě pokusu na jedincích druhů volně žijících zvířat (možno uvést a citovat jako přílohu)</p>

26.	Uživatelské zařízení, které předkládá projekt pokusů k jednorázovým odběrům od hospodářských zvířat a zvířat v zájmových chovech pro získání biologického materiálu k výrobě sér, očkovacích látek, diagnostik a léků, jej rozšíří o písemnou smlouvu s vlastníkem zvířete, od kterého se v takovém případě nevyžaduje osvědčení pro chovné zařízení (smlouvu uvést jako přílohu):
	Provádí uživatelské zařízení takové jednorázové odběry? (nehodící se vymažte) NE
	Druh a množství materiálu určeného k odběru, doba jeho odběru, jeho metodika a způsob péče o zvíře po provedeném odběru, způsob seznámení majitele zvířete s těmito podmínkami a jejich kontrolou


62-2011

Projekt pokusů předkládá	MVDr. Radovan Kabeš
Telefon / Fax	00420 725 851 742
E-mail	kabesr@vfu.cz

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ
 Razítko UNIVERZITA BRNO
FAKULTA VETER. LÉKARSTVÍ
 klinika chorob koní
 612 42 Brno, Palackého 1/3 3

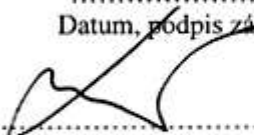
7.7.2011 





Datum, podpis vedoucího pokusu


7.7.2011 

Datum, podpis zástupce vedoucího pokusu


- 4 - 08 - 2011


Datum, podpis statutárního orgánu žadatele

<i>Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18b odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.):</i>		
STANOVISKO ODBORNÉ KOMISE UŽIVATELSKÉHO ZAŘÍZENÍ K PROJEKTU POKUSŮ č. 62/2011 Sledování vlivu mikroimpulzní stimulace na prokrvení končetiny koně.		
<p>Předložený projekt obsahuje po formální stránce náležitosti vyžadované příslušnými právními předpisy – zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů a vyhlášky č. 207/2004 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat. Po obsahové stránce projekt splňuje všechny podmínky předepisované právními předpisy pro provedení projektu pokusů, zejména stanovení odpovědných osob a splnění jejich odborné způsobilosti, stanovení názvu, cíle studie, péče o zvířata, metodických postupů práce se zvířaty, zdůvodnění nezbytnosti pokusu, způsob kontroly dodržování předpisů k ochraně zvířat.</p>		
Členové odborné komise		Datum
Jméno	Podpis	
Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph. D.		28. 7. 2011
Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.		28. 7. 2011
Doc. MVDr. Helena Modrá, Ph. D.		28. 7. 2011
MVDr. Lada Hofmannová Ph.D.		28. 7. 2011
Doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph. D.		28. 7. 2011

<i>Tuto tabulku vyplňuje příslušný státní orgán (§ 18b odst. 2, § 23 odst. 1 písm. a) zákona č. 246/1992 Sb.):</i>	
Nedílnou součástí tohoto projektu pokusů je povolení použití zvířat č.j. 25 056/2011-30	
Povolení bylo vydáno dne 25. 8. 2011	
Razítko a podpis příslušného státního orgánu	 Souhlas G. A. L. H.

<i>Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. c) zákona č. 246/1992 Sb.):</i>	
Schválení projektu pokusů oznámeno příslušnému orgánu veterinární správy dne	
Datum a podpis vedoucího pokusu	

<i>Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18 odst. 7 zákona č. 246/1992 Sb.):</i>	
Souhlas k zahájení pokusu udělen dne	19 -09- 2011
Datum a podpis člena odborné komise uživatelského zařízení	19 -09- 2011 

Příloha G Formulář informovaného souhlasu k projektu 62/2011

Informovaný souhlas majitele koně

Projekt pokusu č.

62/2011

Jméno koně, označení a plemeno:

Datum narození:

Majitel koně:

Kůň byl do studie zařazen pod číslem:

Odpovědný vedoucí pokusu:

MVDr. Radovan Kabeš

Osoba pověřená prováděním pokusu: Bc. Marie Tobolová

Název a popis studie:

V experimentu budou na obě přední končetiny koně umístěny dvě miniaturní termodynamické sondy, snímající velmi malé změny tepelné aktivity, resp. tepelný tok. Pouze na jednu končetinu (např. levou) bude po krátkou dobu (řádově jednotky minut) působeno mikroimpulzním stimulatorem, druhá končetina (např. pravá) je brána jako referenční ke stimulované. Signály z obou sond budou zpracovány, srovnány a statisticky vyhodnoceny.

Termodynamická sonda je vyrobená firmou HIT, s. r. o. Jde o pasivní zařízení, které neinvazivně snímá tepelný tok uvnitř končetiny z povrchu kůže a je speciálně upraveno pro účely měření jak z hlediska bezpečnosti, tak citlivosti.

Mikroimpulzní stimulator je bateriově napájené zařízení malých rozměrů. Generuje impulsy dosahující v nezatíženém stavu vyššího napětí, řádově stovek voltů. Bezpečnost použití tohoto napětí je kompenzována nastavením následujících parametrů.

