

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

**Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.**

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: Neurovědy



**Mgr. Jana Burianová**

Vliv stárnutí na centrální část sluchového systému laboratorního potkana

Age related changes in the central auditory system in the laboratory rat

**Doktorská dizertační práce**

Školitel: RNDr. Jiří Popelář, CSc.

Praha, 2014

## **Poděkování**

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Popelářovi, CSc., za vedení během mého doktorského studia, prof. MUDr. Josefu Sykovi, DrSc., za cenné rady, připomínky a poskytnuté vědecké zázemí. Poděkování též patří všem spolupracovníkům z kolektivu našeho pracoviště za laskavou pomoc a podporu při práci. Také bych chtěla poděkovat své rodině za psychickou podporu a pochopení.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 18. 6. 2014

**Identifikační záznam:**

BURIANOVÁ, Jana. *Vliv stárnutí na centrální část sluchového systému laboratorního potkana. [Age related changes in the central auditory system in the laboratory rat]*. Praha, 2014. 133 stran, 4 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav experimentální medicíny AV ČR. Školitel Popelář, Jiří.

## Abstrakt

Sluchová ztráta způsobená stárnutím, nazývaná presbyakuze, se stává jednou z nejčastějších zdravotních postižení starších osob. Navzdory intenzivnímu výzkumu jsou změny sluchu spojené se stárnutím stále málo prozkoumány a vzhledem k dlouhodobému stárnutí populace je velmi žádoucí prohloubit znalosti mechanismů presbyakuze. Zaměřili jsme se proto na zjištění změn, které nastávají ve struktuře a funkci sluchového systému mozku pokusných zvířat v souvislosti se stárnutím.

V první studii jsme ověřovali hypotézu snížené inhibiční funkce mozku u potkana během stárnutí tím, že jsme hodnotili změny v obsahu dvou izoform enzymu glutamátdekarboxylázy (GAD65 a 67), který je klíčovou molekulou pro syntézu GABA. Naše výsledky prokázaly využitím metody western blot celkový pokles hladin proteinů GAD65 a GAD67 a na základě imunohistochemie významné změny v imunoreaktivitě GAD65 a GAD67 v colliculus inferior a ve sluchové kůře potkana během stárnutí. Snížil se počet GAD65- a 67-imunoreaktivních těl neuronů a poklesla jejich optická denzita. Získaná data vykazují podobný charakter změn, mají podobný průběh u obou izoform GAD a i u obou sledovaných kmenů potkanů – rychlestárnoucího kmene Fischer 344 (F344) i fyziologicky stárnoucího kmene Long Evans (LE).

V dalším experimentu jsme hodnotili změny kalbindinu (CB) a kalretininu (CR), vápník vázících proteinů, které se v centrální části sluchového systému vyskytují převážně v GABAergních neuronech. Jejich úloha bývá spojována s neuroprotektivní funkcí, avšak jejich změny během stárnutí nejsou příliš známy. Naše výsledky prokázaly výrazné snížení hladiny proteinů CB a CR, stejně tak snížení počtu i objemu CB-ir a CR-ir neuronů v průběhu stárnutí v horních etážích sluchové dráhy u potkanů kmene LE a F344. Stejně jako v předchozím experimentu i zde naměřená data vykazují uniformní charakter těchto změn. Za prvé pozorované změny byly obdobné jak v podkorových, tak korových oblastech centrální sluchové dráhy, ale také ve zrakové kůře. Za druhé stárnutím způsobené změny vykazovaly u obou sledovaných kmenů podobný průběh. Za třetí data získaná metodou western blot byla v zásadě ve shodě s daty získanými imunohistochemickými metodami. Navíc jsme prokázali, že pokles v hladinách CB byl výraznější než u CR.

Základem třetího experimentu byla skutečnost, že stárnutí sluchového systému se manifestuje nižší reaktivitou na zvukové podněty. Testovali jsme proto oba zmiňované kmene potkanů v testu úlekové reakce (ASR) a v testu prepulzní inhibice (PPI), a to ve třech různých

věkových kategoriích. Naše výsledky ukazují, že mezi potkany kmene LE a F344 existuje rozdíl ve změnách úlekové reakce na zvukový stimul v souvislosti se stárnutím. Potkani F344 mají menší ASR amplitudy než potkani LE téměř ve všech případech zvukové stimulace. ASR amplitudy u potkanů F344 ve srovnání s kmenem LE klesají během stárnutí rychleji. Stejně tak prepulzní inhibice se manifestuje u F344 potkanů méně než u LE. Nicméně relativní pokles PPI při stárnutí je u obou kmenů podobný a signifikantního snížení PPI se dosahuje pouze u starých zvířat.

Stejnou metodiku jsme použili v poslední studii, v níž bylo našim cílem zjistit behaviorální reaktivitu na zvukové podněty v dospělosti po hlukové expozici v raném věku. Behaviorální reakce by mohly odrážet změněný charakter reprezentací různých frekvencí zvuku. Naše data ukázala, že audiogramy potkanů s ranou expozicí hluku a potkanů bez expozice se od sebe v dospělosti významně neliší, amplitudy ASR jsou však u exponovaných zvířat menší v případě velké intenzity bílého šumu a tónových podnětů o frekvenci  $\geq 4$  kHz a také účinnost PPI je u exponovaných zvířat signifikantně vyšší při nízkých intenzitách prepulzu (20–30 dB SPL) oproti kontrolním zvířatům. Celkově tyto studie naznačují, jaké změny se mohou vyskytnout ve sluchovém systému mozku potkana v souvislosti se stárnutím a jaké behaviorální testy mohou jako indikátor těchto změn sloužit.

**Klíčová slova:** sluch, stárnutí, Fischer 344, Long Evans, GAD, GABA, kalbindin, kalretinin, ASR, PPI, raná hluková expozice.

## **Abstract**

Age-related hearing loss, presbycusis, is becoming one of the most common health disabilities in elderly people. Despite intensive research, age-related changes are still poorly understood and, given the continuous aging of the population, it is desirable to improve our knowledge of the mechanisms of presbycusis. Consequently we decided to study age-related changes that appear in the structure and function of the central auditory system in the brain of experimental animals.

In the first experiment we tested the hypothesis that during aging there is substantial decline of GABA-mediated inhibition in the central auditory system of the rat. We evaluated levels of both isoforms of glutamatedecarboxylase (GAD65, GAD67), a key enzyme in GABA synthesis. Western blot analysis revealed an overall decrease in levels of both isoforms in the inferior colliculus as well as the auditory cortex in aged rats. The same pattern was found when we used immunohistochemistry analysis; there was a decrease in the number of GAD65 and GAD67-ir neuronal bodies and a decrease in the density of the labeling. The results were similar for both GAD isoforms and both studied strains – the normally aging Long Evans strain (LE) and the Fischer 344 (F344) strain known for accelerated aging.

In the next experiment we evaluated age-related changes in two calcium binding proteins, calbindin (CB) and calretinin (CR), present in the auditory system predominantly in GABAergic neurons. Their neuroprotective function has been extensively studied, however, their role during ageing is yet to be fully uncovered. Our results showed a significant decrease in CB and CR protein levels and a decrease in the number and volume of CB-ir and CR-ir neurons during aging in the upper parts of the auditory pathway, both in LE and F344 rats. Like in the study with GAD, the changes displayed a uniform pattern. First, the decline observed was found in both the subcortical and cortical levels of the auditory pathway, but also in the visual cortex. Second, both strains displayed comparable age-related changes. Third, the western blot protein analysis was in line with the immunohistochemistry cell analysis. In addition, CB declined more significantly than CR.

The third experiment focused on behavioural observations of well known age-related decreases in responsiveness to auditory stimuli. We evaluated both the aforementioned rat strains at three different stages of their life using the acoustic startle reflex test (ASR) and prepulse inhibition (PPI). Our results confirmed different age-related changes of the startle responses

in LE and F344 strains. F344 rats showed lower ASR amplitudes compared to LE rats across all types of acoustic stimuli presented. ASR amplitudes decreased faster at each age in F344 than in LE rats and PPI was manifested to a lesser extent in F344 than LE rats. However, relative decline remained the same for both strains, reaching significance only in aged animals.

The same methodology was used in the fourth study in an attempt to evaluate changes in the responsiveness to acoustic stimuli of adult rats exposed to noise stimuli during early development. Such changes could reflect altered representations of various parameters of sound in the central auditory system. Audiogram data showed that, in adolescence, auditory thresholds of exposed rats were not different from those of unexposed animals. However, in exposed rats ASR amplitudes were smaller at higher intensities of white noise and higher frequencies of tonal stimuli ( $\geq 4$  kHz). Moreover, PPI was expressed more at lower prepulse intensities (20–30 dB SPL) in exposed rats. In summary the results of our studies reveal age-related changes in the central auditory system of rats and gives suggestions as to what type of behavioral methods can serve in the detection of these changes.

**Keywords:** audition, aging, Fischer 344, Long Evans, GAD, GABA, calbindin, calretinin, ASR, PPI, early noise exposure



## SEZNAM ZKRATEK

- ABR (auditory brainstem responses) – objektivní audiometrie, akustickým podnětem vyvolané odpovědi mozkového kmene
- AIF (amplitude-intensity function) – funkce závislosti amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu
- AMPA – kyselina  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová
- ASR (acoustic startle reflex) – úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě
- CB – kalbindin
- CCI (*nucleus centralis colliculi inferioris*) – centrální jádro *colliculus inferior*
- CF – charakteristická frekvence
- CGM – *corpus geniculatum mediale*
- CGMD – dorzální část *corpus geniculatum mediale*
- CGMV – ventrální část *corpus geniculatum mediale*
- CI – *colliculus inferior*
- CNS – centrální nervová soustava
- CR – kalretinin
- dB SPL (sound pressure level) – hladina intenzity zvuku [dB SPL]=  $20 \times \log (P/P_0)$ , kde  $P_0$  je základní akustický tlak ( $2 \times 10^{-5}$  Pa)
- DCI (*nucleus dorsalis colliculi inferioris*) – dorzální kůra *colliculus inferior*
- DPOAE (distorsion products of otoacoustic emissions) – distorzní produkty otoakustických emisí
- ECI (*nucleus externus colliculi inferioris*) – externí kůra *colliculus inferior*
- ECL – metoda zesílené chemiluminiscence
- F344 – kmen Fischer 344
- GABA (gamma-aminobutyric acid) – kyselina gamma-aminomáselná
- GAD (glutamic acid decarboxylase) – glutamátdekarboxyláza
- HRP (horse radish peroxidase) – křenová peroxidáza
- IHC (inner hair cell) – vnitřní vlásková buňka
- ir – imunoreaktivní
- LE – kmen Long Evans
- LTP (long-term potentiation) – dlouhodobá potenciace
- MNTB (medial nucleus of the trapezoid body) – mediální jádro trapézového tělesa
- mRNA (messenger ribonucleic acid) – mediátorová ribonukleová kyselina
- NMDA – N-methyl-D-asparagová kyselina
- OHC (outer hair cell) – vnější vlásková buňka
- OSL – *oliva superior lateralis*
- OSM – *oliva superior medialis*
- PBS – fosfátový pufr
- PPI (prepulse inhibition) – prepulzní inhibice
- PV – parvalbumin
- S.D. (standard deviation) – směrodatná odchylka
- SDS – dodecylsulfát sodný
- S.E.M. (standard error of the mean) – střední chyba průměru
- SK – sluchová kůra (oblasti Te1 + Te3 – pro účely této práce)
- TBST – Tris-buffered saline Tween-20
- Te1,2,3 – anatomické oblasti sluchové kůry (primární, sekundární)
- Tween 20 – polyoxyethylensorbitanmonolaurát
- V1,2 – anatomické oblasti zrakové kůry (primární, sekundární)
- VVP – vápník vážící proteiny
- WN (white noise) – bílý šum
- ZK – zraková kůra (oblasti V1 + V2 – pro účely této práce)

# Obsah

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Fyziologie a anatomie sluchového systému .....</b>	<b>12</b>
1.1.1. Periferní část sluchového systému.....	13
1.1.2. Centrální část sluchového systému.....	16
<b>1.2. Neuropřenašeče v centrální části sluchového systému.....</b>	<b>22</b>
1.2.1. Hlavní excitační neuropřenašeče .....	23
1.2.2. Hlavní inhibiční neuropřenašeče.....	23
1.2.3. Ostatní neuropřenašeče a modulátory .....	25
<b>1.3. Vápník vážící proteiny.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4. Metodiky hodnocení funkce sluchového systému.....</b>	<b>27</b>
1.4.1. Elektrofyziologické měření sluchového prahu (ABR).....	28
1.4.2. Behaviorální testování.....	28
<b>1.5. Změny sluchové funkce během vývoje a stárnutí.....</b>	<b>30</b>
1.5.1. Vývoj sluchového systému a jeho kritická perioda.....	30
1.5.2. Stárnutí a ztráta sluchu.....	32
1.5.3. Vliv stárnutí na fyziologii a buněčnou biologii colliculus inferior.....	34
1.5.4. Vliv stárnutí na fyziologii a buněčnou biologii corpus geniculatum mediale .....	35
1.5.5. Vliv stárnutí na fyziologii a buněčnou biologii sluchové kůry .....	36
1.5.6. Vliv stárnutí na behaviorální reakce vyvolané sluchovými podněty .....	37
<b>2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY .....</b>	<b>38</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Pokusná zvířata.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Hodnocení hladin proteinů a imunoreaktivity GAD65 a 67 v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře u mladých a starých potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>41</b>
3.2.1. Pokusná zvířata .....	41
3.2.2. GAD65 a 67 - western blot.....	42
3.2.3. GAD67 – imunohistochemie.....	44
3.2.4. GAD65 – imunohistochemie.....	45
3.2.5. Stereologie GAD.....	45
3.2.6. Statistická analýza .....	48
<b>3.3. Hodnocení hladin proteinů a imunoreaktivity kalbindinu a kalretininu v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře a v corpus geniculatum mediale u mladých a starých potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>49</b>
3.3.1. Pokusná zvířata .....	49
3.3.2. Kalbindin a kalretinin – western blot.....	49
3.3.3. Kalbindin a kalretinin – imunohistochemie.....	49
3.3.4. Stereologie kalbindinu a kalretininu .....	50
3.3.5. Statistická analýza .....	51
<b>3.4. Hodnocení behaviorální reakce na zvukový podnět v průběhu stárnutí u dvou kmenů potkanů.....</b>	<b>52</b>
3.4.1. Pokusná zvířata .....	52
3.4.2. Stanovení sluchového prahu prostřednictvím registrace ABR.....	52
3.4.3. Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět a prepulzní inhibice.....	54

3.4.4. Zařízení pro měření ASR a PPI.....	54
3.4.5. Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět.....	55
3.4.6. Měření prepulzní inhibice úlekové reakce.....	56
3.4.7. Statistické zpracování.....	56
<b>3.5. Hodnocení behaviorální reakce na zvukový podnět u potkaních samic kmene</b>	
<b>Long Evans ovlivněných krátkou hlukovou expozicí v mládí.....</b>	<b>57</b>
3.5.1. Pokusná zvířata.....	57
3.5.2. Hluková expozice.....	58
3.5.3. Stanovení sluchového prahu prostřednictvím registrace ABR.....	58
3.5.4. Měření úlekové reakce na zvukový podnět.....	59
3.5.5. Měření prepulzní inhibice úlekové reakce.....	59
3.5.6. Statistické zpracování.....	59
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1. Změny v hladinách GAD65 a 67 a v imunoreaktivitě v colliculus inferior, sluchové a zrkové kůře způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>60</b>
4.1.1. Změny hladin GAD65 a 67 způsobené stárnutím u kmene Long Evans.....	60
4.1.2. Změny v GAD65 a 67 způsobené stárnutím u kmene Fischer 344.....	65
<b>4.2. Změny v hladinách CB a CR a v imunoreaktivitě v colliculus inferior, CGM, sluchové a zrkové kůře způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>66</b>
4.2.1. Změny hladin CB způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů.....	66
4.2.2. Změny hladin CR způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů.....	70
<b>4.3. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>75</b>
4.3.1. Sluchové prahy stanovené pomocí ABR.....	75
4.3.2. Úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě.....	76
4.3.3. Prepulzní inhibice úlekové reakce na neočekávaný zvukový stimul.....	81
<b>4.4. Změny behaviorální reakce na zvukový podnět u dospělých potkanů vystavených v mládí krátké hlukové expozici.....</b>	<b>83</b>
4.4.1. Sluchové prahy a závislost amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu.....	83
4.4.2. Úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě.....	84
4.4.3. Prepulzní inhibice úlekové reakce na neočekávaný zvukový stimul.....	86
<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>90</b>
<b>5.1. Změny v hladinách a v imunoreaktivitě proteinů GAD65 a 67 v CI, SK a ZK u starých potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>90</b>
<b>5.2. Změny v hladinách a v imunoreaktivitě proteinů CB a CR v CI, SK, ZK a CGM u starých potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>94</b>
<b>5.3. Změny v úlekové reakci na zvukový stimul a prepulzní inhibici během stárnutí potkanů dvou kmenů.....</b>	<b>98</b>
<b>5.4. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět u potkanů vystavených v mládí hluku.....</b>	<b>102</b>
<b>5.5. Souhrnná diskuze výsledků.....</b>	<b>105</b>
<b>6. SOUHRN PRÁCE / SUMMARY.....</b>	<b>108</b>
<b>7. ZÁVĚRY.....</b>	<b>115</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>117</b>
<b>9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ.....</b>	<b>132</b>
<b>PŘÍLOHY – kopie vlastních publikací</b>	

# 1. ÚVOD

Stárnutí je přirozeným fyziologickým dějem. Ve sluchovém systému se stárnutí projevuje zhoršenou sluchovou funkcí způsobenou hlavně úbytkem sluchových receptorových buněk v kochle. Sluchová ztráta způsobená stárnutím, nazývaná presbyakuze, se v současné době vyskytuje zhruba u 40 % lidí ve věku nad 65 let (Gates & Mills, 2005). Tím se presbyakuze stává druhou nejčastější příčinou zdravotního postižení starších osob. V současné době není znám žádný způsob léčby tohoto sluchového postižení. Střední sluchovou ztrátu je možno alespoň částečně kompenzovat sluchadly, při úplné hluchotě je možné vyvolat určitý sluchový vjem použitím elektronické sluchové náhrady (endokochleární neuroprotézy).

Navzdory intenzivnímu výzkumu jsou změny sluchu spojené se stárnutím stále málo prozkoumány a vzhledem k dlouhodobému stárnutí populace je velmi žádoucí prohloubit znalosti mechanismů presbyakuze. Kromě změn na periférii se specifické změny související se stářím projevují i ve sluchových nervových centrech. Cílem této dizertační práce bylo na modelu laboratorních hlodavců přispět k lepšímu poznání dějů, které se stárnutím ve sluchovém systému souvisejí.

## *1.1. Fyziologie a anatomie sluchového systému*

Zvuk je mechanické vlnění pružného prostředí, může být přenášen jak vzduchem, tak kapalinou či pevnou látkou. U živočichů je zvuk detekován a zpracováván sluchovým systémem. Rozsah slyšitelných frekvencí se u jednotlivých druhů živočichů výrazně liší, odvíjí se od ekologických nároků a způsobu komunikace. Nejpozoruhodnější ekologickou adaptací představuje echolokace, která využívá odlišné odrazivosti zvukových vln podle jejich frekvence. Menší vlnové délky se odrážejí i od malých objektů, jako je hmyz (Houston et al., 2004). Nejvyšší tóny v živočišné říši jsou proto schopni zachytit netopýři, u kterých se udává frekvence až 210 kHz (Fenton & Bell, 1981). Jen o něco málo níže nacházíme horní limit sluchu u dalších echolokací používajících živočichů, jako jsou velryby a delfini. Největší rozsah slyšitelných frekvencí je právě u delfinů, jejichž sluch pokrývá 10 oktáv: 100 Hz – 150 kHz (Au, 2004). Infrazvuk (frekvence < 20 Hz) se dobře přenáší na velké vzdálenosti, a proto jej používají pro

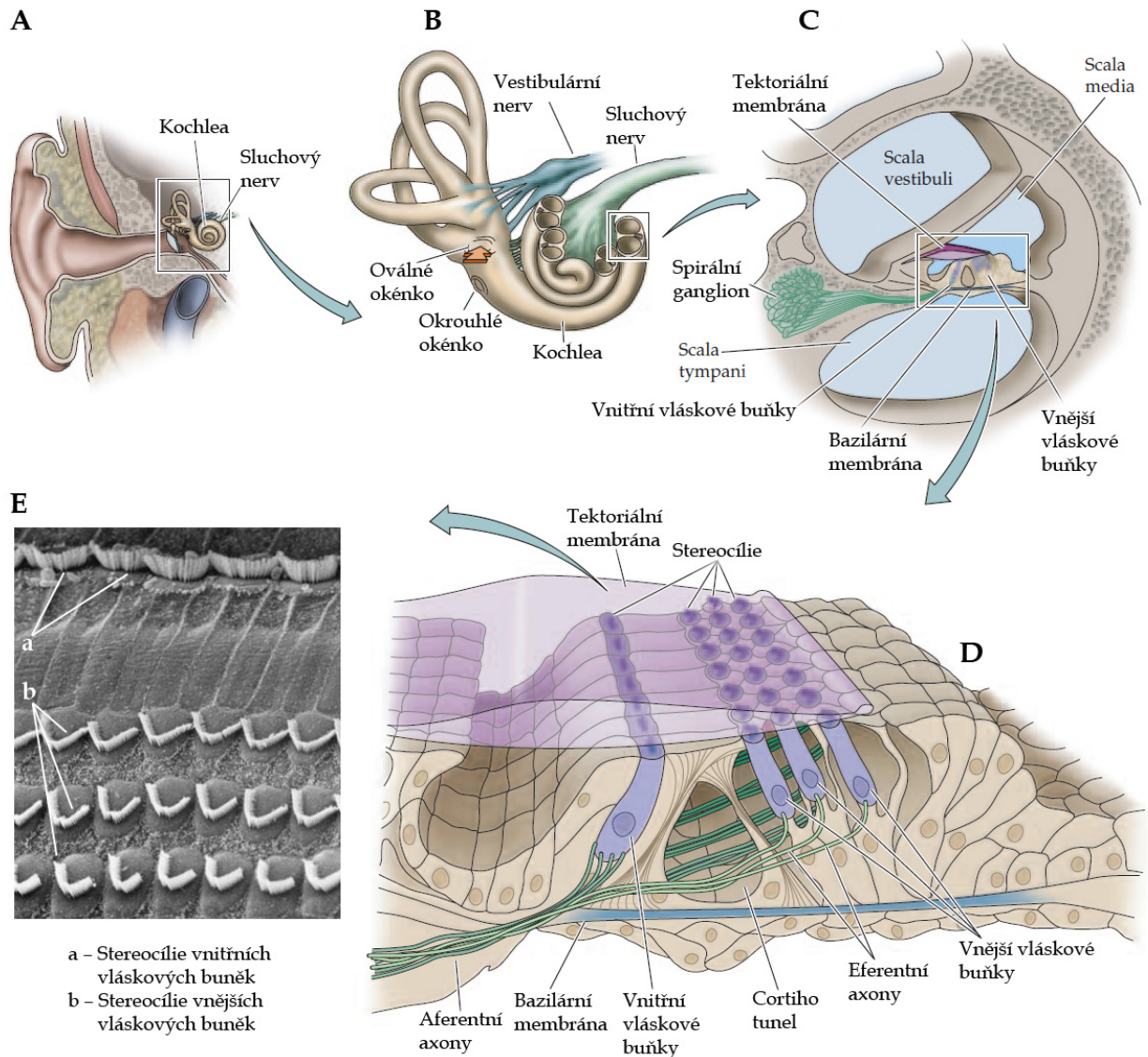
komunikaci velcí živočichové, například okapi, nosorožci a sloni (Langbauer et al., 1991; Payne et al., 1986). U člověka je frekvenční rozsah 16 Hz – 20 kHz, zatímco běžně používaná laboratorní zvířata (myš, potkan, morče) slyší mnohem vyšší frekvence. U pigmentovaného laboratorního potkana se udává rozsah 25 Hz až 70 kHz (Heffner et al., 1994). Potkan může dokonce vnímat i hlubší zvuky, avšak pouze díky tomu, že rozechvívají hmatové vousky, vibrisy (Neimark et al., 2003).

### 1.1.1. Periferní část sluchového systému

Schopnost detekovat zvuk nalézáme ve vývojové linii obratlovců již u ryb, které k tomu používají systém neuromastů postranní čáry. Sluchový orgán (obr. 1) byl původně pouze orgánem rovnovážným (Sigmund et al., 1994), funkce detekovat zvuk se vyvinula až u suchozemských obratlovců (detailní přehled jeho funkce viz Syka et al. (1981b)). Před transformací zvukového podnětu ve vzruch nervových buněk je zvuk filtrován, zesilován a frekvenčně oddělen. V tomto sofistikovaném systému se u savců jako první uplatňuje boltec (obr. 1A), který je u mnoha druhů pohyblivý, avšak u primátů nepohyblivý, a funguje jako frekvenčně závislý směrový přijímač. Přicházející zvukové vlny nejen filtruje, ale také zesiluje a usměrňuje je do zvukovodu, kde se díky efektu pasivní rezonance určité frekvence dále zesilují. U člověka je to nejvíce kolem 3 kHz (Purves, 2004; Shaw, 1974; Syka et al., 1981b), což odpovídá převažující frekvenci lidské řeči, zatímco u potkana je to kolem 17–20 kHz (Gratton et al., 2008; Koka et al., 2008). Na konci zvukovodu zvuk rozechvívá pružnou membránu bubínku a systémem tří kůstek (kovadlinka, kladívko, třmínek) je opět zesilován. Vlnění vzduchu s velkou výchylkou o malém tlaku se převádí na vlnění perilymfy s malou výchylkou o větším tlaku. Uplatňuje se přitom pohyb na páce u středoušních kůstek a dále je tlak zesilován díky tomu, že vibrace jsou přenášeny z velké plochy bubínku na mnohem menší plochu oválného okénka. Pohyb třmínku rozechvívá prostřednictvím oválného okénka perilymfu v hlemýždi.

