

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

květen 2015

Vít Vršník



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra biomedicínské techniky

Název diplomové práce:

**Návrh systému pro behaviorální testy
použitelné při výzkumu sluchu u
laboratorních zvířat**

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Biomedicínský inženýr

Autor diplomové práce: Bc. Vít Vršník

Vedoucí diplomové práce: Ing. Daniel Šuta, Ph.D.

Kladno 2015

Katedra biomedicínské techniky

Akademický rok: 2013/2014

Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Vít Vršník**
Studijní obor: Biomedicínský inženýr
Téma: **Návrh systému pro behaviorální testy použitelné při výzkumu sluchu u laboratorních zvířat**
Téma anglicky: Behavioral system for the auditory research in laboratory animals

Zásady pro vypracování:

Měření úlekové reakce je metoda ve výzkumu a diagnostice poruch nervového systému, která typicky využívá zvukovou stimulaci. Vytvořte nástroj pro generování zvukových stimulů použitelných pro vyvolání úlekové reakce a jejího potlačení. Preferujte softwarové prostředí Matlab. Vytvořte program pro snímání, záznam a analýzu úlekové reakce a jejího potlačení vyvolané zvukovou stimulací. Při návrhu vycházejte z přístrojového vybavení dostupného na ÚEM AV ČR. Vytvořený systém otestujte u laboratorních zvířat (myši nebo potkani) a získané záznamy srovnajte se záznamy z jiných systémů pro měření úlekové reakce či záznamy dostupnými v literatuře.

Seznam odborné literatury:

- [1] Fitch R.H., Threlkeld S.W., McClure M.M., Peiffer AM., Use of a modified prepulse inhibition paradigm to assess complex auditory discrimination in rodents., Brain Res Bull, ročník 76, číslo 1-2, 2008, 1-7 s.
- [2] Rybalko N., Bureš Z., Burianová J., Popelář J., Grécová J., Syka J., Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats., Physiol Behav, ročník 102, číslo 5, 2011, 453-8 s.
- [3] Rybalko N., Bureš Z., Burianová J., Popelář J., Poon P.W., Syka J., Age-related changes in the acoustic startle reflex in Fischer 344 and Long Evans rats., Exp Gerontol, ročník 47, číslo 12, 2012, 966-73 s.

Vedoucí: Ing. Daniel Šuta, Ph.D.
Konzultant: Ing. Richard Grünes, Ph.D., RNDr. Jiří Lindovský, Ph.D.

Zadání platné do: 31.01.2016

vedoucí katedry / pracoviště



děkan

V Kladně dne 17.02.2014

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Návrh systému pro behaviorální testy použitelné při výzkumu sluchu u laboratorních zvířat“ vypracoval/a samostatně. Veškerou použitou literaturu a podkladové materiály uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Kladně 22. 5. 2015

.....

Bc. Vít Vršník

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval panu Ing. Danielu Šutovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné rady, zkušenosti a připomínky, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Jiřímu Lindovskému, Ph.D. za přínosné rady a konzultace vždy, když bylo potřeba. Rovněž děkuji všem ostatním pracovníkům a kolegům z Oddělení neurofyzologie sluchu ÚEM, AV ČR, v.v.i. za vlídný a přátelský přístup během mé práce. Také bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za úžasnou podporu při psaní této práce i během celého studia.

Název diplomové práce:

Návrh systému pro behaviorální testy použitelné při výzkumu sluchu u laboratorních zvířat

Abstrakt:

Při behaviorálním testování v rámci výzkumu sluchu není možné využít komerčně dostupných aparatur k měření úlekové reakce a prepulzní inhibice, většina laboratoří zkoumajících neurofyziologii sluchu si tak vytváří své vlastní aparatury, u kterých bývá základním prvkem procesor RP2 od firmy Tucker-Davis Technologies. Tato práce se zabývá analýzou a návrhem zapojení aparatury pro měření úlekové reakce bez procesoru RP2 TDT. Dle požadavků a dostupného přístrojového vybavení Oddělení neurofyziologie sluchu ÚEM AV ČR v.v.i. bylo navrženo zapojení měřicí aparatury, jehož součástí je zvuková karta E- MU 0404 a software vytvořený v programovacím jazyce Matlab. Toto zapojení bylo otestováno laboratorním měřením úlekové reakce a prepulzní inhibice u potkanů Fischer 344.

Klíčová slova:

Úleková reakce, prepulzní inhibice, Matlab, behaviorální testování, sluch

Master's Thesis title:

Behavioral system for auditory research in laboratory animals

Abstract:

This thesis aims to propose a wiring of system for monitoring startle reflex without a commonly used real-time processor from Tucker-Davis Technologies. Normally it is not possible to use commercially available apparatus for monitoring acoustic startle response and prepulse inhibition for auditory research, majority of laboratories that study auditory science make their own apparatus. A wiring of this system is proposed according to requests and available equipment of Department of Auditory Neuroscience IEM AS CR. This system is composed of a sound card E-MU 0404 and a software created in Matlab programming language. This system was tested by standard laboratory monitoring of acoustic startle response at Fischer 344 rats.

Key words:

Startle reflex, ASR, prepulse inhibition, PPI, Matlab, behavioral testing, hearing

Obsah

Seznam symbolů a zkratek.....	9
1 Úvod.....	10
1.1 Cíle práce	10
2 Teoretické základy práce.....	11
2.1 Behaviorální testování.....	11
2.2 Úleková reakce.....	11
2.2.1 Prepulzní inhibice úlekové reakce.....	14
2.3 Měřicí aparatura	17
2.3.1 Real-time procesor RP2.....	17
3 Praktická část.....	19
3.1 Softwarové požadavky na řešení.....	19
3.2 Technické vybavení laboratoře	20
3.3 Zapojení se zvukovou kartou	21
3.3.1 Zvuková karta E-MU 0404 PCIe.....	21
3.4 Programovací jazyk Matlab	22
3.5 Co musí program splňovat	23
3.6 Stimulační signály.....	24
3.6.1 Generování stimulačních signálů	24
3.6.2 Náběžná a sestupná hrana.....	25
3.6.3 Parametry stimulačních signálů.....	27
3.7 Full-duplexní komunikace	29
3.7.1 Psychophysics Toolbox.....	29
3.8 Synchronizace	31
3.9 Záznam signálu	32
3.10 Amplituda úlekové reakce.....	33
3.11 Grafické uživatelské rozhraní.....	34

3.11.1	Sdílení proměnných mezi funkcemi.....	35
3.12	Módy programu	36
3.12.1	Před měřením	36
3.12.2	Během měření.....	40
3.12.3	Po měření.....	42
3.13	Uživatelské schéma programu.....	46
3.14	Akustická kalibrace	46
3.15	Změna vzorkovací frekvence	47
3.16	Karta zvířete	48
3.17	Měření.....	48
4	Experimentální výsledky.....	50
4.1	Srovnání s procesorem RP2	50
4.2	Úleková reakce u potkanů kmene Fischer	51
4.3	Prepulzní inhibice u potkanů kmene Fischer	53
5	Diskuse.....	56
5.1	Měřicí aparatura	56
5.2	Experimentální výsledky.....	57
5.3	Možnosti rozšíření.....	57
6	Závěr	58
	Seznam použité literatury	59
	Seznam obrázků	62
	Seznam kódů.....	65

Seznam symbolů a zkratek

A/D	analogově-digitální převodník
ABR	akusticky vyvolaná odpověď mozkového kmene (<i>auditory brainstem responses</i>)
Ach	acetylcholin
ASIO	ovladač <i>Audio Stream Input/Output</i> pro komunikaci se zvukovými kartami
ASR	akusticky vyvolaná úleková reakce (<i>acoustic startle reflex</i>)
AV ČR	Akademie věd České republiky - veřejná výzkumná instituce
D/A	digitálně-analogový převodník
dB	jednotka hladiny akustického tlaku (<i>decibel</i>)
F344	označení pro kmen laboratorních rychle stárnoucích potkanů Fischer 344
FFT	metoda výpočtu Fourierovy transformace (<i>Fast Fourier transform</i>)
GABA	kyselina gama-aminomáselná
Glu	glutamát
GUI	grafické uživatelské rozhraní (<i>graphical user interface</i>)
GUIDE	nástroj Matlabu pro design uživatelských rozhraní (<i>GUI design environment</i>)
ISI	latence prepulzu a hlavního pulzu u prepulzní inhibice (<i>inter-stimulus interval</i>)
ITI	čas (s) mezi jednotlivými pulzy v sérii (<i>inter-trial interval</i>)
MEX	<i>Matlab Extension files</i>
m-file	soubor obsahující zdrojový kód v jazyce Matlab
PCIe	sběrnice PCI-Express
PPI	prepulzní inhibice úlekové reakce (velikost se vyjadřuje v %)
PTSD	posttraumatická stresová porucha (<i>posttraumatic stress disorder</i>)
RP2	real-time procesor od firmy Tucker-Davis Technologies, Inc.
RPC	zadní retikulární jádro Varolova mostu (<i>nucleus reticularis pontis caudalis</i>)
SEM	střední chyba průměru (<i>standard error of the mean</i>)
SPL	hladina akustického tlaku (<i>sound pressure level</i>)
TDT	firma Tucker-Davis Technologies, Inc.
ÚEM	Ústav experimentální medicíny - výzkumný ústav AV ČR
VCN	ventrální kochleární jádro (<i>ventral cochlear nucleus</i>)
VLL	ventrální jádro laterálního lemnisku (<i>ventral lateralis lemniscus</i>)
wav	formát zvuku (<i>Waveform audio file format</i>)

1 Úvod

Behaviorální testování je neinvazivní laboratorní metoda založená na analýze reakcí vyvolaných standardizovanými stimuly. Tento způsob testování nachází široké uplatnění především v oblasti neurofyziologie. Nejjednodušší reakcí na podnět je reflex, což je automatická odpověď organismu na podráždění receptorů. Jedním ze základních reflexů je tzv. úleková reakce, což je reakce na krátký intenzivní akustický podnět. Měření tohoto reflexu patří mezi důležité metody laboratorního behaviorálního testování.

Ke stanovení velikosti úlekové reakce se používá měření motorické odezvy na akustický stimul. U člověka je měřitelnou motorickou odezvou nejčastěji mrknutí oka, u laboratorních zvířat je to celotělový záškub, který je snímán akcelerometrem v detekční podlážce, na které je zvíře umístěno.

Pro měření úlekové reakce existuje značné množství komerčně dostupných aparatur, které ale nevyhovují svými parametry potřebám měření zaměřeného na výzkum sluchu. Většina laboratoří zkoumajících neurofyziologii sluchu si tak vytváří své vlastní aparatury, jejichž základním stavebním prvkem je nejčastěji real-time převodník RP2 od firmy Tucker-Davis Technologies [1-4]. Vzhledem k vysoké pořizovací ceně a širokým možnostem využití tohoto zařízení je vytvořena poptávka po alternativním zapojení aparatury pro měření úlekové reakce bez tohoto přístroje.

Tato práce se zabývá analýzou a řešením takových možností zapojení.

1.1 Cíle práce

- Analyzovat z dostupné literatury použitelné způsoby přístrojového zapojení pro měření akusticky vyvolané úlekové reakce a prepulzní inhibice.
- Navrhnout a vytvořit dle dostupného přístrojového vybavení v laboratoři na oddělení neurofyziologie sluchu ÚEM AV ČR softwarový nástroj pro generování zvukových stimulů použitelných pro vyvolání úlekové reakce, její snímání, záznam a analýzu.
- Vytvořený systém otestovat na laboratorních zvířatech a získané záznamy srovnat se záznamy z jiných systémů či literatury.

2 Teoretické základy práce

2.1 Behaviorální testování

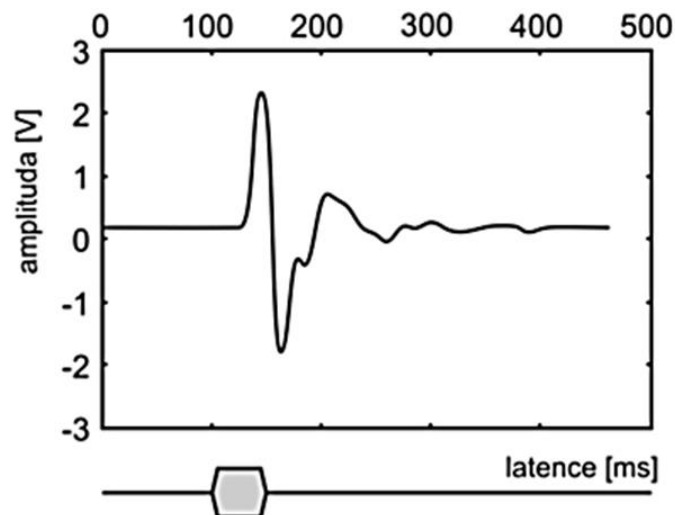
Behaviorismus je psychologický směr, který vznikl na počátku 20. století. Jeho hlavní myšlenkou je pojetí psychologie jakožto objektivní experimentální přírodní vědy, která pomocí pozorování a analýzy studuje chování (*behavior*) zvířat a lidí [5]. Chování jako takové je podle zakladatele behaviorismu J. B. Watsona pouze souborem reakcí živočicha na působící podnět. Hlavní schéma jakéhokoliv jednání je tak vedeno vzorcem: podnět (stimulus) → reakce [6]. Behaviorálním testováním se pak rozumí neinvazivní ovlivnění chování zvířete zvoleným podnětem za účelem pozorování jeho reakce. Tento způsob testování našel velké uplatnění především v neurofyziologii právě díky neinvazivnosti a také schopnosti zachytit i drobné změny ve funkci centrální nervové soustavy [7].

2.2 Úleková reakce

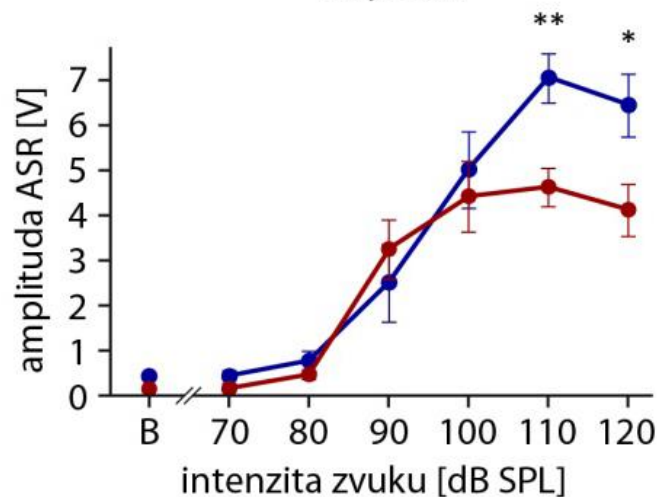
Chování lidí i zvířat je řízeno a regulováno řadou mechanismů, z nichž některé jsou vrozené (stereotypní) a jiné získané či naučené během života (adaptivní). Základním funkčním prvkem těchto mechanismů je automatická odpověď organismu na podráždění receptorů neboli reflex. Je to nervový děj, při kterém se přenáší vzruch z čidla (senzorická dráha) do centrální nervové soustavy a odtud k výkonnému orgánu (motorická dráha). Propojením těchto drah vzniká tzv. reflexní oblouk.

Je-li reflexní oblouk propojen již od narození, jedná se o tzv. nepodmíněný reflex, jehož existence je dána geneticky. Nepodmíněné reflexy bývají sice zpravidla jednoduché odpovědi na jednoduché podněty, avšak jejich velkou výhodou pro laboratorní využití je to, že jsou relativně neměnné. Za stejných podmínek se tedy vždy dostaví kvalitativně stejná reakce na tentýž podnět. To je základem pro využití jednoduchých nepodmíněných reflexů jako prostředku ke studiu patologických změn samotných reflexních drah či ke zkoumání vlivu okolních podmínek na tyto dráhy (např. působení farmak či nemocí). [8]

Jedním z nejjednodušších nepodmíněných reflexů je tzv. úleková reakce, neboli **startle reflex**. Je to automatická motorická reakce organismu (svalové trhnutí, mrknutí oka) na stres, který bývá nejčastěji vyvolán nečekaným intenzivním podnětem, který může být vizuální (světelný záblesk [9]), hmatový (proud vzduchu [10]) či akustický (impulz šumu). Startle reflex je společným nepodmíněným reflexem pro všechny savce [11] a lze ho tedy využít ke studiu u lidí i zvířat (v laboratorních podmínkách nejčastěji myši či potkanů).

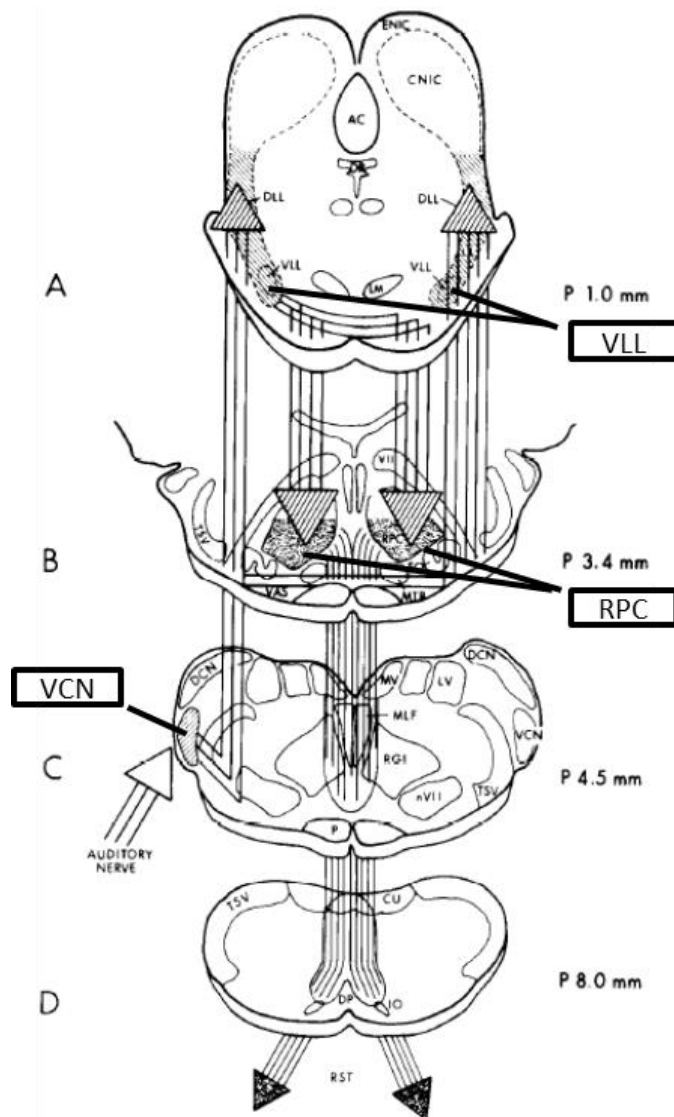


Obrázek 1: Ukázka průběhu odpovědi úlekové reakce akusticky vyvolané bílým šumem o intenzitě 110 dB SPL. [12]

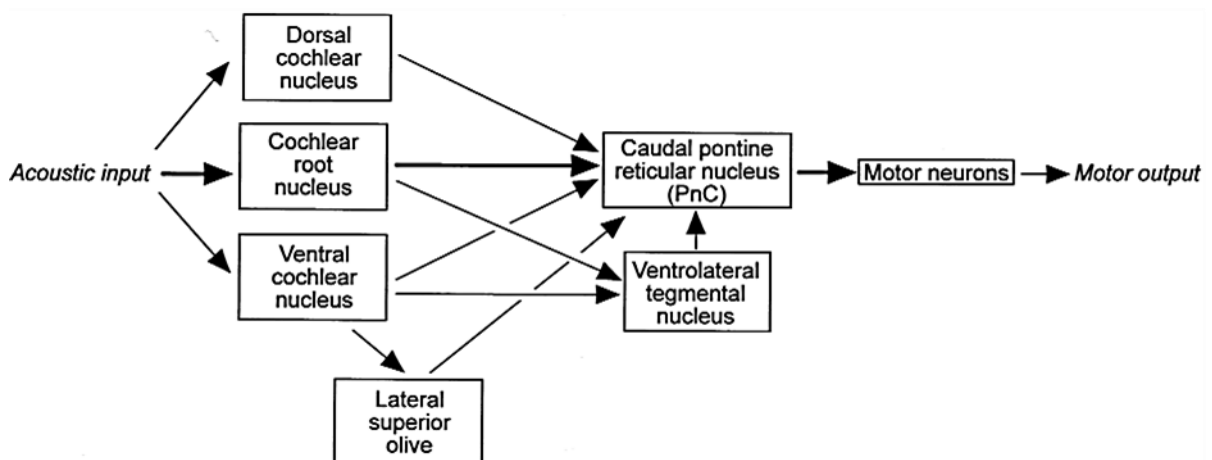


Obrázek 2: Ukázka závislosti amplitudy akusticky vyvolané úlekové reakce (ASR) na intenzitě stimulu (v tomto případě bílého šumu) u potkanů. Červená křivka odpovídá skupině zvířat vystavené v mládí krátké hlukové expozici, modrá křivka je kontrolní skupina zvířat. [12]

Aby došlo k vyvolání úlekové reakce zvukem, musí být intenzita podnětu větší než 80 dB SPL (viz Obrázek 1) [13]. Pak se jedná o tzv. akusticky vyvolanou úlekovou reakci (*acoustic startle reflex - ASR*). Zpracování tohoto reflexu probíhá po tzv. sluchové dráze (viz Obrázek 3 a Obrázek 4) na úrovni mozkového kmene (*Truncus cerebri*). Signál nejdříve přichází z vnitřního ucha (*Auris interna*) dále putuje sluchovými nervy do kochleárních jader a do jader v laterálním lemnisku (*Cochlear nucleus – Lemniscus lateralis*) a dochází k aktivaci motorického centra (*Nucleus caudalis*) v zadním retikulárním jádře Varolova mostu (*Nucleus reticularis pontis caudalis*) což je ústřední struktura celého reflexu [14, 15]. Dále je signál veden na míšní interneurony a motorické neurony, které zprostředkovávají svalovou odpověď. Celý tento reflexní oblouk je uzavřen za méně než 10 ms. Tato rychlá odezva je důležitá, neboť primární funkcí tohoto reflexu je ochrana organismu před nebezpečím (např. predátorem). [14]



Obrázek 3: Primární dráha akusticky vyvolané úlekové reakce prochází ze sluchového nervu do ventrálních kochleárních jader (VCN), odtud do ventrálních jader laterálního lemnisku (VLL) a dále do zadních retikulárních jader Varolova mostu (RPC) a poté přes míšní interneurony do motorických neuronů. (upraveno z [15])



Obrázek 4: Cesta akusticky vyvolané úlekové reakce a centra, která se podílejí na jejím zprostředkování. Tmavé šipky znázorňují nejrychlejší cestu stimulu k motorické odpovědi. [16]

U lidí se úleková reakce využívá například u novorozenců k ověření správné funkce centrálního nervového systému (především mozkového kmene) [17]. U dospělých jsou měření úlekové reakce nejčastěji zjišťovány psychiatrické poruchy. Výrazně zvýšená intenzita úlekové reakce bývá například naměřena u lidí postižených Touretteovým syndromem nebo autismem. [18, 19]

Vhodnou měřitelnou motorickou odezvou bývá nejčastěji mrknutí okem, případně záškub podočnicích svalů. Tyto odezvy se snímají buď elektromyograficky (elektrodami umístěnými na okulomotorických svalech) nebo opticky (kamerou).