1. Vhodná volba šířky a frekvence impulsů zamezuje dodání větší zátěže, než by mohlo být únosné.
2. Proudový obvod se uzavírá mezi soustřednými elektrodami, které přesně vymezují oblast aplikace a zabráňují průchodu elektrického proudu nežádoucími oblastmi.
3. Samotné bateriové napájení přístroje neumožňuje vznik sekundárního obvodu (např. přes srdce) a je tedy prevencí úrazů síťovým proudem.

Mikroimpulzní stimulator splňuje všechny požadavky na bezpečnost, zdravotní nezávadnost a ochranu životního prostředí podle normy ČSN EN 60601-1.

Prohlášení majitele koně:

Já, níže podepsaný(á), souhlasím s účastí mého koně v této klinické studii.

Byl(a) jsem podrobně informován(a) o cíli studie a jejích postupech. Pracovník, pověřený prováděním pokusu, mi vysvětlil případné problémy, které by se mohly vyskytnout během účasti mého koně ve studii a vysvětlil mi způsoby, jakými budou tyto problémy řešeny.

Při zařazení do studie budou moje osobní data a data o mém koni uchována s plnou ochranou důvěrnosti dle platných zákonů ČR. Do mé dokumentace budou moci na základě tohoto souhlasu nahlédnout za účelem ověření získaných údajů zástupci vedení pokusu, nezávislých etických komisí a místních nebo zahraničních kompetentních úřadů. Při vlastním provádění studie mohou být naměřená data poskytnuta jiným než výše uvedeným subjektům pouze bez identifikačních údajů, to je anonymní data pod číselným kódem. Rovněž pro výzkumné a vědecké účely mohou být data naměřená na mém koni poskytnuta pouze bez identifikačních údajů (anonymní data) nebo s mým výslovným souhlasem.

Porozuměl jsem tomu, že mé jméno se nebude vyskytovat v referátech o této studii. Naopak souhlasím s uveřejněním a použitím výsledku této studie.

Datum:

podpis majitele koně

podpis osoby pověřené touto studii

Příloha H Korelační analýza

Výpočet Spearmanova korelačního koeficientu pro referenční signály koní K01 a K02

čas [s]	vzorek	K01 ref	K02 ref	pořadí R _{K01}	pořadí R _{K02}	rozdíl D	D x D
0,00	1,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
0,20	2,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
0,40	3,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
0,60	4,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
0,80	5,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
1,00	6,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
1,20	7,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
1,40	8,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
1,60	9,00	12,00000	12,00000	351,00	597,00	-246,00	60516,00
1,80	10,00	12,00000	11,99989	351,00	592,00	-241,00	58081,00
2,00	11,00	12,00000	11,99232	351,00	591,00	-240,00	57600,00
2,20	12,00	12,00000	11,99000	351,00	588,50	-237,50	56406,25
2,40	13,00	12,00000	11,99000	351,00	588,50	-237,50	56406,25
2,60	14,00	12,00000	11,99000	351,00	588,50	-237,50	56406,25
2,80	15,00	12,00000	11,99000	351,00	588,50	-237,50	56406,25
3,00	16,00	12,00000	11,98067	351,00	586,00	-235,00	55225,00

.

.

.

117,00	586,00	12,17000	11,58000	588,50	104,50	484,00	234256,00
117,20	587,00	12,17000	11,58062	588,50	112,00	476,50	227052,25
117,40	588,00	12,17000	11,58852	588,50	114,00	474,50	225150,25
117,60	589,00	12,17000	11,59000	588,50	120,50	468,00	219024,00
117,80	590,00	12,17000	11,59000	588,50	120,50	468,00	219024,00
118,00	591,00	12,17000	11,59000	588,50	120,50	468,00	219024,00
118,20	592,00	12,17006	11,59000	592,00	120,50	471,50	222312,25
118,40	593,00	12,18510	11,61000	593,00	129,00	464,00	215296,00
118,60	594,00	12,19000	11,63000	597,50	134,00	463,50	214832,25
118,80	595,00	12,19000	11,63000	597,50	134,00	463,50	214832,25
119,00	596,00	12,19000	11,63000	597,50	134,00	463,50	214832,25
119,20	597,00	12,19000	11,63003	597,50	138,00	459,50	211140,25
119,40	598,00	12,19000	11,63784	597,50	140,00	457,50	209306,25
119,60	599,00	12,19000	11,64000	597,50	143,00	454,50	206570,25
119,80	600,00	12,19000	11,64000	597,50	143,00	454,50	206570,25
120,00	601,00	12,19000	11,64000	597,50	143,00	454,50	206570,25
SOUČET							48257093,50

Spearmanův korelační koeficient:

$$r_s(\text{ref}_{K01}, \text{ref}_{K02}) = 1 - \frac{6 \cdot \sum D_i^2}{n \cdot (n^2 - 1)} = 1 - \frac{6 \cdot 48257093,50}{601 \cdot (601^2 - 1)} = -0,33$$

Příloha I Vyjádření etické komise k projektu pokusu 61/2011

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO
Palackého 1-3, 612 42 Brno, tel. 541562771

MVDr. Radovan Kabeš
vedoucí pokusu
VFU Brno
Palackého 1-3
612 42 Brno

V Brně dne 19. 9. 2011

Věc: Schválení projektu pokusu č. 61/2011

V souladu s § 18 odst. 6 písm. b) zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů Vás informuji, že Váš projekt pokusu byl schválen odbornou komisí na ochranu zvířat a byl odeslán na Ministerstvo školství.