Hlemýžď (kochlea) je součástí vnitřního ucha, připomínající svým spirálovitým tvarem ulitu hlemýždě. Podélně je hlemýžď rozdělen na tři části: *scala tympani* a *scala vestibuli*, obsahující perilymfu, a *scala media*, vyplněnou endolymfou. *Scala media* obsahuje vlastní sluchový orgán, Cortiho orgán, což je systém tří řad vnějších vláskových buněk (outer hair cells,

OHC), jedné řady vnitřních vláskových buněk (inner hair cells, IHC) a podpůrných buněk umístěných na bazilární membráně (obr. 1C,D,E). U člověka je kolem 3000 IHC a 12000 OHC, potkan má asi 1000 IHC a 3500 OHC (Dannhof & Bruns, 1993). V porovnání se 120 miliony tyčinek a 5 až 7 miliony čípků v sítnici oka je počet sluchových receptorových buněk relativně nízký.



a - Stereocílie vnitřních vláskových buněk  
b - Stereocílie vnějších vláskových buněk

*Obr. 1: Periferní část sluchového systému.*

*A – vnější ucho; B – vestibulokochleární orgán, C – průřez kochleou, D – Cortiho orgán; E – fotografie vnitřních a vnějších vláskových buněk z elektronového mikroskopu.*

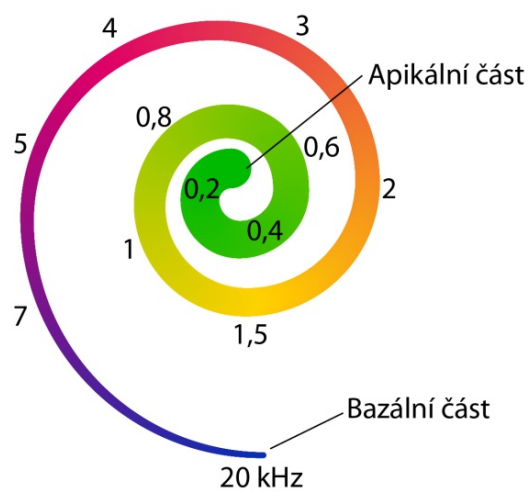
**Obrázky A – D upraveny z Purves (2004);**

**obrázek E upraven z "scienceblogs.com/retrospectacle/2006/06/10/hear-hear-a-primer-on-the-coch-1"**

IHC představují vlastní sluchové receptory. Pohyb endolymfy způsobený zvukovou vlnou ohýbá vlásky IHC, které fungují jako mechanoreceptory. Elektrochemický potenciál endolymfy je +80 mV, zatímco intracelulární prostředí IHC má -40 mV. Ohnutí vlásku jedním směrem způsobí otevření mechanicky ovládaného iontového kanálu pro draslíkové kationty. Ty se proto pohybují ve směru elektrického gradientu a pronikají do buňky. Tímto se membránový potenciál IHC zvýší a na bázi buňky dojde k výlevu mediátoru, glutamátu, který se váže na AMPA receptory výběžků bipolárních buněk spirálního ganglia a vznikne nervový vzruch, který se dále šíří po nervovém vlákne (Matsubara et al., 1996). Na každou IHC je napojeno až 20 aferentních výběžků nervových buněk.

OHC se v evoluci objevují až u savců (Fritsch et al., 2013) a souvisí s lepší detekcí vysokofrekvenčního zvuku (Rossiter et al., 2011). Je pro ně charakteristické, že na svém vrcholu mají stereocilie uspořádané do tvaru W, které se zanořují do tektoriální membrány. OHC mohou na základě stimulace kontrahovat, či se prodlužovat. Obsahují kontraktilní proteiny aktin, myosin a prestin, přičemž prestin tvoří hlavní složku, která aktivně reaguje zkrácením nebo prodloužením na podnět, kterým je změna membránového potenciálu (Dallos, 2008). Kontrakce vyvolají miniaturní pohyb endolymfy, který nicméně můžeme detekovat jako tzv. otoakustické emise. Funkce OHC spočívá v zesílení zvukových signálů a zvýšení citlivosti IHC. Při selektivním funkčním vyřazení OHC se sluchový práh zvyšuje asi o 40 dB. Každá OHC tvoří synapse s nervovými vlákny eferentního nervového systému, který může aktivně ovlivňovat mikromechanické vlastnosti OHC (obr. 1D).

Zvukové vlny vyvolávají pohyb v určité části bazilární membrány v závislosti na své frekvenci: nízké frekvence rozehívají membránu blíže k helikotrematu, vysoké frekvence blíže k oválnému okénku. Tím dochází k analýze zvuku přímo v hlemýždi. IHC v apikálních částech jsou tedy drážděny nízkofrekvenčním zvukem, zatímco IHC na bázi hlemýžďe reagují na vysoké frekvence. Toto rozdělení podle frekvence zvuku (tonotopie, obr. 2) se udržuje dále ve vzestupné dráze až ke sluchové kůře. Neurony sluchového systému jsou charakterizovány



Obr. 2: Tonotopické uspořádání kochleý

tzv. charakteristickou frekvencí (CF), což je frekvence podnětu, na kterou mají nejnižší práh odpovědi. Rozmístění těchto neuronů ve sluchových jádrech určují tonotopii těchto jader.

### 1.1.2. Centrální část sluchového systému

#### 1.1.2.1. Aferentní dráhy

Prvním neuronem centrální části sluchové dráhy (obr. 3) jsou bipolární buňky kochleárního spirálního ganglia (detailní přehled aferentních drah viz Carr et al. (2008); Malmierca a Merchan (2004); Syka et al. (1981b)). Ve spirálním gangliu se rozlišují dva typy neuronů. Převažují neurony typu I (90–95 %), což jsou bipolární, myelinizované neurony inervující IHC a přenášející (striktně tonotopicky) zvukovou informaci z kochlely do vyšších částí centrální sluchové dráhy. IHC komunikuje až s cca 20 dendrity různých neuronů, přičemž nejhustší synaptické spojení je v místech, kde je kochlea na zvuk nejcitlivější (Meyer et al., 2009; Nadol, 1988; Spoendlin, 1969; Spoendlin, 1972). Neurony spirálního ganglia typu II (5–10 %) tvoří slabě myelinizované bipolární (případně unipolární) neurony komunikující s OHC (Nayagam et al., 2011). U OHC je poměr inervace opačný – jeden dendrit neuronu typu II inervuje kolem 20 OHC (Møller, 2000; Spoendlin, 1972). Axony neuronů spirálního ganglia typu I a II se sbíhají a jako sluchová část *nervus vestibulocochlearis* opouští středoušní dutinu a zanořují se přes *meatus acusticus internus* do mozkového kmene. Tam se větví a končí buď ve ventrálním kochleárním jádře (rozlišuje se dále na anteroventrální a posteroventrální) nebo dorzálním kochleárním jádře, přičemž si stále zachovávají tonotopické uspořádání (Romand & Avan, 1997). Vlákná sluchového nervu s nízkou charakteristickou frekvencí směřují převážně do ventrálních částí všech tří oblastí kochleárního jádra, se stoupající charakteristickou frekvencí jsou inervovány dorzálnější částí. Vlákná neuronů typu II končí ve ventrálním kochleárním jádře, jejich význam však není zcela znám (Ryugo & Parks, 2003).

V kochleárním jádře dochází k prvnímu zpracování sluchové informace. Morfologie neuronů úzce koreluje s jejich funkcí. Existují zde např. neurony, které svým jednoduchým výbojem signalizují počátek zvukového podnětu (chobotnicové buňky), jiné doprovázejí zvukové podněty akčními potenciály s pravidelnou frekvencí (tzv. choppery). U hlodavců se zde vyskytují neurony s axony o velké tloušťce, které inervují kontralaterální zadní retikulární jádro Varolova



mostu a které se účastní reflexu úlekové reakce (Sinex et al., 2001). Dorzální kochleární jádro se poprvé vyskytuje u savců (Carr et al., 2008). U potkanů má dokonce laminární strukturu, u člověka nikoliv (Malmierca, 2003). Jeho neurony vysílají axony vzhůru do ipsilaterální olivy superior. Jiné axony směřují do kontralaterální části tegmenta jako *stria acustica dorsalis*, postupují rostrálním mostem vzhůru a inervují *colliculus inferior* (CI). Ventrální kochleární jádro vysílá aferenty přes *stria acustica ventralis (corpus trapezoideum)* do kontralaterální i ipsilaterální olivy superior (přehled spojů kochleárních jader viz Cant & Benson (2003)).

Celý komplex olivy superior je tvořen *nucleus olivaris superior medialis*, *nucleus olivaris superior lateralis*, *nucleus ventralis corporis trapezoidei*, *nucleus medialis corporis trapezoidei* a *nucleus paraolivaris superior*. Neurony dostávají informaci z obou kochleí a i zde jsou tonotopicky organizovány. Jejich funkce spočívá v prostorové lokalizaci zvuku tím, že porovnávají vstup zvukové informace z obou uší a hodnotí rozdíl v čase a intenzitě. Časový rozdíl je analyzován v *nucleus olivaris superior medialis*, zatímco rozdíl v hladině intenzity zvuku je vyhodnocován v *nucleus olivaris superior lateralis* (Carr et al., 2008).

Z komplexu olivy superior vedou ascendentní vlákna k další etáži sluchové dráhy – ke *colliculus inferior* (Druga & Syka, 1984a), který se nachází ve středním mozku. Probíhají cestou laterálního lemnisku a jedná se většinou o vlákna, která nesou informaci z kontralaterální kochley. Část neuronů se ještě v této dráze přepojuje v jádrech laterálního lemnisku.

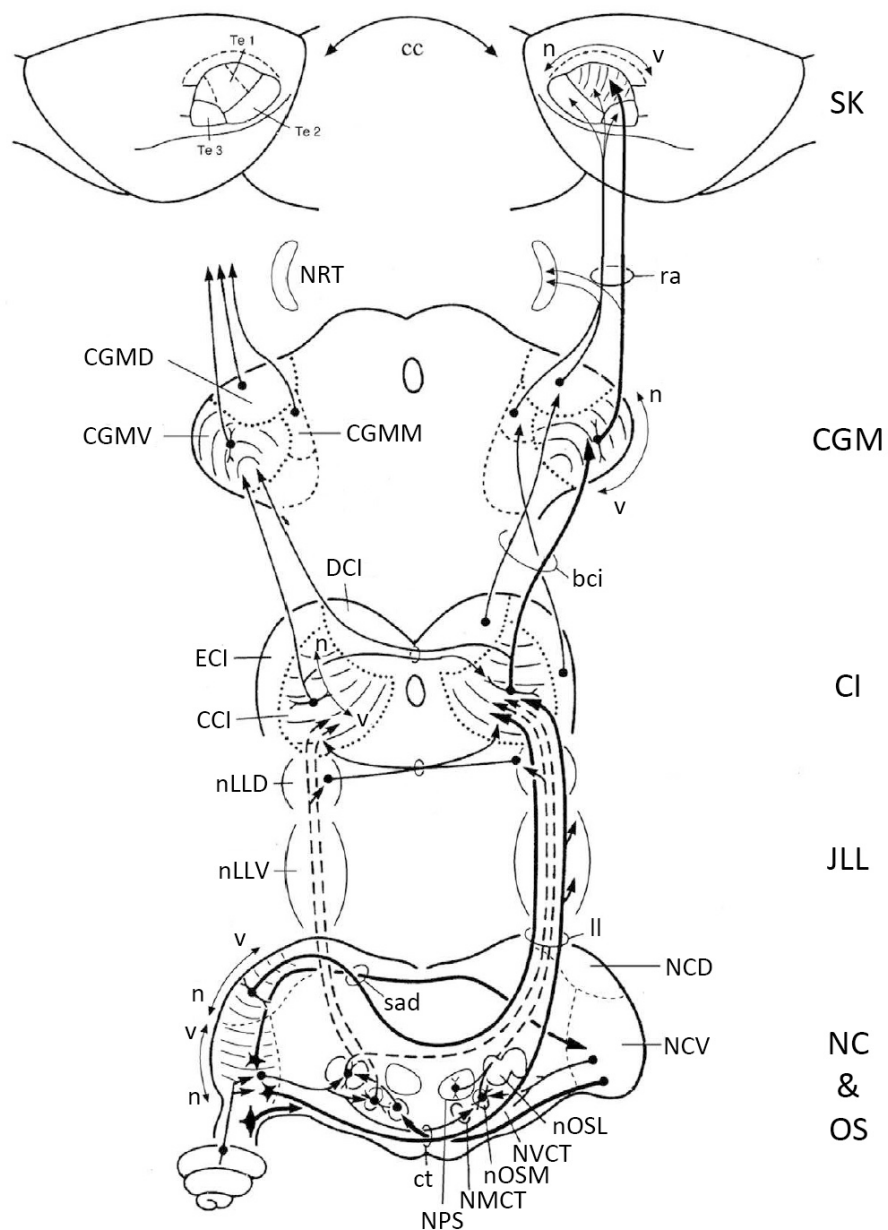
*Colliculus inferior* bývá dělen na centrální jádro (CCI), externí kůru (ECI) a dorzální kůru (DCI). Jednotlivé části CI se mezi savci významně liší co do velikosti, některé mohou dokonce chybět. ECI například zabírá u potkanů větší podíl CI než u kočky (Malmierca et al., 1993; Smith, 1992). Centrální jádro má typickou laminární strukturu, která je přítomna u všech studovaných druhů savců a která představuje funkční základ pro zachování tonotopie. Hlavním buněčným typem jsou ploché, diskovité neurony, které přijímají signály z níže položených jader sluchové dráhy. Sousedící neurony mají často podobné charakteristické frekvence (Syka et al., 1981a). Na tónové stimuly reagují zpravidla tonickou odpovědí, méně často výbojovou aktivitou pouze na začátku podnětu (Popelár & Syka, 1982; Syka et al., 2000). Z centrálního jádra pak dráha pokračuje do *corpus geniculatum mediale* (CGM). Neurony této dráhy jsou nejen glutamatergní, ale i GABAergní (Peruzzi et al., 1997). Externí kůra CI má tři vrstvy. Kombinuje sluchovou a somatosenzorickou informaci a je zajímavé, že například u sov obsahuje zvukovou mapu prostředí (Knudsen & Konishi, 1978). Spojení ECI s *colliculus superior* umožňuje

koordinovat orientaci zraku vzhledem ke sluchovým podnětům (Druga & Syka, 1984c; Syka & Radil-Weiss, 1971; Syka & Straschill, 1970). Stejně tak i dorzální kůra CI se vyznačuje třemi vrstvami. Ta nejhlubší je místem, kde dochází k hlavní interakci mezi vzestupnou a sestupnou drahou, neboť zde končí nejen aferenty z nižších částí sluchové dráhy (kochleární jádro), ale i eferenty z primární sluchové kůry. V obou korových oblastech lze nalézt neurony s CF, třebaže jejich podíl je mnohem menší než v případě CCI (Aitkin et al., 1994). *Colliculus inferior* má bohaté komisurální spoje, zhruba pětina je GABAergních (Hernández et al., 2006). Aferenty opouští CI přes *brachium* a končí v CGM, hlavní sluchové thalamické struktuře.

*Corpus geniculatum mediale* se dělí na tři hlavní části: ventrální, dorzální a mediální (Clerici & Coleman, 1990; Winer et al., 1999). Ventrální část se dále dělí na *pars lateralis* a *pars ovoidea*. I u nich nacházíme laminární uspořádání, které je znakem zachované tonotopie. Ventrální část tak patří k hlavní vzestupné sluchové dráze, tonotopicky uspořádanou informaci dostává vlákny z ipsilaterálního CCI (Ledoux et al., 1987; Peruzzi et al., 1997) a po přepojení ji projikuje dále do primární oblasti sluchové kůry Te1 (Clerici & Coleman, 1990; Kimura et al., 2003; Ryugo & Killackey, 1974; Shi & Cassell, 1997). Hlavní neurony se vyznačují chomáčkovitými dendrity a z CCI dostávají jak excitační, tak inhibiční (GABA) vstup (Bartlett & Smith, 1999; Peruzzi et al., 1997). Dorzální a mediální části CGM přijímají spíše polymodální informaci a elektrofyziologické vlastnosti mají odlišné než ventrální část CGM (Kvasnák et al., 2000). Dorzální část CGM zásobují vlákna z nelemniskálních částí *colliculus inferior*, tzn. DCI a ECI (Shi & Cassell, 1997), a projekce míří do sekundárních oblastí sluchové kůry, insulární kůry (Clerici & Coleman, 1990) a amygdaly (Doron & Ledoux, 1999). Opačným směrem jde signál ze všech oblastí sluchové kůry a z *nucleus reticularis thalami* (Shi & Cassell, 1997). Mediální část CGM přijímá ještě rozmanitější vstup. Nejen polymodální informaci z ECI, ale i níže postavených oblastí sluchové dráhy, jako oliva superior, laterální lemniskus (Bajo et al., 1993) a kochleární jádro (Malmierca et al., 2002). Aferenty přicházejí i ze spinální míchy (Ledoux et al., 1987). Eferentní spoje mediální část CGM vysílá do všech oblastí sluchové kůry (Clerici & Coleman, 1990), k somatosenzorické kůře (Spreafico et al., 1981), amygdale (Doron & Ledoux, 1999) a do *nucleus caudatus* (LeDoux et al., 1985). Je zajímavé, že CGM nemá žádné komisurální spoje a jen minimum vlastních (inter)neuronů produkujících GABA (Winer et al., 1999; Winer & Larue, 1988). CGM se účastní řady integračních procesů, mj. lokalizace zvuku v prostoru (Altman et al., 1970).

Konečným cílem vzestupné sluchové dráhy je sluchová kůra (SK). Obecně se skládá z primární oblasti, která se vyznačuje tonotopií, a z částí sekundárních. Primární oblast bývá označována jako jádrová či centrální (core), obklopená pásem sekundární (belt), která může být obklopena ještě dalším pásem (parabelt). Takové rozdělení odpovídá třem stádiím zpracování sluchové informace v SK. Jelikož však různé druhy savců zpracovávají zvukovou informaci do různé míry, je uspořádání SK velice variabilní. SK je nejlépe zmapována u kočky, zatímco lysencefalický mozek potkana poněkud brání přesnějšímu vymezení jednotlivých částí. Pokusy popsat ho na základě cytoarchitektoniky vedly k několika mapám s různou nomenklaturou (Cipolloni & Peters, 1979; Krieg, 1946a; Krieg, 1946b; Krieg, 1947) v poslední době bývá uznáván systém, který rozděluje kůru na anatomické oblasti Te1, Te2 a Te3 (Zilles, 1985; Zilles et al., 1980).

Sluchová kůra má typickou strukturu obsahující šest vrstev. Pyramidální buňky jsou převážně glutamatergní a nacházejí se ve vrstvách III a V. Naproti tomu GABAergní buňky většinou mezi pyramidové nepatří a najdeme je ve všech vrstvách kůry. Tonotopicky uspořádanou informaci dostává primární sluchová kůra z laminárně uspořádané ventrální části CGM, ačkoliv slabé projekce existují i z dorzální a mediální části (Kimura et al., 2003; Roger & Arnault, 1989; Smith et al., 2012). Thalamokortikální spoje končí ve třetí a čtvrté korové vrstvě a rovněž na rozhraní páté a šesté (Liu et al., 2007; Romanski & LeDoux, 1993; Ryugo & Killackey, 1974; Smith et al., 2012). Vysoké frekvence jsou zastoupeny v Te1 rostrálně, nízké frekvence kaudálně (Profant et al., 2013b). Až 80 % Te1 u potkana je věnováno frekvencím nad 8 kHz (Kelly & Sally, 1988). Některé korové neurony mohou mít prahové křivky úzce laděné, tj. reagují pouze na úzký rozsah frekvence zvuku, zatímco jiné neurony mají receptivní pole komplexnější a variabilnější (Turner et al., 2005b). V kůře je bohaté zastoupení interneuronů, typické jsou košíkové buňky, které jako neurotransmitter využívají GABA. Komisurální spojení jde cestou *corpus callosum* a může začít i skončit prakticky v jakékoliv vrstvě (Roger & Arnault, 1989). Z Te1 se dostává zvuková informace do oblastí Te2 a Te3, ale i do nekorových, například amygdaly (Romanski & LeDoux, 1993; Shi & Cassell, 1997).



Obr. 3: Schéma aferentních spojů centrální části sluchové dráhy.

SK – sluchová kůra, cc – corpus callosum, ra – radiatio acustica, NRT – nucleus reticularis thalami, CGM – corpus geniculatum mediale, CGMD – dorzální část CGM, CGMV – ventrální část CGM, CGMM – mediální část CGM, bci – brachium colliculi inferioris, CI – colliculus inferior, DCI – dorzální kůra colliculus inferior, ECI – externí kůra colliculus inferior, CCI – centrální jádro colliculus inferior, JLL – jádra laterálního lemnisku, ll – laterální lemniskus, nLLD – dorzální jádro laterálního lemnisku, nLLV – ventrální jádro laterálního lemnisku, sad – stria acustica dorsalis, OS – oliva superior, NC – kochleární jádro, NCD – dorzální kochleární jádro, NCV – ventrální kochleární jádro, ct – corpus trapezoideum, NPS – nucleus paraolivaris superior, NMCT – nucleus medialis corporis trapezoidei, NVCT – nucleus ventralis corporis trapezoidei, nOSM – nucleus olivaris superior medialis, nOSL – nucleus olivaris superior lateralis, „n“ – nízké frekvence, „v“ – vysoké frekvence. Tlusté čáry – silné spoje, čárkované čáry – slabé spoje.

Upraveno z (Malmierca & Merchan, 2004), latinská terminologie dle (Petrovický, 2002).

Ve sluchové kůře jsou zpracovávány především složitější zvuky; přicházející informace už je předzpracována v nižších etážích a výboj korového neuronu už ani časovými nebo intenzitními charakteristikami nepřipomíná původní zvukový podnět (Nelken, 2004; Schreiner et al., 2000). Složitější zvuky se vyskytují především při vnitrodruhové komunikaci, a tak v kůře nacházíme odpovědi například na ultrazvukové vokalizace (Profant et al., 2013b; Suta et al., 2013). Zvláštností potkana oproti jiným savcům (Kavanagh & Kelly, 1987) je, že oboustranné léze sluchové kůry nenaruší schopnost lokalizovat zdroj zvuku (Jenkins & Masterton, 1982; Kelly & Glazier, 1978; Kelly & Kavanagh, 1986). Nicméně naruší schopnost odlišovat vzestupné a sestupné frekvenčně modulované zvuky (Rybalko et al., 2006). Sluchová kůra se vyznačuje výraznou plasticitou (Noreña et al., 2006). U lidí existuje funkční asymetrie mezi jednotlivými hemisférami a zdá se, že i u potkanů hraje ve sluchových procesech větší roli levá sluchová kůra než pravá (Rybalko et al., 2006; Rybalko et al., 2010).

#### 1.1.2.2. Eferentní dráhy

Kromě aferentní sluchové dráhy existuje ve sluchovém systému i dráha eferentní, která prochází stejnými jádry jako dráha vzestupná. Sestupná vlákna začínají v páté a šesté vrstvě sluchové kůry a celá sestupná dráha je tvořena několika zpětnovazebnými smyčkami, které na sebe navazují.

Nejvýraznější dráha je kortikotektální, jejíž vlákna sestupují z V. vrstvy SK do *colliculus inferior* (Druga & Syka, 1984b; Druga et al., 1997; Nwabueze-Ogbo et al., 2002; Popelár et al., 2003; Syka & Popelár, 1984). Počet vláken v kortikotektální dráze je dokonce vyšší, než počet vláken aferentních. Největší počet sestupných kortikotektálních vláken inervuje dorzální a externí kůru CI (Druga & Syka, 1984b; Druga et al., 1988). Z jádra CI sestupují vlákna eferentního systému oboustranně do *nucleus cochlearis* a *oliva superior*, kde inervují OSM, OSL i MNTB (Druga & Syka, 1984a; Syka et al., 1988). Byly popsány i přímé spoje ze sluchové kůry do kochleárního jádra a jader olivy superior, ale jejich počet je velmi malý (Weedman & Ryugo, 1996).

V jádrech komplexu oliva superior začíná periferní část eferentního systému, tzv. olivokochleární (Rasmussenův) svazek, který inervuje vláskové buňky hlemýžďe (Rasmussen, 1946). Vlákna olivokochleárního svazku se připojují k aferentním vláknům

sluchového nervu a vstupují společně do hlemýždě. Jejich počet však není velký, u různých živočichů se pohybuje mezi 470 (mys) až 2350 (morče). Ve srovnání s počtem aferentních vláken, který se pohybuje mezi 10000 až 50000, je počet eferentních vláken relativně nízký. Velké multipolární neurony mediální části olivokochleárního svazku leží převážně v kontralaterálním medioventrálním paraolivárním jádře, difuzním jádře nazývaným také ventrální jádro trapézového tělesa, které se nachází v blízkosti OSM, a myelinizovaná vlákna inervují OHC. Laterální část olivokochleárního svazku začíná převážně v ipsilaterální OSL (malé sférické neurony) a nemyelinizovaná vlákna tvoří synapse s IHC, většinou se napojují na presynaptická zakončení aferentních vláken typu I. Hlavním mediátorem mediální i laterální části olivokochleárního svazku na synapsích OHC a IHC je acetylcholin, ale vláskové buňky mohou obsahovat i další mediátory jako dopamin, serotonin nebo GABA.

Funkce eferentního systému dosud není úplně objasněna, ale předpokládá se, že působí protektivně proti účinkům hluku, zlepšuje detekci komplexních zvuků v šumu, řeči, biologicky důležitých zvuků v šumu, potlačení maskování (Christopher Kirk & Smith, 2003; Kawase et al., 1993; Micheyl et al., 1995) a upravuje citlivost sluchu během pozornosti na jiné podněty. Aktivace olivokochleárního svazku (elektrickou stimulací vláken olivokochleárního svazku nebo akustickou stimulací protilehlého ucha) potlačí zvukem vyvolané odpovědi v ipsilaterálním uchu, tzn., že chrání sluchové receptory před poškozením při přebuzení. Podobný efekt má i elektrická stimulace CI (Popelar et al., 2002). Aktivace sluchové kůry má komplexní účinek, excitační i inhibiční, tzn., že spíše moduluje nervovou aktivitu v podkorových strukturách.

## ***1.2. Neuropřenašeče v centrální části sluchového systému***

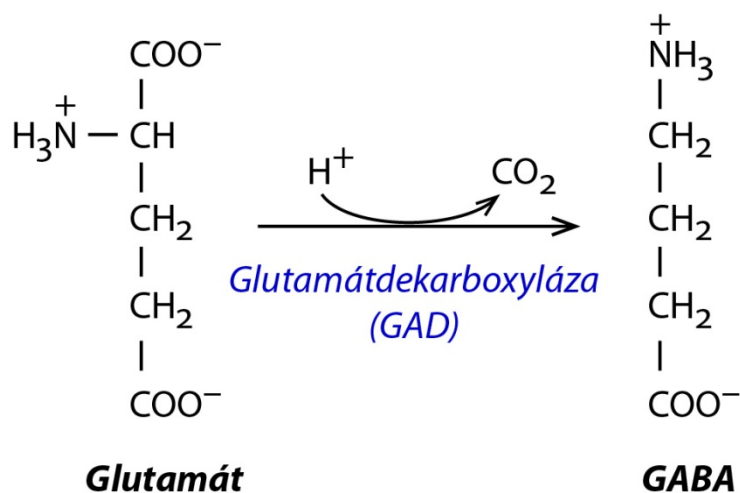
Kódování zvukového stimulu staví centrální část sluchového systému v nárocích na přenos nervového vzruchu do specifické pozice. Na mnoha synapsích dochází k mimořádně rychlému přenosu vzruchu i k rychlému navození refrakterní fáze. Toto přesné časování je důležité nejen pro frekvenční kódování, ale především pro prostorové slyšení.

### 1.2.1. Hlavní excitační neuropřenašeče

Hlavní excitační neurotransmise je zprostředkována glutamátem, u nějž nejdůležitější roli při rychlém přenosu vzruchu hrají AMPA receptory. Ty vykazují v mnohých neuronech sluchové dráhy větší permeabilitu pro dvojmocné kationty než AMPA receptory v jiných oblastech mozku, čímž zajišťují rychlou desenzitizaci a deaktivaci. Za touto vlastností stojí specifické „sluchové“ složení podjednotek AMPA receptoru (Trussell, 1997). Na druhou stranu má vazba glutamátu na NMDA receptory spíše modulační účinek projevující se v různých plastických dějích v CNS (Altschuler & Shore, 2010).