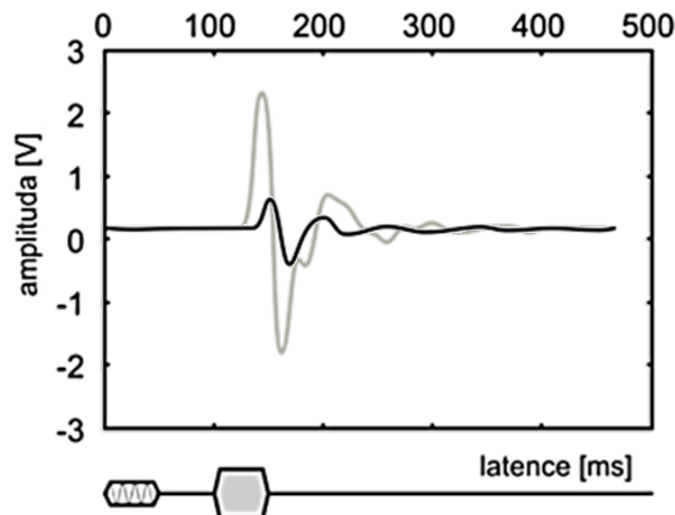
U hlodavců je motorická odezva úlekové reakce měřena zpravidla pomocí akcelerometrické podlážky, na které je zvíře umístěno. Při vybavení reflexu dochází k celotělovému záškubu kosterního svalstva hlodavce, jehož intenzita a průběh je podlážkou zaznamenán. Při měření úlekové reakce se stanovuje především amplituda a latence (zpoždění reakce vůči stimulu) odpovědi.

Většina studií používajících metodu měření úlekových reakcí se zabývá zjišťováním vlivu okolních podmínek na reflexní dráhu. Takovým vlivem může být například působení podaného farmaka. Úleková reakce je poté brána jako měřitelný indikátor účinků různých koncentrací tohoto farmaka na senzomotorický systém. Většina komerčně dostupných systémů pro měření úlekových reakcí u lidí a zvířat je orientována především na sledování vnějších vlivů (farmakologických, psychiatrických či genetických) na reflexní dráhu a pouze velmi málo z nich je určeno ke sledování patologických změn či neurobiologické podstaty reflexu.

2.2.1 Prepulzní inhibice úlekové reakce

Pokud hlavnímu stimulu předchází jiný slabší podprahový stimul (prepulz), dochází k tzv. **prepulzní inhibici** (PPI) úlekové reakce. Intenzita motorické reakce na následný hlavní stimul je poté oproti normální úlekové reakci výrazně snížena – inhibována (viz *Obrázek 5*). Je to dáno vrozenou schopností nervové soustavy omezit reakci na silný sensorický podnět, pokud mu předchází slabší varovný signál. Tento mechanismus je nutný k potlačení behaviorálně irelevantních informací, aby se mozek mohl vyrovnat s přebytkem sensorických informací. Narušením této filtrace může docházet k přesycení vyšších center mozku nevýznamnými podněty, což bývá charakteristickým symptomem například u schizofrenie [20, 21].

Důkazem, že prepulzní inhibice je nepodmíněný reflex, který nevznikl učením, je fakt, že se prepulzní inhibice uplatňuje již při prvním použití prepulzního signálu.



Obrázek 5: Ukázka průběhu odpovědi prepulzně inhibované úlekové reakce (černá barva) v porovnání s neinhibovanou odpovědí (šedá barva). Prepulzní inhibice byla vyvolána čistým tónem o intenzitě 60 dB, SPL hlavní impulz byl tvořen šumem o intenzitě 110 dB SPL. (upraveno z [12])

Hodnotu prepulzní inhibice vyjádřenou v procentech získáme poměřením intenzity reakce na stimul následovaný po varovném signálu vůči intenzitě reakce na samotnou úlekovou reakci. Vztah pro výpočet prepulzní inhibice v procentech je následující [2]:

$$PPI = \left(1 - \frac{\text{Amplituda ASR inhibovaná prepulzem}}{\text{Amplituda ASR bez prepulzu}} \right) \times 100$$

100% prepulzní inhibice tedy znamená úplné tj. 100% potlačení úlekové reakce prepulzem oproti amplitudě úlekové reakce bez předcházejícího slabšího stimulu. Velikost prepulzní inhibice je závislá na intenzitě prepulzu, který by neměl být hlasitější než 80 dB SPL, protože potom dochází k vyvolání regulérní úlekové reakce již samotným prepulzem.

Latence (inter-stimulus interval – ISI) varovného pulzu před hlavním pulzem by se u prepulzní inhibice měla pohybovat mezi 30 a 500 ms [14]. Pokud ani po více než 500 ms (někdy se uvádí po 1000 ms) od varovného stimulu nepřichází hlavní pulz, dochází k tzv. **prepulzní facilitaci**. Při té je naopak intenzita odpovědi na stimul vyšší než u samotné úlekové reakce. Je to dáno zvýšenou pozorností vyvolanou varovným pulzem po překročení inhibiční doby. Prepulzní facilitace také nastává, pokud je latence (zpoždění) mezi pulzy kratší než 20 ms, neboť zde již splývá odpověď na varovný stimul s odpovědí na stimul hlavní.

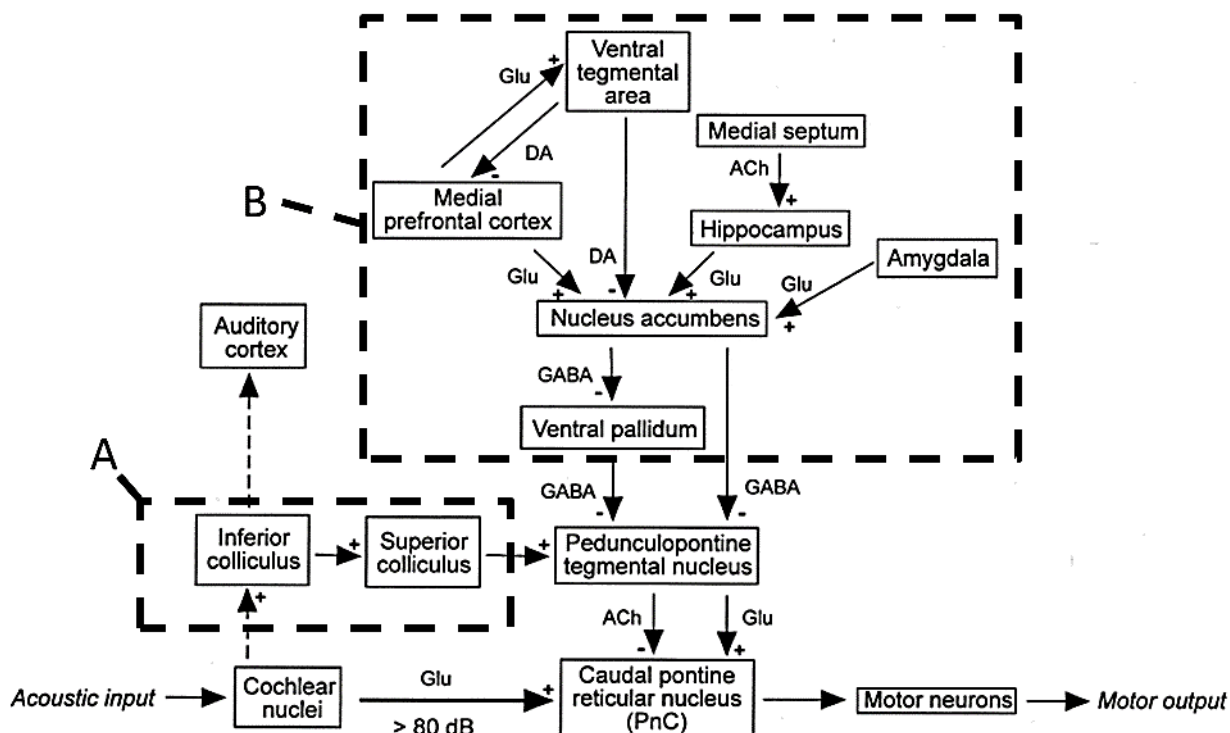
U lidí může být porucha prepulzní inhibice (či facilitace) asociována s některými psychiatrickými onemocněními (schizofrenické poruchy [20, 22], Huntingtonova

choroba [10], obsedantně-kompulzivní porucha [23], Touretteův [24] či Aspergerův syndrom [25]). Výrazný útlum prepulzní inhibice byl pozorován také například u lidí s posttraumatickou stresovou poruchou (*posttraumatic stress disorder – PTSD*) [26].

Prepulzní inhibice je mocný experimentální nástroj, který nachází využití při výzkumech v oblasti farmakologie, genetiky, lidské psychiatrie a především neurobiologie. [24]

Prepulzní inhibice je fyziologicky složitější proces (než samotná úleková reakce), při které se uplatňuje *inferior* a *superior colliculus* a *nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (viz Obrázek 6 - A), ale modulována může být i sluchovou kůrou, thalamem, amygdalou, hipokampem či jinými oblastmi mozku (viz Obrázek 6 - B). Roli zde hrají inhibiční neurotransmitery acetylcholin (*ACh*) a kyselina gama-aminomáselná (*GABA*). [27]

K měření prepulzní inhibice se využívá stejného postupu jako u měření úlekové reakce, změna je pouze v přidání varovného pulzu před hlavní stimul. Z technického hlediska je tedy možné použít stejnou měřicí aparaturu za předpokladu, že je možné navíc generovat i prepulzní signál. Důležitá je zde i sledování latence odpovědi, neboť při vyšších intenzitách prepulzů dochází k vyvolání úlekové reakce na ně, místo na hlavní stimul.



Obrázek 6: Komplexní propojení prepulzně inhibičního reflexu.

A - Primární okruh zprostředkovávající prepulzní inhibici (prepulz je slabší než 80 dB SPL).

B - Hypotetické propojení částí podílejících se na modulaci (redukci) prepulzní inhibice.

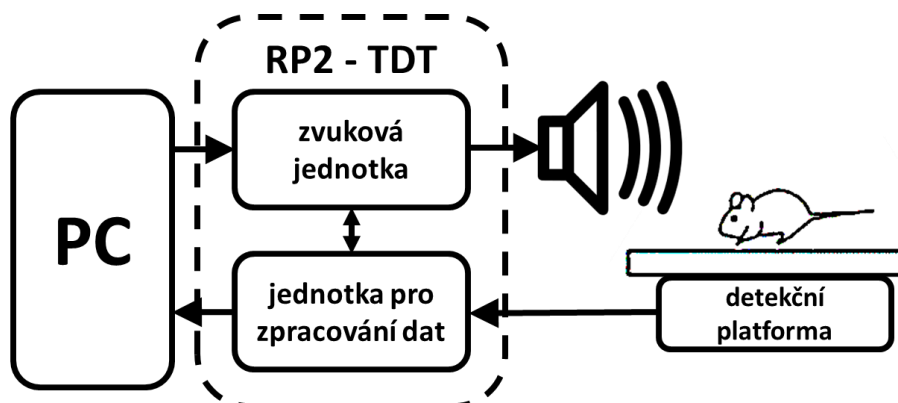
(upraveno z [16])

2.3 Měřicí aparatura

Při laboratorním měření úlekové reakce je zaznamenáván celotělový motorický záškrub zvířete detekční platformou v podlážce. Senzorem v platformě, který snímá odpověď, je piezoelektrický akcelerometr (např. MCM 28-745 [3]). Zvíře je uzavřeno v malé drátěné kličce (o přibližné velikosti testovaných zvířat) tak, aby mu byl znemožněn pohyb mimo detekční podlážku. Vše je umístěno do zvukově izolované komory (např. Coulbourn Habitest, model E10-21 [2]) ve zvukově izolované místnosti. Elektrický signál získaný z akcelerometru v platformě je zesílen, zpracován A/D převodníkem a přenesen do počítače. Ke stimulaci je v boxu umístěn kvalitní reproduktor (např. RT2H-A HiVi [21], Fostex FT17H [3], SEAS 29AF/W [2]) schopný rovnoměrně rozložit zvukovou energii. U některých aparatur pro měření prepulzní inhibice se občas používají reproduktory dva (jeden pro prepulz a druhý pro hlavní pulz). [28]

2.3.1 Real-time procesor RP2

Zvukové signály jdoucí do reproduktoru bývají nejčastěji [1-4] generovány programovatelným real-time procesorem (RP2) od firmy Tucker-Davis Technologies (TDT), který lze ovládat softwarem RP Visual Design Studio (RPvdsEx) od téže firmy. Stejný převodník se často používá i k zesílení a digitalizaci získaného napěťového signálu z akcelerometru (viz *Obrázek 7*).



Obrázek 7: Obecné schéma zapojení systému pro měření úlekové reakce.

Ve zvukové jednotce probíhá generování, digitalizace a zesilování stimulačních pulzů. Detekční platforma snímá piezoelektrickým akcelerometrem celotělové motorické záškruby zvířete a jednotka pro zpracování dat provádí zesílení, digitalizaci a synchronizaci dat před odesláním do počítače.

RP2 obsahuje dvoukanálový 24-bit/200kHz sigma-delta A/D převodník a dvoukanálový 24-bit/200kHz sigma-delta D/A převodník [29]

Toto zařízení je často v laboratořích používáno i k jiným účelům, například k měření akustickým podnětem vyvolané odpovědi mozkového kmene (*auditory brainstem responses*, ABR) [30]. Jelikož je pořízení tohoto zařízení nákladné (cena kompletu od firmy TDT stojí kolem 26 000 \$) a rozsah možností jeho použití v laboratořích zaměřených na výzkum sluchu je velmi široký, byl vznesen požadavek na vytvoření systému pro měření ASR bez tohoto procesoru.



Obrázek 8: Real-time procesor RP2 od firmy Tucker-Davis Technologies. [29]

3 Praktická část

3.1 Softwarové požadavky na řešení

Hlavním cílem této práce je navrhnout a vytvořit systém pro měření úlekové reakce použitelný na Oddělení neurofyziologie sluchu na Ústavu Experimentální medicíny AV ČR. Tento systém by neměl využívat převodníku RP2 od firmy TDT, ale celé zapojení by mělo být nahrazeno zvukovou kartou E-MU 0404. Hlavní součástí systému by měl být softwarový program schopný generovat, zaznamenávat a analyzovat data získaná z detekční platformy ve zvukotěsné komoře.

Požadavky na softwarovou část systému pro behaviorální testování laboratorních zvířat vycházejí z požadavků Oddělení neurofyziologie sluchu na Ústavu Experimentální medicíny AV ČR. Vytvořený program má splňovat tyto podmínky:

- měl by být vytvořen v programovacím jazyce Matlab
- všechny stimulační signály by měly být generovány softwarově v počítači
- vstupní i výstupní signály z počítače by měly přecházet přes zvukovou kartu s co nejmenším možným zpožděním.

3.2 Technické vybavení laboratoře

Laboratoř pro měření úlekových reakcí na Oddělení neurofyziologie sluchu ÚEM AV ČR v.v.i., pro kterou bude systém pro měření úlekové reakce a prepulzní inhibice vytvářen, disponuje tímto přístrojovým vybavením:

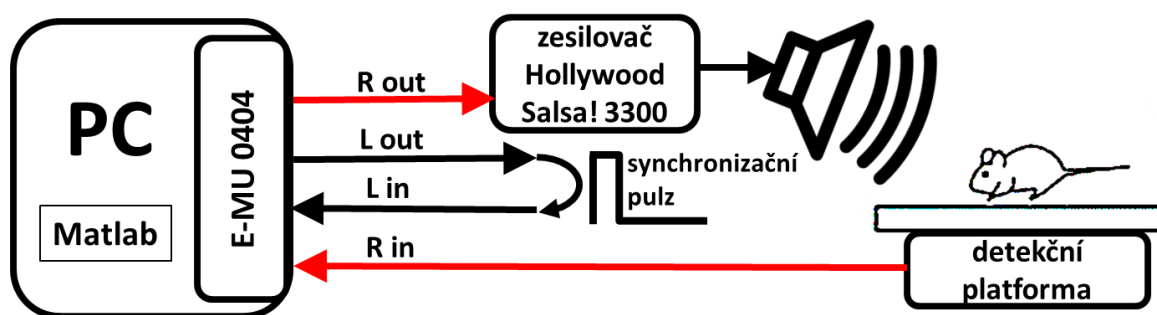
- zvukově izolovaná komora Coulbourn Habitest, model E10-21 ()
- reproduktor SEAS, 29AF/W umístění v komoře
- detekční platforma (Startle Sensor Platform) E45-11
- rozměrově různě drátěné klíčky pro omezení pohybu zvířete (E05-15, E05-20)
- zesilovač a ovladač detekční platformy Acoustic Startle Controller A10-21
- zesilovač Hollywood Salsa! 3300 pro zesílení stimulačních signálů



Obrázek 9: Přístrojové vybavení laboratoře pro měření úlekové reakce:
A: ovladač detekční platformy A10-21
B: drátěná klíčka E05-15
C: detekční platforma E45-11
D: izolovaná komora Coulbourn Habitest E10-21 s detekční platformou a klíčkou

3.3 Zapojení se zvukovou kartou

Chceme tedy vytvořit systém pro behaviorální testování sluchu na laboratorních zvířatech bez použití procesoru RP2 od firmy TDT tak, aby bylo možné vše ovládat z počítače s co nejmenší latencí (v reálném čase). Real-time procesor RP2 se používá ke generování a prezentaci stimulů a k synchronizaci a digitalizování záznamu z akcelerometrů v podlážce. Pokud chceme provádět generování stimulů i synchronizaci softwarově v počítači, zbývá nám nahradit oba (A/D i D/A) převodníky. Napěťové odpovědi přicházející z plošiny jsou relativně pomalé (do 60 Hz), takže není nutné je na vstupu vzorkovat příliš vysokou frekvencí. Šlo by tak využít k záznamu vstupního kanálu zvukové karty, která by zároveň přehrávala vygenerované stimulační pulzy (viz *Obrázek 10*). Druhým výstupním a vstupním kanálem karty by pak bylo možné provádět synchronizaci.



Obrázek 10: Schéma zapojení aparatury se zvukovou kartou E-MU 0404 PCIe.

Pravé kanály zajišťují cestu stimulačních signálů do komory a odpovědi z detekční platformy na kartu. Levé kanály jsou propojeny dohromady a prochází jimi synchronizační pulz (viz kapitola *Synchronizace*).