V souladu s § 18 odst. 7 zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů Vás informuji o tom, že projekt pokusu byl schválen MŠMT a odborná komise Vám **uděluje povolení provádět tento pokus.**

Zahájení pokusu oznamte odesláním e-mailu na adresu chloupekp@vfu.cz, doubekj@vfu.cz a místně příslušné KVS (v Brně na adresu d.obratilova.kvsb@svsscr.cz) nejpozději v den zahájení pokusu s uvedením následujících údajů:

Název pokusu:

Vedoucí pokusu:

Číslo projektu pokusu:

Datum zahájení pokusu:

Ukončení pokusu oznamte nejpozději 7 dnů po ukončení pokusu na adresu chloupekp@vfu.cz s uvedením následujících údajů:

Název pokusu:

Vedoucí pokusu:

Číslo projektu pokusu:

Datum ukončení pokusu:

Druh a počet použitých zvířat:

Neoznámení změny údajů v projektu pokusů týkající se změny vedoucího pokusu, změny druhu použitých zvířat, zákroku na zvířatech, manipulace se zvířaty a změny místa pokusu příslušnému státnímu orgánu se považuje za provádění pokusu bez povolení.



Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.
předseda odborné komise

Příloha: Projekt pokusu č. 61/2011

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ
UNIVERZITA BRNO

ODBORNÁ KOMISE NA OCHRANU ZVÍŘAT
612 42 Brno, Palackého 1/3 4

Č.: 61/2011

**ŽÁDOST O POVOLENÍ
POUŽITÍ ZVÍŘAT PRO PROJEKT POKUSŮ**

Žadatel: VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Název pokusu:

Sledování terapeutického účinku mikroimpulzní stimulace na zánětlivé otoky končetin koní.

Druh a počet zvířat:

Druh	Předpokládaný počet	Skutečně použito
Kůň	40	

Vedoucí pokusu:

Radovan Kabeš, MVDr.; č.osv. V/2/2006/15

Vyplňujte jen bílé kolonky!

Žádost vyplňujte na počítači; kolonky se zvětší automaticky podle množství textu.

Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. b) zákona č. 246/1992 Sb.):			
PROJEKT POKUSŮ č. 61-2011			
podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat			
1.	Identifikace osoby provozující uživatelské zařízení:		
	Žadatel - název právnické osoby nebo jméno a příjmení fyzické osoby, která zařízení provozuje		
	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno		
	IČ	RČH	CZ 62760113
	Adresa sídla nebo místa podnikání žadatele (včetně PSČ a okresu)		
	Palackého 1-3, 612 42 Brno		
	Statutární orgán žadatele - jméno, příjmení, titul		
	Vladimír Večerek, Prof. MVDr. CSc. MBA		
2.	Číslo rozhodnutí o udělení akreditace a doba jeho platnosti		
	45620/2008-17210 Platnost do 6.3.2014		
3.	Vedoucí pokusu - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Radovan Kabeš, MVDr.; č. osv. V/2/2006/15		
	Zástupce vedoucího pokusu (je-li ustanoven) - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Mária Patschová, MVDr.; č. osv. V/1/2007/12		
4.	Osoba odpovědná za péči o zvířata v uživatelském zařízení - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Jaroslav Doubek, prof. MVDr., CSc., č. osvědčení 0005/95 – M 186		
5.	Osoba, která řídí činnost odborné komise uživatelského zařízení - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.		
	Petr Chloupek, Doc. MVDr. Ph.D. č. osvědčení: 0014/96 – M14		
6.	Název úkolu studie, případně označení grantu		
	Sledování terapeutického účinku mikroimpulzní stimulace na zánětlivé otoky končetin koní.		
7.	Charakteristika cílů studie s uvedením konkrétního očekávaného přínosu, včetně charakteristiky aplikovaných látek, nebo zařazení látek do indikačních skupin, s výjimkou výstupní kontroly šarží látek		
	Cílem je objektivně posoudit, zda se mikroimpulzní stimulace významně podílí na redukci otoků a bolestivosti končetin koní způsobených lehčími úrazy (distorze, tendinitidy apod.).		
8.	Podle § 15 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. bude pokus proveden za účelem (odpovídající zařazení označte křížkem (x) do prázdného políčka):		
	a) odvrácení nebo prevence nemocí, zdravotních poruch a jiných anomálií nebo jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin, včetně výroby a zkoušení jakosti, účinnosti a neškodnosti léčiv, látek nebo výrobků		x
	b) provádění diagnostiky nebo léčby onemocnění, zdravotních poruch nebo jiných anomálií a jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin		
	c) zjišťování, vyhodnocování, řízení nebo modifikace fyziologických stavů u člověka, zvířat nebo rostlin		
	d) ochrany životního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí anebo zvířat		
	e) provádění výuky, pokud účelu nelze dosáhnout jinak		
	f) zachování nebo rozmnožování živého materiálu pro vědecké účely		
	g) provádění vědeckého výzkumu		
	h) konání soudního řízení		