### 1.2.2. Hlavní inhibiční neuropřenašeče

V centrální části sluchového systému je inhibice zprostředkována glycinem a kyselinou gamaaminomáselnou (GABA, obr. 4). U obou přenašečů lze pozorovat rostrokaudální gradient. Zatímco GABA je hojněji zastoupena v rostrálních částech mozku, glycin se více vyskytuje v kaudálních (Varolův most, prodloužená mícha). Ve středním mozku se často GABAergní neurony nacházejí spolu s glycinergními.



Obr. 4: Reakce syntézy kyseliny gamaaminomáselné (GABA) dekarboxylací glutamátu prostřednictvím enzymu glutamátdekarboxylázy (GAD).

V primární sluchové kůře představují GABAergní neurony 15–25 % všech neuronů (Prieto et al., 1994). Nejvíce jich je v první vrstvě (95 %), nejméně v šesté (16 %) (Prieto et al.,

1994). Tvoří je především lokální interneurony. CGM má vlastních inhibičních neuronů minimum, avšak bohatá inervace GABAergními axony přichází z CI (Winer et al., 1996), které má naopak obsah GABAergních neuronů poměrně vysoký, tvoří přibližně jednu čtvrtinu (Merchán et al., 2005). Jelikož glycinová neurotransmise je rychlejší než přes GABA, v průběhu vývoje může dojít při zrychlování synaptického přenosu k výměně GABA<sub>A</sub> receptorů za glycinové, jako je tomu v MNTB (Turecek & Trussell, 2002). V kochleárním jádře je inhibičních neurotransmiterů více v dorzálním než ve ventrálním. GABA též nacházíme v kolokalizaci s acetylcholinem v olivokochleárním spojení, jehož terminály se váží k vnitřním či vnějším vláskovým buňkám. GABA<sub>A</sub> receptory jsou iontovými kanály a jsou zpravidla postsynaptické, GABA<sub>B</sub> jsou spřaženy s G proteiny a mohou být pre i post-synaptické. Aktivace presynaptických GABA<sub>B</sub> receptorů sníží výlev GABA nebo glutamátu na synapsi. Ve výsledku může být tedy působení GABA v tomto případě jak inhibiční, tak excitační. Vazba ligandu na postsynaptický GABA<sub>A</sub> receptor vede k jeho hyperpolarizaci.

GABA je syntetizována dekarboxylací glutamátu enzymem glutamátdekarboxylázou (GAD). V savčím mozku se vyskytují dvě izoformy o molekulové hmotnosti 65 kDa (GAD65) a 67 kDa (GAD67), každá je kódována svým vlastním genem. Většina GABAergních neuronů exprimuje obě izoformy, přičemž GAD65 bývá častěji v axonovém zakončení, v němž je pak GABA umístěována do vezikulů, zatímco GAD67 se nachází v průběhu celého neuronu včetně somatu a souvisí s nevezikulárním výlevem GABA. Knock-out GAD67 je letální (Asada et al., 1997), naproti tomu knock-out GAD65 jen zeslabí výlev GABA při vyšší intenzitě stimulace (Tian et al., 1999). Funkce obou forem je tedy odlišná a může odrážet rozdíly v časoprostorovém zpracování či kódování informace přenášené GABAergními neurony (Soghomonian & Martin, 1998).

Funkce inhibičního působení GABA je zesílení sluchové informace, zlepšení poměru signálu k šumu. GABA<sub>B</sub> může mít rovněž vliv na plasticitu ve sluchovém systému. Bylo prokázáno, že v laterální horní olivě je jeho činnost spojena s vyvoláním dlouhodobé deprese inhibiční neurotransmise (Kotak et al., 2001). GABA hraje důležitou roli v plasticitě nervových spojení. Soudí se, že hlavním faktorem určujícím míru synaptické plasticity v senzoryckých částech kůry je poměr mezi inhibicí a excitací. Nedávná studie na potkanech ukázala, že během učení lokalizovat sluchový podnět dochází ve sluchové kůře ke změně poměrů GABA<sub>A</sub> a NMDA



receptorů. Je zajímavé, že dochází i ke změně zastoupení jednotlivých podjednotek těchto receptorů (Zhang et al., 2013).

### *1.2.3. Ostatní neuropřenašeče a modulátory*

Acetylcholin se nevyskytuje v CNS v tak dominantním množství jako předchozí neuropřenašeče, přesto ho nacházíme hned v několika oblastech sluchové dráhy. Obsahují ho eferentní neurony olivokochleárního svazku, které se synapticky pojí s OHC. Najdeme ho rovněž v kochleárním jádře, korových oblastech CI, v CGM a v primární sluchové kůře. Funkce acetylcholinu spočívá zřejmě v modulaci plastických změn (Altschuler & Shore, 2010) a v případě kůry i v regulaci zpracovávání komplexních stimulů (Metherate et al., 2005). Ve sluchové dráze se také uplatňuje noradrenalin, který se dostává z *locus coeruleus* do kochleárního jádra, komplexu olivy superior, CI a sluchové kůry (Altschuler & Shore, 2010). Neuromodulátor oxid dusnatý, resp. NADPH diaforáza, byly popsány v kochleárním jádře, dorzální a externí kůře CI, v CGM a sluchové kůře (Druga & Syka, 1993; Druga & Syka, 2001; Ouda et al., 2003). Ve sluchovém systému byla prokázána jeho role při pomalých regulačních mechanismech na synapsi (Steinert et al., 2008).

### **1.3. Vápník vážící proteiny**

Vápník vážící proteiny (VVP) – kalbindin (CB), parvalbumin (PV) a kalretinin (CR) – představují hlavní nárazníkový systém pro udržování nízké hladiny cytosolického vápníku v CNS (Baimbridge et al., 1992; Heizmann & Braun, 1992; Miller, 1995), což z nich činí jeden z důležitých cílů v neuroprotektivě vůči excitotoxickému výlevu vápníku (Baimbridge et al., 1992; Scharfman & Schwartzkroin, 1989). Jejich úloha však nemusí být nutně vždy neuroprotektivní, jak ukázaly některé studie (D'Orlando et al., 2002; Figueredo-Cardenas et al., 1998). Narušená regulace intracelulárního vápníku způsobená změnami v hladinách VVP se objevuje u neurodegenerativních a neuropsychiatrických onemocnění. Bývá zmiňována v souvislosti s Alzheimerovou (Mikkonen et al., 1999; Palop et al., 2003; Palop et al., 2011), Parkinsonovou (Hurley et al., 2013; Mouatt-Prigent et al., 1994) a Huntingtonovou chorobou (Dong et al., 2012; Liang et al., 2005), stejně tak jako se schizofrenií (Fung et al., 2014; Reynolds

et al., 2004; Sakai et al., 2008), bipolární (Sakai et al., 2008; Wang et al., 2011) a depresivní poruchou (Maciag et al., 2010). Výše uvedené VVP jsou exprimovány v mnoha mozkových oblastech a je pozoruhodné, že téměř nikdy se tyto proteiny nevyskytnou zároveň v jednom neuronu, vidáme je tedy jako tři různé neuronální populace (Hof et al., 1999). Výjimku tvoří gangliové a amakrinní buňky na sítnici, kde se však VVP objevují odděleně v jiných buněčných kompartmentech (Mojumder et al., 2008). Vzhledem k bohatému zastoupení v mozku a vzájemně se nepřekrývající lokalizaci bývají zmiňované VVP často používány jako buněčné markery neuronálních populací.

Parvalbumin bývá nalézán téměř výlučně (výjimka viz Jinno a Kosaka (2004)) v GABAergních neuronech (Gonchar & Burkhalter, 1997). Vyskytuje se ve všech strukturách centrální části sluchové dráhy kromě CGM (Celio, 1990; Coveñas et al., 1991; Ouda et al., 2008), typicky v interneuronech (Celio, 1986; DeFelipe, 1997; Kawaguchi & Kubota, 1998; Kosaka et al., 1987). Vzhledem k funkci sluchové dráhy je důležité zmínit, že ho obsahují mj. i korové GABAergní košíkové buňky vyznačující se vysokofrekvenčními výboji (Atencio & Schreiner, 2008; Kawaguchi & Kubota, 1998; Sohal et al., 2009). Ty jsou nezbytné pro vytvoření gama oscilací (30–80 Hz), což je mechanismus, kterým mozek vytváří časovou synchronizaci při zpracování informace umožňující zesílit zpracováváný signál a potlačit šum (Bartos et al., 2007; Cardin et al., 2009; Sohal et al., 2009). Narušení funkce těchto oscilací je pak pozorováno například v souvislosti s autismem (Gandal et al., 2010; Rubenstein & Merzenich, 2003) a schizofrenií (Gandal et al., 2012; Sun et al., 2011).

Kalbindin naproti tomu není výlučně spjat s GABAergními neurony (Kawaguchi & Kubota, 1998; Kubota et al., 1994; van Brederode et al., 1991), přestože jej nalzáme především v nich (DeFelipe, 1997). Typicky se nachází v hipokampálních granulárních interneuronech, ale i v pyramidálních buňkách (Müller et al., 2005) a v mozečkových Purkyňových buňkách (Baimbridge et al., 1992). U hlodavců byl dále popsán například v dopaminergních neuronech středního mozku (Liang et al., 1996), a třebaže cholinergní neurony bazálního telencefalu u potkana kalbindin neobsahují, byl opakovaně zjištěn u opic (Chang & Kuo, 1991; Geula et al., 1993). Kalbindin je důležitý pro plastické děje v mozku. Kalbindin knockoutované myši neudrží LTP v hipokampálním *gyrus dentatus* a oblasti CA1 (Geula et al., 1993; Westerink et al., 2012). U myších hipokampálních pyramidálních buněk, či na synapsi mezi mechovými vlákny a CA3 pyramidálními neurony vede nasycení presynaptického CB

k facilitaci výlevu neuropřenašeče (Blatow et al., 2003). Úbytek či poškození CB-ir neuronů je pozorováno při schizofrenii (Sakai et al., 2008), Alzheimerově (Hurley et al., 2013; Mikkonen et al., 1999) a Parkinsonově chorobě (Hurley et al., 2013).

U kalretininu se uvádí, že se vyskytuje ve zvýšené míře v neuronech sluchové dráhy (Rogers, 1987), tedy v systému, který obzvláště vyžaduje přesné načasování během zpracování informace, přesto CR-ir buňky (stejně jako CB-ir) nepatří mezi neurony s vysokofrekvenčními výboji jako je tomu u parvalbuminu. V kůře bylo popsáno, že CR-ir neurony tvoří 10 – 30 % GABAergních neuronů (Gonchar & Burkhalter, 1997). Stejně jako v hipokampu (Freund & Buzsáki, 1996), tak i v kůře (Caputi et al., 2009; Gonchar & Burkhalter, 1997) se CR-ir neurony většinou synapticky pojí s dalšími interneurony. Zatímco v hipokampu zpravidla s CR-ir nebo CB-ir neurony (Gulyás et al., 1996), v kůře naopak s PV-ir neurony. Tím se nabízí myšlenka, že korové CR-ir buňky se účastní okruhu, jímž se v kůře generují oscilace (Caputi et al., 2009), čímž by mohly mít zásadní význam pro zpracování sluchové informace. Na rozdíl od parvalbuminu a kalbindinu bývá funkce a hladina kalretininu u neuropsychiatrických onemocnění většinou nezměněna (Beasley et al., 2002; Cotter et al., 2002; Reynolds et al., 2004; Sakai et al., 2008; Sibille et al., 2011; Tooney & Chahl, 2004).

Při stárnutí dochází u VVP k jejich významnému úbytku, který však není v celém mozku uniformní a i jednotlivé VVP se liší mezi sebou. U experimentálních zvířat byl prokázán úbytek CB v mozečku, striatu (Kishimoto et al., 1998) a v hipokampu (de Jong et al., 1996; Kishimoto et al., 1998), kde je provázený zhoršením kognitivních funkcí (Moreno et al., 2012; Soontornniyomkij et al., 2012). U stárnoucích lidí byla objevena snížená hladina jak CB, tak CR v několika korových strukturách včetně sluchové kůry (Bu et al., 2003). Obsah PV zůstává s věkem zpravidla nezměněn. Avšak u stárnoucích potkanů kmene Fischer 344 byl ve sluchové kůře nalezen pokles imunoreaktivity pro PV (Ouda et al., 2008).

#### ***1.4. Metodiky hodnocení funkce sluchového systému***

Ke zhodnocení funkce sluchového systému, ať už v normě, za patologických stavů či po experimentálním zásahu můžeme na živém experimentálním zvířeti použít dvou základních přístupů: elektrofyzilogického a behaviorálního.

#### 1.4.1. Elektrofyziologické měření sluchového prahu (ABR)

Mezi nejpoužívanější elektrofyziologické testy patří akustickým podnětem vyvolané odpovědi mozkového kmene (auditory brainstem responses, ABR), což je poměrně neinvazivní, podkožní elektrodou prováděné snímání celkové aktivity neuronů u zvířete v narkóze, kterému jsou prezentovány různé zvukové stimuly o definované frekvenci a hlasitosti. Zjištěním minimální hlasitosti, která vyvolá měřitelnou odpověď, lze stanovit prahy slyšení.

Snímáním ABR dostáváme informace o přenosu a zpracování nervového signálu v počátečních úrovních sluchové dráhy, tj. ve sluchovém nervu a v jádrech mozkového kmene. Odpovědi ABR probíhají v rozpětí 1,5–15 ms po začátku stimulu. Amplituda kmenových potenciálů je velmi nízká, nepřevyšuje 0,5  $\mu$ V. Standardně se u potkanů hodnotí 5 vln, které vznikají průchodem nervového vzruchu sluchovým nervem a mozkovým kmenem: I. vlna (latence 1,5–1,9 ms) odpovídající aktivitě sluchového nervu, II. vlna (2,8–3,0 ms) odpovídající aktivitě kochleárního jádra, III. vlna (3,5–4,1 ms) odpovídající aktivitě jader v komplexu *oliva superior*, IV. a V. vlna (4,3–5,2 a 5,1–5,9 ms) odpovídající aktivitě *colliculus inferior*. Nejstabilnější a nejlépe vybavná je III. vlna, podle které se většinou určuje sluchový práh.

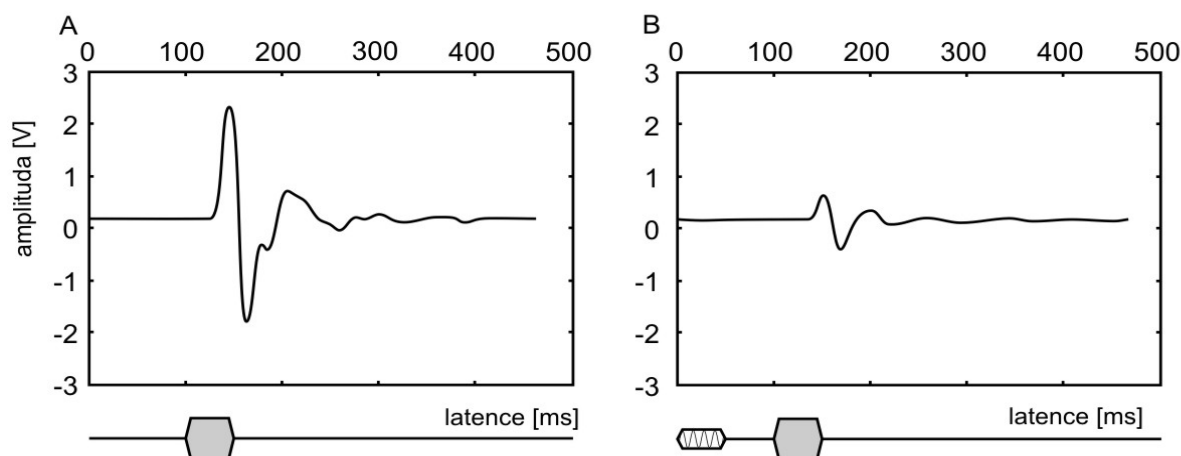
Pro posouzení fyziologického stavu zvířete se hodnotí latence jednotlivých vln ve srovnání s normativními daty a také intervaly mezi jednotlivými vlnami. Normativní délky latencí se mohou v jednotlivých laboratořích mírně lišit v závislosti na použitém typu stimulace a parametrech zvukových podnětů. Nejčastěji se měří interval I–V, který je u normálních jedinců ve většině laboratoří stanoven na 4 ms, dále interval I–III a III–V. Podle hodnot prahů, latencí jednotlivých vln a délky intervalů mezi vlnami lze hodnotit stupeň poškození sluchové dráhy.

#### 1.4.2. Behaviorální testování

Behaviorálním přístupem rozumíme testování a vyhodnocování chování zvířete vzhledem k akustickým podnětům. Chování může být buď podmíněné, nebo nepodmíněné. Podmíněné chování představuje trénování zvířete reagovat na zvukové stimuly, zahrnuje tedy učení – určitý zvuk je asociován s apetitivním (např. potravou) nebo averzivním (např. elektrickým šokem) podnětem. Naproti tomu nepodmíněné procedury zahrnují vrozené reflexy na akustické podněty. Mezi nejrozšířenější patří úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět (acoustic startle

response, ASR) a její potlačení pomocí akustického pulzu, který je aplikován před vlastním podnětem vyvolávajícím ASR (tzv. prepulz).

ASR je přechodná motorická reakce na neočekávaný intenzivní zvukový podnět (obr. 5A), která se projevuje mrknutím očí, kontrakcí obličejových, krčních a kosterních svalů a zrychlením tepu. Jejím neuroanatomickým podkladem je okruh zahrnující posteroventrální část *nucleus ventralis cochlearis*, *lemniscus lateralis*, *nucleus reticularis pontis caudalis* (kde dochází k integraci sluchových a trigeminálních vstupů), míšní interneurony a míšní motorické neurony (Koch, 1999; Yeomans & Frankland, 1995). Navzdory své jednoduchosti vykazuje tento úlekový reflex několik forem behaviorální plasticity, například habituaci, senzitivizaci a prepulzní inhibici, stejně jako pozoruhodnou citlivost k širokému spektru experimentálních manipulací (Koch, 1999; Koch & Schnitzler, 1997; Rybalko et al., 2011). Jak je úlekový reflex adaptivní a důležitý, dokumentuje fakt, že se objevuje u všech savců. U potkanů se objevuje ihned po začátku slyšení (Kungel et al., 1996; Sheets et al., 1988). Vyvolávají ho zvukové podněty o intenzitě větší než zhruba 80 dB nebo ty s náhlým nástupem (Pilz et al., 1987). Úleková reakce má chránit před poškozením ze strany predátora, před nečekaným ohrožujícím stimulem a má připravovat k boji nebo útěku (Koch, 1999).



Obr. 5: (A) - Amplituda úlekové reakce (ASR) vyvolaná testovacím impulzem bílého šumu o intenzitě 110 dB SPL. (B) - Prepulzní inhibice ASR vyvolaná prepulzním tónem o intenzitě 60 dB.

Ve výzkumu sluchových funkcí se ASR často pojí s prepulzní inhibicí ASR (obr. 5B), což je potlačení ASR způsobené tím, že úlekovému zvukovému podnětu předchází podnět nižší intenzity (aby byl účinný, neměl by předcházet o více než 0,5 s (Koch, 1999)). PPI se považuje za příklad senzomotorického zpracování, které odráží inhibiční procesy regulující sensorické vstupy do vyšších center mozku. Zahrnuje okruh, kam patří *nucleus cochlearis*, *colliculus inferior*

i *superior* a *nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (Koch, 1999; Swerdlow et al., 2001). Může být dále modulován sluchovou kůrou, thalamem (Kodsi & Swerdlow, 1997), amygdalou (Decker et al., 1995), hipokampem (Caine et al., 1991; Caine et al., 1992), striatem, ventrálním pallidem (Kodsi & Swerdlow, 1997; Kretschmer & Koch, 1998) a laterálním pallidem (Swerdlow et al., 2001; Takahashi et al., 2007). PPI představuje jednoduchou avšak účinnou metodu ke zhodnocování nadprahové sluchové senzitivity (Carlson & Willott, 1996; Ison & Allen, 2003; Young & Fechter, 1983).

## **1.5. Změny sluchové funkce během vývoje a stárnutí**

### *1.5.1. Vývoj sluchového systému a jeho kritická perioda*

Potkani se rodí s nedovyvinutým sluchem, se zvukovodem uzavřeným epiteliální zátkou. První reakce na zvukové podněty se objevuje kolem 10. postnatálního dne, kdy se zvukovod otevírá a funkčně dozrává kochlea (Geal-Dor et al., 1993). Jedenáctý až dvanáctý den se ve sluchové dráze objevuje jasné tonotopické uspořádání s typickou neuronovou reakcí na jeho „charakteristickou frekvenci“ (de Villiers-Sidani et al., 2007). K dozrávání sluchové funkce dochází mezi čtvrtým a šestým postnatálním týdnem (Geal-Dor et al., 1993; Iwasa & Potsic, 1982; Roth & Bruns, 1992).

Ontogenezi sensorických systémů obecně zcela zásadně formuje raná sensorická zkušenost. Bohatost podnětů či naopak jejich absence, jejich kvalita, kvantita, relevance nebo nebezpečnost – to vše výrazně a nevratně udává, jak bude reprezentace podnětů v mozku vypadat, popřípadě jak bude ještě dále ovlivnitelná. Dnes již klasické pokusy na zrakové kůře u koček prokázaly (Hubel & Wiesel, 1962), že během raného vývoje existuje jistá, poměrně krátká, kritická perioda pro daný sensorický systém, v níž vyniká tzv. reprezentační plasticitou. Přicházející podněty během kritické periody mění elektrofyziologické charakteristiky neuronů smyslové dráhy, jejich počet, receptorové vybavení, plasticitu synapsí, funkční zapojení i behaviorální reakce. Tvárnosti sluchového systému během raného vývoje se věnuje velká pozornost, neboť u člověka souvisí s vývojem řeči a její narušení má pak výrazný dopad na další průběh života. Například děti s rozštěpem patra mají často neprůchodné, tekutinou naplněné Eustachovy trubice, což jim zkresluje vnímání zvuků včetně řeči. Dochází ke zpomalení

řečového vývoje, následně k poruše čtení a kognice. Pokud je jim však včas po narození patro operováno, pak se jim řeč, schopnost číst i kognice vyvíjejí téměř stejně jako u jejich vrstevníků (Dorf & Curtin, 1982; Richman et al., 1988).

U potkana je význam kritické periody pro sluch nejvíce zmapován v souvislosti s ovlivněním reprezentací frekvencí v primární sluchové kůře. Několikadenní expozice čistému tónu (7 kHz) během kritické periody má za následek rozšíření oblasti neuronů s právě touto CF, zatímco nízké frekvence jsou reprezentovány méně a celková plocha primární sluchové oblasti je menší (de Villers-Sidani et al., 2007; Zhang et al., 2001). Paradoxně zvířata hůře rozlišují zvuky o samotné frekvenci 7 kHz, přičemž v jejím okolí naopak rozlišují nejlépe z celého spektra (Han et al., 2007). Podobné změny navodí několikadenní expozice frekvenčně modulovaných vokalizací (Insanally et al., 2009). Další práce sledovaly vliv působení bílého šumu o střední hlasitosti, který modeluje dospívání v hlučnějším prostředí. Ukázalo se, že má na sluchový systém negativní účinek, neboť do značné míry maskuje vnímání relevantních zvuků v prostředí. Významně oddaluje funkční vyzrávání sluchové kůry a rozvoj jejích sluchových oblastí (Chang & Merzenich, 2003; Zhang et al., 2002). Detailnější studie prokázaly, že jednak mění korový inhibiční systém tím, že dojde k podjednotkové expresi GABA<sub>A</sub> receptorů návratem k juvenilní formě (Xu et al., 2010a), jednak ovlivňuje i glutamatergní transmissi snížením exprese jedné z podjednotek AMPA receptoru (Xu et al., 2010b). Zajímavého efektu se dosáhne, pokud zvířata během kritické periody vyrůstají v prostředí bohatém na zvukové podněty (ale i podněty jiných modalit). Lépe pak lokalizují zvuky v prostoru, pravděpodobně proto že neurony sluchové kůry jsou citlivější na směrovou informaci a mají menší receptivní pole (Cai et al., 2009; Zhang et al., 2009). Rovněž se výrazně změní transmise v inhibičních i excitačních okruzích, neboť se zvýší exprese  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$  podjednotek GABA<sub>A</sub> receptoru, NR2A a NR2B podjednotek NMDA receptoru a GluR2 podjednotky AMPA receptoru (Cai et al., 2010).

Vliv rané expozice byl studován i u nižších etáží sluchové dráhy, přičemž v CI bylo zjištěno, že několikadenní vystavení kontinuálním tónům se u potkanů odrazí tak, že snímané CF neuronů se nahustí kolem frekvence produkovaného tónu (Poon & Chen, 1992). Toto několikadenní působení zvukových kliků na myši mláďata rozšíří prahové křivky v CI, obzvláště u neuronů s CF 10–15 kHz (Sanes & Constantine-Paton, 1985).

Velmi výrazné akustické podněty, někdy nazývané akustické trauma, mají pochopitelně během kritické periody velký dopad. Jednorázová, několikaminutová expozice hlasitému

(>120 dB SPL) zvuku v raném věku potencuje u potkanů (Pierson & Swann, 1991) i myši (Kai & Niki, 2002) rozvoj audiogenní epilepsie. Její příčinou může být hlukem způsobené nesprávné dozrávání *colliculus inferior* (Pierson & Snyder-Keller, 1994), které se v této struktuře projevuje ve změněných odpovědích především pro vysoké frekvence (Wu et al., 2003). Hlasitý zvuk v těchto studiích obvykle vede k ohlušení, nicméně pouze dočasněmu (Rybalko & Syka, 2001). Poškození sluchové funkce v raně postnatálním věku u experimentálních zvířat můžeme brát jako analogii k poškození sluchu u předčasně narozených dětí vyrůstajících v inkubátoru (Douek et al., 1976). Bylo prokázáno, že hluky uvnitř aparatury, kterým je dítě vystaveno, mohou výrazně narušit vývoj sluchové funkce (Douek et al., 1976; Falk & Farmer, 1973).

Při hledání konkrétního načasování kritické periody se ukázalo, že se jedná o velmi komplexní fenomén a nelze stanovit jeden obecný časový úsek. Minimálně je potřeba rozlišovat mezi senzitivním obdobím pro vývoj daný smyslovou zkušeností a senzitivním obdobím pro poškození funkce (Kral, 2013). Expozice bílého šumu působí největší korové změny, pokud k ní dojde kdykoliv v rozmezí P 9–28 (Zhang et al., 2002), zatímco čistý tón ovlivňuje rozvoj nejvíce na rozvoj struktury kůry v P 11–13 (de Villers-Sidani et al., 2007). Detailní studie provedená na myších ukázala, že kritická perioda při dozrávání thalamokortikálního spojení trvá P 16–20 (Barkat et al., 2011). Delší kritická perioda se ukázala v jiné studii, v níž elektrofyziologické měření zvukovým podnětem vyvolaných odpovědí se střední latencí (angl. middle latency response, MLR) ukázalo, že hodinová expozice hluku způsobí největší ztrátu sluchu, pokud je aplikována během prvních pěti týdnů věku (Rybalko & Syka, 2001).