3.3.1 Zvuková karta E-MU 0404 PCIe

Jako nejvhodnější kandidát pro náš systém byla zvolena interní zvuková karta E-MU 0404, která se připojuje pomocí sběrnice PCI-Express (*PCIe*). Součástí této karty jsou analogové (6,3 mm jack), digitální i optické vstupy a výstupy, 24-bit/192kHz A/D (i D/A) převodník. [31]

Pro komunikaci může tato karta využívat ovladač *Audio Stream Input/Output (ASIO2)* od firmy *Steinberg*. Tento ovladač obchází uživatelské přístupy Windows a umožňuje přímý softwarový přístup k hardwaru zvukové karty, čímž velmi snižuje dobu odezvy (čas potřebný k předání dat mezi aplikací a zvukovou kartou). ASIO2 zároveň (na rozdíl od originálního rozhraní *DirectSound* od *Microsoft Windows*) umožňuje komunikaci se zvukovou kartou v reálném čase. [32]

E-MU 0404 umožňuje vzorkovat na frekvencích 44,1, 48, 88,2, 96, 176,4 a 192kHz. Na vstupu karty je umístěn A/D převodník PCM1804, který nepotlačuje stejnosměrnou složku, takže u výsledného naměřeného signálu by nemělo docházet ke zkreslení.

Všechny výše uvedené vlastnosti umožňují bez problémů použít kartu E-MU 0404 (jejíž cena se pohybuje kolem 4000 Kč) v zapojení místo převodníku RP2.



Obrázek 11: Interní zvuková karta E-MU 0404 PCIe s analogovými, digitálními a optickými vstupy a výstupy používající ovladač ASIO [31].

3.4 Programovací jazyk Matlab

Matlab je programovací jazyk 4. úrovně od firmy The MathWorks, Inc. určený především pro vědecké a inženýrské prostředí a pro vizualizaci dat. Klíčovou datovou strukturou, se kterou Matlab pracuje při výpočtech, jsou matice, což je ideální předpoklad pro práci se signály. Odtud pochází i název celého jazyka (Matlab = *MATrix LABoratory*). Pracujeme-li se signály, často jde o matice rozměru $1 \times n$, v této práci bude takovýto typ matice nazýván vektor.

Další vlastností tohoto jazyka je možnost doplnit jej o nadstavby (tzv. *toolboxy*) zaměřené na konkrétní oblasti problémů (např. zpracování signálů, obrazů či statistických dat). Uživatelé tohoto jazyka tak mohou využívat široké knihovny různých funkcí, případně si vytvořit své vlastní či používat funkce vytvořené jinými uživateli. [33]

Všechny tyto vlastnosti předurčují Matlab, jako ideální programovací jazyk pro generování a zpracování signálů v navrženém systému pro akustické behaviorální testování.

3.5 Co musí program splňovat

Jádrem celé aparatury je program vytvořený v programovacím jazyce Matlab. Aby bylo možné provádět tímto programem měření úlekových reakcí, je nutné, aby uměl:

- **vygenerovat** čistý tón (sinusový signál) a bílý šum o nastavitelných parametrech (viz kapitola 3.6.3: *Parametry stimulačních signálů*)
- vytvořit náhodnou (v nastavených mezích) několikasekundovou pauzu mezi jednotlivými pulzy při měření (viz kapitola *Čas mezi pulzy (inter-trial interval)*)
- zařadit do seznamu pulzů prázdný tzv. *tichý stimul*, který vypovídá o aktivitě zvířete bez stimulace (*baseline activity*)
- **opakovat** několikrát měření na vytvořených pulzech v náhodném pořadí
- **synchronizovat** záznam ze zvukové komory se začátkem přehrávání zvukového pulzu (viz kapitola 3.9: *Záznam signálu*)
- **zobrazit** nahraný signál a automaticky z něj vypočítat velikost motorické odpovědi zvířete (viz kapitola 3.10: *Amplituda úlekové reakce a Zobrazení výsledků*)
- **uložit** či **exportovat** do jiného programu naměřené výsledky.

3.6 Stimulační signály

Pro potřeby měření úlekových reakcí a prepulzní inhibice se nejčastěji používají dva typy stimulačních signálů: čistý tón nebo bílý nekorelovaný šum, případně kombinace obou jako prepulzu a pulzu.

Tón je ve své podstatě harmonický sinusový signál o dané frekvenci a amplitudě.

Bílý šum je definován jako šum, který má v ideálním případě rovnoměrnou výkonovou spektrální hustotu, tedy má konstantní nenulovou intenzitu na všech frekvencích v celém nekonečném rozsahu. Takový šum samozřejmě nemůže v praxi existovat, proto je frekvenční rozsah omezen na hranice slyšitelnosti člověka (20 Hz – 20 kHz) [34]. V praxi je pak bílý šum generován jako nekorelované náhodné hodnoty s normálním rozložením, nulovou střední hodnotou a konstantní směrodatnou odchylkou. [35]

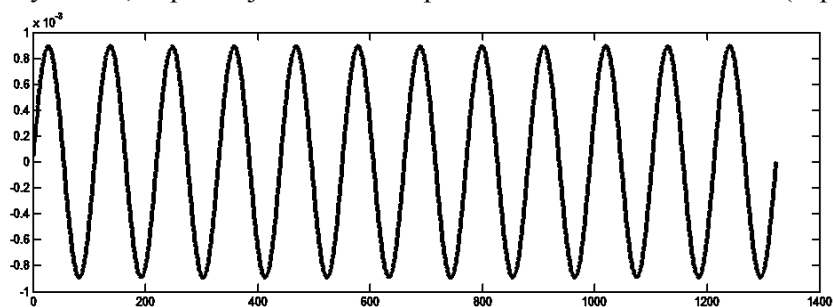
3.6.1 Generování stimulačních signálů

Programovací jazyk Matlab má v sobě integrováno mnoho základních funkcí, které lze při programování používat. Například pro vytvoření vektoru sinusového signálu existuje v Matlabu funkce *sin* [36], jejíž zápis v kódu je znázorněn níže (viz *Kód 1*).

```
tón = A * sin(2 * pi * f * s);
```

Kód 1: Příkaz pro vytvoření sinusového tónu.

A: amplituda výsledného sinu; pi: hodnota Ludolfova čísla; f: frekvence požadovaného tónu v Hz; s: časový vektor, odpovídající délce tónu při dané vzorkovací frekvenci (např. 44100).



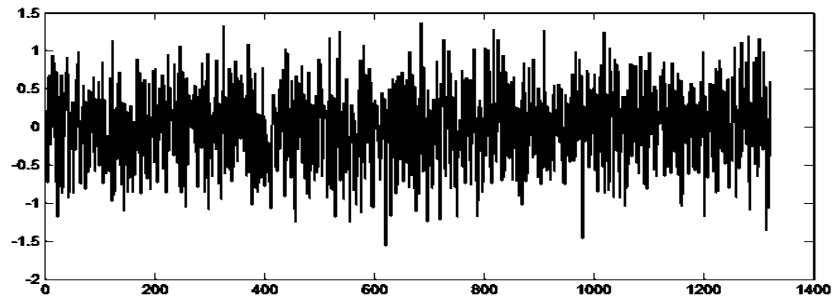
Obrázek 12: Sinusový signál o frekvenci 400 Hz a délce 30 ms vytvoření funkcí *sin*.

Pro generování bílého šumu je možné využít funkce *randn* (viz *Kód 2*), která vrací vektor pseudonáhodných čísel s normálním rozdělením a směrodatnou odchylkou 1. [36]

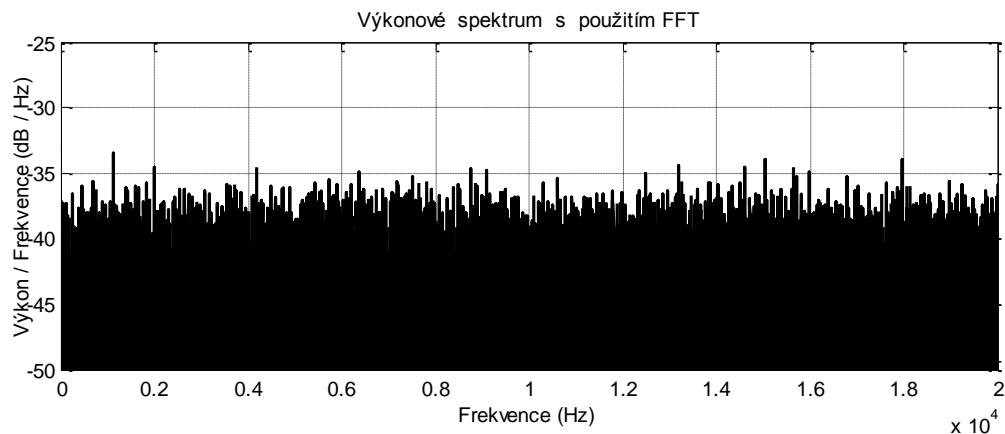
```
šum = SD * (randn(n, 1))';
```

Kód 2: Příkaz pro vytvoření bílého šumu. *n* je počet vzorků požadovaného úseku šumu.

Jednička v závorce udává, že požadujeme pouze jeden řádek o *n* vzorcích; *SD* před závorkou určuje výslednou směrodatnou odchylku pseudonáhodného vektoru čísel.



Obrázek 13: Záznam 30 ms bílého šumu se směrodatnou odchylkou 0,5 vytvořeného funkcí *randn*.



Obrázek 14: Výkonové spektrum signálu bílého šumu vytvořeného funkcí *randn* splňuje podmínku téměř konstantní hladiny výkonu v celém frekvenčním rozsahu (od 20 Hz do 20 kHz).

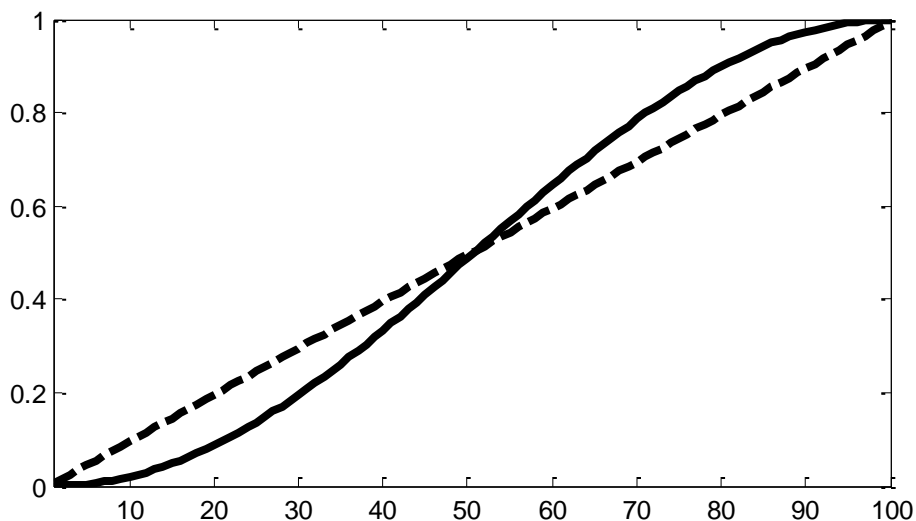
Pomocí obou těchto funkcí dokážeme vytvořit jak tón o libovolné frekvenci, tak šum o libovolné směrodatné odchylce.

3.6.2 Náběžná a sestupná hrana

Při skokové změně intenzity u přechodu z ticha na čistý sinusový tón dochází k akustickým artefaktům v podobě rozšíření spektra frekvencí (tzv. klikům), které mohou výrazně ovlivnit reakci zvířete při měření.

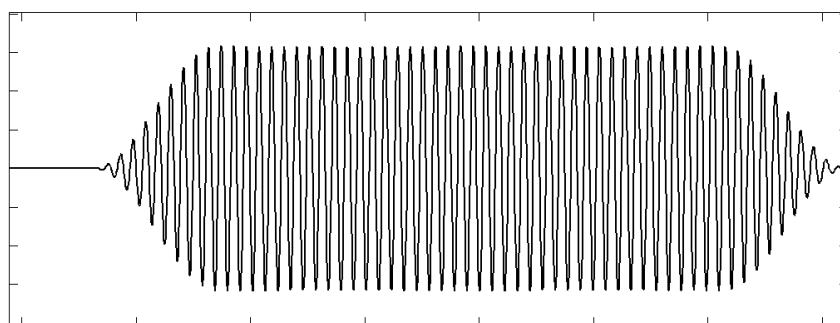
Aby k těmto klikům nedocházelo, je nutné zmírnit skokový přechod tvarováním začátku signálu tzv. *náběžnou hranou*. Tvarování se provádí nejčastěji funkcí či použitím tzv. časových oken (které se používají například při návrhu filtrů). Lze použít tvarování lineární funkcí, ale zde jsou problémová místa zlomů, proto se nejčastěji využívá tvar druhé mocniny kosinu (viz Obrázek 15), který má velmi hladký průběh. Kosinus na druhou se někdy též nazývá Hannovo okno.

U pulzů trvajících desítky milisekund bývá délka náběžné hrany i 5 či 10 ms.

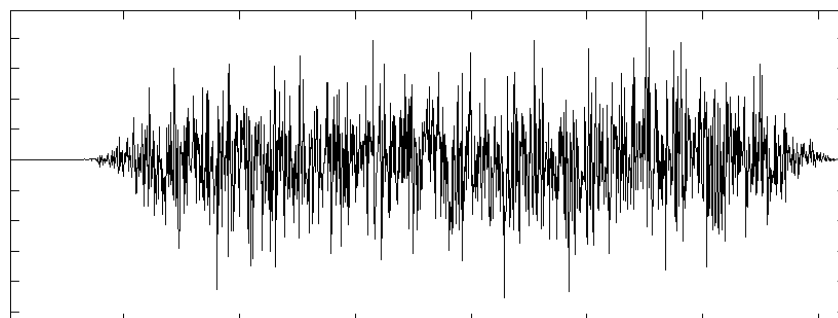


Obrázek 15: Srovnání lineárního (čárkovaně) a na druhou umocněného kosinového (plná černá) náběhu (neboli Hannova okna). Na ose x je čas, na ose y amplituda.

Kliky mohou vznikat i na konci signálu (opět prudkou změnou intenzity), proto se i zde používá tvarování konce signálu tzv. *sestupnou hranou*, která je stejná jako náběžná (akorát horizontálně převrácená). Tvarovaný signál pak může vypadat například tak, jak je znázorněno na *Obrázek 16*.



Obrázek 16: Ukázka 30 ms **sinusového signálu** s 5ms náběžnou a 5ms sestupnou hranou tvarovanou podle funkce kosinus na druhou.



Obrázek 17: Ukázka 30 ms **bílého šumu** s 5ms náběžnou a 5ms sestupnou hranou tvarovanou podle funkce kosinus na druhou.

3.6.3 Parametry stimulačních signálů

Aby bylo možné vytvořit v programu kompletní vektor pulzu pro stimulaci zvířete, je nutné mít v něm možnost nastavit všechny potřebné parametry. Mezi základní parametry patří:

- **typ stimulačního pulzu** (bílý šum či čistý tón)
- **intenzita** (odpovídající hladina akustického tlaku)
- **frekvence** (u čistých tónů)
- **délka trvání pulzu**
- **délka náběžné a sestupné hrany pulzu**
- **latence** mezi prepulzem a hlavním pulzem (*inter-stimul interval*) u PPI

Všechny parametry mají v programu nastavitelnou hodnotu výběrem z rozevíracího seznamu, což byl také jeden z požadavků ÚEM. V porovnání s možností ručního vepisování hodnot je toto řešení jednodušší a urychluje ovládání programu uživatelem. Pokud by bylo požadováno rozšířit rozsah parametrů o nové hodnoty, lze je do kódu kdykoliv jednoduše implementovat.

Intenzita

Zvuk v prostoru představuje vlnění, které v daném prostředí vychyluje hodnoty tlaku od základního atmosférického tlaku. Tyto výchylky se označují jako akustický tlak (p). Aby bylo možné lépe zachytit vliv akustického tlaku na lidský sluch, používá se veličina nazývaná *hladina akustického tlaku* (*SPL* z anglického *Sound Pressure Level*) s jednotkou decibel (*dB*). V literatuře nejčastěji najdeme označení *dB SPL*.

Jedná se o dekadický logaritmus podílu efektivní hodnoty akustického tlaku (p) a referenční hodnoty akustického tlaku (p_0), což je minimální hodnota akustického tlaku, kterou je ještě schopen zaznamenat nepoškozený lidský sluch. Ve vzduchu je referenční hodnota akustického tlaku $2 \cdot 10^{-5}$ Pa. Hladinu akustického tlaku lze tedy vyjádřit rovnicí:

$$SPL = 20 \cdot \log\left(\frac{p}{p_0}\right)$$

U měřicí aparatury musí být provedena kalibrace tak, aby bylo možné určovat při vytváření pulzů přímo odpovídající hladinu akustického tlaku (*dB SPL*) pro každý přehrávaný pulz.

Běžný rozsah hladin akustického tlaku při měření úlekových reakcí se pohybuje od 60 do 120 dB SPL u hlavních stimulů a od 10 do 80 dB SPL u prepulzů. [12]

V programu je možné nastavit tyto hodnoty akustického tlaku u prepulzu: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 dB SPL a u hlavního pulzu: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105, 110 a 115 dB SPL. Také je možné nastavit hladinu -110 dB SPL, která označuje tzv. tichý podprahový stimul neslyšitelný pro zvíře. Tento stimul se používá v sériích měření jako indikátor základní (*baseline*) aktivity zvířete.

Frekvence

Frekvenční rozsah slyšitelnosti je u člověka 20 Hz – 20 kHz, laboratorní hlodavci však mohou mít frekvenční rozsah mnohem větší a to až do 50 kHz [37]. Záleží na kmenu zvířete a také na jeho stáří. Pro stimulace při měření úlekových reakcí se nejčastěji používají frekvence 2, 4, 8 a 16 kHz (ale někdy i např. 32 kHz u mladých zvířat [30]). V programu je možné nastavit frekvence 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 a 16 kHz u prepulzu i hlavního pulzu.

Délka pulzu

Délky stimulačních pulzů (i prepulzů) se pohybují v desítkách milisekund. Nejčastěji se používá 50 ms pulz. V navrženém programu je možné nastavit délky prepulzů na 10, 20, 30, 40, 50 a 60 ms a délky hlavních pulzů na 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 a 200 ms.

Délka náběžné a sestupné hrany

Tvarování pulzů a důvody použití náběžné a sestupné hrany jsou vysvětleny v kapitole 3.6.2: *Náběžná a sestupná hrana*. Délka náběžné hrany bývá většinou 5 ms. V programu je možné nastavit délku hrany na 1 (pro použití u kratších pulzů) či 5 ms.

Latence mezi prepulzem a pulzem (inter-stimulus interval)

V tomto případě je latencí, neboli zpožděním, myšlena časová vzdálenost mezi prepulzem a hlavním pulzem (*inter-stimulus interval – ISI*). Tato vzdálenost velmi ovlivňuje účinky a velikost prepulzní inhibice. *ISI* by měl být vyšší než 30 ms a zároveň by neměl překročit 500 ms. Obvykle se latence mezi prepulzem a pulzem volí okolo 50 ms. [30] V navrženém programu je možné zvolit latence 0, 30, 40, 50, 60, 80, 100 a 120 ms.

3.7 Full-duplexní komunikace

Další překážkou při vytváření programu je problematika souběžné oboustranné (tzv. *full-duplexní*) komunikace Matlabu a zvukové karty. Aby byl software funkční a použitelný, musí zároveň s přehráním stimulačního pulzu probíhat synchronizovaně i nahrávání odpovědi přes analogový vstup karty. Originální funkce Matlabu pro přehrávání zvuku (*sound*, *soundsc* atd.) toto bohužel neumožňují. Existuje toolbox pro Matlab, který by tento problém překonal (*DSP System Toolbox*), ale ten není součástí licence Matlabu na Ústavu experimentální medicíny (k dispozici je pouze *Signal Processing Toolbox*). Tento problém byl vyřešen použitím volně dostupného softwarového balíčku *Psychophysics Toolbox* (*Psychtoolbox*).

3.7.1 Psychophysics Toolbox

Balíček *Psychtoolbox* je soubor funkcí v Matlabu, který byl vytvořen pro rychlejší prezentaci a synchronizaci vizuálních a akustických stimulů v psychofyzikálních aplikacích. Jádrem *Psychtoolboxu* jsou soubory *Matlab Extension (MEX)*, které jsou psané v programovacím jazyce C a zkompileovány do objektových souborů rozpoznatelných Matlabem. [38]

Pro účely navrhované aplikace je důležitý ovladač *PsychPortAudio*, který je součástí balíčku. Ten umožňuje asynchronní full-duplexní operace, tedy souběžné synchronizované přehrávání a nahrávání přes zvukovou kartu na pozadí, zatímco Matlab provádí další operace.