6-1-2011

9.	<p>Metodické postupy práce se zvířaty</p> <p>V experimentu bude zjišťováno, zda má mikroimpulzní stimulace prokazatelný účinek na léčbu otoků končetin koní. Mikroimpulzní stimulator bude přikládán k oteklé oblasti končetiny ze všech stran po dobu max. 30 minut 1x denně v rozmezí několika dnů, pokud možno až do úplného ústupu otoku, případného kulhání a bolestivosti. Končetina může být pro snížení kožního odporu opláchnuta čistou vodou. Celý průběh experimentu bude zaznamenáván jak fotograficky, tak pomocí videozáznamů, které pak budou sloužit ke zhodnocení a srovnání metody mikroimpulzní stimulace oproti jiným běžně používaným postupům léčby.</p> <p>Mikroimpulzní stimulator, který je vlastním předmětem zkoumání, je bateriově napájené zařízení malých rozměrů. Generuje impulsy dosahující v nezatíženém stavu 750 V. Vyšší napětí je kompenzováno vhodným nastavením šířky a frekvence impulsů, čímž je zamezeno dodání větší zátěže, než by bylo únosné. Impulsy mají velmi krátké trvání řádově desítky mikrosekund a opakovací frekvenci 1 – 3 Hz. Proudový obvod se uzavírá mezi soustřednými elektrodami, které přesně vymezují oblast aplikace impulsů a zabraňují průchodu elektrického proudu nežádoucími oblastmi. Samotné bateriové napájení přístroje neumožňuje vznik sekundárního obvodu (např. přes srdce) a je tedy prevencí úrazů síťovým proudem. Mikroimpulzní stimulator splňuje podmínky pro získání certifikátu bezpečnosti Institutu pro testování a certifikaci.</p> <p>Vzhledem k tomu, že bude pracováno s koňmi soukromých majitelů, bude každé měření doloženo informovaným souhlasem majitele konkrétního koně.</p>
10.	<p>Prohlášení navrhovatele o průkazu nezbytnosti pokusu nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusu ukládá, včetně zdůvodnění, proč nelze pokus na zvířeti nahradit alternativními metodami</p> <p>Vzhledem k povaze experimentu není možná jeho realizace alternativním způsobem, tzn. počítačový model, tkáňové kultury apod.</p>
11.	<p>Zdůvodnění volby druhu, plemene, kmene a kategorie zvířat, jejichž využití je plánováno, s uvedením parametrů jejich kvality</p> <p>K experimentu budou použiti koně plemene český teplokrevník ve věku od 1 roku do 15 let obou pohlaví, přičemž nebudou používány gravidní klisny.</p>
12.	<p>Původ pokusných zvířat, s uvedením evidenčních údajů chovného a dodavatelského zařízení vč. RČH</p> <p>Teplokrevní koně v majetku: AGRI-M, Místřice Omický dvorek, Omice Školní hospodářství, Staré Město u Uh. Hradiště JK Hrubšice, Ivančice – Hrubšice</p>
13.	<p>Zdůvodnění počtu zvířat, jejichž využití je plánováno, za stanovené časové období</p> <p>Pro experiment bude použito min. 12 koní a maximálně 40 koní v závislosti na dostupném počtu koní s vhodným postižením končetin.</p>
14.	<p>Způsob značení zvířat v pokusu</p> <p>Zvířata zařazená do pokusu budou identifikována způsobem obvyklým v chovu koní, tzn. popis exteriéru, výžehy, RFID čip.</p>
15.	<p>Způsob znecitlivění, případně podání bolest utišujících prostředků nebo opatření ke snížení bolesti</p> <p>Považba experimentu nevyžaduje analgézi.</p>
16.	<p>Umístění zvířat během pokusu nebo u volně žijících zvířat místo pokusu</p> <p>AGRI-M, Místřice Omický dvorek, Omice Školní hospodářství, Staré Město u Uh. Hradiště JK Hrubšice, Ivančice – Hrubšice</p>
17.	<p>Časový plán jednotlivých fází pokusu na zvířatech, včetně data jeho ukončení</p> <p>Provedení experimentu je plánováno v období 1. 9. 2011 až 30. 5. 2012</p>
18.	<p>Úroveň operačního vybavení a způsob pooperační péče</p> <p>Experiment bude prováděn přímo v uvedených chovech a kromě specifické instrumentace popsané v bodě 9 nevyžaduje žádné další vybavení. Nepředpokládá se nutnost pooperační péče.</p>
19.	<p>Způsob naložení se zvířaty po ukončení pokusu</p> <p>Zvířata budou majiteli využívána obvyklým způsobem</p>
20.	<p>Způsob kontroly dodržování předpisů k ochraně zvířat</p> <p>Zahájení pokusu bude předem oznámeno KVS a odborné komisi uživatelského zařízení</p>
21.	<p>Uvedení zdravotního rizika pro další zvířata a pro zaměstnance</p> <p>Nepředpokládá se jiné riziko než běžné spojené s manipulací s velkými zvířaty.</p>
22.	<p>Veterinární podmínky pokusu stanovené podle zvláštních právních předpisů</p>
23.	<p>Zdůvodnění opakování zákroků na zvířatech (je-li s ním počítáno)</p>
24.	<p>Údaj o úrovni podmínek správné laboratorní praxe (je-li to požadováno zvláštními právními předpisy)</p>
25.	<p>Stanovisko orgánu ochrany přírody v případě pokusu na jedincích druhů volně žijících zvířat</p>