V této dizertační práci jsme zkoumali vliv silného akustického podnětu působícího u mladých zvířat v kritické periodě na sluchovou funkci v dospělosti. Vycházeli jsme z metodiky, která používá akutní zvukové trauma (125 dB po dobu 8 minut) u potkaních mláďat ve věku P 14 (Pierson & Snyder-Keller, 1994). Předchozí práce ukázaly, že takovýto zásah během raného vývoje sice neovlivní výraznějším způsobem sluchové prahy v dospělosti, avšak pozmění elektrofyziologické vlastnosti neuronů v CI (Bures et al., 2010; Grécová et al., 2009).

### 1.5.2. Stárnutí a ztráta sluchu

Věkem podmíněná ztráta sluchu (presbyakuze) je nejčastější příčinou chronického a trvalého poškození sluchu u zvířat i lidí (Gates & Mills, 2005; Syka, 2002). Patologické změny



spojené s presbyakuzí se vyskytují jak v periferní, tak centrální části sluchového systému, přičemž periferní komponenta je prozkoumána poměrně podrobně (Harding et al., 2005; Parham, 1997; Schuknecht & Gacek, 1993; Spongr et al., 1997). Centrální komponenta bývá spojována se zhoršováním schopnosti zpracovat komplexní zvukové podněty, jakým je například lidská řeč. V lidské populaci pak zhoršené porozumění řeči představuje závažný zdravotní a sociální handicap. Řeč je zhoršena především v prostředí bohatém na ostatní zvuky a hluk.

Pro výzkum změn ve sluchovém systému spojených se stárnutím jsou laboratorní hlodavci dobrým modelem díky své 2–3 leté délce života, čímž se dají v rozumném čase experimentálně testovat různé etapy vývoje a stárnutí. U potkanů se etabloval model potkana se zrychleným stárnutím (kmen Fischer 344), což nám skýtá možnost porovnat rychlestárnoucí kmen s kmenem s normálním průběhem stárnutí (např. Long Evans). Kmen Fischer 344 představuje imbrední, albinotické potkany s vysokou incidencí nádorového bujení a degenerativních poruch během stárnutí. Potkani F334 se vyznačují změnami v periferní i centrální části sluchového systému (přehled viz Syka (2010)). Vnějších vláskových buněk sice stárnutím ubývá poměrně málo a srovnatelně s kmenem Long Evans (Bielefeld et al., 2008; Popelar et al., 2006), avšak stávají se nefunkční, jak dokládá snížení až úplné vymizení distorzních produktů otoakustických emisí (DPOAE) (Bielefeld et al., 2008; Buckiova et al., 2007; Chen et al., 2009; Popelar et al., 2006; Popelář et al., 2005). Za narušením jejich funkce lze v případě podkmene Fischer 344/DuCr1, který se používá v naší laboratoři, vidět degenerativní změny ve *stria vascularis* a *ligamentum spirale*. U podkmene F344/NHsd však zřejmě vnější vláskové buňky neztrácejí funkci v důsledku narušení podpurných elementů, ale prestinu (Bielefeld et al., 2008; Chen et al., 2009; Hu et al., 2008). Narušení sluchu u kmene F344 se dále projevuje posunem prahů ABR v časnějším věku, než je tomu u kmene Long Evans (Popelar et al., 2003). Jistou obdobu představuje kmen myší C57bl/6J s podobnou, časně se rozvíjející ztrátou sluchu. Ten bývá často experimentálně porovnáván s kmenem CBA jakožto představitelem fyziologického stárnutí sluchu (Syka, 2002).

Centrální komponenta presbyakuze zasahuje všechny etáže centrální části sluchové dráhy (přehled viz Canlon et al. (2010)). Více pozornosti bude věnováno CI, CGM a SK, neboť tvoří předmět výzkumu v této dizertační práci.

### 1.5.3. *Vliv stárnutí na fyziologii a buněčnou biologii colliculus inferior*

CI prodělává během stárnutí výrazné a poměrně dobře dokumentované změny (přehled viz Ouda a Syka (2012)). Vliv stárnutí na histologii CI byl zkoumán na CBA myších ve studii (Kazee & West, 1999), v níž však autoři nenašli ani ve věku 25 měsíců žádné signifikantní změny v počtu hlavních, diskovitých neuronů, synapsí či v ploše synaptických terminál. Naproti tomu výrazné změny byly pozorovány u myši C57bl/6J s geneticky podmíněným časným rozvojem ztráty sluchu. Již během 2. měsíce života se u nich objevilo zhoršené vnímání vysokých frekvencí, které se zrychlilo v druhém roce života a přešlo i do nízkých frekvencí. Došlo k výraznému snížení počtu diskovitých neuronů a plocha somatické membrány pokrytá synapsemi se zmenšila o 67 %.

Během stárnutí prodělává CI výrazné změny i co do hladin neuropřenašečů, receptorového vybavení a VVP. Hladina hlavního excitačního neuropřenašeče glutamátu může být zvýšena, neboť s věkem dochází u CBA myši k snížené expresi enzymu pyrrolin-5-karboxylát syntetázy, která se účastní konverze glutamátu na prolin (Tadros et al., 2007b). Výsledný nadbytek glutamátu může působit na neurony neurotoxicky. Naproti tomu inhibičního přenašeče GABA s věkem ubývá, především v CCI. U starých (18–29 měsíců) potkanů kmene Fischer 344 byl objeven ve ventrolaterální části CCI úbytek GABA-pozitivního barvení (Caspary et al., 1990), o kterém se však Helfert et al. (1999) domnívají, že spíše odrážel úbytek synaptických terminál a dendritického větvení než snížení počtu neuronů. Dále Caspary et al. (1990) v CCI pozorovali výrazné (30%) snížení výlevu GABA za současně nezměněných hodnot výlevu glutamátu, aspartátu a acetylcholinu. U stejného kmene byl v CCI rovněž nalezen pokles v aktivitě GAD, jak starých potkanů (24–26 měsíců), tak dokonce i středního věku (15–17 měsíců) (Raza et al., 1994). K podobnému výsledku došli Gutiérrez et al. (1994), kteří u starých potkanů kmene Sprague-Dawley (24 měsíců), ale i kmene Fischer 344 (30 měsíců), našli v porovnání s mladými potkany snížený obsah GAD65 i její mRNA. Nicméně v této práci byl hodnocen CI jako celek. Studie, které se zaměřily na jednotlivé typy GABA receptoru, našly během stárnutí změny jak v GABA<sub>A</sub> (Caspary et al., 1999; Gutiérrez et al., 1994; Milbrandt et al., 1997) tak i GABA<sub>B</sub> (Milbrandt et al., 1994). GABA<sub>A</sub> receptorů v CI nejenže věkem ubývá (Gutiérrez et al., 1994), ale mění se i poměr jednotlivých podjednotek (Milbrandt et al., 1997). Ten může být projevem kompenzační plasticity stárnoucího CI, neboť dochází ke zvýšené

expresi  $\gamma 1$  podjednotky (Casparý et al., 1999; Milbrandt et al., 1997), která umožňuje účinnější funkci GABA<sub>A</sub> receptoru (Casparý et al., 1999). Aktivita GABA<sub>B</sub> receptoru se rovněž během stárnutí snižuje. Měření kvantitativní autoradiografií při současné saturaci GABA<sub>A</sub> receptorů prokázalo úbytek [3H]GABA vazby u 26 měsíčních potkanů v porovnání s mladými ve všech třech částech CI (Casparý et al., 1995; Milbrandt et al., 1994). Naproti tomu u stárnoucích potkanů Long Evans (27–30 měsíců) se obsah parvalbumin-imunoreaktivních neuronů, které představují subpopulaci GABAergních neuronů, během stárnutí zvyšuje (Ouda et al., 2008). Konkrétně dochází v CCI u PV-ir neuronů k nárůstu počtu o 19 % a optické denzity těl o 18 %. U starých potkanů (22 měsíců) kmene F334 se však paralela v nárůstu PV-ir neuronů neobjevuje, naopak dochází v CCI ke snížení objemu PV-ir neuronálních somat o 21% (Ouda et al., 2008).

Elektrofyzilogické vlastnosti neuronů v CI se vzhledem k jednoduchým zvukům mění v průběhu stárnutí jen málo (Palombi & Casparý, 1996b; Willott et al., 1988). Více je narušeno kódování časových charakteristik zvuku, které úzce souvisí se správným vnímáním a vyhodnocováním složitých zvuků, např. řeči. Detekce mezery v šumu představuje jeden z parametrů odrážející časové rozlišení zvukových reprezentací. U stárnoucích CBA myši nastává v CI neuronech posun minimální délky mezery v šumu, na kterou reagují. Minimální délka je u stárnoucích myši delší (Walton et al., 1998). Reaktivita CI neuronů na jiný aspekt složitějších zvuků, na frekvenční modulaci, zůstává během stárnutí u potkanů nezměněná (Lee et al., 2002).

#### *1.5.4. Vliv stárnutí na fyziologii a buněčnou biologii corpus geniculatum mediale*

Dle práce Shim et al. (2012) nedochází v CGM stárnoucích (24 měsíců) potkanů kmene Sprague-Dawley ke změně v počtu somat neuronů. Stejní autoři uvádějí nejen vzestup zastoupení NMDA receptorů, ale i v expresi serotoninu a GAD67 (Shim et al., 2012). Naproti tomu Richardson et al. (2013) popsali pokles v obsahu GAD67 u stárnoucích (28–32 měsíců) hybridních potkanů Fischer/Brown Norway doprovázený poklesem GABA<sub>A</sub> receptorové denzity. Třebaže u potkanů je velmi nízká imunoreaktivita parvalbuminu v CGM a nejsou v ní ani pozorovány změny během stárnutí (Ouda et al., 2008), u stárnoucích jedinců druhu primátů *Makak rhesus* byl zaznamenán vzestup v denzitě PV-ir neuronů v mediální a ventrální části CGM

(Gray et al., 2013). Reaktivita neuronů na frekvenčně modulované zvuky se ve ventrální části CGM během stárnutí nemění (Mendelson & Lui, 2004).

#### 1.5.5. *Vliv stárnutí na fyziologii a buněčnou biologii sluchové kůry*

Neurony sluchové kůry podléhají během stárnutí především kvalitativním změnám. U pyramidových neuronů bylo zjištěno, že denzita jejich dendritického větvení je u třicetíměsíčních potkanů v porovnání s tříměsíčními výrazně snížena (Vaughan, 1977). Spolu s další, detailnější studií (Vaughan & Vincent, 1979) bylo prokázáno, že hlavní buněčné změny během stárnutí souvisejí se změnami dendritické morfologie a následně se synaptickou konektivitou.

Hlavním neurochemickým znakem stárnoucí primární sluchové kůry je narušení inhibičních systémů, za nímž stojí úbytek funkce GABA. Ta se u starých (30–32 měsíců) potkanů Fischer/Brown Norway projevuje snížením optické denzity GAD67-ir neuronů, poklesem obsahu mRNA pro GAD65 a 67 v II.–VI. vrstvě doprovázeným sníženou hladinou proteinu GAD67 rovnoměrně ve všech vrstvách (Ling et al., 2005). Narušení GABA inhibice dosvědčuje i úbytek parvalbuminové imunoreaktivity. Statisticky významný úbytek PV-ir buněk byl pozorován v primární sluchové kůře u starých potkanů kmene Brown Norway (snížení o čtvrtinu) (de Villers-Sidani et al., 2010), v Te1 a Te3 v početní denzitě u kmene Fischer 344 (Ouda et al., 2008), avšak nikoliv u kmene Long Evans. Podobně u starých C57bl/6J myši (14–20 měsíců) byl prokázán úbytek počtu PV-ir neuronů v primární sluchové kůře, konkrétně ve vrstvách I–IV při nezměněném počtu ve vrstvách V–VI (Martin del Campo et al., 2012). Stárnutím je inhibice narušena nejen kvantitativním úbytkem neuronů, ale i změnou ve farmakologických vlastnostech GABA<sub>A</sub> receptoru, neboť u něj dochází ke změně podjednotkového složení a tím ke snížené schopnosti vazby ligandu na receptor (Casparly et al., 2013). Podjednotkové změny se dějí hlavně v povrchových vrstvách. Během stárnutí se ve sluchové kůře rovněž snižuje produkce oxidu dusnatého, o čemž svědčí pokles počtu neuronů pozitivních na NADPH-diaforázu (Ouda et al., 2003).

Jak prokázala elektrofyzilogická měření, korové neurony stárnoucích potkanů v Te1 zpracovávají hůře rychlé frekvenčně modulované zvuky (Mendelson & Ricketts, 2001), mají širší rozpětí charakteristické frekvence, která se méně často vyskytuje ve svém typickém „V/U“ tvaru

(Turner et al., 2005a), vykazují nižší synchronicitu (de Villers-Sidani et al., 2010) a vyšší spontánní aktivitu (Hughes et al., 2010). V reakci na bílý šum pak reagují větší frekvencí výbojů na počátek stimulu i během jeho trvání (Hughes et al., 2010). Jelikož je tento stárnutím způsobený rozdíl pouze v povrchových vrstvách kůry (I–III), dává se do souvislosti s výše uvedeným úbytkem parvalbuminu (a tedy GABA inhibice) v povrchových vrstvách (Hughes et al., 2010).

Otázkou zůstává, zda změny spojené se stárnutím se ve sluchové kůře dějí ve větší míře než v porovnatelném senzoricím systému, například zrakové kůře. Ta u potkana obsahuje relativně méně inhibičních GABAergních buněk: cca 15 % všech neuronů ZK (Meinecke & Peters, 1987) oproti 25% u SK (Prieto et al., 1994). Nicméně i ve ZK je výrazná ztráta inhibice v průběhu stárnutí, jak ukazují pokusy na opicích (Leventhal et al., 2003) a kočkách (Hua et al., 2008).

#### *1.5.6. Vliv stárnutí na behaviorální reakce vyvolané sluchovými podněty*

V současné době data, která se zabývají vlivem stárnutí na úlekovou reakci na neočekávaný zvukový podnět (ASR) a její prepulzní inhibici (PPI), nepodávají jednoznačný obrázek. Třebaže většina studií provedená na potkanech a myších udává během stárnutí snížení ASR a v menší míře i snížení efektivity PPI, autoři zároveň upozorňují na velkou variabilitu mezi jednotlivými kmeny, danou mj. různě rychle se rozvíjejícími se patologiemi ve sluchovém systému během stárnutí, a na variabilitu výsledků v souvislosti s různými druhy zvukových podnětů. Přímé porovnání ASR u myšího kmene s časným nástupem úbytku sluchu C57bl/6J a kmene s relativně pozdě se objevující presbyakuzí CBA ukázalo, že amplitudy ASR se během stárnutí snižují u obou kmenů, avšak u C57bl/6J myši výrazněji, a to především u tónů o vysoké (12–24 kHz) frekvenci (Parham & Willott, 1988). Na rozdíl od ASR klesá efektivita PPI s věkem pomaleji, nejen u CBA myši, ale i u dalších kmenů (Ouagazzal et al., 2006). U potkanů kmene Fischer 344 platí, že s věkem ubývá výrazně jak ASR, tak efektivita PPI (Varty et al., 1998). U člověka nebyl v několika studiích pokles v PPI s věkem pozorován (Harbin & Berg, 1983; Ludwig et al., 2003). Podle Ellwanger et al. (2003) má křivka závislosti PPI na věku tvar obráceného U, přičemž nejvýraznější PPI je u lidí středního věku.

## 2. CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cíle a hypotézy:

**I.** V současné době přibývá důkazů, že během stárnutí dochází v centrální části sluchového systému především k narušení inhibičního systému neuropřenašeče kyseliny gamaaminomáselné (GABA). Ta je syntetizována za přítomnosti enzymu glutamátdekarboxylázy (GAD), který má dvě izoformy GAD65 a GAD67.

Cílem naší práce bylo zjistit změny spojené se stárnutím v *colliculus inferior* (CI), sluchové (SK) a zrakové kůře (ZK) u fyziologicky stárnoucího kmene potkanů Long Evans a rychle stárnoucího kmene Fischer 344 stanovením obsahu obou izoform GAD metodou western blot a zhodnocením počtu a optické denzity GAD-ir neuronů.

Předpokládali jsme, že:

- ve stáří se celkové hladiny glutamátdekarboxylázy v CI a SK sníží více než v jiném senzorickém systému, například ve zrakové kůře.
- počet neuronů exprimujících glutamátdekarboxylázu (GAD65 a GAD67) se v CI a SK sníží, ve ZK dojde k menšímu poklesu.
- ve stáří se rovněž změní morfologie GAD-ir neuronů v uvedených sluchových strukturách.
- změny spojené se stárnutím budou výraznější u rychleji stárnoucího kmene Fischer 344 než u kmene s fyziologickým průběhem stárnutí Long Evans.

**II.** Kalbindin (CB) a kalretinin (CR) jsou proteiny vážící vápník, které se v centrální části sluchového systému vyskytují převážně v GABAergních neuronech. Bývají spojovány s neuroprotektivní funkcí, avšak jejich změny během stárnutí nejsou příliš známy.

Cílem naší práce bylo zjistit změny spojené se stárnutím v CI, *corpus geniculatum mediale* (CGM), SK a ZK u potkanů kmene Long Evans a kmene Fischer 344 stanovením obsahu CB a CR metodou western blot a zhodnocením počtu a optické denzity CB-ir CR-ir neuronů.

Předpokládali jsme, že:

- během stárnutí se sníží hladina CB a CR v potkaním CI a SK, méně pak v ZK.
- počet CB-ir a CR-ir neuronů se v CI, CGM a SK sníží.
- ve stáří se rovněž změní morfologie CB-ir a CR-ir neuronů v uvedených sluchových strukturách.
- změny spojené se stárnutím budou výraznější u rychleji stárnoucího kmene Fischer 344 než u kmene s fyziologickým průběhem stárnutí Long Evans.

**III.** Stárnutí sluchového systému je doprovázeno postupnou ztrátou sluchu (presbyakuzí), která se manifestuje nižší reaktivitou na zvukové podněty. Kromě periferní komponenty presbyakuze existuje i méně prozkoumaná komponenta centrální.

Naším cílem bylo zhodnotit v průběhu stárnutí u potkanů kmene Long Evans a kmene Fischer 344 sluchové prahy metodou odpovědi mozkového kmene na akustické podněty (ABR) a stav sluchového systému u bdělého zvířete sledováním úlekové reakce na neočekávaný podnět (ASR) a prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI). Použili jsme tři věkové skupiny zvířat (mladí dospělí, zvířata středního věku, staří) a v behaviorálních metodách jak tónové podněty o různých frekvencích, tak bílý šum.

Předpokládali jsme, že:

- během stárnutí se objeví posun prahů v ABR, přičemž u kmene Fischer 344 bude výraznější a nastane již v ranějším věku.
- během stárnutí se sníží amplituda ASR; u kmene Fischer 344 bude pokles výraznější.
- reaktivita na vyšší frekvence zvukových podnětů bude nižší.
- účinnost PPI bude s věkem klesat; u kmene Fischer výrazněji.
- nebude přítomna závislost mezi prahy slyšení hodnocené metodou ABR a amplitudou ASR, čímž by změny v ASR mohly být užitečným indikátorem centrální presbyakuze.

**IV.** Během raného vývoje sluchového systému existuje kritická perioda, v níž sensorická zkušenost výrazně ovlivňuje vyvíjející se nervové obvody. Narušení sluchové funkce v tomto období může mít výrazný dopad na její stav v dospělosti. Ohlušení potkanů v P 14 krátkou (8 minut) expozicí hluku (125 dB SPL) sice nezpůsobí trvalou ztrátu sluchu, ale vyvolá změny, které lze v dospělosti pozorovat jako výrazné elektrofyzilogické a buněčné abnormality v centrální části sluchového systému. Jaké jsou jejich behaviorální koreláty, nebylo dosud známo.

Proto naším cílem bylo u dospělých potkanů kmene Long Evans, kteří byli postnatální čtrnáctý den (P 14) podrobeni uvedené hlukové expozici, zhodnotit jednak prahy ABR a jednak behaviorální reaktivitu na zvukové podněty testem úlekové reakce a její prepulzní inhibice a porovnat je s výsledky stejně starých potkanů, kteří expozici vystavení nebyli.

Předpokládali jsme, že:

- u exponovaných zvířat se neobjeví posun prahů v ABR.
- exponovaná zvířata vykáží menší amplitudu ASR a nižší účinnost PPI.



### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. *Pokusná zvířata*

Všechna zvířata kmene Fischer 344 byla dovezena ve stáří 2 měsíců z Charles River Deutschland (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Germany). Dále byla chována v areálovém zvěřinci za standardních podmínek. Všechna zvířata kmene Long Evans pocházela z areálové chovné stanice Fyziologického ústavu AV ČR. Mláďata (z experimentu s krátkou hlukovou expozicí) ve věku deseti postnatálních dnů byla i s matkami umístěna do příručního zvěřince. Ostatní experimentální zvířata byla od 2 měsíců věku chována v areálovém zvěřinci za standardních podmínek: 12/12 hodin cyklus světlo/tma; přístup k potravě a tekutinám *ad libitum*.

Celkový počet zvířat zařazených do experimentů uvedených v této práci byl 85 potkanů kmene Long Evans a to ve věku 3–6 měsíců (n=47), 12–14 měsíců (n=5) a 24–35 měsíců (n=33). Dále jsme použili 53 potkanů kmene Fischer 344: věku 3–5 (n=26), 12–14 měsíců (n=6) a 18–26 měsíců (n=21). Hmotnost čtrnáctidenních mláďat se pohybovala mezi 29–32 g, dospělých potkanů v rozmezí 250–350 g, potkanů ve věku 12–14 měsíců 300–500 g a hmotnost starých 400–600 g. Žádná zvířata neměla během chovu známky středoušní infekce. Všechny experimenty byly provedeny v souladu s principy péče o laboratorní zvířata a v souladu s předpisy etické komise Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR a Helsinskou deklarací.

#### 3.2. *Hodnocení hladin proteinů a imunoreaktivity GAD65 a 67 v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře u mladých a starých potkanů dvou kmenů*

##### 3.2.1. *Pokusná zvířata*

Do experimentu bylo zařazeno celkem 42 potkanů (38 potkanů kmene Long Evans: z toho 19 ve stáří 3–5 měsíců a 19 ve stáří 30–35 měsíců; 20 potkanů kmene Fischer 344, z toho 11 starých 3–5 měsíců a 9 starých 24 měsíců). Další podrobnosti viz kapitola 3.1.

### 3.2.2. *GAD65 a 67 - western blot*

Pro tento druh analýzy byli použiti potkani kmene Long Evans, ve stáří 3–6 měsíců (n=10) a 30–35 měsíců (n=10), a potkani kmene Fischer 344, ve stáří 4 měsíců (n=6) a 21–25 měsíců (n=6). Pro ověření publikovaných dat a pro lepší statistické vyhodnocení byly počty zvířat ve skupinách navýšeny a jsou tedy vyšší než v Burianova et al. (2009). Experimentální zvířata byla v hluboké anestézii (ketamin 35 mg/kg + xylazin 6 mg/kg, intramuskulárně) dekapitována a jejich mozky rychle vyjmuty a ponořeny do ledově chladného fyziologického roztoku. Z obou hemisfér byly urychleně odebrány CI a dále oblasti sluchové a zrakové kůry. Odebrané vzorky zahrnovaly vždy celý CI (centrální jádro a externí i dorzální kůru v jednom celku, obr. 6A), sluchové oblasti kůry Te1+Te3 (Zilles, 1985) a zhruba rozsah zrakových oblastí V1+V2 (Paxinos & Watson, 1998) (obr. 6B). Všechny tkáňové vzorky byly po odběru okamžitě vloženy v mikrozkuřavkách do ledu a následně uloženy až do doby dalšího zpracování při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nejprve byly tkáně homogenizovány Potter-Elvehjemovým homogenizátorem s teflonovým pístem v homogenizačním pufru 0,05 M Tris-NaCl (pH 7,4) obsahujícím inhibitory proteáz za intenzivního chlazení v ledové lázni. Homogenát jsme centrifugovali 10 minut při  $10\,000 \times g$  při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Stanovení celkové koncentrace proteinů v alikvotech bylo provedeno metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976), která využívá reakce bílkovin s trifenylmethanovým barvivem Coomassie brilliant blue G 250 spektrofotometricky měřitelné při vlnové délce 595 nm. Metoda je empirická a před použitím je nutné změřit kalibrační křivku pro roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) jako standardu o koncentraci  $0\text{--}1,4\ \mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}$ .

Vzorky (cytosolická frakce) jsme zředili vzorkovým puftrem (10% glycerol, 2% dodecyl sulfát sodný (SDS), 0,05% bromphenolová modř a 4M dithiotreitol) a 10 minut inkubovali ve vodní lázni při teplotě  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo prováděno 150 minut při 250 V a 30 mA na 1 gel na plochých polyakrylamidových gelech v prostředí SDS (SDS–PAGE) v elektroforetické soustavě Mini-Protean II (Bio-Rad) podle Ogity a Markerta (Ogita & Markert, 1979). Elektroforetická souprava byla sestavena dle instrukcí výrobce. Koncentrace akrylamidu ve startovacím gelu byla 3% a v dělicím 8%. Rozměry gelů byly  $65 \times 85 \times 0,75\text{ mm}$ .

Dalším krokem byl western blotting, neboli elektropřenos proteinů na nitrocelulóзовé membrány (Amersham, Biosciences), který byl proveden metodou podle Towbina (Towbin et al., 1979) v elektropřenosové soupravě (Bio-Rad Mini Protean II transblot) v prostředí vychlazeného transferového pufru (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 0,1% SDS) při 350 mA, 100 V, 65 minut, při teplotě 4 °C. Po ukončení přenosu a odpojení od zdroje, byly sendviče rozebrány a membrány přeneseny na 3 minuty do barvicího roztoku Ponceau 2S (0,1% červeně Poceau 2S v 1% ledové kyselině octové). Barvení membrán Ponceau červení slouží ke kontrole přenosu proteinů.

Imunodetekci jednotlivých izoforem na nitrocelulóзовých membránách předcházela 60 minutová inkubace membrán při laboratorní teplotě v blokovacím roztoku 5 % nízkotučného mléka v TBST (10% Tris-NaCl s 0,05% Tween 20, pH 7,5). Po promytí (3× krátce 3 × 5 minut v TBST) byly membrány inkubovány přes noc při teplotě 4 °C v roztocích primárních protilátek: GAD65 (králičí polyklonální, Chemicon, 1:1200 v TBST), GAD67 (myší monoklonální, Chemicon, 1:5000 v TBST) a aktin (myší monoklonální, Chemicon, 1:10 000 v TBST). Poté byly membrány opět promyty a 2 hod inkubovány při laboratorní teplotě v roztoku sekundární protilátky konjugované oxidační metodou s křenovou peroxidázou (anti-myší IgG 1:7500, Upstate a anti-králičí IgG 1:3333, Chemicon v TBST).