Po bezplatném stažení (ze stránek: <http://docs.psychtoolbox.org/PsychPortAudio>) a automatické instalaci lze *Psychtoolbox* ovládat přímo z Matlabu. Pro nastavení duplexní komunikace je nutné vložit do programu příkazy (viz *Kód 3*), jejichž použití je podrobně popsáno na stránkách poskytujících *Psychtoolbox*. V zásadě jde o vytvoření dvou objektů zvukového ovladače se stejnými parametry, z nichž jeden je určen k výstupu ze zvukové karty (*paoutput*) a druhý k záznamu vstupních signálů (*painput*). Oba tyto objekty jsou přepnuty na plně duplexní mód (*Kód 3 - B*), který *Psychtoolbox* umožňuje. Poté je do vyrovnávací paměti (*bufferu*) výstupního objektu nahrán výstupní signál a objekt je spuštěn (*Kód 3 - D,E*). Po celou dobu jednoho přehrávání (je možné nastavit i vícenásobné přehrávání) je zároveň do druhého objektu nahráván signál ze vstupu zvukové karty, který má tedy stejnou délku jako výstupní signál (je nutné prodloužit výstupní vektor stimulačního signálu na požadovanou délku nahrávané odpovědi). Po dokončení přehrávání je vše zastaveno (*Kód 3 - G*) a data z vstupního objektu jsou uložena do matice (*Kód 3- H*).

```

A: InitializePsychSound;
B: painput = PsychPortAudio('Open', [], 3, 2, Fs, 2, [], 0.010);
C: paoutput = painput;
D: PsychPortAudio('FillBuffer', paoutput, [XL;XR]);
E: PsychPortAudio('Start', paoutput, 1, 0, 1);
F: s = PsychPortAudio('GetStatus', painput);
G: PsychPortAudio('Stop', painput,1);
H: audiodata = PsychPortAudio('GetAudioData', painput);

```

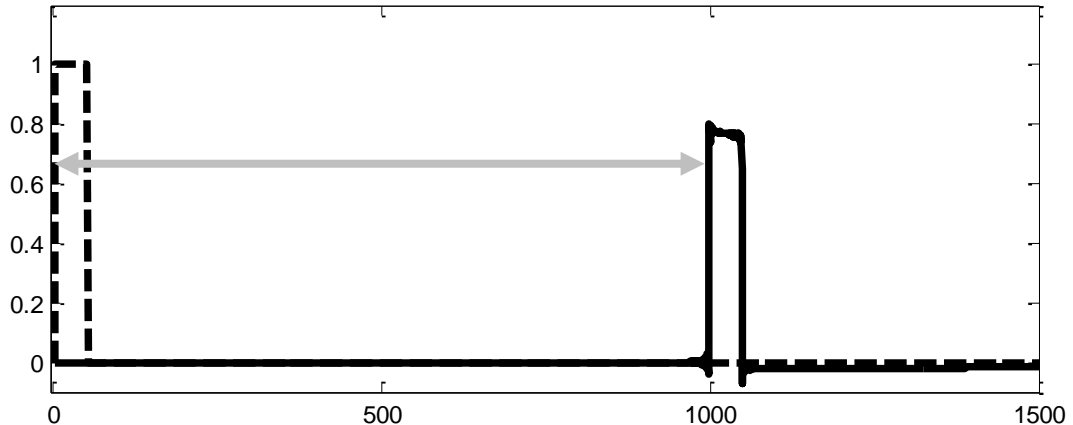
Kód 3: Příkazy, kterými lze z Matlabu kompletně ovládat duplexní komunikaci se zvukovou kartou pomocí Psychtoolboxu:

- A:** na začátku skriptu načte zvukový ovladač PsychPortAudio.
- B:** vytváří vstupní objekt zvukového ovladače s příslušnými parametry: 3 v závorce znamená, že požadujeme plně duplexní mód objektu, 2 znamená, že objekt přebírá plnou kontrolu nad zvukovým zařízením, F_s je vzorkovací frekvence se kterou má objekt pracovat (automaticky 44100 kHz) a 2 za ní označuje počet kanálů. 0,010 je ideální požadovaná latence v sekundách.
- C:** vytvoří stejný objekt jako přechází řádek, tento však bude použit na výstup
- D:** naplní buffer výstupního zvukového objektu dvoukanálovým signálem (XR je pravý a XL levý kanál; je nutné, aby oba signály měly stejnou vektorovou délku)
- E:** spustí zvukové objekty; v plně duplexním módu začne současně jeden objekt nahrávat a druhý přehrávat; první 1 v závorce označuje, že chceme, aby se daný signál přehrál pouze jednou
- F:** vrací informaci o stavu objektu; 1 znamená, že přehrávání či záznam jsou stále aktivní, 0 identifikuje neaktivní stav (pozastavení či ještě nespuštěný)
- G:** zastaví přehrávání či záznam objektu; 1 znamená, že se tak stane po dohrání aktuálního signálu
- H:** uloží do proměnné *audiodata* oba kanály (matice 2×n) nahraného signálu ze vstupního objektu.

3.8 Synchronizace

Veškeré kroky od výběru zvukové karty až po implementaci *Psychtoolboxu* do softwarové aplikace byly provedeny s ohledem na maximální možné snížení časové odezvy v komunikaci se zvukovou kartou. K určitému drobné zpoždění ale bude docházet vždy. Jedním z hlavních úkolů programu je však stoprocentně přesná identifikace začátku prezentace stimulu se začátkem nahrávání odpovědi.

Abychom tuto přesnou synchronizaci výstupu se vstupem zajistili, použijeme tzv. **synchronizační pulz**. Jedná se o jednoduchý jednotkový impulz o délce několika desítek vzorků (v programu 50) na začátku, doplněný nulami do délky stimulačního pulzu (viz *Obrázek 18*). Synchronizační pulz je přehráván zvukovou kartou ve druhém kanálu zároveň se stimulačním pulzem v prvním kanálu (je proto nutné, aby měly stejnou délku). Druhý výstupní kanál (out L) zvukové karty je analogově propojen s druhým vstupním kanálem (in L). Synchronizační pulz je tedy přehráván a zároveň nahráván. Každý posun jednotkového impulzu na snímaném signálu vůči prezentovanému synchronizačnímu pulzu odpovídá posunu nahraného signálu vůči přehrávanému. Tento posun lze poté při zobrazování získané odpovědi vykompenzovat (viz *Kód 4*).



Obrázek 18: Tvar vytvořeného synchronizačního pulzu o délce 50 vzorků (*čárkovaně*). Podoba synchronizačního pulzu po průchodu zvukovou kartou (*plná čára*). Kromě drobného zkreslení je vidět i posun (*šipka*), který je zde přibližně 1000 vzorků (na ose x je počet vzorků signálu). To odpovídá (při vzorkovací frekvenci 44100 Hz) latenci kolem 22 ms což je v porovnání s časem ITI mezi stimuly zanedbatelná doba.

Zároveň lze synchronizačním pulzem sledovat zkreslení, ke kterému dochází na zvukové kartě při převodu digitálního signálu na analogový a zpět. Při zobrazení synchronizačního po průchodu kartou E-MU 0404 je vidět pouze velmi drobné zkreslení (viz *Obrázek 18*). Náběžná hrana pulzu je velmi dobře zachytitelná, a tak není těžké určit zpoždění.

3.9 Záznam signálu

Záznam signálu z měřicí plošiny probíhá pomocí vstupního A/D převodníku zvukové karty E-MU 0404, která je řízena ovladačem ASIO a Psychtoolbox příkazy z Matlabu. Výsledný záznam je uložen do matice $2 \times n$, kde n je počet vzorků zaznamenaného signálu, který je shodný s počtem vzorků stimulačního signálu. Matice má 2 řádky, protože nahrávání probíhá stereo z obou kanálů. Do druhého kanálu je nahráván synchronizační pulz, který je použit pro kompenzaci odezvy karty. Výsledná odpověď zvířete je vektor prvního kanálu (první řádek matice) počínaje vzorkem, ve kterém byla nalezena náběžná hrana synchronizačního pulzu v druhém kanálu (viz *Kód 4*).

```
A: Y=audiodata(2,1:0.6*Fs);  
B: [~,idx2]=find(audiodata(1,1:0.6*Fs)>0.3);  
C: if length(idx2)>30  
    X(i,:)=Y(1,idx2(1,1):idx2(1,1)-1+Fs/2);  
    end
```

Kód 4: Kompenzace zpoždění začátku hledáním náběžné hrany synchronpulzu.

- A:** Vektor nahrané odpovědi z pravého kanálu je z matice *audiodata* uložen do proměnné *Y*.
- B:** Nalezení pozic všech vzorků nahraného synchronpulzu větších než mez (0.3)
- C:** Pokud je nalezeno alespoň 30 vzorků překračující mez je poloha prvního z nich určena jako náběžná hrana synchronpulzu a od jejího počátku je do matice *X* (do řádku *i* odpovídajícímu pořadí pulzu v sérii) uloženo 0.5 s naměřeného signálu (poloviční počet vzorků než je vzorkovací frekvence *Fs*, která je jako výchozí nastavena na 44100 Hz).

Průběh nahraného signálu odpovědi je poté zobrazen v grafickém uživatelském rozhraní a je provedena automatická detekce velikosti její amplitudy, která je základní výstupní veličinou celého měření.

3.10 Amplituda úlekové reakce

Pro stanovení velikosti odpovědi je užito jednoduchého systému rozdílu absolutního maxima a absolutního minima naměřeného signálu (tzv. *peak-to-peak*). Absolutní minimum je hledáno v Matlabu funkcí *min*, která vrací nejen hodnotu minima, ale i jeho polohu (index) ve vektoru. Jakmile je lokalizováno minimum, probíhá v oblasti od počátku do polohy minima hledání lokálního maxima, funkcí *max* (viz *Kód 5*).

```
A: [minX, idxminX] = min(X(i, :));  
B: [maxX, idxmaxX] = max(X(i, 1:idxminX));  
C: listPtP(i, :) = [minX, idxminX, maxX, idxmaxX, abs(maxX) + abs(minX)];
```

Kód 5: Část kódu pro stanovení amplitudy úlekové reakce.

- A:** nalezení velikosti (*minX*) a polohy (*idxminX*) absolutního minima vektoru odpovědi.
- B:** nalezení velikosti (*maxX*) a polohy (*idxmaxX*) maxima v úseku od počátku do polohy minima.
- C:** uložení velikosti a polohy obou extrémů a výpočet a uložení jejich vzdálenosti (*peak-to-peak*), tedy součtu jejich absolutních hodnot ($\text{abs}(\text{maxX}) + \text{abs}(\text{minX})$)

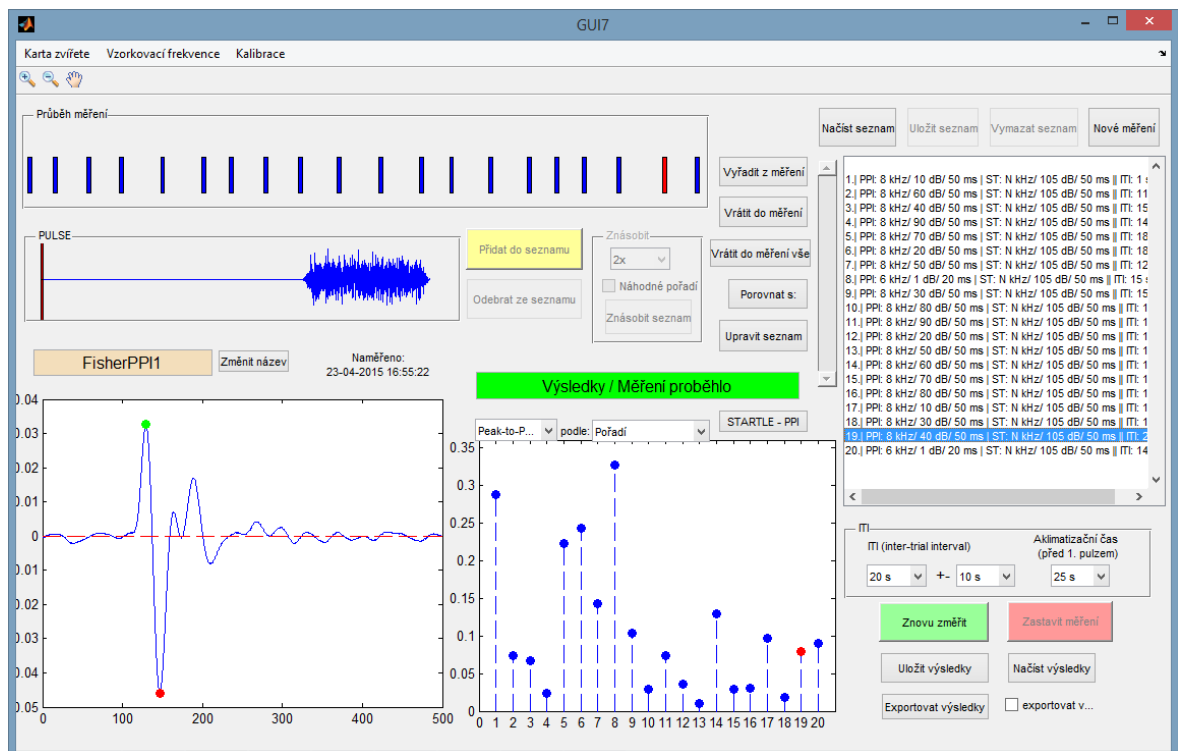
Po nalezení obou extrémů, jsou v grafickém uživatelském rozhraní do průběhu signálu odpovědi umístěny barevné body (zelený pro maximum a červený pro minimum) do místa jejich lokalizace. Uživatel má tímto přehled, kde bylo maximum a minimum nalezeno. Zároveň se do grafu pro zobrazení výsledků vykreslí celková hodnota *peak-to-peak*.

Při měření biologických veličin někdy dochází k různým artefaktům (např. spontánním pohybem zvířete v době záznamu signálu) či odchýlkám, proto je tento systém vybaven možností buď přímo daná data vyřadit z dalšího zpracování, nebo alespoň uživatelsky zasáhnout do automatické lokalizace maxima a minima a zpřesnit je. Po kliknutí uživatele do grafu s průběhem pulzu je aktivována možnost změnit lokální minimum a maximum (o čemž je uživatel informován) pouhým kliknutím buď levým tlačítkem (pro minimum) nebo pravým (pro maximum) do přibližného místa uživatelem stanoveného extrému. V blízké oblasti místa kliknutí (cca 10 ms na každou stranu) je poté provedeno nové nalezení a zobrazení maxima či minima. Velikost amplitudy je také ihned přepočítána a vykreslena na grafu zobrazujícím amplitudy naměřených odpovědí.

3.11 Grafické uživatelské rozhraní

Grafické uživatelské rozhraní je grafické rozhraní, které umožňuje uživateli ovládat počítačový program klikáním myši na interaktivní grafické ovládací prvky (okna, ikony, tlačítka, posuvníky atd.), případně umožňuje do některých prvků (např. textová pole) vypisovat znaky pomocí klávesnice. [39]

V jazyce Matlab lze k vytváření grafického rozhraní použít speciální nástroj tzv. GUIDE (*graphical user interface design environment*). V něm je možné navrhnout přesnou podobu výsledného rozhraní vkládáním tlačítek (*push button*), grafů (*axes*), textů (*static text*), seznamů (*listbox*) a mnoha dalších. [40]



Obrázek 19: Podoba výsledného grafického uživatelského rozhraní programu. Jednotlivé jeho části jsou vysvětleny v kapitole 3.12: *Módy programu* a jejich podkapitolách.

Nástroj GUIDE ukládá podobu grafického rozhraní, tak jak ji navrhl programátor, do souboru typu *MATLAB figure* (s koncovkou *.fig*). Zároveň však pro toto rozhraní automaticky vygeneruje i příslušný kód v Matlabu (typ *MATLAB code* s koncovkou *.m* tzv. *m-file*).

Celý navržený program je tak tvořen pouze jedním souborem typu *m-file* a jedním typem *.fig*, které spolu s nainstalovaným programem Matlab (obsahujícím *Signal Processing Toolbox* a *Psychtoolbox*) a ovladačem ASIO dostačují k používání programu.

3.11.1 Sdílení proměnných mezi funkcemi

Chceme-li vytvářet složitější program ovladatelný přes grafické rozhraní, je výhodné si nejprve načrtnout rozložení prvků nástrojem GUIDE a poté teprve vpisovat potřebné příkazy a funkce do vygenerovaného *m-file*. Nástrojem GUIDE lze poté přidávat další prvky, k nimž lze v kódu dopisovat další příkazy. Jedinou nevýhodou tohoto uspořádání je, že jednotlivé funkce v automaticky vytvořeném kódu *m-file* spolu nesdílejí proměnné. Tento problém lze obejít buď deklarováním všech proměnných jako tzv. *globální* (platné pro celý kód). Pak je ale potřeba vytvořit mnoho odlišně nazvaných proměnných, jinak hrozí riziko duplicitního použití stejně pojmenované proměnné ve více funkcích. Druhou možností je na konci funkce uložit potřebné proměnné do tzv. *UserData*, což je část paměti vytvořená u každého interaktivního objektu v *GUIDE*, do níž lze uložit právě jednu proměnnou (o libovolné velikosti například matici 1000×1000). Každý objekt má svou část *UserData*, takže je možné takto skladovat i poměrně velké množství proměnných. Na začátku každé funkce pak lze konkrétní potřebnou proměnnou vyvolat z této paměti příslušným příkazem (viz *Kód 6*).

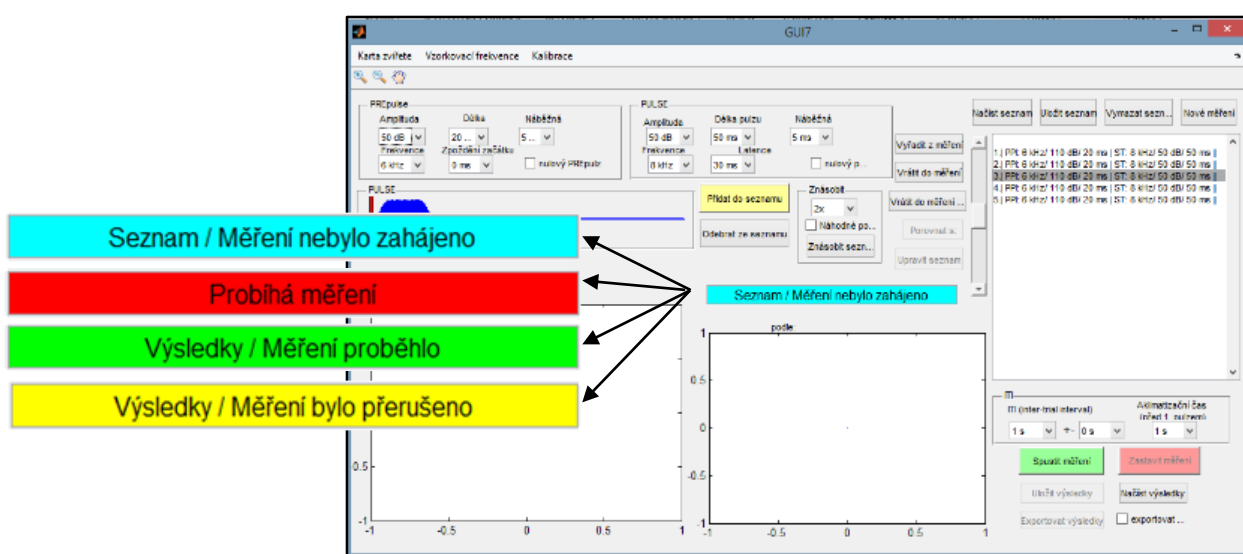
```
A: listPULSES = get(handles.axes1, 'UserData');  
B: set(handles.axes1, 'UserData', listPULSES);
```

Kód 6: Soubor příkazů pro předávání proměnných mezi funkcemi v *m-filu*:

- A:** uloží do proměnné *listPULSES* obsah paměti *UserData* příslušící objektu *axes1*.
- B:** uloží proměnnou *listPULSES* do paměti *UserData* objektu *axes1*.

3.12 Módy programu

Časově nejnáročnější fází tvorby programu bylo propojování jednotlivých funkčních částí s grafickými objekty vytvořenými nástrojem *GUIDE*. Pro jednodušší orientaci uživatele (i pro lepší vysvětlení jeho tvorby) byl program rozdělen do tří různých funkčních skupin – **módů**, ve kterých je možné program používat. Jde o funkce zpřístupněné **před** zahájením měření, **během** samotného měření a **po** něm. Mezi těmito třemi módy lze program libovolně přepínat například spuštěním či přerušením měření nebo nahráním výsledků předchozího měření. Aktuální mód programu je také velmi výrazně slovně i barevně signalizován na panelu v prostřední části programu (viz *Obrázek 20*)



Obrázek 20: Zobrazení signalizace různých módů programu a jejich umístění v okně uživatelského prostředí.

3.12.1 Před měřením

Před započítím měření je nutné především vytvořit seznam stimulačních pulzů. To je možné pouze v tomto jediném módu programu. Také je možné nahrát již existující seznam pulzů, což by mělo ulehčit práci při opakovaném měření stejné série pulzů.