61-2011

	<i>(možno uvést a citovat jako přílohu)</i>	
26.	Uživatelské zařízení, které předkládá projekt pokusů k jednorázovým odběrům od hospodářských zvířat a zvířat v zájmových chovech pro získání biologického materiálu k výrobě sér, očkovacích látek, diagnostik a léků, jej rozšíří o písemnou smlouvu s vlastníkem zvířete, od kterého se v takovém případě nevyžaduje osvědčení pro chovné zařízení <i>(smlouvu uvést jako přílohu)</i> :	
	Provádí uživatelské zařízení takové jednorázové odběry? <i>(nehodící se vymažte)</i>	NE
	Druh a množství materiálu určeného k odběru, doba jeho odběru, jeho metodika a způsob péče o zvíře po provedeném odběru, způsob seznámení majitele zvířete s těmito podmínkami a jejich kontrolou	

Projekt pokusů předkládá	MVDr. Radovan Kabeš
Telefon / Fax	00420 725 851 742
E-mail	kabesr@vfu.cz

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ
UNIVERZITA BRNO
Razítko uživatelského zařízení
FAKULTA VETER. LÉKARSTVÍ
klinika chorob koní
612 42 Brno, Palackého 1/3 3

7.7.2011 Radovan Kabeš

Datum, podpis vedoucího pokusu

7.7.2011 [podpis]

Datum, podpis zástupce vedoucího pokusu





- 4 - 03 - 2011

Datum, podpis statutárního orgánu žadatele

Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18b odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.):

STANOVISKO ODBORNÉ KOMISE UŽIVATELSKÉHO ZAŘÍZENÍ K PROJEKTU POKUSU č. 61/2011
Sledování terapeutického účinku mikroimpulzní stimulace na zánětlivé otoky končetin koní.

Předložený projekt obsahuje po formální stránce náležitosti vyžadované příslušnými právními předpisy – zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů a vyhlášky č. 207/2004 Sb., o chovu a využití pokusných zvířat. Po obsahové stránce projekt splňuje všechny podmínky předepisované právními předpisy pro provedení projektu pokusů, zejména stanovení odpovědných osob a splnění jejich odborné způsobilosti, stanovení názvu, cíle studie, péče o zvířata, metodických postupů práce se zvířaty, zdůvodnění nezbytnosti pokusu, způsob kontroly dodržování předpisů k ochraně zvířat.

Členové odborné komise		Datum
Jméno	Podpis	
Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph. D.		28. 7. 2011
Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.		28. 7. 2011
Doc. MVDr. Helena Modrá, Ph. D.		28. 7. 2011
MVDr. Lada Hofmannová Ph.D.		28. 7. 2011
Doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph. D.		28. 7. 2011

Tuto tabulku vyplňuje příslušný státní orgán (§ 18b odst. 2, § 23 odst. 1 písm. a) zákona č. 246/1992 Sb.):

Nedílnou součástí tohoto projektu pokusů je povolení použití zvířat č.j. 25 055/2011-30

Povolení bylo vydáno dne 25. 8. 2011

Razítko a podpis příslušného státního orgánu



Souhlas
Č. Modrá


Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. a) zákona č. 246/1992 Sb.):

Schválení projektu pokusů oznámeno příslušnému orgánu veterinární správy dne

Datum a podpis vedoucího pokusu

Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18 odst. 7 zákona č. 246/1992 Sb.):

Souhlas k zahájení pokusu udělen dne **19 -09- 2011**

Datum a podpis člena odborné komise uživatelského zařízení **19 -09- 2011** 

Příloha K Obrazová dokumentace projektu 61/2011

T01
* 1990
anglický plnokrevník

1. den

SP

- kůň silně kulhá (viz video)
- oteklá šlacha na levé přední noze, hřeje
- příčinou pravděpodobně úraz v boxu v průběhu noci
- pro klid ponechán v boxe

1. terapie

T: 20 min, F: max, I: max, L: spěnka



2. den

SP

- výrazné snížení kulhání
- mírný otok

2. terapie

T: 20 min, F: max, I: max, L: spěnka
po terapii volný pohyb ve výběhu



4. den

SP

- čistý chod (viz video)
- bez výrazného otoku



T02
* 2005
velkopolský kůň



1. den

SP

- otok na levé zadní noze sahající od patky k holeni
- odřeniny dezinfikovány
- nekulhá, končetina hřeje
- příčinou úraz ve výběhu, pravděpodobně kopnutí jiným koněm

1. terapie

T: 25 min, F: max, I: max, L: oblast otoku



2. den

SP

- ustoupení otoku
- končetina výrazně nehřeje

2. terapie

T: 15 min, F: max, I: max, L: spěnka, patka



T03
* 2006
český teplokrevník

1. den

SP

- akutní otok na pravé přední končetině
- nekulhá
- noha bolestivá na dotek, hřeje