Po imunodetekci byly membrány promyty a po 2 hodinové inkubaci v TBST byla provedena metoda zesílené chemiluminiscence (ECL). ECL je firmou Amersham<sup>TM</sup> patentovaná metoda detekce peroxidázové aktivity prostřednictvím chemiluminiscence za přítomnosti zesilovačů. Tato metoda používá cyklického diacylhydrazidu luminolu, který je v mírně alkalickém prostředí oxidován peroxidem vodíku za katalýzy křenovou peroxidázou (HRP). ECL se používá téměř výhradně při detekci různých antigenů na membránách konjugáty protilátek s HRP v dvoustupňovém systému: primární protilátka proti detekovanému antigenu / konjugát sekundární protilátky proti primární protilátce s HRP. Při této metodě bylo postupováno podle instrukcí výrobce (Amersham). Detekční roztok byl připraven smícháním roztoku A (luminol) a B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) v poměru 40:1 (Amersham Biosciences) a nalit na membrány. Membrány byly exponovány na autoradiografický film (Kodak MXB). Exponované filmy byly vloženy do vývojky a ustalovače a následně promyty pod studenou tekoucí vodou a sušeny volně při laboratorní teplotě. Pro každou izoformu GAD byla vyzkoušena optimální doba expozice. Bylo

provedeno vždy několik různě dlouhých expozic, aby byl zachycen optimální rozsah denzit pro denzitometrické vyhodnocení.

Následně byly filmy naskenovány v procházejícím světle (Canon CanoScan 8400F). Při snímání skenerem je objekt osvětlován zdrojem bílého světla. Intenzita prošlého záření je snímána řadou CCD elementů, pohybujících se podél jedné z os přístroje. Signál snímacích elementů je digitalizován, což znamená, že analogové hodnotě odezvy detektoru pro každý snímáný bod je přiřazen jeden z 256 odstínů šedi (tj. celé číslo z intervalu 0–255; v případě 8 bitové hloubky), diskrétně rozložených přes dynamický rozsah detektoru. Pro zjištění relativního množství GAD a aktinu v jednotlivých vzorcích, jsme použili vyhodnocení denzitometrického objemu skvrn na filmu pomocí programu ImageQuant. Hladiny GAD65 a GAD67 byly vypočítány jako podíly skvrn denzitometrických objemů požadovaného proteinu oproti aktinu. Množství celkového proteinu naneseného na gel se pro každou izoformu a frakci lišilo z důvodu zajištění linearitu poměru intenzita x plocha u výsledných proužků z western blotu. K zaručení specifity proteinů GAD65, GAD67 a aktinu, byl použit roztok směsi barevných proteinových standardů molekulových hmotností (Invitrogen).

### 3.2.3. *GAD67 – imunohistochemie*

Potkani Long Evans ve stáří 3–5 měsíců (n=5) a 30–35 měsíců (n=5), a potkani Fischer 344 ve věku 3–5 měsíců (n=5) a 24 měsíců (n=3), byli v hluboké anestézii (ketamin 35 mg/kg + xylazin 6 mg/kg, intramuskulárně) transkardiálně perfundováni nejprve fyziologickým roztokem a poté 4% roztokem paraformaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,4). Mozky byly po perfuzi do 15 minut vyjmuty, ve stejném fixativu (4 °C) 1 hodinu postfixovány a dále nasyceny v 30 % roztoku sacharózy ve fosfátovém pufru (PBS) při téže teplotě přes noc. Ze zájmových oblastí byly na zmrazovacím mikrotomu nakrájeny frontální řezy o tloušťce 40 µm.

Následně byly volné řezy 1 hodinu preinkubovány v blokovacím roztoku (kozí sérum, Vector) a poté 24 hodin inkubovány v PBS (4 °C) obsahujícím anti-GAD67 (myší monoklonální, 1:2000, Chemicon). Dále byly řezy po dobu 1 hodinu inkubovány s biotinylovanou sekundární protilátkou (1:200, Vector) a následně po dobu 1 hodiny s avidin-peroxidázovým komplexem

(1:100, Vektor), vše při laboratorní teplotě. Poté bylo provedeno zviditelnění peroxidázové reakce pomocí 0,05% diaminobenzidinem s 0,01% hydrogen peroxidázou (3 min). Řezy byly nanесeny na sklíčka, vysušeny a překryty krycím sklíčkem.

#### 3.2.4. *GAD65 – imunohistochemie*

Potkani Long Evans ve věku 3–5 měsíců (n=4) a 30–35 měsíců (n=4) byli podrobeni stejné proceduře, vedoucí k přípravě histologických řezů, jako LE potkani pro barvení na GAD67 (viz kapitola 3.2.3).

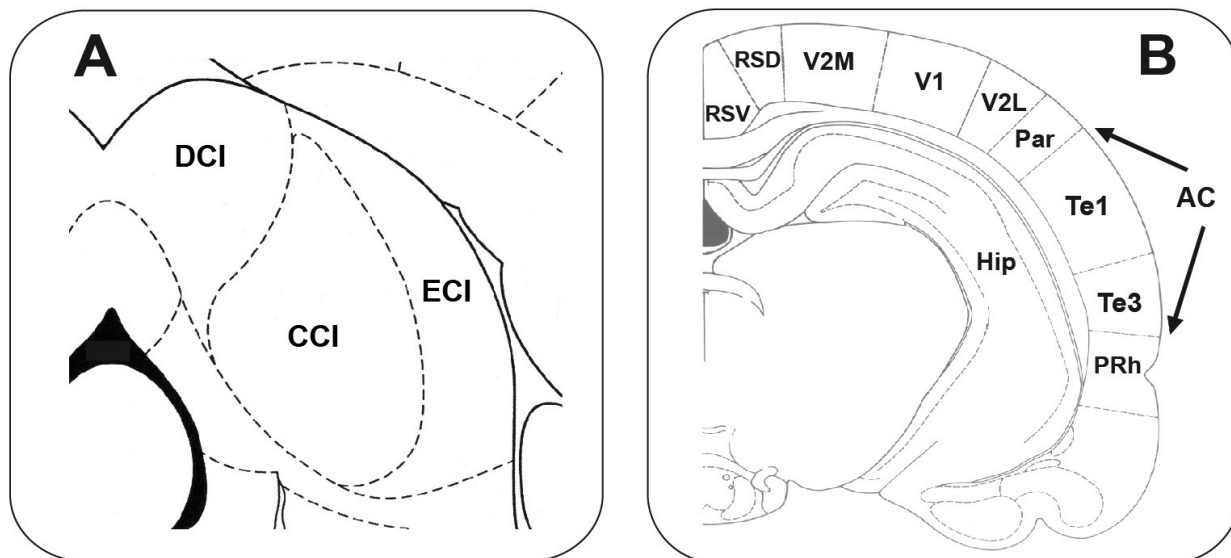
Volné řezy byly následně preinkubovány 1 hodinu v blokovacím roztoku (kozí sérum, Vector) a poté 72 hodin inkubovány v PBS (4 °C) obsahujícím anti-GAD65 (králičí polyklonální, 1:750, Chemicon) a 1% blokovací kozí sérum. Následně byly řezy 1 hodinu inkubovány s biotinylovanou sekundární protilátkou (1:200, Biosource) a poté 1 hodinu s avidin-peroxidázovým komplexem (1:100, Vektor), vše při laboratorní teplotě. Peroxidázová reakce byla zviditelněna 0,05% diaminobenzidinem s 0,01% hydrogen peroxidázou (3 min). Řezy byly opět nanесeny na sklíčka, vysušeny a překryty krycím sklíčkem.

#### 3.2.5. *Stereologie GAD*

Imunoreaktivita byla analyzována v řezech, které obsahovaly CI, sluchovou a zrakovou kůru. Hranice jednotlivých anatomických struktur byly určeny podle příslušných anatomických atlasů (Paxinos & Watson, 1998; Zilles, 1985) a s pomocí řezů barvených podle Nissla (především ohraničení sluchové kůry) (viz též obr. 6 A,B).

V CI jsme vybrali vzorky mezi –8,0 až po –9,2 mm od bregmy, které obsahují všechny tři části CI, centrální jádro i externí a dorsální kůru. Řezy obsahující sluchovou kůru byly vybrány ve vzdálenosti od –4,2 mm do –5,8 mm od bregmy. Ventrální hranice oblastí Te1 a Te3 byly kontrolně identifikovány odměřením 2,0 – 2,5 mm od *fissura rhinalis* pro Te3 a 3,5–4,0 mm pro Te1. Jako dodatečné kritérium pro určení dorzální hranice sluchové kůry (Te1) jsme zvolili

proloženou linií procházející současně horním (dorzálním) okrajem diencephala v daném řezu. Ve zrakové kůře jsme vybrali vzorky mezi  $-5,0$  až po  $-6,5$  mm od bregmy.



*Obr. 6 (A,B): Topografický přehled colliculus inferior (CI) a mozkové kůry a jejich vnitřního členění. (A) – bregma  $-8,8$  mm; (B) – bregma  $-4,8$  mm.*

*DCI, ECI – dorzální a externí kůra CI, CCI – centrální jádro CI;*

*Par – parietální kůra; Hip – hipokampus; PRh – perirhinální kůra;*

*V1,2 – zraková kůra (primární a sekundární); RSD, RSV – retrosplenální kůra, dorzální a ventrální*  
**Obrázek upraven pro naše účely podle Paxinos a Watson (1998) a Zilles (1985).**

Pro vlastní kvantitativní vyhodnocení změn imunoreaktivity GAD ve stáří jsme použili stereologické metody vylučující zkreslení, tzv. optický disektor (Mayhew & Gundersen, 1996; West et al., 1991). Stereologické metody je možné využít pro odhady plochy povrchu objektu, celkového objemu objektu, délky lineárních útvarů a počtu částic v tkáni. Základem pro používání stereologických metod je využívání principu nestranného systematického náhodného výběru. Stereologická analýza využívá principů geometrické pravděpodobnosti a výsledek, který je získán, není přesnou hodnotou, nýbrž jejím odhadem, který není zatížen systematickým zkreslením. Optický disektor je stereologická sonda, která zahrnuje počítání objektů v objemové jednotce. Využívá dostatečně silných řezů ( $40 \mu\text{m}$  je pro počítání neuronů plně dostačující), uvnitř kterých jsou postupným zaostřováním po daných intervalech procházeny jednotlivé optické (ohniskové) roviny. Celkový přehled problematiky, viz Howard a Reed (1998).

K hodnocení jsme použili světelný mikroskop Leica DMRXA, který byl spojen s digitální kamerou (Optronics,  $1600 \times 1200$  pixelů) převádějící obraz na monitor počítače. Provedli jsme obrazovou analýzu pomocí softwaru Neurolucida (MicroBrightField, USA). Mikroskop (Leica

DMRXA) byl vybaven motorizovaným stolcem umožňujícím pohyb ve směru os X a Y, posun ve směru osy Z byl řízen digitálním mikroposuvem spjatým přímo s mikroskopem. Využili jsme možnost počítačově generované sítě (v programu Neurolucida) přes obrazovku monitoru, díky níž a tabulce náhodných čísel bylo možné náhodně zvolit počáteční pozici hodnotícího rámečku ve vyhodnocované oblasti.

Při použití 100x násobně zvětšujícího objektivu byla stanovena stálá velikost hodnotícího rámečku (3880  $\mu\text{m}^2$ ) a výška optického disektoru byla konstantních 5  $\mu\text{m}$ . Horní a dolní hranice řezu byly zběžně prohlédnuty, zda v nich nejsou ztracena buněčná jádra (Andersen & Gundersen, 1999). Prvních a posledních přibližně 5  $\mu\text{m}$  řezu bylo vyloučeno z analýzy pro vyloučení takto vzniklého zkreslení. Průměrně bylo počítáno 200 neuronů na zvíře, zvláště pro *colliculus inferior*, zvláště pro sluchovou a zvláště pro zrakovou kůru. Každý neuron v hodnotícím rámečku byl započítán v okamžiku, kdy jeho jádro bylo v maximálním zaostření. V této poloze bylo kurzorem na obrazovce monitoru obkresleno buněčné tělo a automaticky byly změřeny morfologické parametry a optická denzita. Hodnocena byla jen GAD-ir somata větší než 5  $\mu\text{m}$  a s viditelným jadérkem.

I když počítání neuronů bylo nezkreslené, měření jejich objemu mohlo být spojeno s malou chybou. Vzhledem k tomu, že šlo o frontální řezy, nebyl zcela splněn požadavek na izotropní či vertikální rovnoměrně náhodnou polohu řezů (Mayhew & Gundersen, 1996). Autoři Gundersen et al. (1988) argumentují, že chyba v tomto případě by měla být zanedbatelná. Objem jednotlivých somat neuronů byl určen tzv. nukleátorem. Vypočítán byl pomocí vzorce:  $estV = 4/3 \times \pi \times (m^3)$ , kde  $m^3$  je průměrná hodnota třetích mocnin délek průsečíků náhodně proložených skrze nucleolus (na monitoru, 3-4 průsečíky na jedno soma) v poloze, kdy bylo buněčné jádro v maximálním ohnisku (Mayhew & Gundersen, 1996). Spočítán byl objem přibližně 60 somat na jednu strukturu (CI, SK, ZK) pro každé jednotlivé zvíře.

Variace v intenzitě nespecifického imunoznačení v pozadí ovlivňuje výsledné hodnoty optické denzity (intenzity imunoreakce) neuronových těl. Např. na řezu více nespecificky nabarveném jsou i více, arteficiálně, denzní buněčná těla. Proto je třeba provést normalizaci. Ve studiích zabývajících se stárnutím neexistuje v mozku struktura, která by mohla být považována za indiferentní (tj. nedotčenou stárnutím), proto jsme počítali normalizovanou hodnotu optické denzity v každém řezu jako podíl mezi průměrnou optickou denzitou analyzovaných GAD-ir neuronů a průměrnou optickou denzitou odpovídajícího počtu imunonegativních buněk v témže

řezu (tj. pouze nespecificky zbarvených, viditelných jako obrysy na pozadí), viz Ling et al. (2005). U většiny neuronů bylo na první pohled jasné, zda je imunopozitivní. U několika málo nejistých neuronů byl proveden další krok, a pokud jejich naměřená optická denzita nebyla vyšší než dvojnásobek průměrné optické denzity imunonegativních buněk v daném řezu, byly považovány také za negativní a z analýzy byly vyloučeny.

### 3.2.6. *Statistická analýza*

Ke statistické analýze rozdílů v jednotlivých nálezech mezi skupinami mladých a starých potkanů jsme použili neparametrický dvoustranný Mann-Whitney test v programu GraphPad Prism 4.0, a to jak pro western blot, tak i pro histochemii a imunohistochemii. Z dat western blotu byly navíc analyzovány i rozdíly v hladinách proteinů mezi jednotlivými strukturami mozku (CI, sluchová a zraková kůra) a rozdíly v míře procentuální velikosti poklesu těchto hladin proteinů mezi sebou (tj. zda se v některé struktuře snížila hladina proteinů ve stáří signifikantně více než v jiných) pomocí jednocestného testu ANOVA a Bonferroniho *post-hoc* testu v programu GraphPad Prism 4.0. Chybové úsečky představují S.D. u dat western blotu a S.E.M. u imunohistochemických dat. Ve všech testech jsme považovali pouze hodnoty  $P < 0,05$  za signifikantní. V každém statistickém testu bylo každé zvíře reprezentováno jen jedním číslem, aby byla zajištěna vzájemná nezávislost dat vstupujících do testu (tj. např. 5 číselných údajů představujících průměrnou optickou denzitu GAD-ir neuronů v CI u 5-ti mladých zvířat bylo statisticky srovnáváno s 5-ti číselnými údaji představujícími totéž u 5-ti starých zvířat).



### ***3.3. Hodnocení hladin proteinů a imunoreaktivity kalbindinu a kalretininu v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře a v corpus geniculatum mediale u mladých a starých potkanů dvou kmenů***

#### *3.3.1. Pokusná zvířata*

Do experimentu bylo zařazeno celkem 36 potkanů (18 potkanů kmene Long Evans ve věku 3–6 měsíců (n=9) a ve věku 28–33 měsíců (n=9); 18 potkanů kmene Fischer 344 ve věku 3–5 měsíců (n=9) a 18–25 měsíců (n=9). Další podrobnosti viz kapitola 3.1.

#### *3.3.2. Kalbindin a kalretinin – western blot*

Pro tento druh analýzy byli použiti potkani kmene Long Evans, ve stáří 3–6 měsíců (n=4) a 30–33 měsíců (n=4), a potkani kmene Fischer 344, ve stáří 4 měsíců (n=4) a 21–25 měsíců (n=4).

Další zpracování bylo shodné s postupem uvedeným v kapitole 3.2.2. Pro imunoreakci byly použity tyto primární protilátky: anti-kalbindin (králičí polyklonální, Chemicon, 1:5000 v TBST), anti-kalretinin (králičí polyklonální, Millipore, 1:2000 v TBST) a anti-aktin (myší monoklonální, Chemicon, 1:10 000 v TBST) a sekundární protilátky konjugované oxidační metodou s křenovou peroxidázou (anti-myší IgG, Upstate, 1:7500 v TBST a anti-králičí IgG, Chemicon, 1:3333 v TBST).

#### *3.3.3. Kalbindin a kalretinin – imunohistochemie*

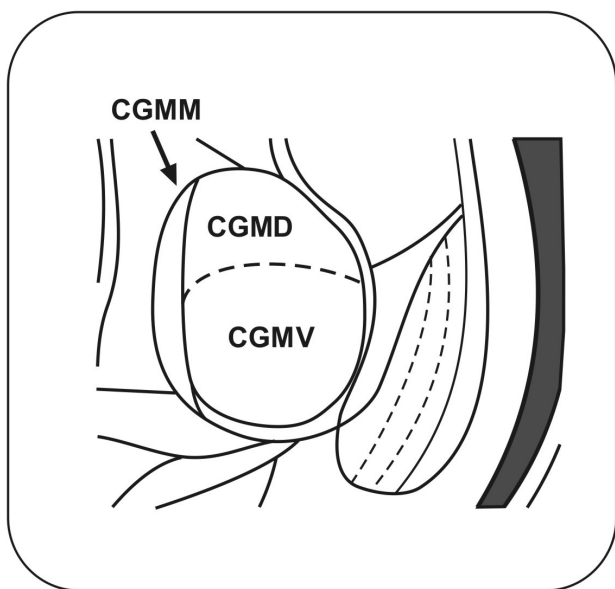
Pro tento druh analýzy byli použiti potkani Long Evans ve stáří 3–5 měsíců (n=5) a 28–33 měsíců (n=5), a potkani Fischer 344 ve věku 3–5 měsíců (n=5) měsíců a 18–24 měsíců (n=5). Potkani byli v hluboké anestézii (ketamin 35 mg/kg + xylazin 6 mg/kg, intramuskulárně) transkardiálně perfundováni nejprve fyziologickým roztokem a poté 4% roztokem paraformaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH = 7,4). Mozky po perfuzi byly do 15 minut vyjmuty, 1 hodinu postfixovány ve stejném fixativu (4 °C) a dále nasyceny v 30% roztoku

sacharózy ve fosfátovém pufru (PBS) při téže teplotě přes noc. Z vybraných oblastí mozku byly na zmrazovacím mikrotomu nakrájeny frontální řezy o tloušťce 40  $\mu\text{m}$ .

Následně byly volné řezy 1 hodinu preinkubovány v blokovacím roztoku (kozí sérum, Vector). Dále byly řezy 48 hodin inkubovány v PBS (4 °C) obsahujícím 1% blokovací sérum a anti–kalbindin (králičí polyklonální, 1:1000, Chemicon) nebo anti–kalretinin (králičí polyklonální, 1:5000, Millipore). Poté byly řezy po dobu 1 hodiny inkubovány s biotinylovanou sekundární protilátkou (1:200, Vector) a následně po dobu 1 hodiny s avidin–peroxidázovým komplexem (1:100, Vektor), vše při laboratorní teplotě. Poté bylo provedeno zviditelnění peroxidázové reakce pomocí 0,02% diaminobenzidinem s 0,01% hydrogen peroxidázou (5 min). Řezy byly nanесeny na sklíčka, vysušeny a překryty krycím sklíčkem.

#### 3.3.4. Stereologie kalbindinu a kalretininu

Imunoreaktivita byla analyzována v řezech, které obsahovaly CI, sluchovou a zrakovou kůru a *corpus geniculatum mediale* (CGM). Hranice jednotlivých anatomických struktur byly určeny podle příslušných anatomických atlasů (Paxinos & Watson, 1998; Zilles, 1985) a s pomocí řezů barvených podle Nissla (především ohraničení sluchové kůry) (viz též obr. 6 A,B a obr. 7).



Obr. 7: Topografický přehled *corpus geniculatum mediale* (CGM) a jeho vnitřního členění.

*bregma* –5,0 mm

CGMM – *corpus geniculatum mediale*, mediální část

CGMD, – *corpus geniculatum mediale*, dorzální část

CGMV – *corpus geniculatum mediale*, ventrální část

**Obrázek upraven pro naše účely podle Zilles (1985).**

Řezy obsahující sluchovou kůru byly vybrány ve vzdálenosti od –4,2 mm do –5,8 mm od bregmy. Ventrální hranice oblastí Te1 a Te3 byly kontrolně identifikovány odměřením 2,0–2,5

mm od fissura rhinalis pro Te3 a 3,5–4,0 mm pro Te1. Jako dodatečné kritérium pro určení dorzální hranice sluchové kůry (Te1) jsme zvolili proloženou linii procházející současně horním (dorzálním) okrajem diencephala v daném řezu. V CI jsme vybrali vzorky mezi –8,0 až po –9,2 mm od bregmy, které obsahují všechny tři části CI, centrální jádro i externí a dorsální kůru. Pro CGM jsme vybrali vzorky mezi –5,0 až po –6,2 mm od bregmy, které obsahují dorzální a ventrální část. Ve zrkové kůře jsme vybrali vzorky mezi –5,0 až po –8,0 mm od bregmy.

Pro vlastní kvantitativní vyhodnocení změn imunoreaktivity CB-ir a CR-ir ve stáří jsme použili stereologickou metodu vylučující zkreslení, tzv. optický disektor (Mayhew & Gundersen, 1996; West et al., 1991). K hodnocení jsme použili světelný mikroskop Leica DMRXA, který byl spojený s digitální kamerou (Optronics, 1600 × 1200 px) převádějící obraz na monitor počítače. Pomocí softwaru Neurolucida (MicroBrightField, USA) jsme provedli obrazovou analýzu. Mikroskop (Leica DMRXA) byl vybaven motorizovaným stolcem umožňujícím pohyb ve směru os X a Y, posun ve směru osy Z byl řízen digitálním mikroposuvem spojeným přímo s mikroskopem. Využili jsme možnost počítačově generované sítě (v programu Neurolucida) přes obrazovku monitoru, díky níž a tabulce náhodných čísel bylo možné náhodně zvolit počáteční pozici hodnotícího rámečku ve vyhodnocované oblasti.

Při použití 100x násobně zvětšujícího objektivu byla stanovena stálá velikost hodnotícího rámečku ( $3850 \mu\text{m}^2 - 70 \times 55 \mu\text{m}$ ) a výška optického disektoru byla konstantních 10  $\mu\text{m}$ . Horní a dolní hranice řezu byly zběžně prohlédnuty, zda v nich nejsou ztracena buněčná jádra (Andersen & Gundersen, 1999). Prvních a posledních přibližně 5  $\mu\text{m}$  řezu bylo vyloučeno z analýzy pro vyloučení takto vzniklého zkreslení. Průměrně bylo počítáno 200 neuronů na zvíře, zvlášť pro *colliculus inferior*, zvlášť pro sluchovou a zvlášť pro zrkovou kůru a pro CGM. Každý neuron v hodnotícím rámečku byl započítán v okamžiku, kdy jeho jádro bylo v maximálním zaostření. V této poloze bylo kurzorem na obrazovce monitoru obkresleno buněčné tělo a automaticky byly změřeny morfologické parametry a optická denzita. Hodnocena byla jen CB-ir a CR-ir somata větší než 5  $\mu\text{m}$  a s viditelným jadérkem.

### 3.3.5. Statistická analýza

Použité testy pro statistické zpracování byly shodné jako v kapitole 3.2.6.

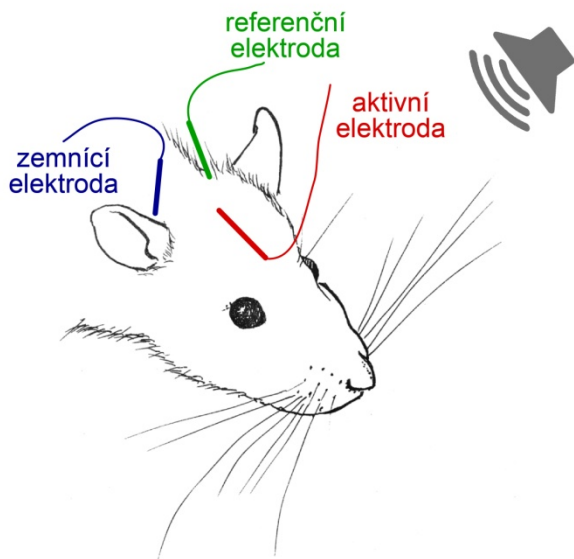
### ***3.4. Hodnocení behaviorální reakce na zvukový podnět v průběhu stárnutí u dvou kmenů potkanů***

#### *3.4.1. Pokusná zvířata*

Do experimentu bylo zařazeno celkem 46 potkanů (23 potkanů kmene Long Evans a 23 potkanů kmene Fischer 344). Měření bylo provedeno ve třech věkových skupinách: mladí dospělí potkani (ve věku 3–5 měsíců: n=10 potkanů kmene F344 a n=9 potkanů kmene LE), potkani středního věku (12–14 měsíců: n=6 potkanů kmene F344 a n=5 potkanů kmene LE) a staří potkani (24–26 měsíců: n=7 potkanů kmene F344 a ve věku 24–34 měsíců n=9 potkanů kmene LE). Rozsah třetí věkové kategorie zvířat (staří potkani) byl užší u skupiny F344 než u LE potkanů. Důsledkem těchto rozdílů je délka života (life span). U potkanů kmene F344 je asi o 6–8 měsíců kratší než u potkanů kmene LE (Hoffman, 1979; Sass et al., 1975). Z tohoto důvodu byla skupina starých LE rozdělena do dvou podskupin, které byly hodnoceny odděleně: skupina LE-A1, věk: 24 až 26 měsíců, n=5 a skupina LE-A2, věk: 29–34 měsíců, n=4. To nám umožnilo porovnat obě věkové skupiny F344 a LE, ale také nejstarší zvířata obou kmenů. Další podrobnosti viz kapitola 3.1.

#### *3.4.2. Stanovení sluchového prahu prostřednictvím registrace ABR*

Teoretický úvod je popsán v kapitole 1.4.1. Pro vyhodnocování sluchových prahů pomocí odpovědí ABR na zvukové podněty jsme potkany uvedli do anestezie intramuskulární aplikací směsi ketaminu (38 mg/kg; Calypsol, Gedeon Richter) a xylazinu (5 mg/kg; Sedazine, Fort Dodge). Pro zajištění klidu zvířete při měření a pro vyloučení svalových artefaktů byla tato anestézie nezbytná. Po celou dobu měření byla zvířata položena na vyhřívané podložce s automaticky regulovanou teplotou 38 °C. Měření sluchových prahů probíhalo ve zvukově izolované a bezdozvukové komoře.



Obr. 8: Ilustrační schéma pro měření ABR.  
 Ilustrace Jiří Lindovský, ml.

ABR byly měřeny diferencíální metodou pomocí tří jehel z nerez oceli. Snímací, aktivní, elektroda byla umístěna podkožně nad temenem lebky v místě tzv. vertex. Tyto nahrané odpovědi se někdy označují jako odpovědi snímané ze vzdáleného místa (far-field technique). Referenční a zemní elektrody byly umístěny za pravý a levý mastoideus (obr. 8).