Tvorba stimulačních pulzů

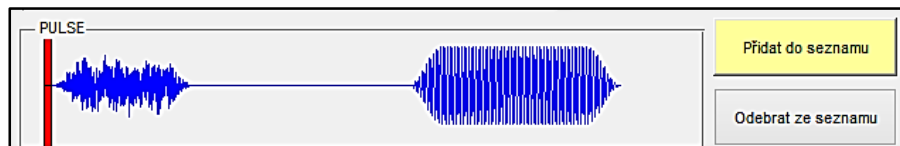
Vytváření pulzů se řídí všemi výše zmíněnými pravidly (viz kapitola 3.6: *Stimulační signály* a její podkapitoly). Aby bylo možné jednoduše vytvořit stimulační pulz dle všech parametrů, byly v grafickém rozhraní navrženy dva panely (viz *Obrázek 21*) s rozevíracími seznamy (tzv. *pop-up menu*). Jeden je určen k vytváření prepulzů a obsahuje pět rozevíracích seznamů, které umožňují nastavit požadovanou amplitudu, délku prepulzu i jeho náběžné

hrany, frekvenci a zpoždění prepulzu od začátku měření. Druhý panel je téměř totožný a je určen pro vytváření hlavních úlekových pulzů. Místo zpoždění začátku obsahuje možnost nastavit čas mezi prepulzem a hlavním pulzem (*inter-stimulus interval*). Na obou panelech je ještě možnost zaškrtnout v boxu nulový prepulz či nulový pulz v případě, že si uživatel přeje stimulovat bez této části. Vynecháním obou částí se nastaví tzv. *tichý podprahový stimul*, který monitoruje *baseline aktivitu* zvířete. Chce-li uživatel stimulovat namísto tónu (který je nastaven jako výchozí) bílým šumem, stačí odkliknout políčko *noise* při výběru frekvence.

Hodnoty není třeba nikam vpisovat, stačí pouze vybrat příslušnou hodnotu z rozevíracího seznamu, který obsahuje pouze rozmezí již popsaná v kapitole 3.6.3. Po výběru parametru tlačítkem je volána funkce, která znovu vytváří výsledný stimulus. Ten je vygenerován vždy, když dojde ke změně libovolného parametru. Pro lepší přehlednost je ještě vytvořený stimul zobrazen uživateli v malém okně pod oběma ovládacími panely (viz Obrázek 22).

PREpulse			PULSE		
Amplituda	Délka prepulzu	Náběžná hrana	Amplituda	Délka pulzu	Náběžná hrana
70 dB	30 ms	5 ms	80 dB	50 ms	5 ms
Frekvence	Zpoždění začátku	<input type="checkbox"/> nulový PREpulz	Frekvence	ISI (inter-stimulus interval)	<input type="checkbox"/> nulový pulz
6 kHz	0 ms		4 kHz	30 ms	

Obrázek 21: Ovládací panely pro výběr parametrů prepulzu (vlevo) a hlavního stimulačního pulzu (vpravo).



Obrázek 22: Informativní náhled vygenerovaného pulzu. Prepulz je tvořen bílým šumem, zatímco hlavní pulz je tón o frekvenci 2 kHz. Červená čára naznačuje pozici synchronizačního pulzu ve druhém kanálu. Vpravo jsou tlačítka pro přidání či odebrání pulzu ze seznamu pulzů.

Seznam vytvořených pulzů

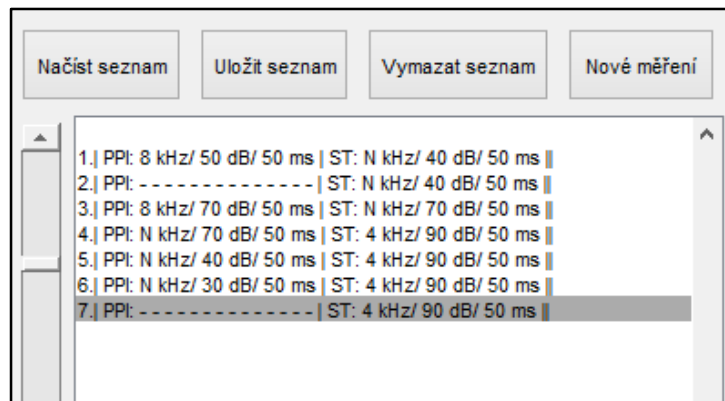
Měnit parametry pulzů lze mnohokrát, avšak ještě tím stále není vytvořen finální stimulační pulz. Ten vznikne až kliknutím na tlačítko *Přidat do seznamu*. Seznam je představován výpisem parametrů všech již uložených pulzů v objektu *listbox*, interaktivním seznamu, ve kterém lze kliknutím vybírat jednotlivé řádky. Text řádku je tvořen výpisem parametrů uložených pulzů. Hodnoty parametrů přidávaného pulzu jsou ukládány do seznamu v jednotném formátu (viz *Obrázek 23*), který má podobu:

pořadí.|**PPI**:*frekvence*/*amplituda*/*délka*(*prepulzu*)|**ST**:*frekvence*/*amplituda*/*délka*(*pulzu*)||

například zde:

1.| PPI: 4 kHz / 70 dB / 30 ms | ST: 6 kHz / 90 dB / 50 ms ||

je vytvořen první pulz s frekvencí prepulzu 4 kHz, amplitudě 70 dB a délce 30 ms a 6kHz tónem jako hlavním pulzem, který má amplitudu 90 dB a délku 50 ms.



Obrázek 23: Seznam pulzů se sedmi vytvořenými stimulačními pulzy. Je-li utlumena některá část stimulačního pulzu je nahrazena čárkami (např. zde u dvou pulzů chybí prepulz). Vlevo od seznamu je posuvník umožňující měnit jejich pořadí. Nad nimi tlačítka umožňující načíst již vytvořený seznam pulzů, či jej uložit, nebo tento vymazat.

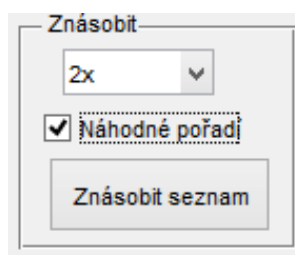
Seznam vytvořených pulzů je možné měnit, přidávat či odebírat pulzy, měnit jejich pořadí (posuvníkem vlevo), případně uložit či nahrát (tlačítka nad seznamem) již dříve vytvořený seznam. Poslední možnost umožňuje zjednodušit práci obsluhy tím, že není třeba vytvářet pro stejná měření na různých zvířatech vždy nové totožné sady stimulačních pulzů. Aktivní prvek *listboxu* se projeví po kliknutí na libovolný řádek s parametry pulzu. Ty jsou poté zpětně nastaveny v rozevíracích seznamech obou panelů a vytvořený stimul je zobrazen v boxu pod nimi.

Všechny nastavené parametry měření jsou (ve stejném pořadí jako jsou vypisovány do seznamu) ukládány do matice s názvem *listboxDATA* a to vždy i s pořadím dané hodnoty

v rozevíracím seznamu. Například je-li u prepulzu vybrána amplituda 50 dB, je do matice uložena hodnota 50 a do políčka vedle ní i hodnota 6 označující, že 50 dB je 6. hodnota vybraná z rozevíracího seznamu. To zjednodušuje zpětné nastavení hodnot do rozevíracích seznamů při kliknutí na pulz. Matice *listboxDATA* je tedy hlavním nositelem informací o stimulaci a při ukládání seznamu měřících stimulů je to především ona, která je ukládána či nahrávána.

Znásobení seznamu pulzů

Aby mohla být naměřená data statisticky zpracována, je třeba mít pro každý parametr stimulačního pulzu více nahaných odpovědí. Proto je vhodné mít v programu možnost jednoduše zmnožit již vytvořený seznam pulzů, bez toho aniž by bylo nutné všechny znovu nastavovat a vkládat do seznamu. Pro takovéto zmnožení seznamu pulzů je v programu vytvořen panel s názvem *Znásobit* (viz *Obrázek 24*). Slouží k dvou až pětinasobnému znásobení již existujícího seznamu pulzů a to buď v pořadí, v jakém byly vytvořeny, nebo v pořadí naprosto náhodném. Náhodné pořadí je pro měření vhodnější, protože vylučuje závislost odpovědi zvířete na parametrech předchozího pulzu.

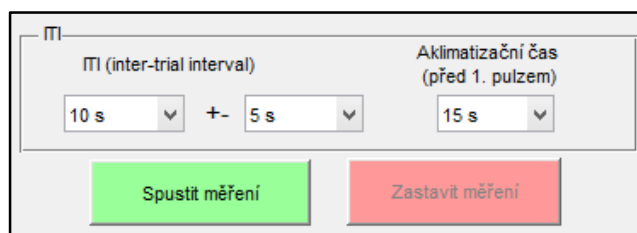


Obrázek 24: Panel pro dvou až pětinasobné znásobení vytvořeného seznamu pulzů v normálním či náhodném pořadí. Lze jím násobit seznam i vícekrát po sobě.

Čas mezi pulzy (inter-trial interval)

Při delších sériích měření s mnoha pulzy může u zvířete docházet k tzv. *habituci*, což je adaptace na opakovaný pravidelný zvukový podnět, která snižuje výslednou amplitudu úlekové reakce. Aby k tomuto nežádoucímu jevu nedocházelo, je třeba nastavit mezi jednotlivými pulzy časový odstup v řádu sekund (*inter-trial interval* - *ITI*). Pravidelnému opakování se zamezí náhodnou změnou délky ITI v určitém rozsahu. Pro tento účel byl vytvořen panel ITI, ve kterém je možné nastavit požadovanou délku času mezi pulzy (např. 10 s) plus mez její odchylky (např. 5 s). Po přehrání každého pulzu tak bude program čekat náhodně dlouhý čas v rozmezí od 5 do 15 s (viz *Obrázek 25*).

Před úplně prvním pulzem v sérii je nutné nechat zvíře aklimatizovat po manipulaci z klece do měřicího boxu. V programu je proto možnost nastavit *aklimatizační čas* před tím, než dojde k přehrání prvního pulzu.

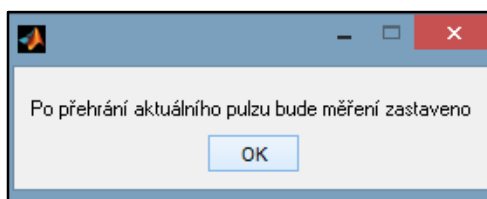


Obrázek 25: Panel pro nastavení rozmezí času mezi pulzy (*ITI*) a také aklimatizačního času před přehráním prvního pulzu. Pod panelem jsou tlačítka pro spuštění či přerušení samotného měření.

Náhodný čas ITI (v intervalu daném parametry v panelu) je vygenerován až ve chvíli, kdy je měření spuštěno (tlačítkem *Spustit měření*). Tento čas je poté ke každému pulzu přiřazen v matici *listboxDATA* a zobrazen v seznamu pulzů na konci každého řádku.

3.12.2 Během měření

Při samotném měření již není vhodné provádět změny, které by mohly ohrozit jeho průběh, proto se při módu měření deaktivují všechny ovládací prvky okna programu. Jediné tlačítko, které je po celou dobu měření aktivní je možnost předčasně přerušit měření (*Zastavit měření* – viz *Obrázek 25*). Při stisku tohoto tlačítka je na obrazovku vyvolána zpráva (tzv. *message box*) oznamující uživateli, že měření bude zastaveno ihned po přehrání pulzu, který je na řadě (viz *Obrázek 26*). Po přerušení měření před řádným koncem je vyvolán speciální případ módu výsledků (viz kapitola *Předčasně ukončené měření*).

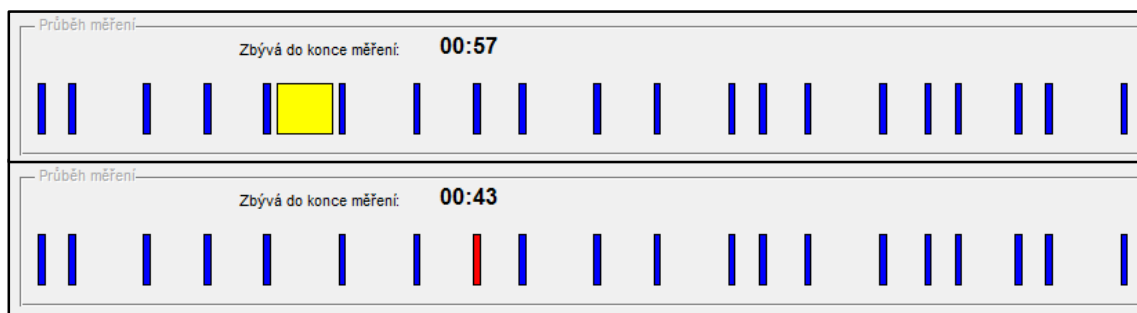


Obrázek 26: Zpráva zobrazená pomocí funkce *msgbox* po přerušení měření.

Běžná měření úlekových reakcí sestávají z mnoha pulzů a čas mezi nimi (*ITI*) se může pohybovat i kolem 30 s [41]. Jedna série testů pak zabere i 15 minut. Aby bylo možné sledovat průběh měření i při takto dlouhé době, obsahuje program ukazatel průběhu měření (viz *Obrázek 27*). Jde o panel, který je zobrazen při přechodu do měřicího módu a obsahuje modré čáry reprezentující jednotlivé pulzy včetně rozestupů mezi nimi (*ITI*). Jako ukazatel aktuálního stavu je použit buď žlutý obdélník v mezerách mezi pulzy, který signalizuje, že

právě ubíhá čas *ITI*, anebo červená čára na místě pulzu, jež je zrovna přehráván. Uživatel se tak může velmi rychle dozvědět, v které části měření se program nalézá. Panel je také vybaven ukazatelem času zbývajících do konce měření, který je aktualizován vždy po přehrávání pulzu. Uživatel má tak přesnější představu, kdy bude měření ukončeno.

Během měření jsou také ihned zobrazovány naměřené odpovědi, a to vždy poslední naměřený signál včetně automaticky detekované amplitudy úlekové reakce.



Obrázek 27: Ukazatel průběhu měření a času zbývajících do konce. Žlutý obdélník reprezentuje čas mezi pulzy (*ITI*), zatímco červeně je označen pulz, který je právě přehráván.

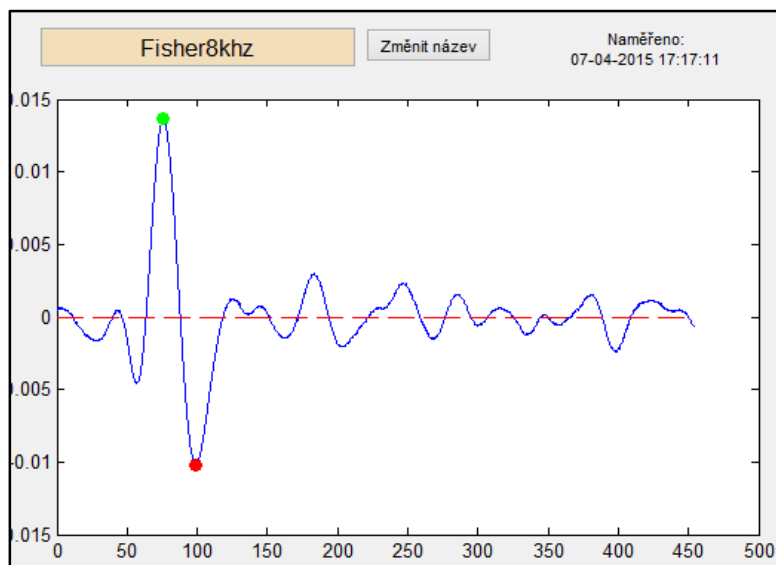
Jakmile je měření dokončeno, proběhne automatické uložení naměřených dat do aktuální složky a program se přepne do dalšího módu. Data jsou vždy uložena do souboru ve formátu *MATLAB Data* (s příponou *.mat*) pod výchozím názvem *IdentifikátorMěření_v_datum_čas*. Datum a čas jsou brány přesně v době ukončení měření (v této fázi). V módu zobrazených výsledků lze samozřejmě data řádně uložit i pod jiným názvem zvoleným uživatelem. Část „_v_“ je automaticky součástí názvu proto, že označuje ve složce soubory s naměřenými výsledky a odlišuje je tak od souborů stejného typu (*.mat*), které jsou vytvořeny jako připravený seznam pulzů k měření (ty jsou označeny koncovkou *_s_*). Pokud uživatel uloží data pod svým názvem je automaticky uložený soubor odstraněn, aby nedocházelo ke zbytečnému narůstání počtu takovýchto souborů ve složce. Automatické ukládání je zavedeno především jako ochrana před nechtěnou ztrátou dat.

3.12.3 Po měření

Poslední mód programu nastává po doměření všech impulzů v přednastavené sérii. Většina tlačítek deaktivovaných v průběhu měření je opět přístupná a je možné přepínat mezi jednotlivými naměřenými signály, mezi různými zobrazeními amplitud úlekové reakci či přepnout do režimu pro výpočet prepulzní inhibice. Na ukazateli průběhu měření je červeně označeno pořadí pulzu aktuálně vybraného k zobrazení odpovědi.

Zobrazení výsledků

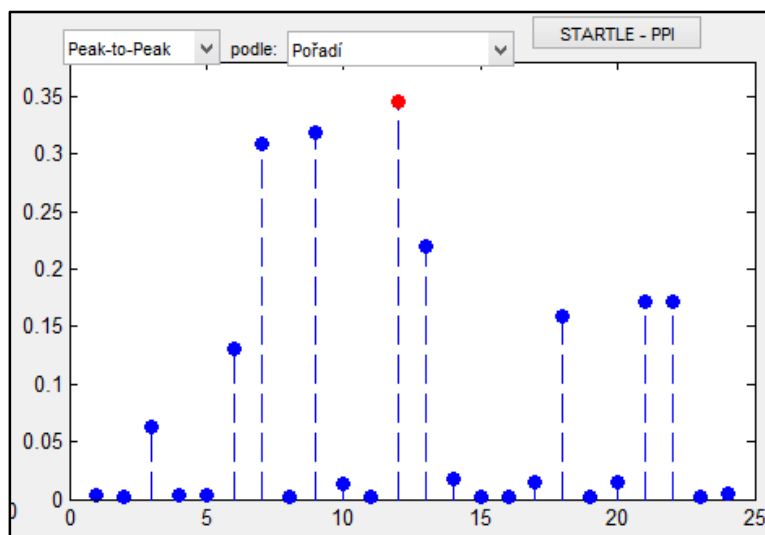
Výsledné signály naměřené z akcelerometrické podlahy v komoře se zobrazují pomocí objektu typu *axes* v levém dolním rohu okna programu (viz *Obrázek 28*). Jedná se vždy o jeden konkrétní signál, který je buď aktuálně naměřen (v módu měření), nebo je vybrán ze seznamu pulzů (v módu po měření). Časová osa zobrazení je udávána v ms a vždy je zobrazeno 500 ms jednoho signálu. V objektu *axes* jsou také zobrazeny oba nalezené extrémy (minimum i maximum) vyznačené barevnými body (červeným a zeleným). Změnu těchto extrémů lze učinit při kliknutí do objektu.



Obrázek 28: Zobrazení naměřeného signálu s vyznačením minimální a maximální hodnoty. Časová osa je udávána v ms a červeně je vyznačena nulová hodnota napěťové odpovědi. Nad objektem *axes* je pole obsahující název měření, který lze změnit a také je zde text zobrazující datum a čas kdy byly data naměřeny.

Výběr nahrané odpovědi probíhá buď kliknutím na řádek s parametry odpovídajícího stimulačního pulzu v seznamu pulzů (viz *Obrázek 23*) nebo označením bodu odpovídajícího amplitudě nahrané odpovědi v grafu zobrazujícím *peak-to-peak* hodnoty (viz *Obrázek 29*). Tento objekt je přehledným grafickým znázorněním automaticky stanovených velikostí

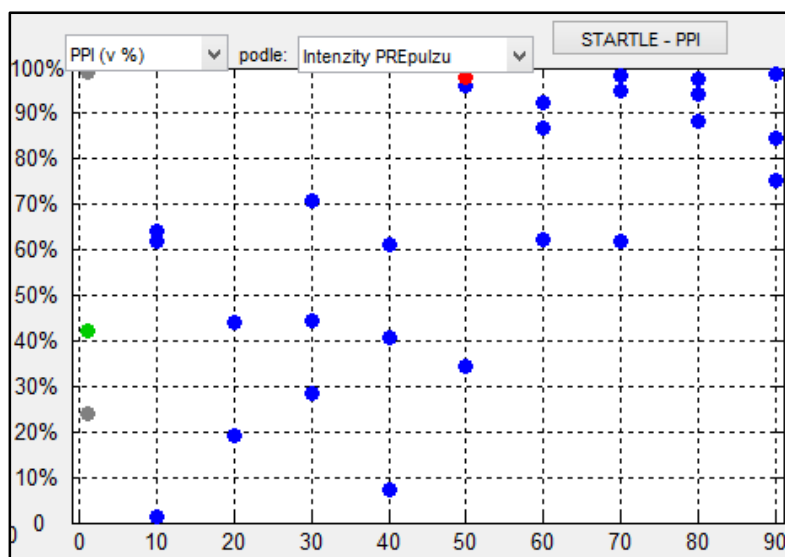
úlekových reakcí. Ve výchozím nastavení jsou velikosti amplitud odpovědí srovnány (na ose x) dle jejich pořadí tak, jak byly změřeny. Toto nastavení lze změnit výběrem z výsuvných seznamů nad grafem a zobrazit tak velikosti v závislosti na jiných parametrech (intenzitě či frekvenci prepulzu či pulzu).



Obrázek 29: Zobrazení naměřených amplitud úlekových reakcí v grafu podle pořadí je možné přepnout rozevíracími seznamy nad ním. Vpravo nahoře je tlačítko *startle-PPI*, které lze použít k označení referenčního startle pulzu při přepnutí do módu pro zobrazení prepulzní inhibice.