1. terapie

T: 20 min, F: max, I: max, L: holeň



2. den

SP

- nekulhá
- znatelný ústup otoku
- menší bolestivost

2. terapie

T: 20 min, F: max, I: max, L: holeň



3. den

SP

- nekulhá, bez bolesti
- bez otoku



T04
* 1992
český teplokrevník

1. den

SP

- nevýrazný akutní otok spěnkového kloubu levé přední končetiny
- příčinou podvrtnutí ve výběhu, bandážováno, potíráno akriflavinem (žlutá dezinfekční látka)
- výrazně kulhá, neochota k chůzi, noha na dotek nebolestivá, hřeje

1. terapie

T: 15 min, F: max, I: max, L: spěnka



2. den

SP

- ústup otoku
- kulhá, ale ochota k chůzi

2. terapie

T: 35 min, F: max, I: max, L: spěnka, holeň



3. den

SP

- bez otoku
- lehké polevování na tvrdém podkladě, jinak bez kulhání

3. terapie

T: 10 min, F: max, I: max, L: spěnka



T05
* 2006
český teplokrevník

1. den

SP

- úraz v boxe (vykopnutí proti stěně), malá odřenina na patce
- otok na levé zadní noze v oblasti šlachy a nad patkou, hřeje
- končetina velmi bolestivá, kůň odmítá nakončetině stát
- výrazné kulhání

1. terapie

T: 30 min, F: min-max, I: max, L: spěnka, patka



2. den

SP

- mírný ústup otoku i kulhání
- končetina stále citlivá na dotek

2. terapie

T: 20 min, F: min-max, I: max, L: spěnka, patka



3. den

SP

- téměř bez otoku
- chod pravidelný, bez kulhání
- ústup bolesti

3. terapie

T: 15 min, F: max, I: max, L: spěnka, patka



T06
* 2004
moravský teplokrevník

1. den

SP

- vytvoření rozsáhlého otoku na levé přední končetině od ramene ke spěnkovému kloubu
- ze začátku mírné kulhání
- citlivý na dotek, hřeje
- na kolenu malá ranka
- bez léčby asi 4 dny

1. terapie

T: 30 min, F: min-max, I: max, L: oblast otoku



2. den

SP

- mírný ústup otoku od ramene ke kolenu
- koleno a holeň stále oteklé

2. terapie

T: 30 min, F: min-max, I: max,
L: koleno, holeň, rameno



3. den

SP

- ustoupení otoku
- koleno s mírným otokem kolem naraženého místa

3. terapie

T: 30 min, F: min-max, I: max,
L: koleno, holeň



4. den

SP

- na kolenu zůstává mírné vyboulení v místě naražení

4. terapie

T: 25 min, F: min-max, I: max,
L: koleno, holeň



T07
* 2007
moravský teplokrevník

1. den

SP

- úraz ve stáji (vykopnutí proti dřevěné stěně)
- rána na patce levé zadní nohy
- otok v oblasti poraněné patky, hřeje
- končetina bolestivá, neochota k chůzi

1. terapie

T: 20 min, F: min-max, I: max, L: oblast patky



2. den

SP

- ustoupení otoku
- plynulejší chůze

2. terapie

T: 15 min, F: min-max, I: max, L: patka



T08
* 2004
moravský teplokrevník

1. den

SP

- vytvoření rozsáhlého podlomu na levé zadní končetině
- menší otok v oblasti spěnkového kloubu, hřeje
- končetina velmi bolestivá, zpočátku mímekulhání
- bez terapie
- majitel nepravidelně prováděl omývání roztokem Betadine a zapařovací zábaly



5. den

SP

- podlom neustupuje
- vytvoření výrazného otoku sahajícího od spěnkového kloubu až po hlezno
- končetina citlivá na dotek, hřeje

1. terapie

T: 30 min, F: min-max, I: max,
L: oblast podlomu a oteklé části,
po terapii na popraskanou kůži aplikována mast s propolisem



7. den

SP

- výrazné ustoupení otoku
- zůstává mírný otok spěnkového kloubu
- končetina podstatně méně citlivá na dotek a kůň klidnější při terapii

2. terapie

T: 30 min, F: min-max, I: max,
L: oblast podlomu a spěnky,
po terapii aplikace masti s propolisem



8. den

SP

- bez pozorovatelného otoku

3. terapie (preventivní)

T: 15 min, F: max, I: max, L: oblast podlomu, po terapii aplikace masti s propolisem



T09
* 2008
welsch pony

1. den

SP

- úraz ve výběhu (kopnutí druhým koněm)
- tržná rána na dolní části stehna pravé zadní nohy s otokem sahajícím až k hlezennímu kloubu, hřeje
- končetina velmi bolestivá, výrazné kulhání

1. terapie

T: 30 min, F: min-max, I: max,
L: oblast rány, stehno



2. den

SP

- mírné ustoupení otoku i kulhání
- končetina méně citlivá na dotek

2. terapie

T: 20 min, F: min-max, I: max,
L: oblast rány, stehno



3. den

SP

- výrazné ustoupení otoku i kulhání
- bez bolesti
- ranka se postupně zatahuje

3. terapie

T: 15 min, F: max, I: max,
L: oblast ranky, stehno



4. den

SP

- bez otoku
- chod pravidelný



Příloha L Vyjádření veterinárního lékaře k výsledkům projektu 61/2011

Vyjádření k terapeutickému efektu mikrostimulace u koní s akutním zánětem měkkých tkání distálních částí končetin

Na základě provedené pilotní studie lze předpokládat pozitivní efekt této metody, neboť u všech koní byl nezávislým posuzovatelem, který hodnotil videozáznamy pohybujících se koní, hodnocen klinický stav po terapii lépe, než před ní.