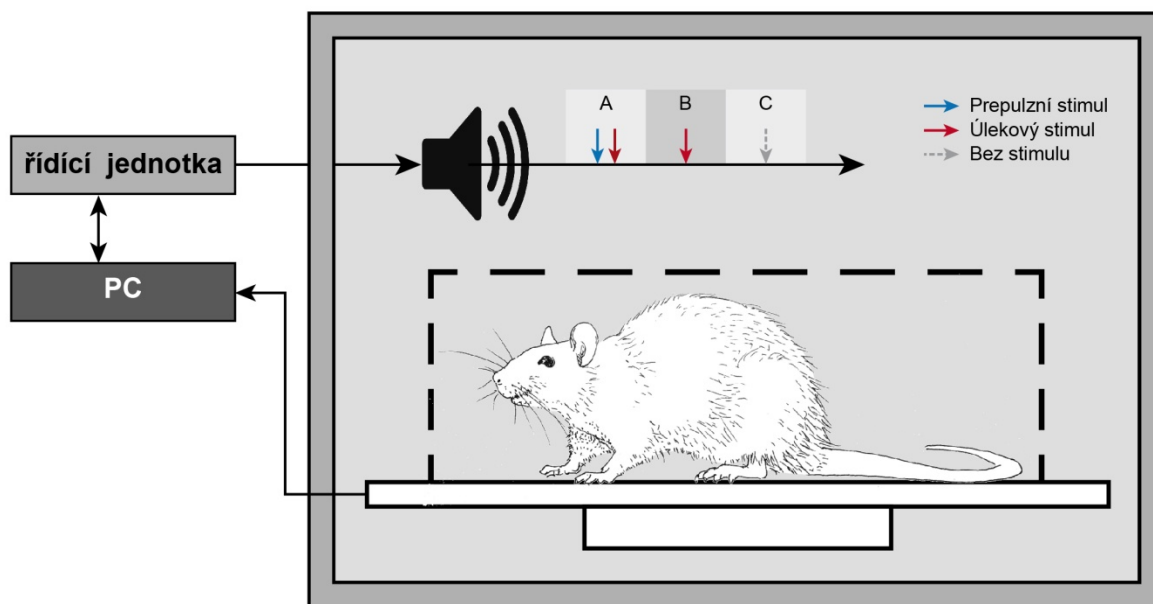
Zvuková stimulace byla generována a zpracování signálu z elektrod bylo prováděno zařízením TDT (System III, Tucker Davis Technologies, Florida, USA) a programem BioSig. Registrované vyvolané odpovědi byly impedančně upraveny předzesilovačem TDT RA4LI, zesíleny desetkrát zesilovačem TDT RA16PA a zavedeny optickými kabely do procesoru TDT Pentusa, kde byly dále zesíleny, filtrovány v rozmezí 300 Hz – 3 kHz (zisk 80 dB) a digitalizovány vzorkovací frekvencí 25 kHz (16 bitový analogově/digitální převodník). Podněty pro akustickou stimulaci byly generovány počítačově řízeným systémem TDT a přiváděny do volného pole ve zvukově stíněné komoře pomocí dvoupásmového reproduktorového systému (Jamo woofer – nízké frekvence a SEAS T25CF 002 tweeter – vysoké frekvence) umístěného ve vzdálenosti 70 cm před hlavou testovaného zvířete. Pro stanovení sluchových prahů jsme jako stimuly užívali širokopásmové kliky a čisté tóny frekvencí v rozmezí 2–32 kHz (trvání 3 ms, časy náběhu a poklesu 1 ms). Akustický systém byl kalibrován za použití mikrofону B&K 4939, předzesilovače ZC0020 a zvukoměru B&K 2231. U nahraných odpovědí byl sluchový práh pro každou frekvenci stanoven vizuálním hodnocením odpovědí na monitoru počítače od jednoznačně nadprahových hodnot po 5 dB sestupně až po hraniční prahovou odpověď (viditelnou odchylku od základní hladiny šumu v časovém okénku odpovídajícímu výskytu vyvolaných odpovědí). Pro každý podnět a každou intenzitu bylo pro zprůměrnění provedeno 250 vyvolaných odpovědí při opakování podnětů 20/s.

### 3.4.3. *Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět a prepulzní inhibice*

ASR je přechodná motorická reakce na neočekávaný intenzivní senzorický podnět. Jde o primitivní behaviorální projev, který je společný všem savcům. Prepulzní inhibice úlekové reakce je způsobena akustickým stimulem, který je vložený před samotný úlekový signál a samotnou odpověď na úlekový signál zeslabuje. Více viz kapitola 1.4.2.

### 3.4.4. *Zařízení pro měření ASR a PPI*

Všechna behaviorální testování jsme prováděli ve zvukově izolované komoře (Coulbourn Habitest, model E10-21) ve zvukotěsné místnosti. Potkan byl umístěn do malé drátěné klece (160 × 85 × 90 mm), která byla uložena na platformu citlivou na pohyb. Byl detekován motorický reflex potkana a následně pomocí piezoelektrického akcelerometru převeden na elektrický signál. Zesílený napěťový signál byl dále zpracován zařízením TDT system III (Tucker Davis Technologies, Florida, USA; RP 2.1 Real-Time Processor), viz obr. 9. Výsledky jsme vyhodnocovali pomocí programu vytvořeném v programovém prostředí MATLAB (The MathWorks, Inc.). Velikost úlekové reakce byla vyhodnocena v časovém rozmezí 100 ms od spuštění úlekového stimulu. Velikost amplitudy ASR byla určena maximální výchylkou střídavého napětí v časovém okně odpovědi. Jako úlekové stimuly jsme použili krátké tóny nebo krátké impulzy bílého šumu. Jako prepulzní stimuly jsme použili krátké tóny. V obou případech byly stimuly generované systémem TDT a prezentované reproduktorem (SEAS, 29AF/W), který byl umístěn uvnitř komory (12 cm nad platformou). Prezentace stimulů, stejně tak i nahrávání dat, bylo řízeno programem vyrobeným v prostředí MATLAB. Zařízení bylo zkalibrováno ve frekvenčním rozmezí 1–32 kHz pomocí mikrofону Brüel & Kjaer 4939, připojenému k předzesilovači ZC 0020 a zvukoměru B&K 2231.



Obr. 9: Ilustrační schéma testovacího zařízení pro ASR, kde jsou znázorněny 3 typy měření:  
 A – reakce při úlekovém stimulu, kterému předchází prepulzní stimul  
 B – reakce při samotném úlekovém stimulu  
 C – reakce bez stimulu  
 Ilustrace Jiří Lindovský, ml.

### 3.4.5. Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět

Úlekovou reakci vyvolaly zvukové stimuly, krátké tóny o frekvenci 4, 8, a 16 kHz a bílý šum o frekvenci 1,5–45 kHz (délka stimulů 50 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms). V každé testovací sérii byly měřeny reakce potkana na 7 úlekových stimulů o různé intenzitě: 60, 70, 80, 90, 100, 110 a 120 dB SPL, ale také úroveň aktivity bez stimulu (–10 dB). Každý stimul byl prezentován 10×. Stimuly byly prezentovány v náhodném pořadí. Aby u zvířat nedošlo ke snížené tendenci reagovat při opakované prezentaci stimulů, k tzv. habituaci, byly mezi jednotlivými stimuly proměnné intervaly o trvání v průměru 15–30 s.

U každého typu stimulu byla vypočítána průměrná amplituda ASR ze všech prezentovaných stimulů daného typu. Největší a nejmenší hodnota amplitudy ASR byla ze zprůměrnování vyloučena. Úleková reakce byla započítána, pokud průměrná amplituda ASR překročila průměrnou základní amplitudu ( $0,03 \pm 0,008$  V) o více než dvojnásobek směrodatné

odchylky (tj. přibližně o více než 0,05 V). Poté byla označena prahová hodnota ASR jako minimální intenzita testovaného stimulu, která vyvolala úlekovou reakci alespoň u 50 % případů z celkové prezentace stimulu.

#### 3.4.6. Měření prepulzní inhibice úlekové reakce

Při měření prepulzní inhibice (PPI) úlekové reakce jsme použili 3 různé typy stimulů: samotný úlekový stimul (bílý šum o intenzitě 115 dB SPL, délka stimulu 50 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms), kombinaci úlekového stimulu a prepulzního tónu (délka trvání stimulu 50 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms) o frekvenci 4, 8 a 16 kHz a při intenzitě 75 dB SPL a úroveň aktivity bez zvukového stimulu. Mezi prezentací prepulzního a úlekového stimulu byla pauza 50 ms. Každý typ stimulu byl prezentován desetkrát v testovací sérii. Průměrný interval mezi jednotlivými stimuly se pohyboval v rozmezí 15–30 s. Účinnost prepulzní inhibice úlekového stimulu byla vyjádřena jako:

$$\text{PPI} = [1 - (\text{amplituda ASR inhibovaná prepulzním tónem}) / (\text{amplituda ASR bez PPI})] \times 100 \%$$

100 % PPI tedy odpovídá úplnému potlačení ASR a vyšší hodnoty znamenají silnější PPI.

#### 3.4.7. Statistické zpracování

Ke statistickému vyhodnocování byly použity tyto parametry: prahy ABR, ASR prahy, ASR amplitudy a amplituda ASR inhibovaná prepulzním tónem. Analyzovány byly dvěma způsoby: mezikmenovým porovnáním potkanů stejného věku (např. mladí potkani F344 vs. mladí LE potkani) a na základě věkové závislosti v rámci daného kmene (např. mladí potkani vs. potkani středního věku vs. staří potkani kmene F344). Tento přístup nám umožnil snížit stupně volnosti v každém testu a tedy použít 2D testů místo 3D a zároveň se zaměřit více na vybraný parametr vynecháním dat, která neposkytují relevantní informaci. Používali jsme dvojcestný ANOVA test s opakováním následovaný Bonferroniho *post-hoc* testem. K použití ANOVY s opakováním nás vedla skutečnost, že každé testované zvíře poskytovalo data ve všech měřených frekvencích, tzn. že v případě ABR prahů to byly tóny frekvence 2, 4, 8, 16 a 32 kHz;



v případě ASR prahů a amplitud to byl bílý šum a tóny frekvencí 4, 8 a 16 kHz a v případě PPI se jednalo o tóny 4, 8 a 16 kHz. První typ analýzy použil tři testy (jeden pro každou skupinu – mladí dospělí, středního věku a staří potkani), kde závislou proměnnou byla frekvence a kmen potkana. U druhého typu analýzy byly provedeny dva testy (jeden u každého kmene), kde závislou proměnnou byla frekvence a věk. Navzdory tomu, že ASR odpovědi a prahy byly měřeny při několika hladinách úlekového stimulu, statistické vyhodnocení ASR amplitud bylo provedeno v jednotné intenzitě stimulu, a to 120 dB SPL. K testování závislosti amplitudy ASR na prazích slyšení jsme použili lineární regresi následovanou F-testem, abychom určili, zda směrnice vypočtené přímkou se signifikantně liší od nuly.

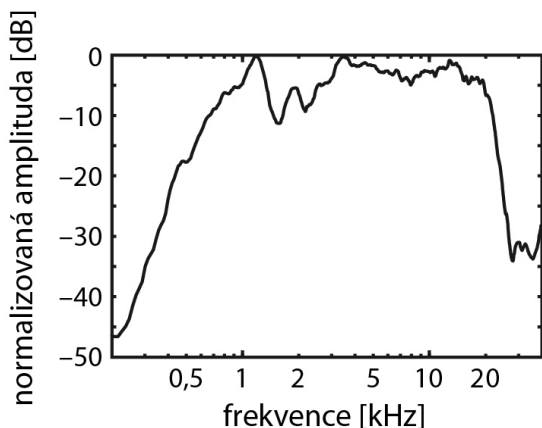
### ***3.5. Hodnocení behaviorální reakce na zvukový podnět u potkaních samic kmene Long Evans ovlivněných krátkou hlukovou expozicí v mládí***

#### *3.5.1. Pokusná zvířata*

Do této části experimentu bylo zařazeno celkem 14 potkaních samic kmene Long Evans, které byly rozděleny do dvou skupin: 7 potkaních mláďat bylo 14. postnatální den vystaveno krátké expozici hluku (8 min, 125 dB SPL) a zbylých 7 potkanů bylo použito jako kontrolní skupina. Obě skupiny potkanů byly ve věku 3–5 měsíců každý den testovány metodou měření velikosti úlekové reakce na zvukový podnět (acoustic startle reflex, ASR) a prepulzní inhibice úlekové reakce na zvukový podnět (prepulse inhibition, PPI). Do elektrofyziologického testování sluchových prahů bylo zařazeno 8 zdravých potkaních mláďat – samic kmene Long Evans ve věku P 14, z nichž 4 byly čtrnáctý postnatální den vystaveny krátké expozici hluku o vysoké intenzitě (8 min, 125 dB SPL). U exponovaných zvířat byly zhruba 1 hodinu po expozici a následně 15. a 33. postnatální den testovány sluchové prahy prostřednictvím kmenových vyvolaných odpovědí a výsledné hodnoty byly porovnány s hodnotami sluchových prahů kontrolních potkanů (n=4). Další podrobnosti viz kapitola 3.1.

### 3.5.2. Hluková expozice

Potkaní mláďata byla 14. postnatální den v bdělém stavu vystavena 8 minut hlukové expozici bílým šumem o intenzitě 125 dB SPL ve speciálním boxu. Během hlukové expozice byla zvířata jednotlivě uzavřena v malé drátěné kleci (vnitřní rozměry: 13 × 6 × 6 cm) a umístěna v bezdozvukovém boxu (vnitřní rozměry: 24 × 24 × 34 cm) vybaveném reproduktorem (B&C Speakers DE700) ve vzdálenosti 17 cm od přední stěny drátěné klece. Bílý šum byl generován generátorem bílého šumu RFT 03 004 a zesílen pomocí zesilovače. Pomocí mikrofону B&K



Obr. 10: Frekvenční spektrum bílého šumu.

4939, předzesilovače ZC0020 a zvukoměru B&K 2231 bylo změřeno zvukové pole uvnitř boxu ve čtyřech bodech. Hodnoty akustického tlaku v jednotlivých bodech boxu se vzájemně nelišily o více než  $\pm 1,5$  dB SPL. Ve speciálním boxu bylo naměřené frekvenční spektrum šumu v rozsahu frekvencí 0,8–20 kHz ploché ( $\pm 5$  dB SPL) (obr. 10).

### 3.5.3. Stanovení sluchového prahu prostřednictvím registrace ABR

Pro snímání kmenových evokovaných potenciálů byli dospělí v mládí ohlušovaní potkani a kontrolní potkani uvedeni do anestézie pomocí intramuskulární aplikace sedativa medetomidin hydrochlorid (Domitor, Farnos) v dávce 0,3 mg/kg (účinky přetrvávaly minimálně 1 hodinu). Pro stanovení sluchových prahů jsme jako stimuly užili širokopásmové kliky a čisté tóny frekvencí v rozmezí 2–40 kHz (trvání 3 ms, časy náběhu a poklesu 1 ms). Pro každý podnět a každou intenzitu bylo pro zprůměrnění provedeno 500 vyvolaných odpovědí při opakování podnětů 20/s. Teoretický úvod je popsán v kapitole 1.4.1. Další podrobnosti viz kapitola 3.4.2.

#### 3.5.4. Měření úlekové reakce na zvukový podnět

Úlekovou reakci vyvolaly zvukové stimuly, krátké tóny o frekvenci 2, 4, 8, a 16 kHz a bílý šum o frekvenci 1,5–45 kHz (délka stimulů 50 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms). V každé testovací sérii byly měřeny reakce potkana na 6 úlekových stimulů o různé intenzitě (70, 80, 90, 100, 110 a 120 dB SPL), ale také úroveň aktivity bez stimulu. Teoretický úvod je popsán v kapitole 1.4.2. Další podrobnosti viz v kapitolách 3.4.3., 3.4.4. a 3.4.5.

#### 3.5.5. Měření prepulzní inhibice úlekové reakce

Při měření prepulzní inhibice (PPI) úlekové reakce jsme použili 10 různých typů stimulů: samotný úlekový stimul (bílý šum o intenzitě 110 dB SPL, délka stimulu 50 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms), 8 kombinací úlekového stimulu a prepulzního tónu (délka stimulu 50 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms) na různých úrovních intenzity (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 a 80 dB SPL), a úroveň aktivity bez zvukového stimulu. Mezi prezentací prepulzního a úlekového stimulu byla pauza 50 ms. Každý typ stimulu byl prezentován desetkrát v testovací sérii. Průměrný interval mezi jednotlivými stimuly se pohyboval v rozmezí 15–40 s. Prepulzní inhibice úlekové reakce byla měřena prepulzními stimuly o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz. Účinnost prepulzní inhibice úlekového stimulu byla vyjádřena jako:

$$\text{PPI} = (\text{amplituda ASR inhibovaná prepulzním tónem}) / (\text{amplituda ASR bez PPI}) \times 100 \%$$

Teoretický úvod je popsán v kapitole 1.4.2. Další podrobnosti viz kapitoly 3.4.3., 3.4.4. a 3.4.6.

#### 3.5.6. Statistické zpracování

Pro ověření statistické významnosti rozdílů mezi průměrnými hodnotami ASR na různé typy stimulů mezi skupinami exponovaných a kontrolních potkanů jsme použili analýzu variance (analysis of variance, ANOVA) s následným Student-Newman-Keuls *post-hoc* testem. Stejně tak jsme testovali rozdíly mezi průměrnými hodnotami ASR u jednotlivých stimulů a účinnost prepulzní inhibice ASR v experimentálních skupinách. Rozdíly ve sklonech funkce PPI jsme analyzovali pomocí t-testu nebo lineární regrese.

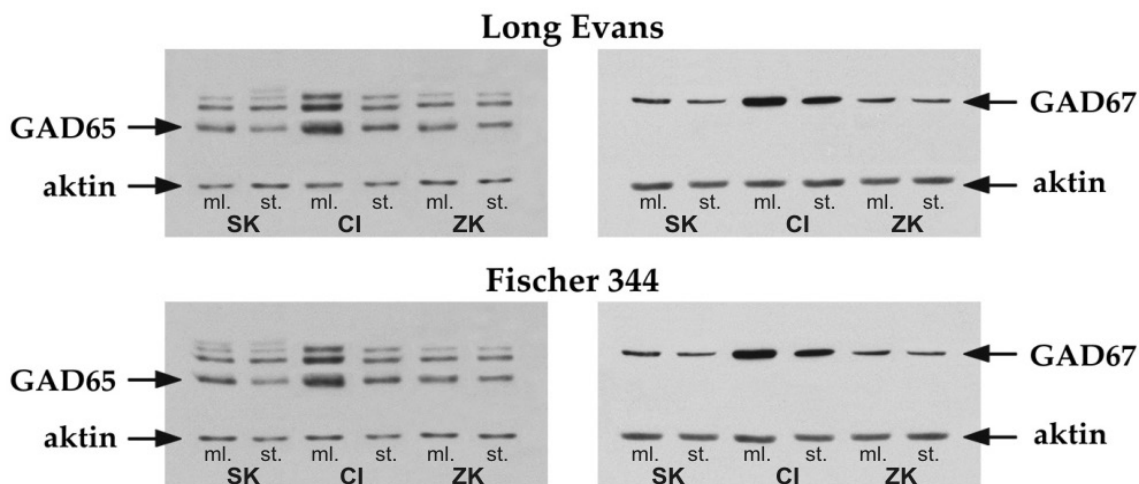
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Změny v hladinách GAD65 a 67 a v imunoreaktivitě v *colliculus inferior*, sluchové a zrakové kůře způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů

#### 4.1.1. Změny hladin GAD65 a 67 způsobené stárnutím u kmene Long Evans

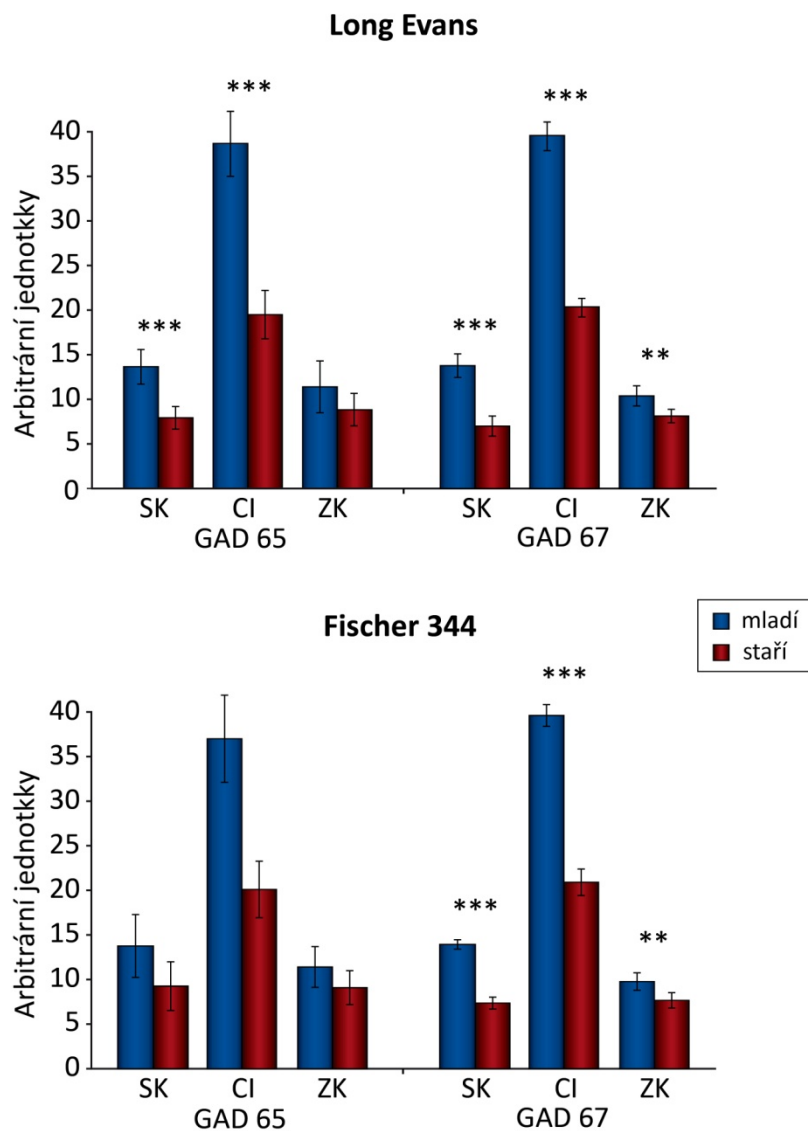
##### 4.1.1.1. *Colliculus inferior*

Z analýzy provedené metodou western blot (viz obr. 11) vyplynul při srovnání starých zvířat s mladými zvířaty velmi výrazný pokles hladin obou proteinů, GAD65 i GAD67, o 50 % a 48 % ( $P < 0,01$  a  $P < 0,001$ ) (obr. 12). Analyzované vzorky zahrnovaly celý *colliculus inferior*, tedy všechny jeho tři podčásti - externí kůru (ECI), dorzální kůru (DCI) a centrální jádro (CCI). Nelze tedy říci, jak velké byly změny v samotném centrálním jádře (CCI), kde podle histochemické analýzy byly poklesy nejvýraznější.



Obr. 11: Reprezentativní filmy (1 mladý a 1 starý potkan LE a totéž F344) s výsledky analýzy western blotu pro GAD65 (65 kDa, levý panel) a GAD67 (67 kDa, pravý panel) vyvolané metodou zesílené chemiluminiscence. Aktin o molekulové hmotnosti 42 kDa byl interní kontrolou. Vzhledem k použití polyklonální protilátky pro GAD65 je na levém panelu přítomné i nespecifické zbarvení (neoznačené horní bledé proužky).

SK – sluchová kůra, CI – *colliculus inferior*, ZK – zraková kůra, ml. – mladí a st. – starší potkani.



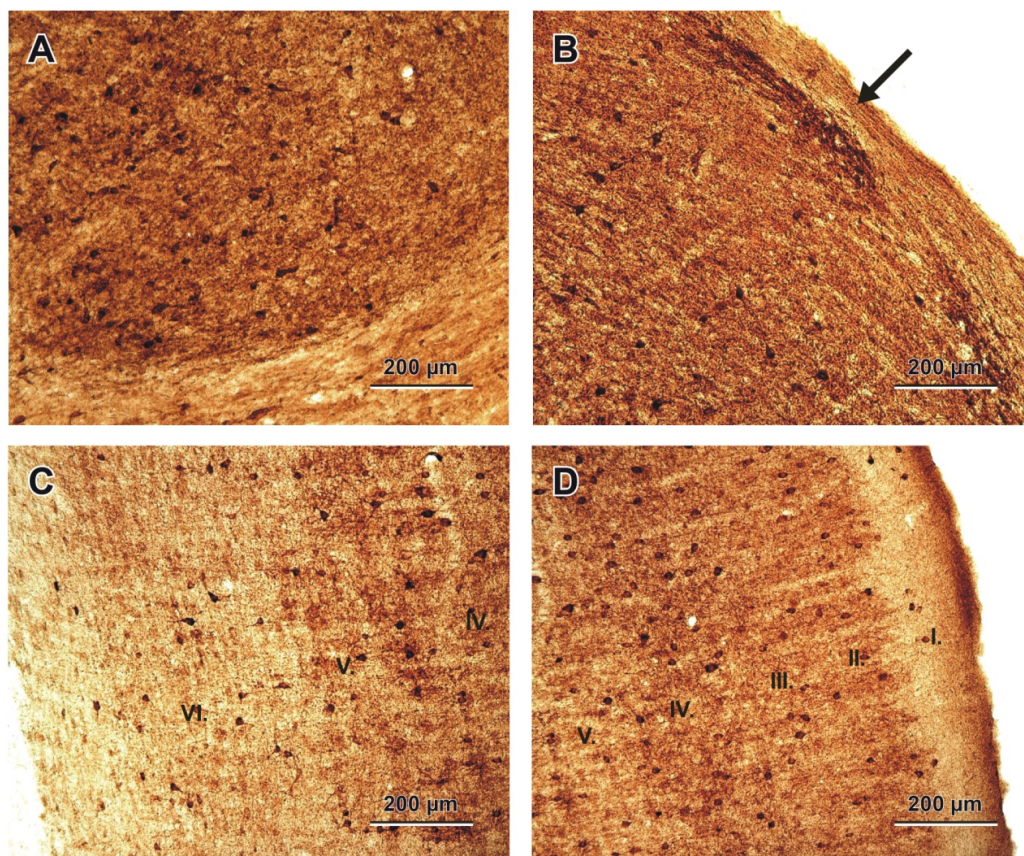
Obr. 12: Výsledky analýzy hladin proteinů GAD65 a GAD67 v SK, CI a ZK u potkanů kmene Long Evans (6 mladých a 6 starých u GAD65; 10 mladých a 10 starých u GAD67) a potkanů kmene Fischer 344 (2 staří a 2 mladí u GAD65; 6 mladých a 6 starých u GAD67). Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata.

Jednotlivé experimentální skupiny a mozkové struktury byly pro daný protein vždy zastoupeny na jednom filmu (viz obr. 11). Arbitrární jednotky jsme vypočítali jako poměr optické denzity detekovaného proteinu a aktinu (v naskenovaných filmech analýzou v softwaru ImageQuant).

Chybové úsečky představují S.D.; (\*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$ ).