Program je vybaven také možností vypočítat a případně i zobrazit hodnoty prepulzní inhibice (*PPI*). K tomu je nutné nejprve určit v seznamu pulzů alespoň jeden, který je považován za tzv. *referenční startle*, tedy pulz, který není žádným způsobem tlumen předcházejícím prepulzem. Hodnoty prepulzní inhibice jsou poté vztaheny právě k hodnotě tohoto neinhibovaného pulzu. Výběr provádí uživatel označením daného pulzu v seznamu stimulů a poté kliknutím na tlačítko *startle-PPI* umístěné nad grafem amplitud (viz Obrázek 29). Tento referenční netlumený pulz je poté označen zeleně v seznamu stimulů i v obou grafech zobrazujících naměřené odpovědi.

Většinou bývá referenčních hodnot v jedné sérii více, program proto umožňuje vybrat jich postupným opakováním výše uvedeného postupu libovolný počet. Hodnota amplitudy referenční netlumené odpovědi je poté vypočítána zprůměrováním všech takto označených hodnot. Po prvním stisku tlačítka *startle-PPI* je graf amplitud úlekových reakcí automaticky přepnut do módu pro zobrazení prepulzní inhibice (viz Obrázek 30). Prepulzní inhibice je pak vypočítána podle příslušného vzorce (viz kapitola 2.2.1: *Prepulzní inhibice*). V grafu je při přepnutí do zobrazení prepulzní inhibice na ose y vyjádřena procentuální hodnota *PPI* a na ose x je výchozím parametrem intenzita prepulzu (která lze opět uživatelsky změnit).



Obrázek 30: Zobrazení hodnot prepulzní inhibice v závislosti na intenzitě prepulzu (dB SPL). Červeně je označena aktuální zobrazená odpověď, zeleně referenční startle a šedou barvou odpovědi vyřazené z měření.

Vyřazení chybných odpovědí

Při biologických měřeních je běžným jevem, že některá naměřená data jsou z různých příčin zatížena výraznými chybami či artefakty. Zkušený odborný vědecký pracovník většinou takové odpovědi pozná na první pohled z tvaru signálu odpovědi. Takovéto signály není třeba zahrnovat do dalších statistických zpracování, neboť vnášejí mezi získaná data značnou chybu. Aby byla možnost tento typ signálů odstranit z naměřených dat, bylo do programu začleněno tlačítko *Vyřadit z měření* (vlevo od seznamu pulzů). Vyřazený pulz je v seznamu označen červeně (v grafu amplitud úlekových reakcí šedě) a při exportování dat s ním není počítáno (pokud není přímo zaškrtnuta možnost exportovat všechna data). Každý vyřazený pulz je samozřejmě možné opět vrátit mezi normální pulzy (tlačítkem *Vrátit do měření*), případně (pokud je vyřazeno více pulzů) je možné vrátit najednou všechny pulzy (tlačítkem *Vrátit do měření vše*).

Exportování výsledků do Microsoft Excel

Aby bylo možné se získanými daty pracovat i mimo prostředí programu, je v něm integrována možnost exportovat data do tabulkového editoru Microsoft Excel. Pak je možné s nimi provádět statistická hodnocení, případně je vložit do jiného libovolného programu. K exportování dat do Excelu slouží tlačítko *Exportovat výsledky* v pravém dolním rohu okna. Zaškrtačací box vedle něj umožňuje exportování všech dat včetně pulzů, které byly označeny jako vyřazené. Po aktivaci exportu dat je automaticky vytvořen soubor s názvem

sestavajícím z názvu měření (uloženého v boxu s názvem viz *Obrázek 28*) a data a času, kdy bylo měření provedeno. Vytvořený soubor je automaticky otevřen v Excelu a data v něm, přehledně vložená do tabulky s předepsaným záhlavím, zobrazena (viz *Obrázek 31*).

	Pořadí pulzů	Frekvence	Amplituda	Délka PRE	Latence	Frekvence	Amplituda	Délka PUL	ITI	Peak-to-p	Prepulzní inhibice - PPI
		kHz	dB	ms	ms	kHz	dB	ms	s	%	
4	1	8	10	50	50	0	105	50	1	0,288242	-37,8987
5	2	8	60	50	50	0	105	50	11	0,07356	64,80811
6	3	8	40	50	50	0	105	50	15	0,067299	67,8034
7	4	8	90	50	50	0	105	50	14	0,023998	88,51924
8	5	8	70	50	50	0	105	50	18	0,223332	-6,84502
9	6	8	20	50	50	0	105	50	18	0,243827	-16,6504
10	7	8	50	50	50	0	105	50	12	0,142399	31,87432
11	8	6	1	20	0	0	105	50	15	0,327751	-56,8006
12	9	8	30	50	50	0	105	50	15	0,104031	50,23004
13	10	8	80	50	50	0	105	50	17	0,029053	86,10071
14	11	8	90	50	50	0	105	50	18	0,073537	64,81883
15	12	8	20	50	50	0	105	50	18	0,036277	82,6445
16	13	8	50	50	50	0	105	50	13	0,009762	95,32953
17	14	8	60	50	50	0	105	50	17	0,129198	38,1898
18	15	8	70	50	50	0	105	50	17	0,02958	85,84829
19	16	8	80	50	50	0	105	50	12	0,031039	85,1504
20	17	8	10	50	50	0	105	50	12	0,097402	53,40149
21	18	8	30	50	50	0	105	50	15	0,018059	91,36043
22	19	8	40	50	50	0	105	50	20	0,07872	62,33905
23	20	6	1	20	0	0	105	50	14	0,090297	56,80062

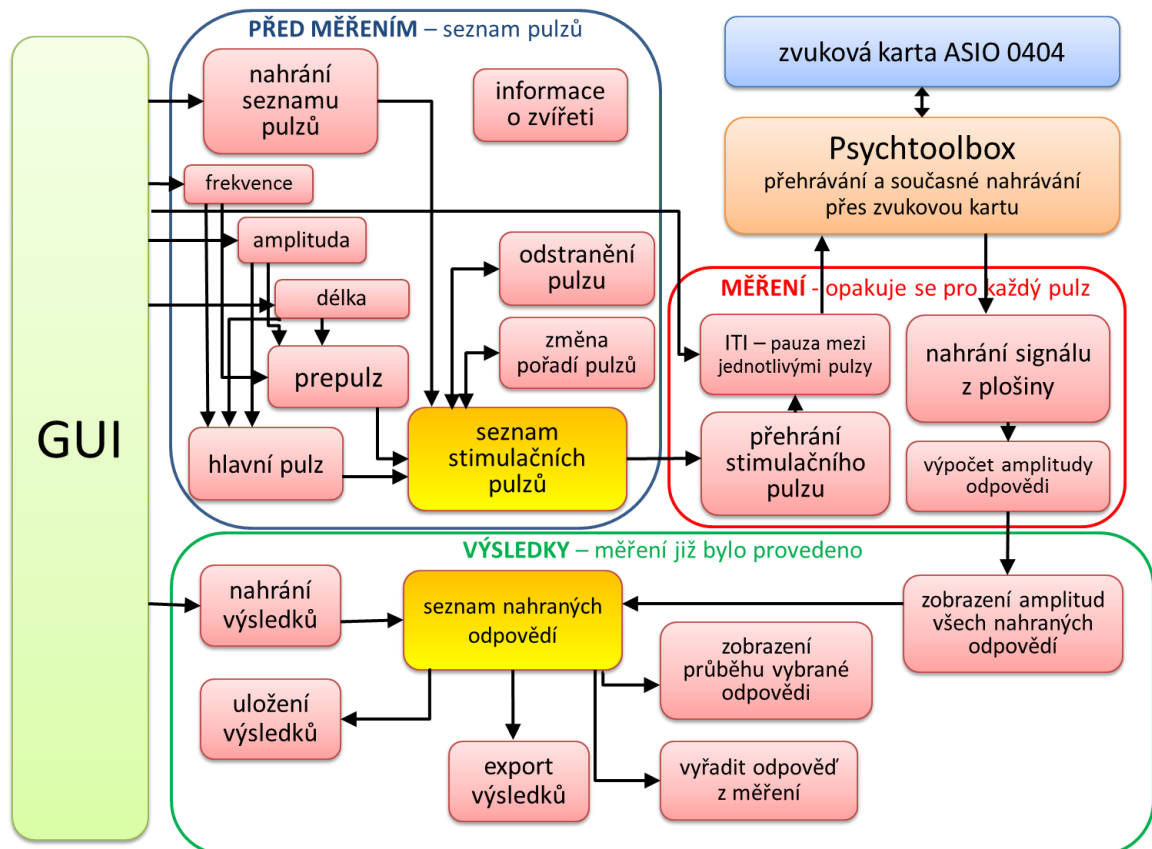
Obrázek 31: Automaticky vytvořená tabulka v programu MS Excel, do které jsou vložena naměřená data po stisku tlačítka *Exportovat výsledky*.

Předčasně ukončené měření

Pokud došlo během měření k předčasnému zastavení, je zobrazen speciální případ výsledkového módu, ve kterém jsou v seznamu pulzů červenou barvou označeny dosud neměřené pulzy. Všechny ostatní funkce módu jsou zachovány (včetně automatického uložení před předčasným ukončením měření). Pokud chce uživatel zopakovat celé měření, musí předtím použít tlačítko *Vrátit vše do měření* (na nezměřené pulzy je totiž pohlíženo jako na vyřazené) a poté teprve zvolit volbu *Znovu změřit*.

3.13 Uživatelské schéma programu

Pro přehlednější ukázkou možností programu a jeho jednotlivých módů bylo vytvořeno uživatelské schéma, zobrazující jeho základní funkce, jejich návaznost a propojení.



Obrázek 32: Uživatelské schéma programu pro měření úlekových reakcí a všech jeho módů.

3.14 Akustická kalibrace

Akustická kalibrace celého měřicího systému se provádí zejména proto, aby bylo možné přiřadit neurčitý rozměr matic v Matlabu odpovídající hladině akustického tlaku (SPL). V programu pak bude možné nastavovat přímo hodnoty SPL, které uživatel požaduje při stimulaci. Kalibrace se musí provést pro každou frekvenci čistého tónu, kterou lze v programu nastavit (v rozmezí 1 – 16 kHz) a také pro bílý šum. Při kalibraci tónů byla v Matlabu nastavena amplituda (hodnota A v *Kódu 1*) na 0,1. Při kalibraci šumu byla směrodatná odchylka funkce *randn* (SD v *Kódu 2*) nastavena na 0.05.

Měřicí sestava byla kalibrována pro šum a frekvence tónů 1, 2, 4, 8 a 16 kHz pomocí mikrofону Brüel & Kjaer 4939, připojenému k předzesilovači ZC 0020 a zvukoměru B&K 2231. Naměřené hodnoty akustických tlaků vypadají jako v Tabulce 1.

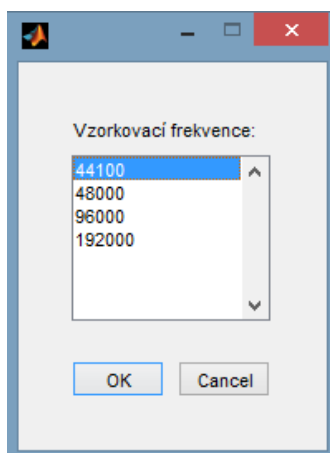
Frekvence (kHz)	hladina akustického tlaku (dB SPL)
šum	85
1	98
2	90
4	101
8	97
16	95

Tabulka 1: Hladiny akustických tlaků odpovídající konkrétním nastaveným hodnotám v Matlabu (SD bílého šumu 0.05 a A tónu 0.1).

Akustická kalibrace je provedena pro celou soustavu společně. Pokud dojde k výměně jakékoliv části aparatury (reproduktor, zesilovač, zvuková karta atd.), je nutné provést ji znovu.

3.15 Změna vzorkovací frekvence

Vzorkovací frekvence celého systému je primárně nastavená na 44100 kHz, ale lze ji lehce změnit kliknutím na záložku *Vzorkovací frekvence* na horní liště okna programu. Rozevře se seznam, který ukazuje aktuální vzorkovací frekvenci a možnost *Změnit*. Ta otevře okno se seznamem povolených vzorkovacích frekvencí, které vychází z možností zvukové karty. Výběrem a potvrzením volby se změní vzorkovací frekvence v celém programu.



Obrázek 33: Okno umožňující změnu vzorkovací frekvence.

3.16 Karta zvířete

Do programu byla také implementována tzv. karta zvířete. Je to soubor informací o měřeném zvířeti, které se uloží spolu s naměřenými výsledky. Jedná se o váhu, datum narození (k určení stáří zvířete), pohlaví a poznámku ke zvířeti. Kartu lze zobrazit, upravit či nahrát (z již provedeného měření) v záložce *Karta zvířete* na horní liště okna programu.

3.17 Měření

Pro ověření správné funkčnosti programu a celého zapojení bylo provedeno měření v laboratoři Oddělení neurofyziologie sluchu ÚEM AV ČR. Při měření bylo použito vybavení laboratoře, které již bylo zmíněné v kapitole 3.2: *Technické vybavení laboratoře* a navíc ještě osobní počítač Lenovo s integrovanou zvukovou kartou E- MU 0404 PCIe. Abychom mohli ověřit, že u nově vytvořeného systému nedochází ke zkreslení signálu v porovnání s použitím procesoru RP2, byl signál z detekční plošiny rozdělen a nahráván paralelně zvukovou kartou i procesorem RP2. Porovnáním těchto dvou signálů je v zobrazeno v kapitole 4.1: *Srovnání s procesorem RP2*.

Měření bylo koncipováno jako běžné měření úlekových reakcí a prepulzních inhibicí u dvou zdravých potkanů rychle stárnoucího kmene Fischer 344 (F344). U obou zvířat byly měřeny tyto série pulzů:

- čisté tóny bez prepulzu o frekvenci **4 kHz** na hladinách akustického tlaku 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105 a 110 dB SPL + tiché stimuly (-110 dB SPL)
- čisté tóny bez prepulzu o frekvenci **8 kHz** na hladinách akustického tlaku 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105 a 110 dB SPL + tiché stimuly (-110 dB SPL)
- čisté tóny bez prepulzu o frekvenci **16kHz** na hladinách akustického tlaku 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105 a 110 dB SPL + tiché stimuly (-110 dB SPL)
- **bílý šum** bez prepulzu na hladinách akustického tlaku 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 a 105 dB SPL + tiché stimuly (-110 dB SPL)
- **bílý šum** (105 dB SPL) s **prepulzy** čistého tónu o frekvenci **2 kHz** na hladinách akustického tlaku 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 dB SPL + referenční stimuly bez prepulzů (pouze bílý šum 105 dB SPL)
- **bílý šum** (105 dB SPL) s **prepulzy** čistého tónu o frekvenci **8 kHz** na hladinách akustického tlaku 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 a 90 dB SPL + referenční stimuly bez prepulzů (pouze bílý šum 105 dB SPL)

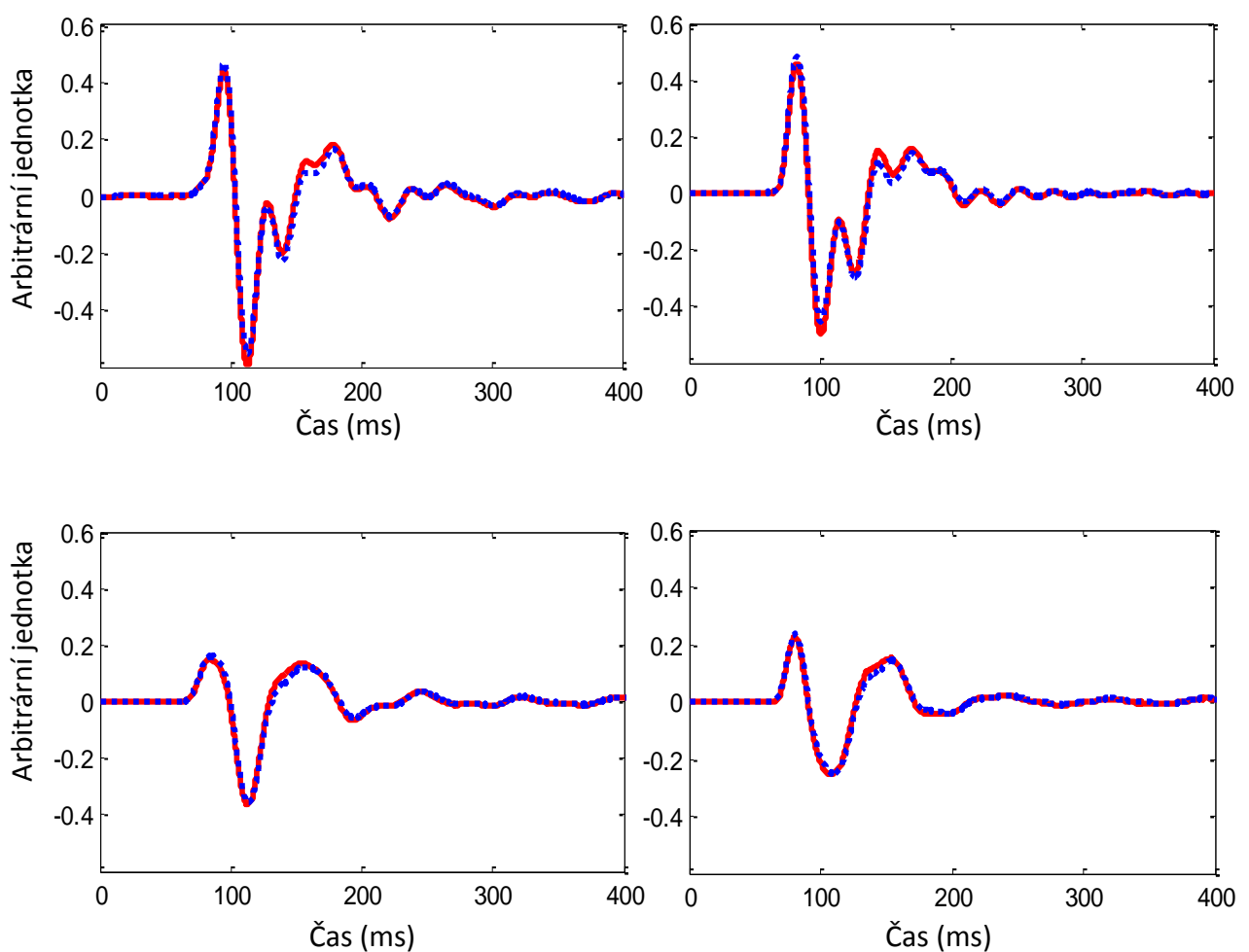
Všechny hlavní stimuly měly **délku 50 ms**, prepulzní **20 ms**. Délka náběžné hrany všech stimulů byla 5 ms. Při použití prepulzů byla latence mezi prepulzem a hlavním pulzem (*ISI*) nastavena na 30 ms. Čas mezi jednotlivými stimuly (*ITI*) byl nastaven jako 15 ± 5 s. Měření probíhalo se vzorkovací frekvencí 44100 Hz. Experiment byl proveden v souladu s principy péče o laboratorní zvířata a v souladu s předpisy etické komise Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR a Helsinskou deklarácí.

Všechny série stimulů byly u každého zvířete měřeny několikrát a výsledky byly poté zpracovány do grafů pomocí Matlabu a Excelu (viz kapitola *Experimentální výsledky*).