Pro úplnou validaci této u koní nové terapeutické metody by však bylo nutné provést randomizovanou kontrolovanou klinickou studii na dostatečném počtu koní, aby bylo možné spolehlivě vyloučit vliv přirozených hojících procesů v akutně poškozených tkáních.

V Brně 11. 5. 2012

MVDr. Radovan Kabeš
Klinika chorob koní
VFU Brno
Palackého 1/3
612 42 Brno

Příloha M Algoritmus Longest Common SubSequences (LCSS) zdrojový kód pro MATLAB

```
% Načtení vstupního souboru dat a definování vstupních parametrů
M = xlsread('srovnani_rezimu.xls','data','B2:I602');
[d, s] = size(M); % zjištění rozměrů matice dat [řádky, sloupce]
epsilon = 0.09; % parametr pro vytvoření obálky
delta = ceil(0.05*d); % parametr možného posunu sekvencí vůči sobě
% v horizontálním směru

% Vytvoření matice vzdáleností pomocí algoritmu LCS
% dist_matrix = zeros(s);
% for r = 1:s
%     for c = 1:s
%         dist_matrix(r,c)=LCS(M(:,r),M(:,c),delta,epsilon);
%     end
% end

% Uložení matice vzdálenosti do souboru .xls
xlswrite('matice_vzdalenosti.xls', dist_matrix)
LCSSgraf(M(:,5),M(:,7),delta,epsilon);

%-----
% Zjištění vzdálenosti dvou signálů s využitím algoritmu dynamického
% programování Longest Common Subsequences
%-----
%=====
% BEGIN COPYRIGHT NOTICE
%
% lcsMatching code (c) 2002 Michalis Vlachos
% http://www.cs.ucr.edu/~mvlachos)
%
% This code is provided as is, with no guarantees except that
% bugs are almost surely present. Published reports of research
% using this code (or a modified version) should cite the
% article that describes the algorithm:
%
% M. Vlachos, M. Hadjieleftheriou, D. Gunopulos, E. Keogh:
% "Indexing Multi-Dimensional Time-Series with Support for Multiple
% Distance Measures", In Proc. of 9th SIGKDD, Washington, DC, 2003
%
% Comments and bug reports are welcome. Email to mvlachos@cs.ucr.edu
% I would also appreciate hearing about how you used this code,
% improvements that you have made to it.
%
% You are free to modify, extend or distribute this code, as long
% as this copyright notice is included whole and unchanged.
%
% END COPYRIGHT NOTICE
%=====
% [vzdalenost,prev,match_point] = LCS(a, b, delta, epsilon)
%
% VSTUP:
% a = [n x 1] časová řada A
% b = [n x 1] druhá časová řada B
% delta = vymezuje oblast sekvence B pro porovnání s A v horizontálním
% směru (levá & pravá mez), nejlépe 5% délky časové sekvence A
% epsilon = vymezuje oblast sekvence B pro porovnání s A ve vertikálním
% směru (horní & dolní mez), hodnota se volí z intervalu 0<epsilon<1
%
```

```

% VÝSTUP:
% Vzdálenost mezi A a B definovaná jako:
% vzdálenost = 1 - (LCSS(A,B) / min(m,n))
% prev = indexace společných bodů sekvencí
% match_point = společné body sekvencí

function [vzdálenost,prev,match_point] = LCS(a, b, delta, epsilon)

m = length(a);
n = length(b);
LCStable = zeros(m+1, n+1); % tabulka pro zarovnání sekvencí a, b
prevx = zeros(m+1, n+1); % tabulka pro indexování hodnot x
prevy = zeros(m+1, n+1); % tabulka pro záznam hodnot y

for i=1:m
    for j = (i-delta):1:(i+delta),
        if (j<=0 || j>n); % mimo rozsah
        elseif (b(j)+epsilon)>=a(i) && (b(j)-epsilon)<=a(i)
            % jestliže vzdálenost |ab| < prahová hodnota epsilon, pak prvek
            % a(i) spadá do blízké oblasti b(j) => jejich podobnost vede
            % k posunu na další prvek nejkratší možnou cestou po diagonále,
            % a ohodnocení této podobnosti navýšením prvku o +1
            LCStable(i+1,j+1) = LCStable(i,j)+1;
            prevx(i+1,j+1) = i; % záznam 1.indexu pozice výchozího prvku
            prevy(i+1,j+1) = j; % záznam 2.indexu pozice výchozího prvku
        elseif LCStable(i,j+1) > LCStable(i+1,j)
            % v případě, že vzdálenost |ab| > práh epsilon, pak následující
            % diagonální prvek převezme hodnotu toho prvku shora nebo zleva,
            % který má vyšší hodnotu
            LCStable(i+1,j+1) = LCStable(i,j+1);
            prevx(i+1,j+1) = i;
            prevy(i+1,j+1) = j+1;
        else
            LCStable(i+1,j+1) = LCStable(i+1,j);
            prevx(i+1,j+1) = i+1;
            prevy(i+1,j+1) = j;
        end
    end
end

% Odstranění počátečních podmínek z tabulek
LCStable = LCStable(2:end, 2:end);
prevx = prevx(2:end, 2:end)-1;
prevy = prevy(2:end, 2:end)-1;

% Nalezení maximální hodnoty v posledním řádku tabulky a uložení její
% hodnoty (lcs) a pozice (pos)
[lcs, pos]= max(LCStable(m, :));
% Výpočet LCS vzdálenosti (distance)
vzdálenost = 1-(lcs/min(m,n));

% Nalezení optimální cesty zarovnání dvou sekvencí zpětným trasováním od
% konce tabulky
now = [m, pos]; % výchozí pozice v místě maximální hodnoty
prev = [prevx(now(1), now(2)), prevy(now(1), now(2))];
lcs_path = now;
while all(prev>0),
    now = prev;
    prev = [prevx(now(1), now(2)), prevy(now(1), now(2))];
    lcs_path = [lcs_path; now]; % zpětná cesta
end