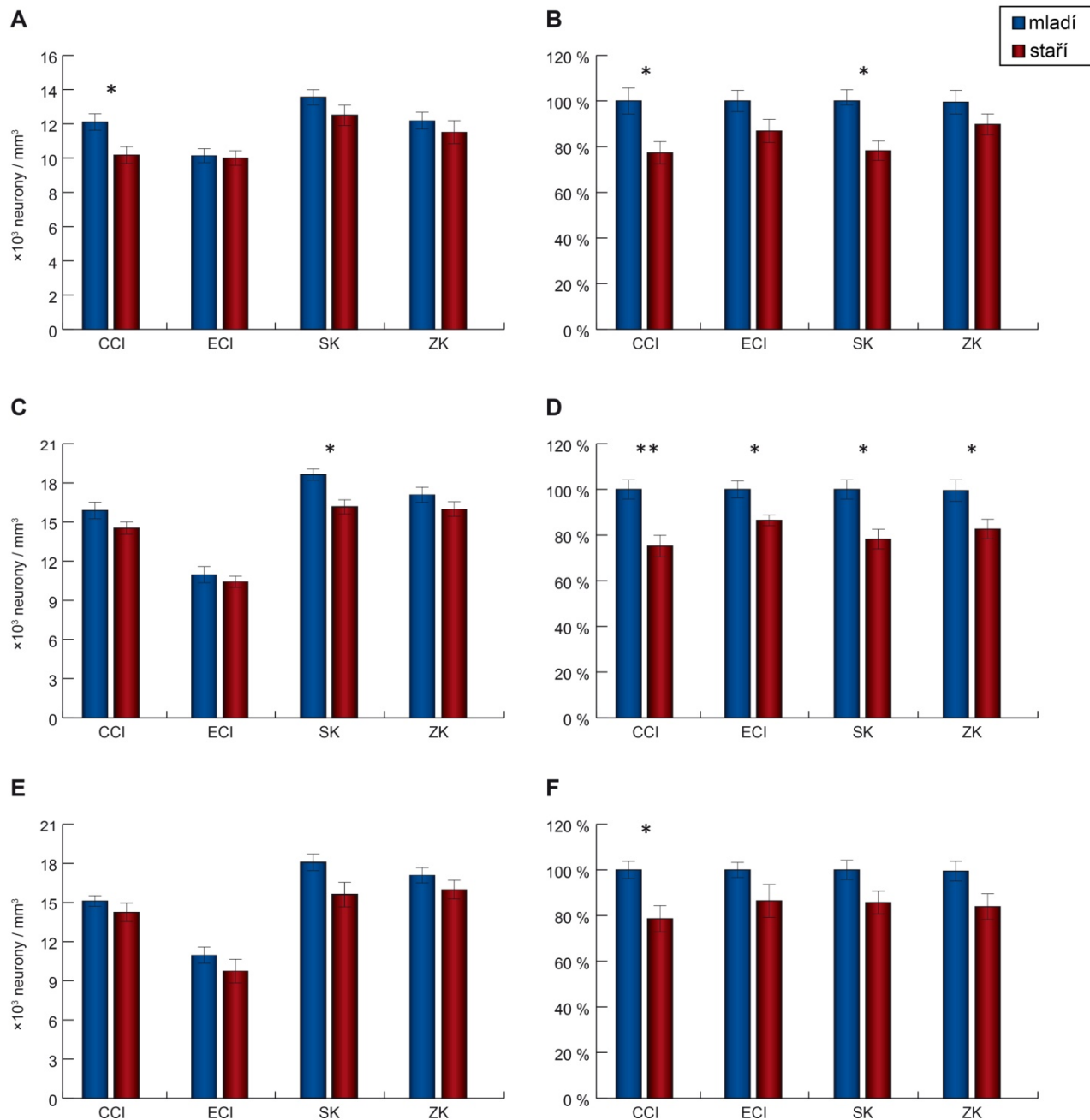
Imunohistochemická analýza zjistila, že neurony GAD65 a GAD67-ir byly přítomny ve všech třech částech *colliculus inferior* (pro detailnější rozbor, viz Oliver et al. (1994). Pro CCI

byla charakteristická variabilita tvarů, různá velikost a intenzita nabarvení somat GAD-ir buněk. Většina pozitivních neuronů v ECI patřila buď k velkým větvenitým neuronům nebo menším oválným neuronům spolu se shluky intenzivně nabarveného neuropilu a malým neuronům. Zatímco v DCI byla populace malých GAD-ir buněk řídko zastoupená (obr. 13A,B).



*Obr. 13: Ilustrační obrázek imunoreaktivitu GAD67 v CCI (A), ECI (B) a v hlubokých a povrchových vrstvách sluchové kůry (C,D) u mladého potkana kmene Long Evans. V barvení na GAD byly změny ve stáří homogenní, pouhým okem neviditelné, proto je obrázek určen pro demonstraci samotného barvení nikoliv pro demonstraci změn.*

Statisticky významné změny ve spojení se stárnutím byly zjištěny pouze v centrálním jádře a externí kůře (obr. 14A–D). V CCI se výrazně snížila optická denzita GAD65 a 67-ir somat o 27 % ( $P=0,015$ ) a 25 % ( $P=0,015$ ). Zároveň se méně výrazně snížil i počet přítomných GAD65 a 67-ir buněk a to o 14 % ( $P=0,03$ ) a 9 % (nesignifikantní). V ECI došlo pouze k poklesu optické denzity o 16 % ( $P=0,03$ ) a 14 % ( $P=0,03$ ), zatímco počet buněk zůstal na úrovni mladých potkanů. V průměrné velikosti somat jsme žádnou změnu v CI starých zvířat nenalezli.



Obr. 14: Výsledky kvantitativního vyhodnocení imunoreaktivity GAD65 a GAD67 u potkanů kmene **Long Evans (A,B,C,D)** a **Fischer 344 (E,F)**. Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata. A, B) Počet a optická densita GAD65-imunoreaktivních neuronů v CCI, ECI, SK a ZK u mladých (n=4) a starých (n=4) zvířat kmene Long Evans. C, D) Počet a optická densita GAD67-imunoreaktivních neuronů v CCI, ECI, SK a ZK u mladých (n=5) a starých (n=5) zvířat kmene Long Evans. E, F) Počet a optická densita GAD67-imunoreaktivních neuronů v CCI, ECI, SK a ZK u mladých (n=5) a starých (n=3) zvířat kmene Fischer 344. Chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ ).

#### 4.1.1.2. Sluchová kůra

Z výsledků získaných z western blot analýzy vyplynul značný pokles hladin obou izoform GAD u starých potkanů ve srovnání s mladými jedinci. Hladiny poklesly o 43 % u GAD65 a o 48 % u GAD67 ( $P < 0,01$  a  $P < 0,001$ ) (obr. 12). Analyzované vzorky pro western blot obsahovaly oblasti Te1 a Te3 dohromady. Ukázalo se také, že hladiny obou GAD proteinů v CI byly skoro třikrát vyšší než ve sluchové kůře, a to jak u mladých, tak i u starých zvířat ( $P < 0,001$ ). Rozdíly mladí vs. staří potkani i rozdíly mezi CI a SK (a ZK) jsou dobře viditelné i na obr. 11.

GAD65 a 67-ir neurony byly přítomny ve všech korových vrstvách studovaných zvířat nezávisle na věku s výraznějším zastoupením v povrchových vrstvách (I.–IV.) než v hlubších vrstvách (V.–VI.) (detailní popis, viz Prieto et al. (1994)). Stejně tak i v povrchových vrstvách (II.–IV.) bylo výraznější barvení neuropilu, kromě málo intenzivní I. vrstvy (obr. 13C,D). Barvení dendritického větvení bylo nestálé. Většinou bylo možné sledovat alespoň primární dendrity, ale občas i některý dendrit až do vzdálenosti 50–100  $\mu\text{m}$ . Rozdíl mezi areami Te1 a Te3 nebyl patrný. Změny spojené se stárnutím postihovaly obě oblasti v průměru stejně.

Výsledky imunohistochemické analýzy ukázaly pokles v optické denzitě neuronů u starých potkanů srovnatelný s poklesem v CI. Optická denzita GAD65-ir somat klesla o 20 % ( $P = 0,015$ ) a GAD67-ir somat o 22 % ( $P = 0,015$ ). Počet GAD65-ir buněk se u starých potkanů ve srovnání s mladými snížil jen nevýznamně (o 8 %), zatímco u GAD67-ir neuronů byl o něco výraznější (13 %,  $P = 0,03$ ). V žádné korové vrstvě jsme neprokázali specificky odlišnou změnu. Pokles počtu buněk byl homogenní a bez jakýchkoliv fokálních rozdílů (obr. 14A–D).

#### 4.1.1.3. Zraková kůra

Analýza western blotu odhalila značné snížení hladin obou izoform proteinů i ve zrakové kůře, nicméně jejich pokles byl méně výrazný než v obou sluchových strukturách. GAD65 poklesl o 23 % ( $P < 0,05$ ) a GAD67 o 21 % ( $P < 0,05$  a  $P < 0,001$ ) (obr. 11, 12). U mladých potkanů byla hladina obou proteinů ve sluchové kůře vyšší než v kůře zrakové (v případě GAD67 signifikantně,  $P < 0,05$ ). U starých potkanů byla hladina obou izoform proteinů GAD ve sluchové i zrakové kůře přibližně stejná. Po provedení statistické analýzy velikosti poklesu jsme našli



v *colliculus inferior* i ve sluchové kůře shodné, tedy méně patrné, poklesy obou izoform proteinů, zatímco ve zrakové kůře byl rozsah poklesu nejen procentuálně, ale i statisticky menší než ve sluchovém systému ( $P < 0,05$ ).

Neurony GAD65 a GAD67-ir se nacházely ve všech korových vrstvách zrakové kůry. Rozložení, optická denzita buněk i imunoreaktivita neuropilu byly velmi podobné nalezeným výsledkům ve sluchové kůře. U starých potkanů bylo zjištěno snížení optické denzity buněk, které bylo poněkud méně výrazné než ve sluchové kůře, konkrétně o 12 % pro GAD65-ir (nesignifikantní) a o 18 % pro GAD67-ir neurony ( $P = 0,03$ ). Naproti tomu počet buněk GAD65 a 67-ir se s věkem téměř nesnížil (cca o 5 %, nesignifikantní). Stejně jako ve sluchové kůře a v *colliculus inferior* se nezměnil ani průměrný objem GAD pozitivních buněk (obr. 14A–D).

#### 4.1.2. Změny v GAD65 a 67 způsobené stárnutím u kmene Fischer 344

V analýze western blot byly sledovány změny hladin proteinů GAD65 a GAD67. Z důvodu nízkého počtu zvířat pro stanovení GAD65 ( $n = 2$ ) byla statistická analýza prováděna pouze pro GAD67 ( $n = 6$ ). V *colliculus inferior* poklesly hladiny GAD65 o 46 % a GAD67 o 47 % ( $P < 0,001$ ) (obr. 12). Ve sluchové kůře se snížilo množství GAD65 o 34 % a GAD67 o 45 % ( $P < 0,001$ ). A ve zrakové kůře byly hladiny GAD65 nižší o 19 % a GAD67 o 24 % ( $P < 0,01$ ). Změny byly tedy zcela obdobné jako u potkanů kmene Long Evans.

V zásadě platí, že změny související s věkem u kmene Fischer 344 měly stejný charakter jako u kmene Long Evans. V imunohistochemické části experimentu byly studovány pouze změny v GAD67. Optická denzita GAD67-ir somat poklesla v CCI o 21 % ( $P = 0,03$ ), v ECI o 13 %, ve sluchové kůře o 14 % a ve zrakové kůře také o 15 %. Počet GAD67-ir buněk se snížil v týchž strukturách v uvedeném pořadí o 6 %, 10 %, 10 % a 6 % (obr. 14E–F).

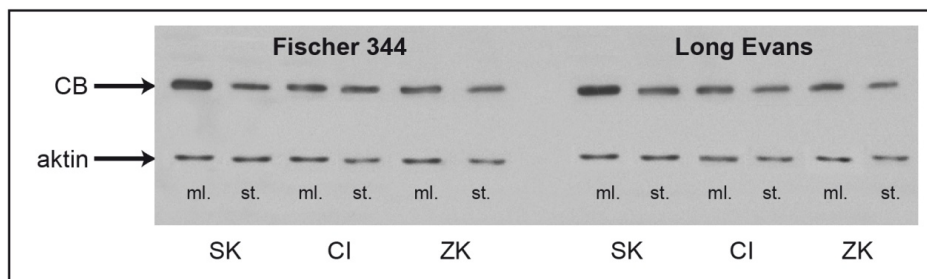
## 4.2. Změny v hladinách CB a CR a v imunoreaktivitě v *colliculus inferior*, CGM, sluchové a zrakové kůře způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů

### 4.2.1. Změny hladin CB způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů

#### 4.2.1.1. *Colliculus inferior*

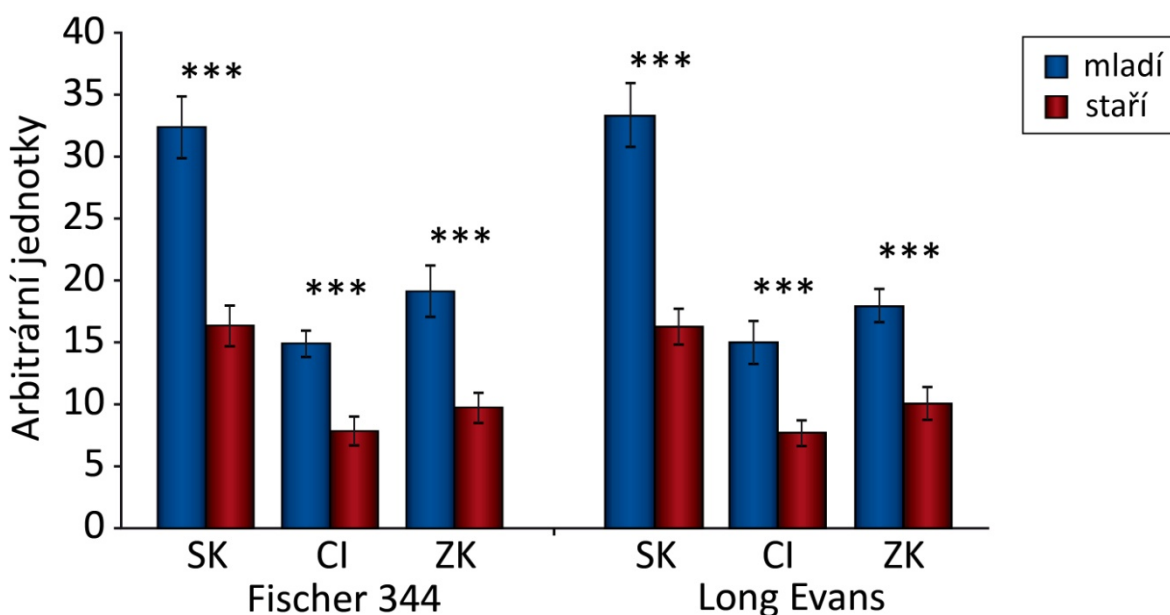
Analýza western blotu ukázala s věkem související signifikantní pokles hladiny kalbindinu v celém IC u obou kmenů starých potkanů v porovnání s mladými zvířaty: o 49% u kmene Long Evans a o 45 % u kmene Fischer 344 (oba  $P < 0,001$ ) (obr. 15 a 16). Analyzované vzorky zahrnovaly celý *colliculus inferior*, tedy všechny tři jeho podčásti.

CB-ir neurony byly přítomny ve všech třech částech *colliculus inferior*. Většina pozitivních neuronů byla nalezena v dorzální kůře (DCI) a externí kůře (ECI) (obr. 17A,B). Zatímco v centrálním jádře (CCI) byla populace CB-ir buněk zastoupená pouze řídce. Statisticky významné změny spojené se stárnutím byly zjištěny převážně v dorzální kůře a v externí kůře. Vlivem stárnutí se výrazně snížil počet CB neuronů v DCI a ECI kůře u obou kmenů potkanů (o 21% a 16% u kmene Long Evans a o 18 % a 13 % u kmene F344 potkanů, resp.  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  v DCI LE potkanů; obr. 18A,B). Průměrné velikosti CB-ir neuronálních somat se signifikantně snížily pouze v dorzální kůře IC (o 18 % u Long Evans a 16 % u F344 potkanů, respektive  $P < 0,05$ ; obr. 18C,D).



Obr. 15: Reprezentativní filmy (1 mladý a 1 starý potkan Fischer 344 a totéž Long Evans) s výsledky analýzy western blotu pro CB 28 kDa vyvolané pomocí metody zesílené chemiluminiscence. Aktin o molekulové hmotnosti 42 kDa byl interní kontrolou.

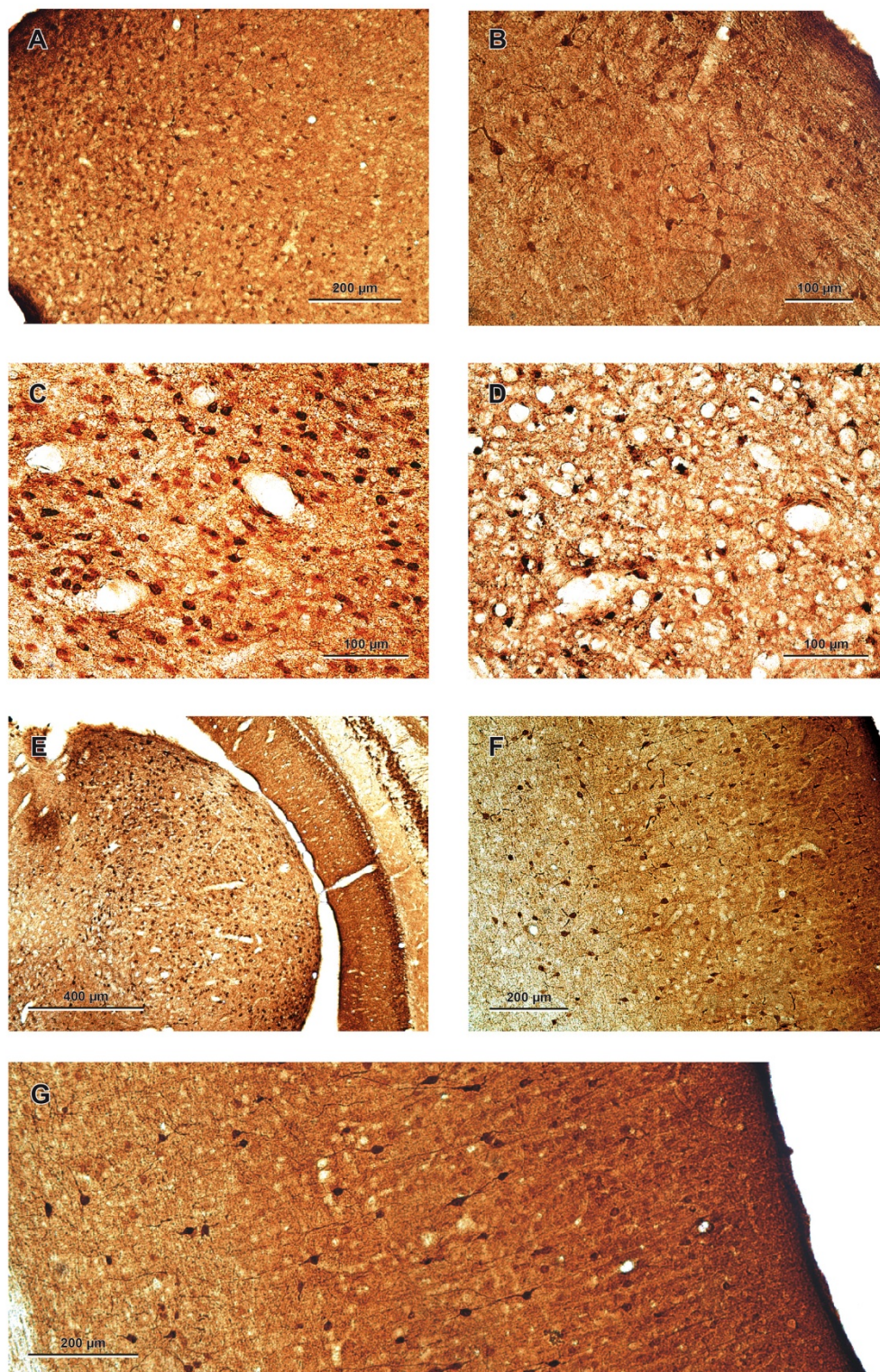
SK – sluchová kůra, CI – *colliculus inferior*, ZK – zraková kůra, ml. – mladí a st. – staří potkani.



Obr. 16: Výsledky analýzy hladin proteinů CB v SK, CI a ZK u mladých a starých potkanů (4 mladí a 4 staří potkani kmene Fischer 344 a 4 mladí a 4 staří potkani kmene Long Evans). Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata. Jednotlivé experimentální skupiny a mozkové struktury byly pro daný protein vždy zastoupeny na jednom filmu (viz obr. 15). Arbitrární jednotky byly vypočítány jako poměr optické hustoty detekovaného proteinu a aktinu (v naskenovaných filmech analýzou v softwaru ImageQuant). Chybové úsečky představují S.D.; (\*\*\*) –  $P < 0,001$ .

#### 4.2.1.2. Sluchová kůra

Analýza metodou western blot ukázala signifikantní pokles způsobený stárnutím v hladině CB o 54 % u LE a o 48 % u F344 ( $P < 0,001$ ) (obr. 15 a 16). Analyzovali jsme oblasti Te1 a Te3. Statisticky významný pokles v hladině CB v průběhu stárnutí byl pozorován i u zrakové kůry: 42 % u LE a 50 % u F344 ( $P < 0,001$ ) (obr. 15 a 16). Tyto stárnutím způsobené poklesy v podkorových a korových sluchových oblastech jsou jasně patrné na reprezentativních filmech na obr. 15. Nicméně je zajímavé, že hladina CB byla jak u starých tak u mladých zvířat přibližně 2× vyšší ve sluchové kůře než v CI a ZK ( $P < 0,01$ ; Bonferroniho test s mnohonásobným porovnáváním).



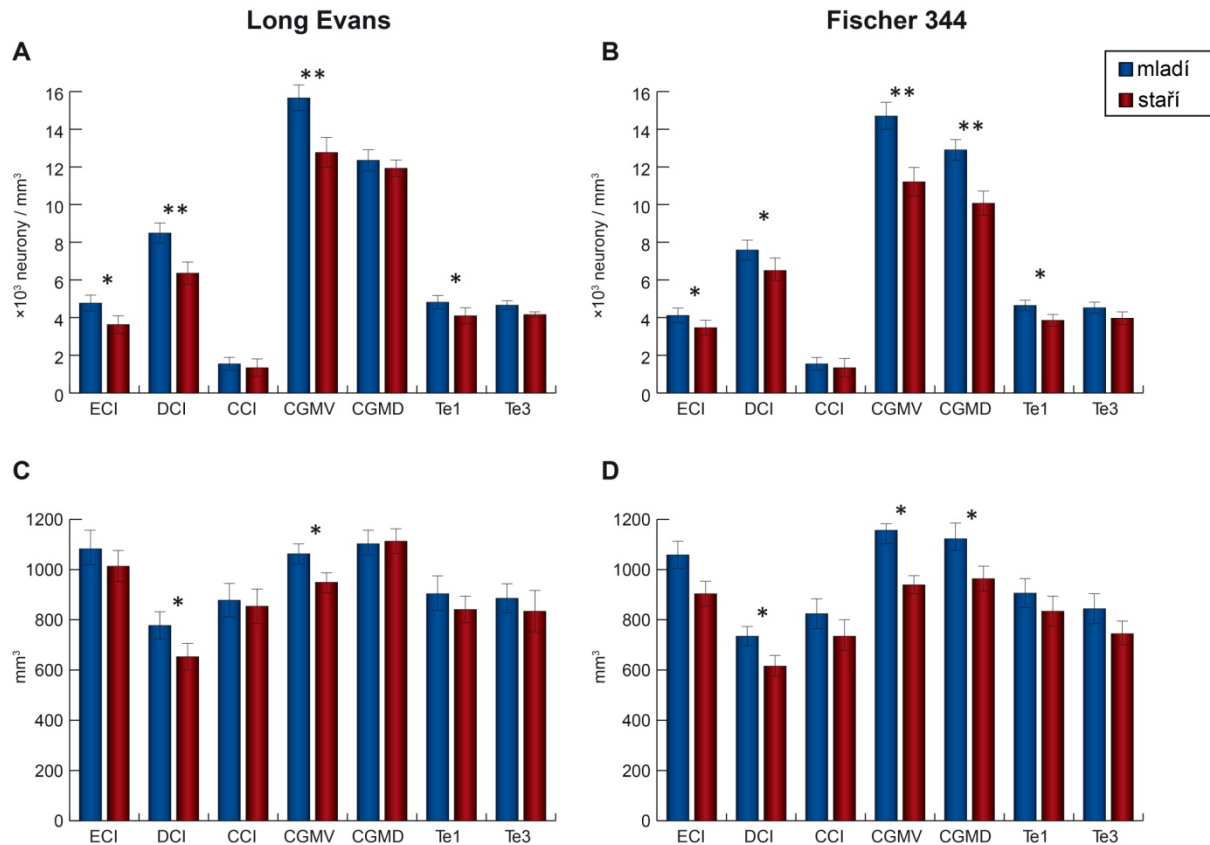
*Obr. 17: Ilustrační obrázek imunoreaktivity CB v dorzální (A) a externí (B) kůře IC u mladých potkanů kmene Long Evans, ve ventrální části CGM mladého (C) a starého (D) potkana kmene Fischer 344, v CGM (E) mladého potkana kmene Fischer 344 a ve sluchové kůře oblasti Te1 u starého (F) a mladého (G) potkana kmene Long Evans.*

CB-ir neurony byly pozorovány jak u kmene LE, tak u kmene F344 a to ve II. – VI. vrstvě v oblastech Te1 a Te3. Výrazně vyšší optická denzita a větší intenzita zbarvení neuropilu se více vyskytovalo v povrchových vrstvách (I. – IV.) než ve vrstvách hlubokých (V. – VI.). Toto platilo jak u starých, tak i u mladých zvířat (obr. 17F,G). Neurony v povrchových vrstvách byly obarveny slaběji než neurony v hlubokých vrstvách: v několika případech jejich morfologie připomínala pyramidové neurony. V porovnání se změnami způsobenými stárnutím u CI a CGM byly změny u CB-ir neuronů ve sluchové kůře méně nápadné: snížení o 14 % u LE a o 16 % u F344 potkanů. Pokles v počtu CB-ir neuronů v průběhu stárnutí v oblasti Te1 u starých zvířat dosáhl statistické významnosti ( $P < 0,05$ ) (obr. 18A,B). Na druhou stranu objemové změny CB-ir neuronálních somat byly nepatrné a nesignifikantní.

#### 4.2.1.3. *Corpus geniculatum mediale*

Z metodických důvodů nebylo CGM možné zahrnout do analýzy metodou western blot.