4 Experimentální výsledky

4.1 Srovnání s procesorem RP2

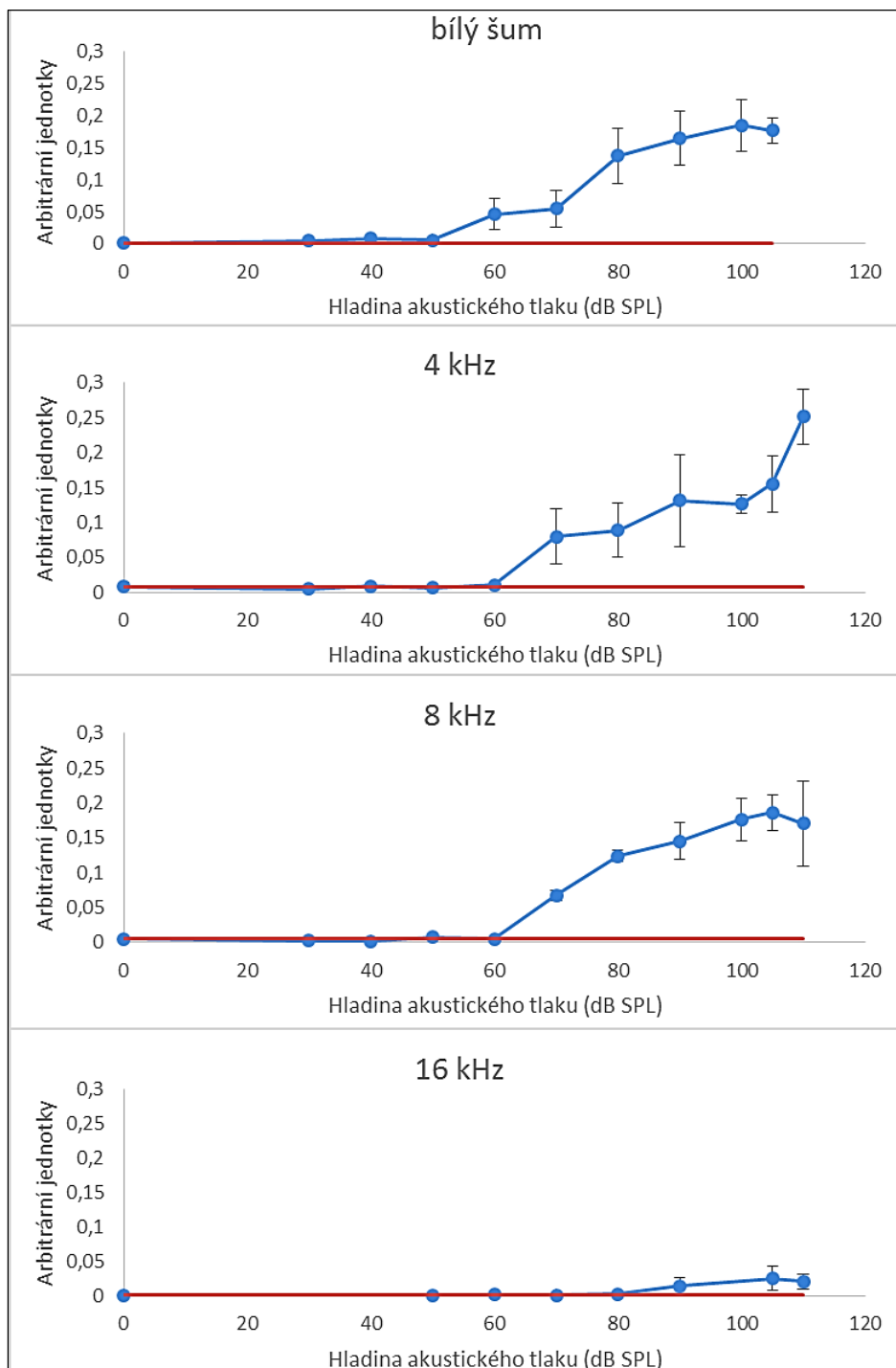
Výsledky srovnání průběhu odpovědi zaznamenaných programem přes zvukovou kartu a procesorem RP2 ukazují, že při použití vytvořeného systému dochází pouze k nepatrným rozdílům oproti použití dřívějšího systému. Tento velmi drobný rozdíl může být způsoben použitím filtrů v procesoru RP2 při nahrávání odpovědi. Na charakteristický tvar odpovědi však toto nemá žádný vliv.



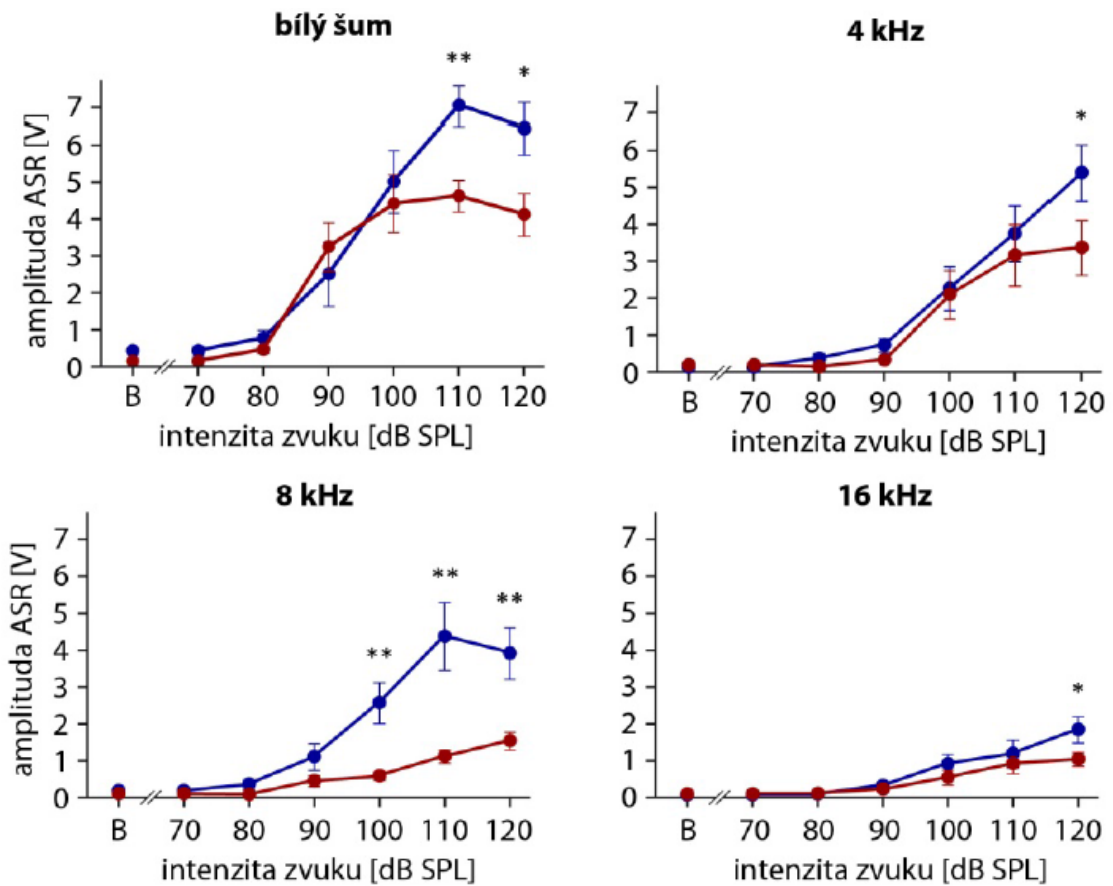
Obrázek 34: Srovnání průběhu signálů naměřených programem (červeně) a procesorem RP2 (modře tečkovaně). Jedná se o odpovědi na stimulaci bílým šumem na hladině akustického tlaku 100 - 105 dB SPL.

4.2 Úleková reakce u potkanů kmene Fischer

Výsledky amplitud úlekových reakcí potkanů Fischer 344 na bílý šum a čisté tóny o frekvencích 4, 8 a 16 kHz jsou srovnatelné s výsledky v literatuře [41]. Odpověď na bílý šum začíná na nižší hladině akustického tlaku, než u čistých tónů. U vyšších hladin SPL dochází někdy k drobnému poklesu amplitudy.

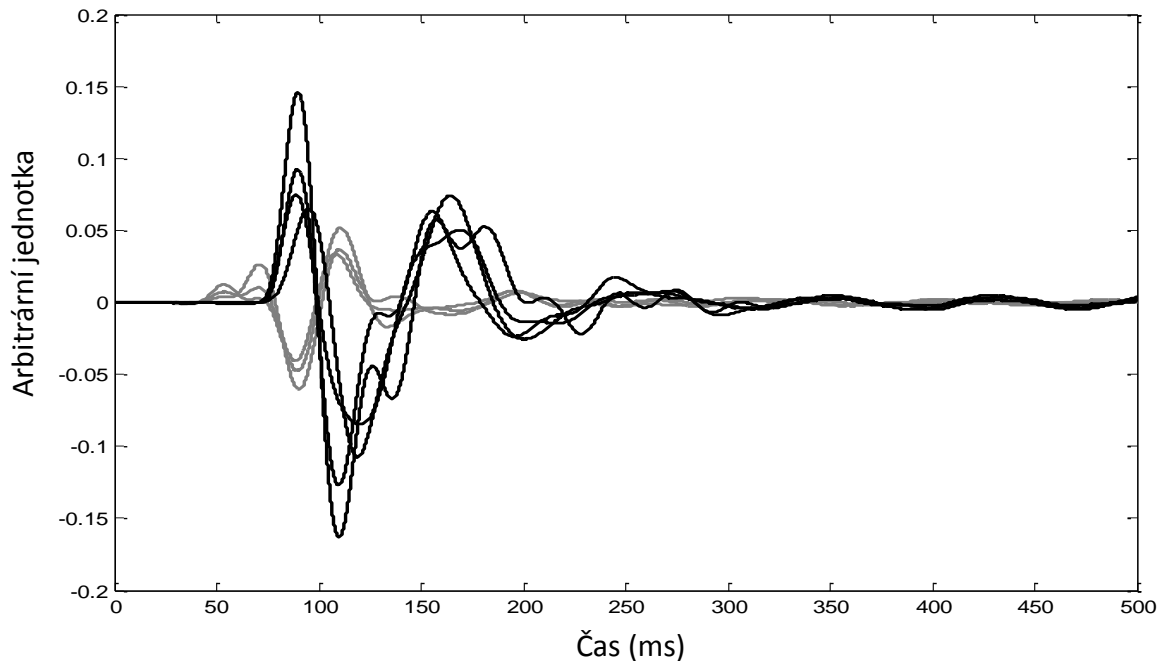


Obrázek 35: Průměry naměřených amplitud (*modře*) úlekových reakcí pro bílý šum a čisté tóny. Chybové úsečky ukazují střední chybu průměru (SEM) z naměřených dat. Červená linka označuje základní (*baseline*) aktivitu zvířete jako odpověď na tichý stimul.



Obrázek 36: Amplitudy úlekových reakcí v závislosti na hladinách akustických tlaků stimulačních pulzů (bílého šumu a čistých tónů) naměřené na potkanech F344 [41].

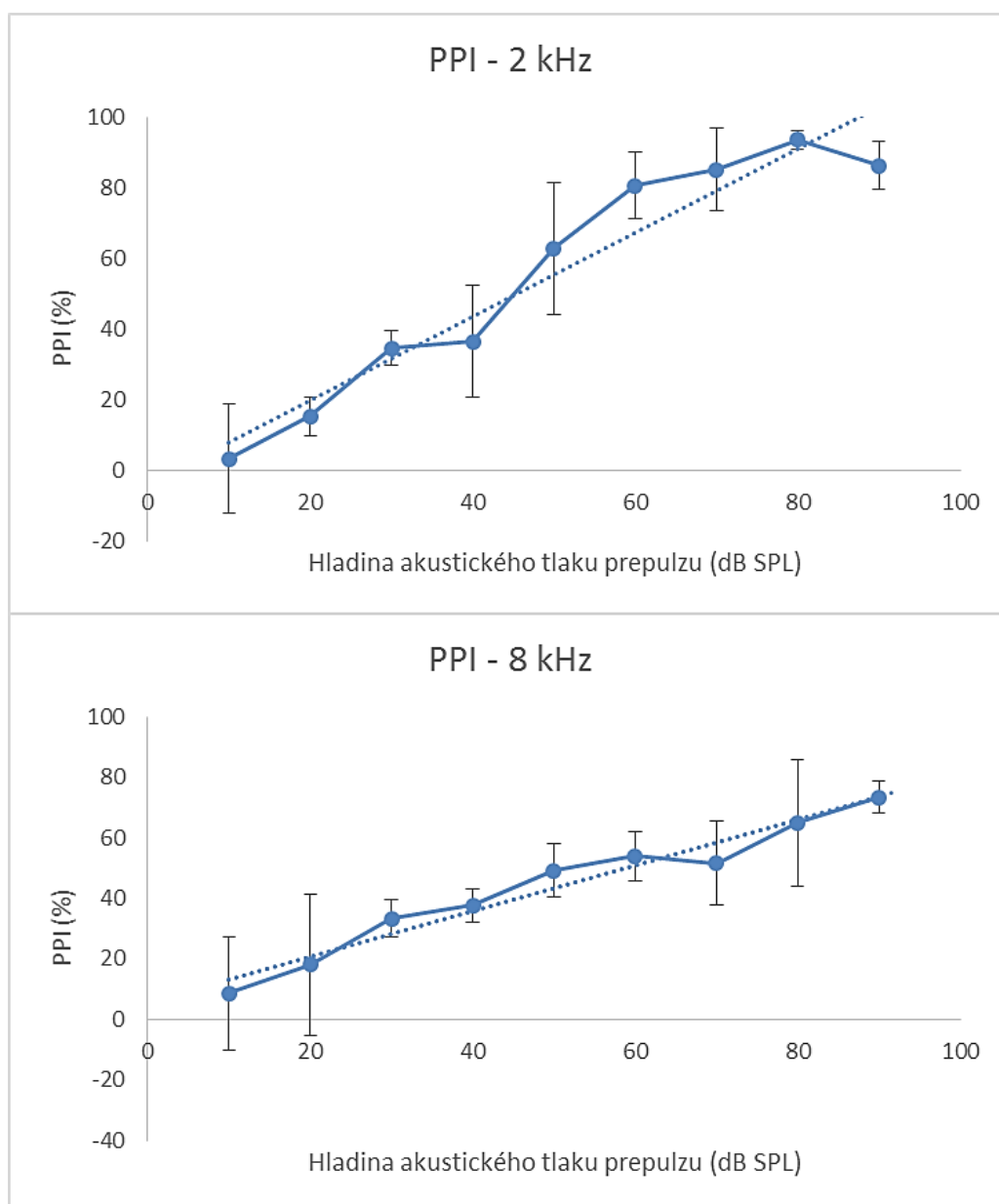
Body označují průměry amplitud úlekových reakcí s chybovými úsečkami střední chyby průměru (SEM). Červeně jsou vyneseny hodnoty skupiny v mládí ohlušených zvířat, modře kontrolní skupina zdravých zvířat (s tou byla srovnávána naměřená data).



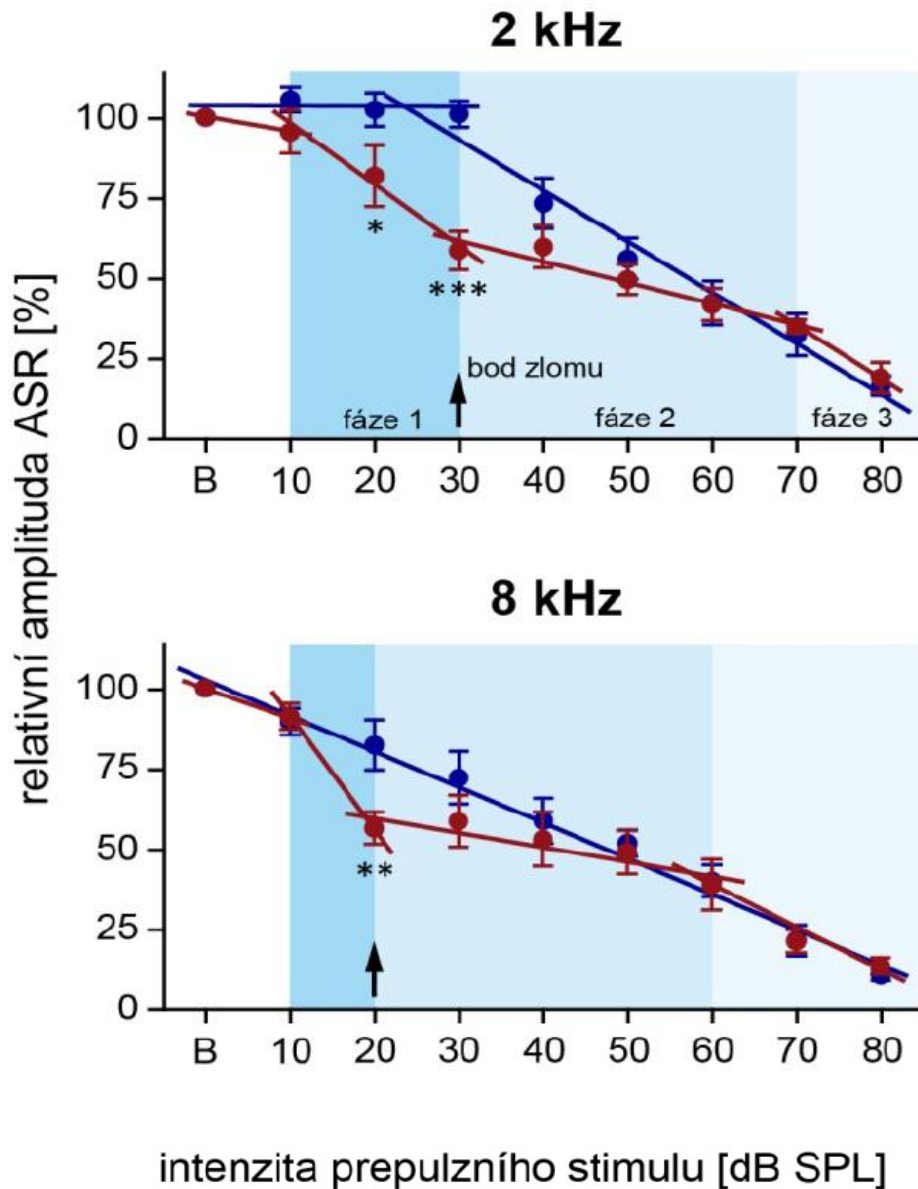
Obrázek 37: Ukázka variability konkrétních naměřených odpovědí na bílý šum. Odpovědi na stimulace na hladině akustického tlaku 60 – 70 dB SPL (šedá) mají nejen menší amplitudu, ale i rozdílný tvar oproti odpovědím na hladině akustického tlaku 90 – 100 dB SPL (černá).

4.3 Prepulzní inhibice u potkanů kmene Fischer

Výpočet prepulzní inhibice byl vztažen k průměrné amplitudě neinhibované odpovědi (*referenční startle*) na bílý šum na hladině akustického tlaku 105 dB SPL. Prepulzy byly tvořeny čistým tónem o frekvenci 2 a 8 kHz na různých hladinách SPL (10 – 90 dB). Z výsledků je patrná lineárně tvarovaná závislost mezi intenzitou prepulzního tónu a procentuálním útlumem amplitudy odpovědi na hlavní stimul (viz *Obrázek 38*). Takovou závislost je možné najít i v odborné literatuře (viz *Obrázek 39*).

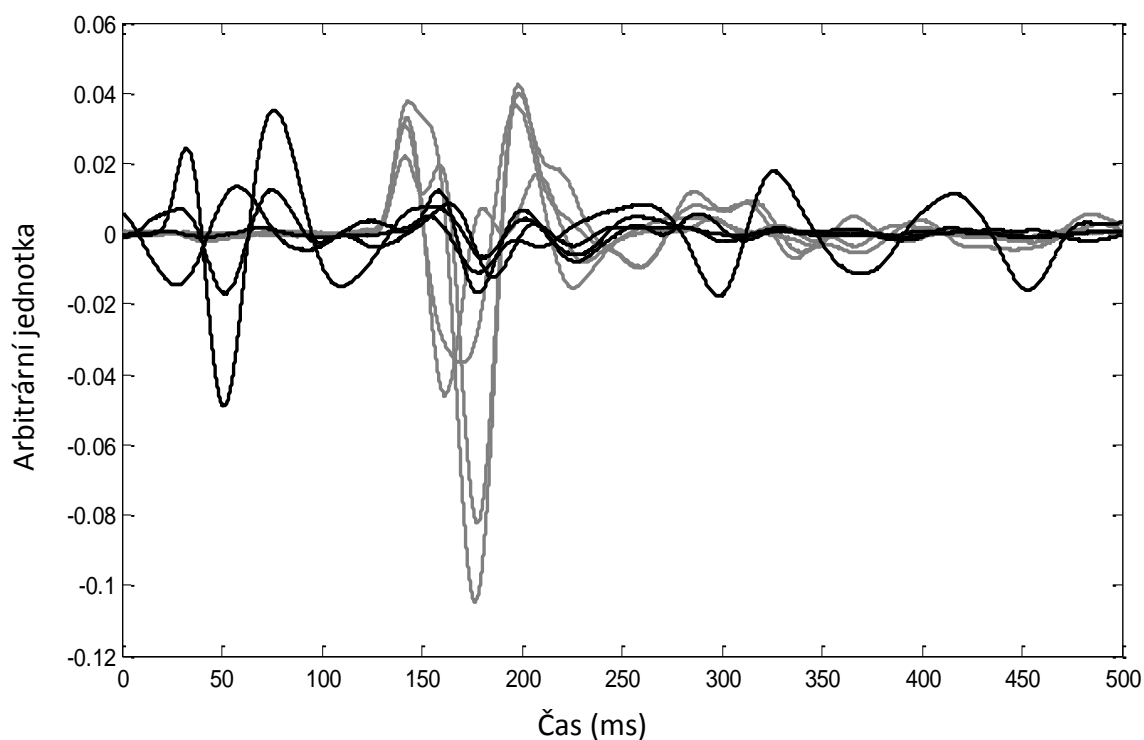


Obrázek 38: Průměry procentuálního vyjádření prepulzní inhibice úlekové reakce na bílý šum (105 dB SPL) v závislosti na hladině akustického tlaku prepulzních tónů o frekvenci 2 a 8 kHz (*plná čára*). Mezi hladinou akustického tlaku prepulzu a procentuální hodnotou PPI je patrná lineární závislost (*čárkovaně*). Chybové úsečky ukazují střední chybu průměru (*SEM*) z naměřených dat.