```

```

lcs_path = flipud(lcs_path); % převrácení matice od začátku

% Nalezení shodných bodů obou sekvencí
temp = LCStable((lcs_path(:,2)-1)*m+lcs_path(:,1)); % počet LCS podél cesty
temp = [0; temp];
index = find(diff(temp));
match_point = lcs_path(index, :);

=====

%-----
% Grafická reprezentace srovnání sekvencí
%-----
% VSTUP:
% a = 1. sekvence
% b = 2. sekvence
% delta = vymezuje oblast obálky sekvence b v horizontálním směru
% epsilon = vymezuje oblast obálky sekvence b ve vertikálním směru
%
% VÝSTUP:
% Grafy sekvencí, obálky MBE pro jejich srovnání a vykreslení
% společných bodů.

function LCSSgraf(a, b, delta, epsilon)

[vzdalenost,prev,match_point]=LCS(a,b,delta,epsilon);

% Vykreslení sekvencí a, b a obálky
figure(1);
subplot(2,1,1);
createEnvelope(b', delta, epsilon);
plot(a,'b-','LineWidth',2);
plot(b,'r-','LineWidth',2);
title('Minimum Bounding Envelope (MBE) pro LCSS');

% Vykreslení sekvencí a, b a jejich společných bodů
subplot(2,1,2);
title(['Vzdálenost sekvencí _{[\delta=' num2str(delta) ',\epsilon ='...
      num2str(epsilon) ']} = ' num2str(vzdalenost)...
      ' a společné body nalezené algoritmem LCSS' ]);

for i=1:length(match_point)
    s = match_point(i,1);
    e = match_point(i,2);
    h=line([s e], ([a(s) b(e)]));
    set(h,'LineWidth',1,'color',[0.5 0.5 0.5]);
end
hold on;
plot(a,'b-','LineWidth',2);
plot(b,'r-','LineWidth',2);
set(gca, 'ytick', []);

=====

%-----
% Funkce pro vytvoření horní a dolní hranice obálky MBE
% (Minimum Bounding Envelope) kolem vstupní křivky
%-----
% Funkce createEnvelope vytvoří obálku kolem vstupní křivky na základě
% definovaných parametrů.
%
% VSTUP:
% traj = sekvence, kolem které chceme vytvořit obálku

```

```

% window = okno pro procházení hodnot sekvence (zde hodnota delta)
% epsilon = parametr šířky obálky ve vertikálním směru
%
% VÝSTUP:
% Horní (U) a dolní (L) hranice pro vytvoření obálky vstupní časové
% sekvence.

function [U,L]=createEnvelope(traj, window, epsilon)

% Konstrukce hranic U (Up, horní) a L (Low, dolní)
[tt,n]=size(traj);
U = zeros(1,n);
L = zeros(1,n);
[U(1), maxpos] = max(traj(1,[1:window+1])+epsilon);
[L(1), minpos] = min(traj(1,[1:window+1])-epsilon);

for i=1:n
    pLow = i-window;
    pHigh = i+window;
    if i<(window+1)
        pLow = 1;
    end
    if i+window>n
        pHigh = n;
    end
    U(i)=max(traj(1,pLow:pHigh)+epsilon);
    L(i)=min(traj(1,pLow:pHigh)-epsilon);
end

% Vykreslení obálky
x = 1:n;
fill([x,flip1r(x)],[L,flip1r(U)],[0.7 0.7 0.7]);% barevná výplň
hold on;
plot(L,'LineWidth',1.5,'color',[0.5 0.5 0.5]);
plot(U,'LineWidth',1.5,'color',[0.5 0.5 0.5]);
xlabel('vzorek')
ylabel('odezva TDS')

```

Příloha N CD médium

- Diplomová práce ve formátu .pdf
- Průvodní dokumentace a návod k použití mikrostimulátoru
- Riziková analýza mikrostimulátoru
- Protokoly zkoušek č. 3343/11 a 3670/11
- Formuláře informovaných souhlasů
- Dokumentace projektu 61/2011 (fotografie a videozáznamy)
- Dokumentace projektu 62/2011 (fotografie, naměřená data, výsledky statistických analýz)
- Zdrojové kódy použitých funkcí