Obrázek 39: Ukázka lineární závislosti útlumu amplitudy úlekové reakce na hladině akustického tlaku prepulzního tónu v literatuře [41]

Útlum není vyjádřen v % PPI, ale v % relativní amplitudy netlumeného úlekového pulzu (100 % odpovídá amplitudě neinhibované úlekové reakce = bod B na ose x). Body označují průměry relativních útlumů úlekových reakcí s chybovými úsečkami střední chyby průměru (SEM). Červeně jsou vyneseny hodnoty skupiny v mládí ohlušených zvířat, Modře je označena kontrolní skupina zdravých zvířat (s tou byla srovnávána naměřená data).



Obrázek 40: Ukázka variability odpovědí prepulzně inhibovaných úlekových reakcí. Hlavní stimul (bílý šum – 105 dB SPL) byl inhibován prepulzními tóny o frekvenci 8 kHz na hladinách akustického tlaku 30 – 40 dB SPL (*šedá*) a 70 – 80 dB SPL (*černá*). Kromě výrazně viditelného útlumu u odpovědí, kterým předchází silnější prepulz (*černá*), je zde také patrný výskyt odpovědi již na prepulzní tón, jehož intenzita se pohybuje okolo 80 dB SPL (oblast do 100 ms).

5 Diskuse

Cílem této práce bylo vytvořit systém pro měření akusticky vyvolané úlekové reakce a prepulzní inhibice v reálném čase. Systém bude používán v laboratoři úlekových reakcí Oddělení neurofyziologie sluchu na Ústavu experimentální medicíny AV ČR k výzkumu sluchu.

5.1 Měřicí aparatura

Pro měření úlekových reakcí je k dispozici široký sortiment komerčně dostupných prostředků včetně celých aparatur (např. od firmy Coulbourn). Jejich použití je však omezeno na využívání úlekové reakce jako měřitelného indikátoru vnějších vlivů na reflexní dráhu a nelze je použít ke studiu samotné sluchové dráhy. Většina z nich ale nemá dostatečně širokou možnost nastavení stimulačních parametrů tak, aby bylo možné je použít k výzkumu sluchu. Mnoho odborných laboratoří si proto sestavuje tyto aparatury tak, aby svými parametry vyhovovaly potřebám aktuálního výzkumu. Nejčastějším komponentem využívaným v těchto aparaturách je real-time procesor RP2 od firmy Tucker Davis Technologies. Nevýhodou tohoto přístroje jsou jeho vysoké pořizovací náklady. V laboratořích je navíc využíván i k mnoha jiným měřením. Na Oddělení neurofyziologie sluchu ÚEM vznikl proto požadavek na vytvoření systému pro měření úlekové reakce v reálném čase bez zařízení RP2 TDT. Adekvátní náhradu tohoto zařízení poskytuje navržená softwarová aplikace spolu s kvalitní zvukovou kartou.

Program, který byl v rámci této práce vytvořen v programovacím jazyce Matlab, je schopen generovat stimulační pulzy a zaznamenávat a analyzovat signály odpovědí z měřicí plošiny. Výhodou tohoto programu je, že není vázán na konkrétní hardwarové řešení (díky ovladači ASIO) a lze jej použít v kombinaci s téměř jakoukoliv zvukovou kartou s vhodnými parametry. V takovém případě je nutné mít přístup k licenci programu Matlab a před použitím programu s nově zapojenou zvukovou kartou provést akustickou kalibraci. V rámci testování tohoto programu byly pro měření využity dvě různé zvukové karty, E-MU 1414 a E-MU 0404.

Programem vygenerované stimulační pulzy jsou vedeny ze zvukové karty pravým výstupním kanálem do zesilovače a poté do reproduktoru v měřicí komoře. Signál z detekční plošiny je přiveden na pravý vstup karty, zatímco levý vstup je propojen s levým výstupním kanálem a je využíván k synchronizaci signálu.

Podobné zapojení pro měření akustické úlekové reakce bylo provedeno na univerzitě v Pittsburghu [17], kde byly – obdobně jako v našem případě – stimulační signály generovány softwarově přímo v počítači a poté prezentovány přes zvukovou kartu a zesilovač do reproduktoru. Rozdíl mezi touto a naší aparaturou je v tom, že zde byl ke generování stimulů použit programovací jazyk LabView, ze kterého byly všechny stimuly v sadě měření uloženy do formátu *.wav*.

5.2 Experimentální výsledky

V rámci ověření funkčnosti vytvořeného programu bylo provedeno standardní laboratorní měření úlekové reakce a prepulzní inhibice na zdravých potkanech Fischer 344. Výsledky tohoto měření jsou kvalitativně srovnatelné se záznamy dostupnými v literatuře [1, 28, 41], což potvrzuje, že tento program je možné využít k behaviorálnímu testování v rámci výzkumů na Oddělení neurofyzologie sluchu ÚEM AV ČR.

Výsledky naměřené vytvořeným programem ve výše uvedeném zapojení potvrzují, že program lze využít jako plnohodnotnou náhradu procesoru RP2. Při srovnávacím měření provedeném paralelně na obou aparaturách se dosáhlo takřka totožných průběhů nahrávaných odpovědí. Odchyšky těchto průběhů jsou pro určení výsledné amplitudy úlekové reakce naprosto zanedbatelné.

5.3 Možnosti rozšíření

Vytvořený program sice splňuje požadavky na stimulační parametry potřebné pro běžná měření úlekové reakce, ale zároveň je možné jej v případě potřeby upravit dle aktuální potřeby výzkumu. Jednou z možností rozšíření je například úprava stimulační části pro měření metodou detekce mezery v kontinuálním šumu (*gap detection*), která poskytuje informaci o schopnostech časového rozlišení.

6 Závěr

V rámci předkládané diplomové práce byl vytvořen systém pro měření úlekové reakce a prepulzní inhibice. Hlavní součástí systému je software vytvořený v programovacím jazyce Matlab, který umožňuje generovat stimulační pulzy, synchronizovaně nahrávat a zaznamenávat signály z akcelerometru detekční plošiny ve zvukotěsné komoře a analyzovat je.

Tento vytvořený systém využívá zvukové karty E-MU 0404, jejíž cena je významně nižší než standardně používaného real-time procesoru RP2 od firmy Tucker-Davis Technologies.

Experimentální výsledky dokazují, že navržený systém lze využít k behaviorálnímu testování v rámci výzkumu sluchu na Oddělení neurofyzologie sluchu na Ústavu experimentální medicíny Akademie věd České republiky v.v.i.

Seznam použité literatury

1. Fitch, R.H., et al., *Use of a modified prepulse inhibition paradigm to assess complex auditory discrimination in rodents*. Brain Research Bulletin, 2008. 76(1–2): p. 1-7.
2. Rybalko, N., et al., *Age-related changes in the acoustic startle reflex in Fischer 344 and Long Evans rats*. Experimental Gerontology, 2012. 47(12): p. 966-973.
3. Lobarinas, E., S.H. Hayes, and B.L. Allman, *The gap-startle paradigm for tinnitus screening in animal models: Limitations and optimization*. Hearing Research, 2013. 295(0): p. 150-160.
4. Ison, J.R. and P.D. Allen, *Deficits in Responding to Brief Noise Offsets in Kcna1 –/– Mice Reveal a Contribution of This Gene to Precise Temporal Processing Seen Previously Only for Stimulus Onsets*. Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 2012. 13(3): p. 351-358.
5. Watson, J.B., *Psychology as the behaviorist views it*. Psychological review, 1913. 20(2): p. 158.
6. Plháková, A., *Dějiny psychologie*. 2006: Grada Publishing.
7. Pometlová, M., K. Nohejlová, and R. Šlamberová, *Některé problémy behaviorálního testování*. Československá fyziologie, 2012. 61(2): p. 45-50.
8. Moberg, G.P., *The biology of animal stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. 2000, New York: CABI Publishnig. 377.
9. Witvliet vanOyen, C. and S.R. Vrana, *Emotional imagery, the visual startle, and covariation bias: An affective matching account*. Biological Psychology, 2000. 52(3): p. 187-204.
10. Swerdlow, N.R., et al., *Impaired prepulse inhibition of acoustic and tactile startle response in patients with Huntington's disease*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 1995. 58(2): p. 192-200.
11. Landis, C., W.A. Hunt, and H. Strauss, *The startle pattern*. 1939, New York: Farrar & Rinehart, Inc.
12. Burianová, J., *Vliv stárnutí na centrální část sluchového systému laboratorního potkana*, in *1. lékařská fakulta, Ústav experimentální medicíny AV ČR*. 2014, Univerzita Karlova v Praze: Praha. p. 133.
13. Pilz, P.K., H.-U. Schnitzler, and D. Menne, *Acoustic startle threshold of the albino rat (Rattus norvegicus)*. Journal of Comparative Psychology, 1987. 101(1): p. 67 - 72.
14. Koch, M., *The neurobiology of startle*. Progress in Neurobiology, 1999. 59(2): p. 107- 128.
15. Davis, M., et al., *A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies*. The Journal of Neuroscience, 1982. 2(6): p. 791-805.

16. Koch, M. and H.-U. Schnitzler, *The acoustic startle response in rats—circuits mediating evocation, inhibition and potentiation*. Behavioural Brain Research, 1997. 89(1–2): p. 35-49.
17. Als, H., et al., *The Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale (BNBAS)*. Journal of Abnormal Child Psychology, 1977. 5(3): p. 215-229.
18. Gironell, A., et al., *Abnormalities of the acoustic startle reflex and reaction time in gilles de la tourette syndrome*. Clin Neurophysiol, 2000. 111(8): p. 1366-71.
19. Wilbarger, J.L., D.N. McIntosh, and P. Winkielman, *Startle modulation in autism: positive affective stimuli enhance startle response*. Neuropsychologia, 2009. 45(5): p. 1323-31.
20. Wynn, J.K., et al., *Prepulse facilitation and prepulse inhibition in schizophrenia patients and their unaffected siblings*. Biological Psychiatry, 2004. 55(5): p. 518-523.
21. Clause, A., T. Nguyen, and K. Kandler, *An acoustic startle-based method of assessing frequency discrimination in mice*. Journal of Neuroscience Methods, 2011. 200(1): p. 63-67.
22. Braff, D., et al., *Prestimulus Effects on Human Startle Reflex in Normals and Schizophrenics*. Psychophysiology, 1978. 15(4): p. 339-343.
23. Hoenig, K., et al., *Impaired Prepulse Inhibition of Acoustic Startle in Obsessive-Compulsive Disorder*. Biological Psychiatry, 2005. 57(10): p. 1153-1158.
24. Swerdlow, N.R., *Update: Studies of prepulse inhibition of startle, with particular relevance to the pathophysiology or treatment of Tourette Syndrome*. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2013. 37(6): p. 1150-1156.
25. McAlonan, G.M., et al., *Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger's syndrome*. Vol. 125. 2002. 1594-1606.
26. Grillon, C., et al., *Baseline startle amplitude and prepulse inhibition in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder*. Psychiatry Research, 1996. 64(3): p. 169- 178.
27. Swerdlow, N., M. Geyer, and D. Braff, *Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges*. Psychopharmacology, 2001. 156(2-3): p. 194-215.
28. Turner, J., et al., *Time course of tinnitus development following noise exposure in mice*. Journal of Neuroscience Research, 2012. 90(7): p. 1480-1488.
29. Tucker-Davis Technologies, I., *System 3 Manual*. 2012: Alachua, USA.
30. Rybalko, N., et al., *Development of the acoustic startle response in rats and its change after early acoustic trauma*. Behavioural Brain Research, 2015. 286(0): p. 212-221.
31. Systems, E.-M., *E-MU 0404 Digital Audio System (Owner's Manual)*. 2004: Scotts Valley. p. 96.

32. Steinberg, *ASIO 2.0 - Steinberg Audio Streaming Input Output Specification (Development Kit)*. 1999.
33. Heringová, B. and P. Hora, *MATLAB: Díl I. - Práce s programem*. 1995, Plzeň: H-S.
34. Heřman, P., *Biosignály z pohledu biofyziky*. 2006, Praha: DÚLOS. 63.
35. Hančlová, J. and L. Tvrđý, *Úvod do analýzy časových řad*. 2003, Ekonomická fakulta, VŠB-TU: Ostrava.
36. Zaplatílek, K. and B. Doňar, *MATLAB - začínáme se signály* 2006, Praha: BEN. 271.
37. Portfors, C.V., *Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rats and Mice*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2007. 46(1): p. 28-34.
38. Brainard, D.H., *The Psychophysics Toolbox*. Spatial Vision, 1997. 10(4): p. 433-436.
39. Dostál, M., *Základy tvorby uživatelského rozhraní*. 2006, Olomouc: Katedra informatiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého. 68.
40. Zaplatílek, K. and B. Doňar, *MATLAB - tvorba uživatelských aplikací*. 2004, Praha: BEN. 215.
41. Rybalko, N., et al., *Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats*. Physiology & Behavior, 2011. 102(5): p. 453-458.

Seznam obrázků

<i>Obrázek 1:</i> Ukázka průběhu odpovědi úlekové reakce akusticky vyvolané bílým šumem o intenzitě 110 dB SPL. [12]	12
<i>Obrázek 2:</i> Ukázka závislosti amplitudy akusticky vyvolané úlekové reakce (ASR) na intenzitě stimulu (v tomto případě bílého šumu) u potkanů. Červená křivka odpovídá skupině zvířat vystavené v mládí krátké hlukové expozici, modrá křivka je kontrolní skupina zvířat. [12]	12
<i>Obrázek 3:</i> Primární dráha akusticky vyvolané úlekové reakce prochází ze sluchového nervu do ventrálních kochleárních jader (VCN), odtud do ventrálních jader laterálního lemnisku (VLL) a dále do zadních retikulárních jader Varolova mostu (RPC) a poté přes míšní interneurony do motorických neuronů. (upraveno z [15]).....	13
<i>Obrázek 4:</i> Cesta akusticky vyvolané úlekové reakce a centra, která se podílejí na jejím zprostředkování. Tmavé šipky znázorňují nejrychlejší cestu stimulu k motorické odpovědi. [16]	13
<i>Obrázek 5:</i> Ukázka průběhu odpovědi prepulzně inhibované úlekové reakce (černá barva) v porovnání s neinhibovanou odpovědí (šedá barva).....	15
<i>Obrázek 6:</i> Komplexní propojení prepulzně inhibičního reflexu. A - Primární okruh zprostředkovávající prepulzní inhibici (prepulz je slabší než 80 dB SPL). B - Hypotetické propojení částí podílejících se na modulaci (redukci) prepulzní inhibice.	16
<i>Obrázek 7:</i> Obecné schéma zapojení systému pro měření úlekové reakce.	17
<i>Obrázek 8:</i> Real-time procesor RP2 od firmy Tucker-Davis Technologies. [29].....	18
<i>Obrázek 9:</i> Přístrojové vybavení laboratoře pro měření úlekové reakce: A: ovladač detekční platformy A10-21 B: drátěná klíčka E05-15 C: detekční platforma E45-11 D: izolovaná komora Coulbourn Habitest E10-21 s detekční platformou a klíčkou	20
<i>Obrázek 10:</i> Schéma zapojení aparatury se zvukovou kartou E-MU 0404 PCIe.....	21
<i>Obrázek 11:</i> Interní zvuková karta E-MU 0404 PCIe s analogovými, digitálními a optickými vstupy a výstupy používající ovladač ASIO [31].....	22
<i>Obrázek 12:</i> Sinusový signál o frekvenci 400 Hz a délce 30 ms vytvoření funkcí <i>sin</i>	24
<i>Obrázek 13:</i> Záznam 30 ms bílého šumu se směrodatnou odchylkou 0,5 vytvořeného funkcí <i>randn</i>	25

<i>Obrázek 14:</i> Výkonové spektrum signálu bílého šumu vytvořeného funkcí <i>randn</i> splňuje podmínku téměř konstantní hladiny výkonu v celém frekvenčním rozsahu (od 20 Hz do 20 kHz).....	25
<i>Obrázek 15:</i> Srovnání lineárního (<i>čárkovaně</i>) a na druhou umocněného kosinového (<i>plná černá</i>) náběhu (neboli Hannova okna). Na ose x je čas, na ose y amplituda.....	26
<i>Obrázek 16:</i> Ukázka 30 ms sinusového signálu s 5ms náběžnou a 5ms sestupnou hranou tvarovanou podle funkce kosinus na druhou.....	26
<i>Obrázek 17:</i> Ukázka 30 ms bílého šumu s 5ms náběžnou a 5ms sestupnou hranou tvarovanou podle funkce kosinus na druhou.....	26
<i>Obrázek 18:</i> Tvar vytvořeného synchronizačního pulzu o délce 50 vzorků (<i>čárkovaně</i>)...31	
<i>Obrázek 19:</i> Podoba výsledného grafického uživatelského rozhraní programu. Jednotlivé jeho části jsou vysvětleny v kapitole 3.12: Módy programu a jejich podkapitolách. 34	
<i>Obrázek 20:</i> Zobrazení signalizace různých módů programu a jejich umístění v okně uživatelského prostředí.....	36
<i>Obrázek 21:</i> Ovládací panely pro výběr parametrů prepulzu (vlevo) a hlavního stimulačního pulzu (vpravo).	37
<i>Obrázek 22:</i> Informativní náhled vygenerovaného pulzu. Prepulz je tvořen bílým šumem, zatímco hlavní pulz je tón o frekvenci 2 kHz. Červená čára naznačuje pozici synchronizačního pulzu ve druhém kanálu. Vpravo jsou tlačítka pro přidání či odebrání pulzu ze seznamu pulzů.....	37
<i>Obrázek 23:</i> Seznam pulzů se sedmi vytvořenými stimulačními pulzy. Je-li utlumena některá část stimulačního pulzu je nahrazena čárkami (např. zde u dvou pulzů chybí prepulz).	38
<i>Obrázek 24:</i> Panel pro dvou až pětinasobné znásobení vytvořeného seznamu pulzů v normálním či náhodném pořadí. Lze jím násobit seznam i vícekrát po sobě.	39
<i>Obrázek 25:</i> Panel pro nastavení rozmezí času mezi pulzy (ITI) a také aklimatizačního času před přehráním prvního pulzu. Pod panelem jsou tlačítka pro spuštění či přerušení samotného měření.....	40
<i>Obrázek 26:</i> Zpráva zobrazená pomocí funkce <i>msgbox</i> po přerušení měření.	40
<i>Obrázek 27:</i> Ukazatel průběhu měření a času zbývajících do konce. Žlutý obdélník reprezentuje čas mezi pulzy (ITI), zatímco červeně je označen pulz, který je právě přehráván.	41
<i>Obrázek 28:</i> Zobrazení naměřeného signálu s vyznačením minimální a maximální hodnoty.	42

<i>Obrázek 29:</i> Zobrazení naměřených amplitud úlekových reakcí v grafu podle pořadí je možné přepnout rozevíracími seznamy nad ním. Vpravo nahoře je tlačítko startle-PPI, které lze použít k označení referenčního startle pulzu při přepnutí do módu pro zobrazení prepulzní inhibice.	43
<i>Obrázek 30:</i> Zobrazení hodnot prepulzní inhibice v závislosti na intenzitě prepulzu (dB SPL).....	44
<i>Obrázek 31:</i> Automaticky vytvořená tabulka v programu MS Excel, do které jsou vložena naměřená data po stisku tlačítka Exportovat výsledky.	45
<i>Obrázek 32:</i> Uživatelské schéma programu pro měření úlekových reakcí a všech jeho módů.	46
<i>Obrázek 33:</i> Okno umožňující změnu vzorkovací frekvence.	47
<i>Obrázek 34:</i> Srovnání průběhu signálů naměřených programem (červeně) a procesorem RP2 (modře tečkovaně). Jedná se o odpovědi na stimulaci bílým šumem na hladině akustického tlaku 100 - 105 dB SPL.	50
<i>Obrázek 35:</i> Průměry naměřených amplitud (modře) úlekových reakcí pro bílý šum a čisté tóny.	51
<i>Obrázek 36:</i> Amplitudy úlekových reakcí v závislosti na hladinách akustických tlaků stimulačních pulzů (bílého šumu a čistých tónů) naměřené na potkanech F344 [41].	52
<i>Obrázek 37:</i> Ukázka variability konkrétních naměřených odpovědí na bílý šum.....	52
<i>Obrázek 38:</i> Průměry procentuálního vyjádření prepulzní inhibice úlekové reakce na bílý šum	53
<i>Obrázek 39:</i> Ukázka lineární závislosti útlumu amplitudy úlekové reakce na hladině akustického tlaku prepulzního tónu v literatuře [41].....	54
<i>Obrázek 40:</i> Ukázka variability odpovědí prepulzně inhibovaných úlekových reakcí.	55

Seznam kódů

<i>Kód 1:</i> Příkaz pro vytvoření sinusového tónu.	24
<i>Kód 2:</i> Příkaz pro vytvoření bílého šumu. <i>n</i> je počet vzorků požadovaného úseku šumu.	24
<i>Kód 3:</i> Příkazy, kterými lze z Matlabu kompletně ovládat duplexní komunikaci se zvukovou kartou pomocí Psychtoolboxu:	30
<i>Kód 4:</i> Kompenzace zpoždění začátku hledáním náběžné hrany synchronpulzu.	32
<i>Kód 5:</i> Část kódu pro stanovení amplitudy úlekové reakce.	33
<i>Kód 6:</i> Soubor příkazů pro předávání proměnných mezi funkcemi v m-filu:	35