V CGM byly CB-ir neurony přítomny jak v dorzální tak i ve ventrální části v podstatně vyšší hustotě oproti výskytu v IC a sluchové kůře (obr. 17C–E). Ve srovnání s mladými potkany významně poklesl počet CB-ir buněk ve ventrální části u obou kmenů potkanů, a to o 18 % u kmene Long Evans a o 23 % u kmene F344 (obojí  $P < 0,01$ ; obr. 18A,B). Kromě toho, v dorzální části CGM u starých potkanů kmene F344 se také signifikantně snížil počet CB-ir neuronů o 21 % ( $P < 0,01$ ; obr. 18A,B). Průměrný objem CB-ir neuronových somat byl ve ventrální části obou kmenů potkanů vlivem stárnutí menší, stejně tak i v dorzální části kmene F344 potkanů (všechny  $P < 0,05$ ; obr. 18C,D). Rozdíl v průměrné hustotě imunoreaktivních neuronů mezi mladými a starými zvířaty byl v některých případech viditelný pouhým okem (obr. 17C,D). Kvůli menší velikosti řezu v mediální části CGM a nízkému počtu CB-ir neuronů v části této struktury se značně zvýšila S.E.M. ve srovnání se všemi ostatními analyzovanými strukturami. To by nám neumožnilo provádět smysluplnou statistickou analýzu, proto jsme se rozhodli vynechat mediální části z našich výpočtů.



Obr. 18: Výsledky kvantitativního vyhodnocení imunoreaktivity CB u kmene **Long Evans** (A,C) a u kmene **Fischer 344** (B,D). Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata.

A, C) Počet a průměrný objem CB-imunoreaktivních neuronů v ECI, DCI, CCI, CGMV, CGMD, Te1 a Te3 u mladých (n=5) a starých (n=5) zvířat kmene Long Evans.

B, D) Počet a průměrný objem CB -imunoreaktivních neuronů v ECI, DCI, CCI, CGMV, CGMD, Te1 a Te3 u mladých (n=5) a starých (n=5) zvířat kmene Fischer 344.

Chybové úsečky představují S.E.M.; (\* – P<0,05, \*\* – P<0,01).

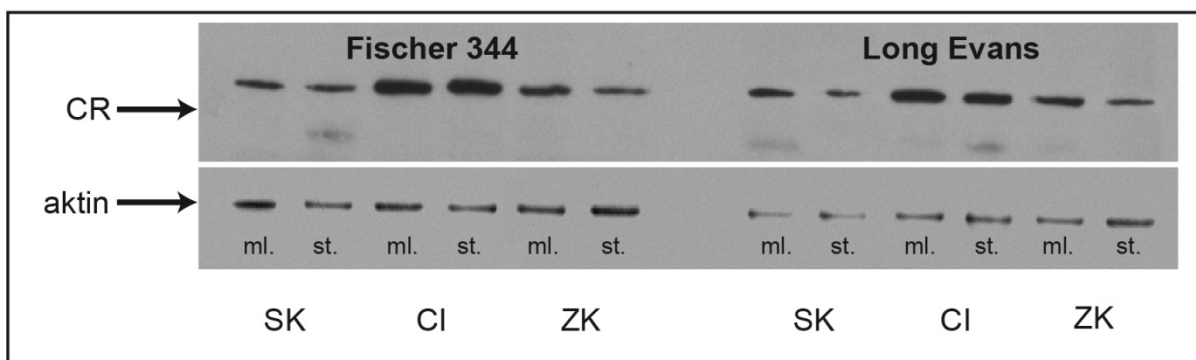
#### 4.2.2. Změny hladin CR způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů

##### 4.2.2.1. Colliculus inferior

Analýza pomocí western blotu ukázala signifikantní pokles hladin CR způsobený stárnutím v CI u obou kmenů potkanů: 22 % u kmene LE a 21 % u kmene F344 (oboje P<0,05) (obr. 19 a 20). Analyzované vzorky zahrnovaly všechny tři oddíly CI. Je zajímavé, že hladina CR byla jak u starých, tak u mladých zvířat přibližně 2x vyšší v CI než ve sluchové kůře a ZK

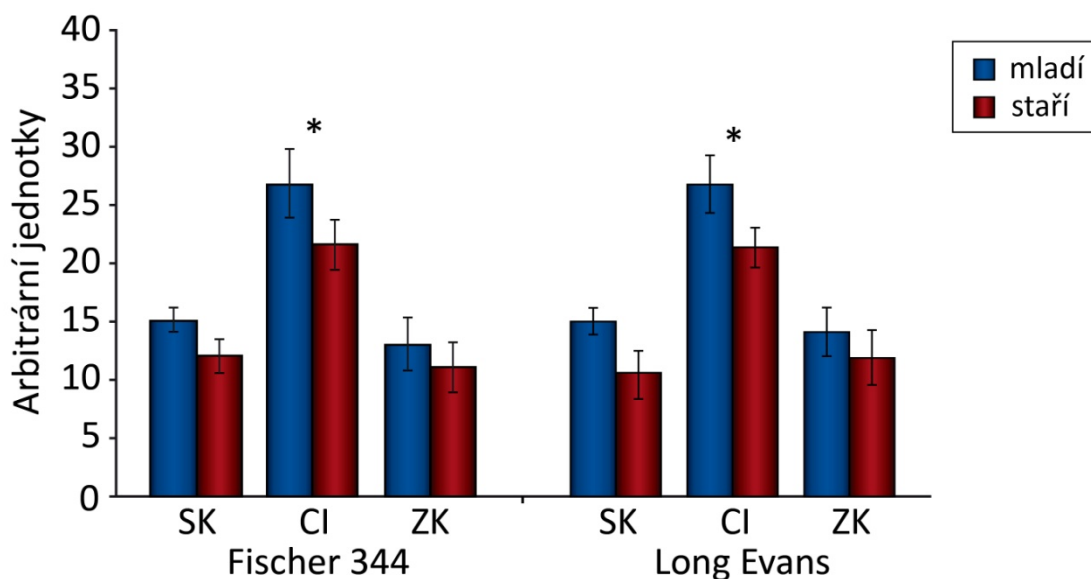
( $P < 0,01$ ; Bonferroniho test s mnohonásobným porovnáváním), jak je vidět na reprezentativních filmech na obr. 19.

CR-ir neurony byly nalezeny ve všech třech oddílech CI. Většina CR-ir buněk se vyskytovala v dorzální a externí kůře (obr. 21A,B), pouze slabé barvení bylo pozorováno v centrálním jádře. Změny způsobené stárnutím byly podobné bez ohledu na kmen a měly tendenci k poklesu k CR-ir neuronů a k poklesu průměrných objemů přítomných CR-ir neuronálních somat ve všech oddílech CI. Počet CR-ir neuronů se snížil signifikantně u obou kmenů v dorzální kůře: 16 % LE a 20 % F344 (oboje  $P < 0,05$ ) (obr. 22A,B). Navíc průměrné objemy CR-ir neuronálních somat signifikantně poklesly v dorzální a externí kůře v porovnání s mladými zvířaty. V dorzální kůře byl tento pokles 19 % ( $P < 0,05$ ) u LE a 25 % ( $P < 0,01$ ) u F344, zatímco v externí kůře se jednalo o pokles 15 % ( $P < 0,05$ ) u LE a 18% ( $P < 0,05$ ) u F344 (obr. 22C,D).



Obr. 19: Reprezentativní filmy (1 mladý a 1 starý potkan Fischer 344 a totéž Long Evans) s výsledky analýzy western blotu pro CR 29 kDa vyvolané pomocí metody zesílené chemiluminiscence. Aktin o molekulové hmotnosti 42 kDa byl interní kontrolou. Vzhledem k použití polyklonální protilátky jsou přítomné i nespecificky zbarvené proužky.

SK – sluchová kůra, CI – colliculus inferior, ZK – zraková kůra, ml. – mladí a st. – staří potkani.



Obr. 20: Výsledky analýzy hladin proteinů CR v SK, CI a ZK u mladých a starých potkanů (4 mladí a 4 staří potkani kmene Fischer 344 a 4 mladí a 4 staří potkani kmene Long Evans).

Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata.

Jednotlivé experimentální skupiny a mozkové struktury byly pro daný protein vždy zastoupeny na jednom filmu (viz obr. 19).

Arbitrární jednotky byly vypočítány jako poměr optické density detekovaného proteinu a aktinu (v naskenovaných filmech analýzou v softwaru ImageQuant).

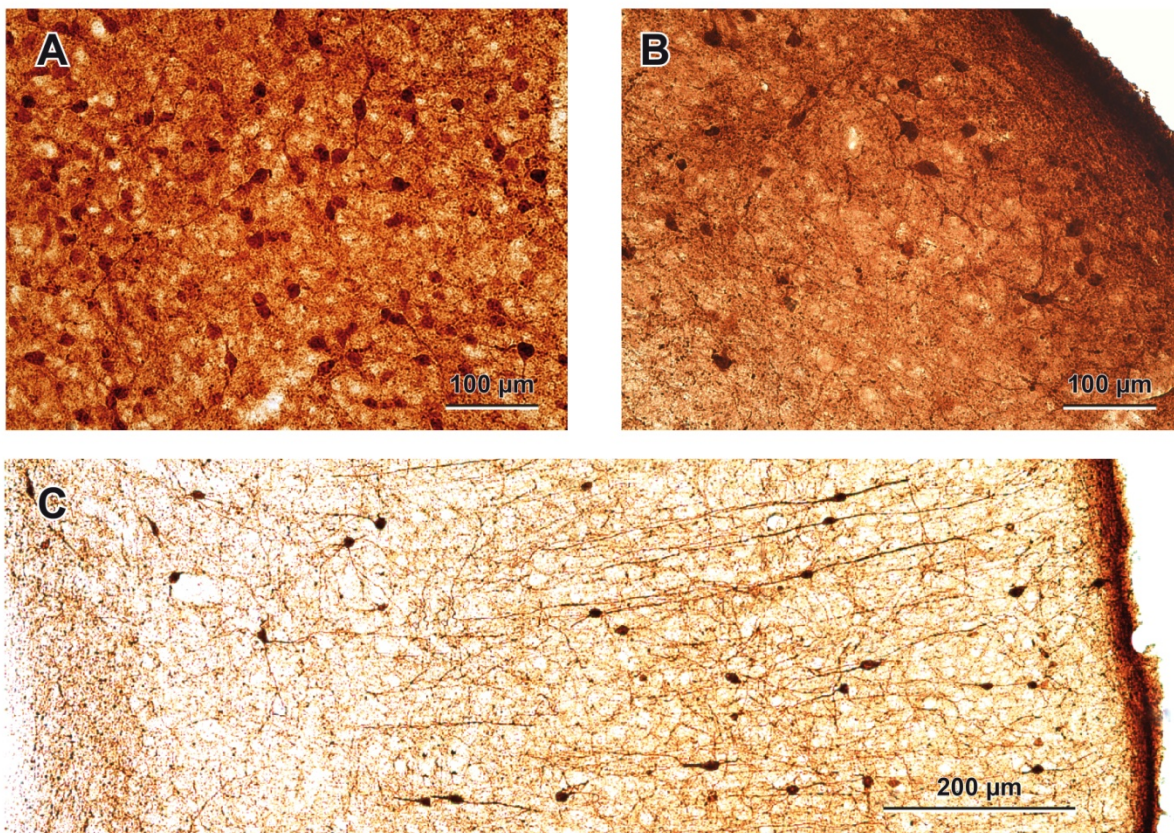
Chybové úsečky představují S.D.; (\* –  $P < 0,05$ ).

#### 4.2.2.2. Sluchová kůra

Metoda western blot ukázala pouze nesignifikantní pokles v hladinách CR během stárnutí a to jak u sluchové, tak u zrakové kůry. Pokles u sluchové kůry byl 26 % u kmene LE a 20 % u kmene F344, což je více než u zrakové kůry (16 % u LE a 15 % u F344) a podobá se výsledkům u CI. Nicméně kvůli větší variabilitě hodnot u jednotlivých zvířat (hodnot CR v příslušných SK) byly rozdíly v porovnání se situací v CI nesignifikantní (obr. 19 a 20).

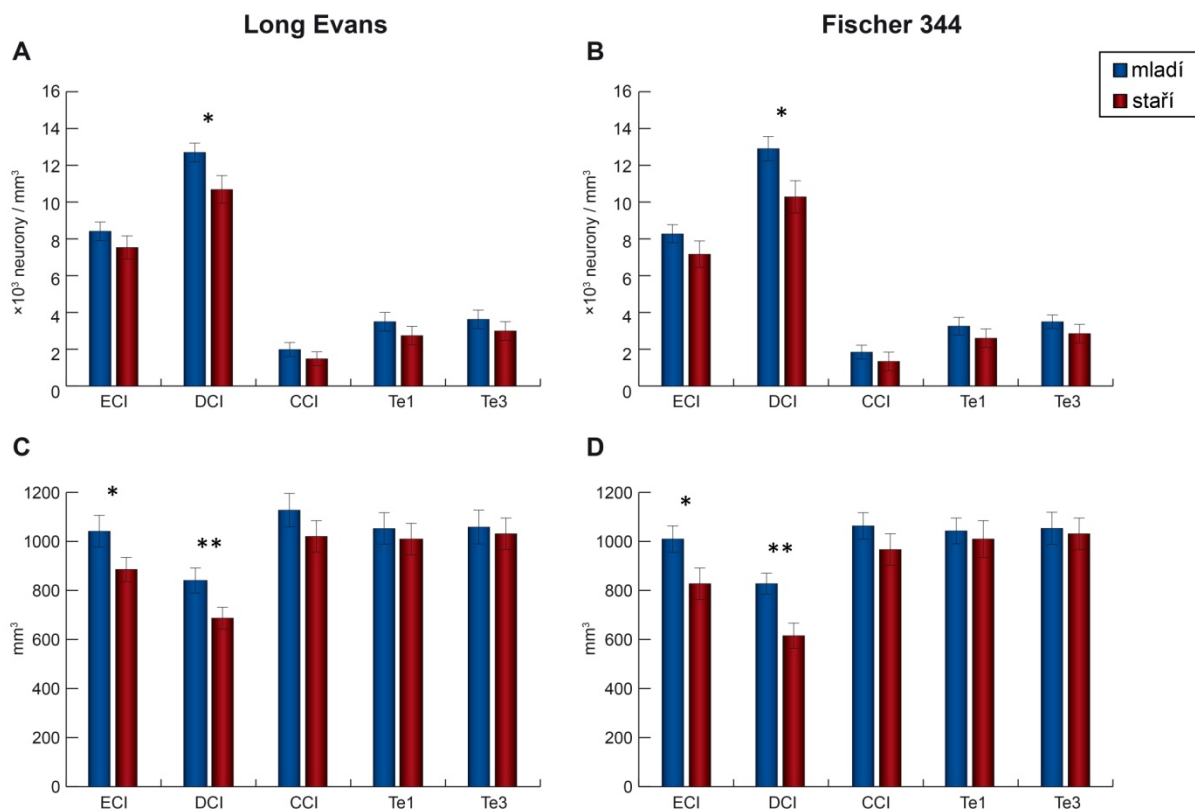
CR-ir neurony se vyskytovaly ve všech korových vrstvách bez ohledu na kmen a věk, avšak nejčastěji byly v povrchových vrstvách II. – III. V oblasti Te3 byl počet CR-ir buněk o něco vyšší v porovnání s oblastí Te1 u obou kmenů zvláště v povrchových vrstvách. Distribuce CR-ir neuronů však byla v korových vrstvách prakticky stejná v obou sluchových oblastech.





*Obr. 21: Ilustrační obrázek imunoreaktivity CR v dorzální (A) a externí (B) kůře IC u mladých potkanů kmene Long Evans a ve sluchové kůře oblasti Te1 u mladého (C) potkana kmene Fischer 344.*

Pozitivní neurony s dobře obarvenými výběžky ukázaly omezené horizontální a dlouhé vertikální větvení (obr. 21 C). Během stárnutí počet CR-ir neuronů v oblasti Te1 a Te3 poklesl. Nicméně pokles nebyl signifikantní ani u jednoho kmene. Rozdíl v průměrném objemu somat mezi mladými a starými zvířaty byl nepatrný (obr. 22C,D). Při analýze jednotlivých korových vrstev se ukázalo, že pokles počtu CR-ir neuronů během stárnutí byl výraznější ve vrstvách I. – III. a VI., zatímco ve vrstvách IV. a V. téměř k poklesu nedošlo.



Obr. 22: Výsledky kvantitativního vyhodnocení imunoreaktivity CR u kmene **Long Evans** (A,C) a u kmene **Fischer 344** (B,D). Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata.

A, C) Počet a průměrný objem CR-imunoreaktivních neuronů v ECI, DCI, CCI, Te1 a Te3 u mladých (n=5) a starých (n=5) zvířat kmene Long Evans.

B, D) Počet a průměrný objem CB -imunoreaktivních neuronů v ECI, DCI, CCI, Te1 a Te3 u mladých (n=5) a starých (n=5) zvířat kmene Fischer 344.

Chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ ).

#### 4.2.2.3. *Corpus geniculatum mediale*

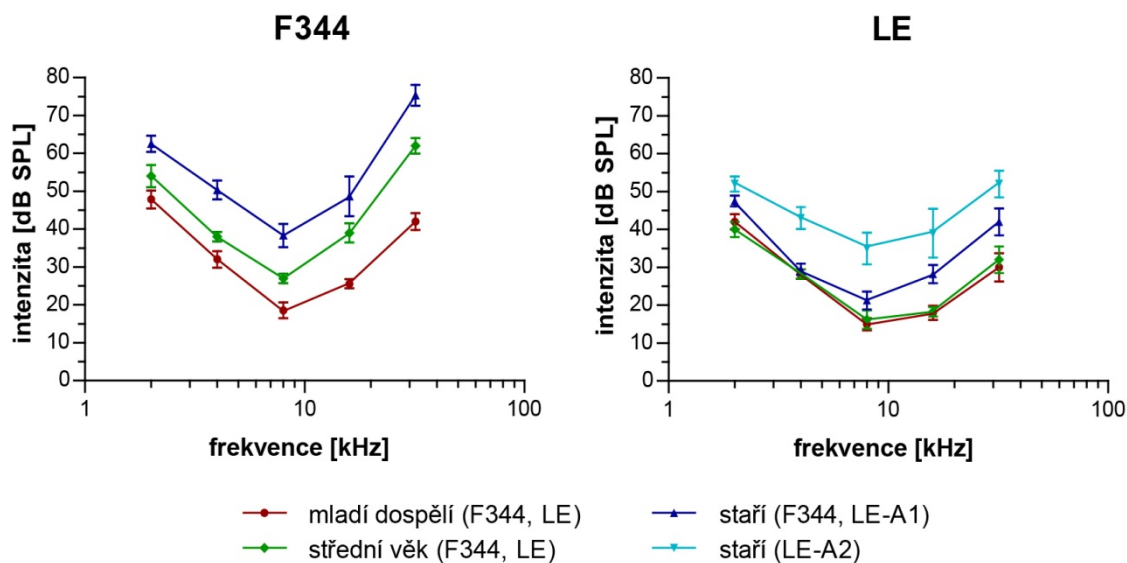
Prakticky žádné CR-ir buňky nebyly pozorovatelné na řezech CGM u starých či mladých zvířat obou kmenů. V některých případech bylo vidět několik CR-ir buněk ve vnějších povrchových vrstvách dorzálního CGM a to u všech zvířat bez ohledu na věk a kmen. Nicméně přesná hranice vzhledem k sousedním jádrům nebyla v těchto případech jasná.

### **4.3. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět způsobené stárnutím u potkanů dvou kmenů**

#### **4.3.1. Sluchové prahy stanovené pomocí ABR**

Odhad citlivosti sluchu je založen na záznamu ABR, který byl měřen u každého experimentálního zvířete. Na obr. 23 jsou znázorněny průměrné hodnoty ABR vyhodnocené pro oba kmeny potkanů v jednotlivých věkových skupinách. Při porovnávání hodnot sluchových prahů mezi oběma kmeny potkanů jsme zjistili, že prahové hodnoty ABR stanovené u mladých dospělých potkanů kmene F344 měly tendenci k mírnému zvýšení ve srovnání s hodnotami u mladých dospělých potkanů kmene LE (viz tabulka 1, test ABR-Y); rozdíly byly statisticky významné jen při 32 kHz ( $p < 0,01$ ). Potkani ve středním věku měli v celém frekvenčním rozsahu signifikantně vyšší prahové hodnoty ABR u kmene F344 než potkani kmene LE (viz tabulka 1, test ABR-M). Porovnání hodnot sluchových prahů ve skupině starých potkanů ukázalo podobné poškození u obou kmenů (skupiny zvířat: starých F344, LE-A1 a LE-A2), signifikantně vyšší prahové hodnoty ABR u potkanů kmene F344 byly přítomny pouze na frekvenci 32 kHz (viz tabulka 1, test ABR-A).

Výsledky porovnání prahů při stárnutí u každého kmene ukazují, že na frekvenci 16–32 kHz byly u F344 potkanů sluchové prahy výrazně zvýšeny již ve středním věku. K dalšímu zhoršení sluchových prahů, a to v celém rozsahu frekvencí, došlo během druhého roku života (viz tabulka 1, test ABR-F344). Na rozdíl od kmene F344 byly sluchové prahy u středního věku LE potkanů podobné prahům mladým dospělým potkanům LE (viz tabulka 1, test ABR-LE). Zatímco v porovnání s mladými zvířaty jsme zjistili u nejstarších LE potkanů (skupina starých LE-A2, 29 až 34 měsíců) významné zvýšení sluchových prahů, u starých potkanů LE ve věku 24–26 měsíců (skupina starých potkanů LE-A1, viz kapitola 3.4.1.) byl nárůst mírný, leč nesignifikantní.



Obr. 23: Průměrné hodnoty sluchových prahů ABR u mladých dospělých, ve středním věku a starých potkanů kmene Fischer 344 a Long Evans. Staří potkani kmene LE byli rozděleni do dvou podskupin: LE-A1 (24–26 měsíců) a LE-A2 (29–34 měsíců). Chybové úsečky představují S.E.M.

#### 4.3.2. Úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě

Výsledky pokusů ukázaly, že se úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět mezi F344 a LE potkany liší. U každého kmene byly navíc pozorovány věkem podmíněné změny v amplitudě ASR. Při porovnání sluchových prahů ASR stejných věkových skupin obou kmenů potkanů jsme zjistili podobné průměrné hodnoty u všech srovnávaných dvojic – mladých dospělých (viz tabulka 1, test ASRt-Y), středního věku (viz tabulka 1, test ASRt-M) a u starých zvířat (skupiny starých potkanů F344, LE-A1 a LE-A2, viz tabulka 1, test ASRt-A). Hodnoty sluchových prahů ASR se u obou kmenů pohybovaly mezi 75 a 90 dB SPL u tónů s frekvencí 4–16 kHz (u vysokofrekvenčních tónů s posunem prahu nahoru) a 70–75 dB SPL u bílého šumu. Staří potkani obou kmenů vykazovali trend vyšších prahových hodnot ASR zejména na vyšších frekvencích. Tyto rozdíly ve srovnání s mladými potkany F344 nebyly statisticky významné (viz tabulka 1, test ASRt-F344). Naproti tomu u potkanů LE došlo k výraznému zvýšení hodnot

sluchových prahů ASR u nejstarších zvířat (ve srovnání s mladými) na frekvenci 8 a 16 kHz (viz tabulka 1, test ASRt-LE).

Na obrázku 24 jsou znázorněny závislosti průměrné amplitudy ASR na intenzitě zvukového podnětu u mladých dospělých, středního věku a starých potkanů kmene F344 a kmene LE získané měřením úlekové reakce na neočekávaný podnět – bílý šum a tóny o různých frekvencích (4, 8, 16 kHz). Vzhledem k monotónnímu průběhu funkce závislosti amplitudy ASR na intenzitě zvuku a podobným změnám ASR při různých intenzitách bylo statistické vyhodnocení úlekové reakce provedeno pouze na jedné intenzitě stimulu, a to 120 dB SPL, který obvykle vyvolal maximální amplitudu ASR (obr. 25).

Porovnáním obou kmenů potkanů jsme zjistili, že u potkanů F344 byly amplitudy odpovědi ASR celkově nižší (obr. 24, 25). Rozdíl se projevil výrazněji u bílého šumu a u tónů nízkých frekvencí, zejména u mladých dospělých potkanů a u potkanů středního věku. V obou věkových skupinách měla zvířata kmene F344 oproti stejně starým LE potkanům amplitudy reakcí na bílý šum nebo 4 kHz tóny přibližně dvojnásobně menší. Statistická analýza odhalila u mladých dospělých významný rozdíl mezi kmeny pouze u odpovědi na bílý šum a na tóny při 4 kHz (viz tabulka 1, test ASRa-Y), naproti tomu u potkanů ve středním věku byly u kmene F344 signifikantně nižší ASR amplitudy nejen na bílý šum a tóny 4 kHz, ale i tóny 8 kHz (viz tabulka 1, test ASRa-M). U starých potkanů byly amplitudy ASR u obou kmenů (skupiny zvířat F344, LE-A1 a LE-A2) podobné bez ohledu na stimul (viz obr. 24, 25) (viz tabulka 1, test ASRa-A).

Vyhodnocení efektu stárnutí ukázalo, že u potkanů obou kmenů došlo u odpovědi na úlekový stimul k poklesu. Snížení amplitud ASR se však projevilo dříve u potkanů F344 než u kmene LE (obr. 25). U tónových podnětů, a to u všech frekvencí, byl stárnutím způsobený pokles amplitudy ASR u potkanů F344 patrný již ve věku 12–14 měsíců; rozdíl mezi potkany středního věku a mladými dospělými dosáhl statistické významnosti (viz tabulka 1, test ASRa-F). Důležité je, že u tónových podnětů nebyl u kmene F344 zaznamenán rozdíl mezi zvířaty středního věku a starými potkany. Naproti tomu reakce na bílý šum nebyly u F344 rozdílné mezi potkany mladými a středního věku, avšak byly významně nižší u starých zvířat v porovnání se středním věkem. U potkanů kmene LE se ukázalo, že se zvířata středního věku od mladých dospělých potkanů v ASR amplitudách neliší. Avšak staří potkani obou podskupin již v porovnání se zvířaty středního věku reagovali méně. To platilo pro všechny stimuly kromě tónů

o frekvenci 16 kHz (viz tabulka 1, test ASRa-L). Stručně řečeno u potkanů středního věku kmene F344 byla zaznamenána podobná tendence odpovědi jako u starších zvířat, zatímco u potkanů kmene LE ve středním věku měla zvířata podobné odpovědi jako mladá dospělá zvířata.

	Nezávislá proměnná			Proměnná s opakováním (frekvence)		
	Označení faktoru	Stupně volnosti	Hodnota F	Stupně volnosti	Hodnota F	
ABR-Y	kmen	1	11,22 **	4	85,69 ***	
ABR-M	kmen	1	130,10 ***	4	69,11 ***	
ABR-A	kmen	2	18,61 ***	4	52,91 ***	
ABR-F	věk	2	58,96 ***	4	109,50 ***	
ABR-L	věk	3	14,80 ***	4	87,28 ***	
ASRt-Y	kmen	1	4,29 ns	3	38,17 ***	
ASRt-M	kmen	1	3,62 ns	3	23,71 ***	
ASRt-A	kmen	2	1,99 ns	3	21,01 ***	
ASRt-F	věk	2	2,73 ns	3	37,56 ***	
ASRt-L	věk	3	5,80 **	3	37,98 ***	
ASRa-Y	kmen	1	22,77 ***	3	26,19 ***	
ASRa-M	kmen	1	55,42 ***	3	20,18 ***	
ASRa-A	kmen	2	7,28 **	3	29,07 ***	
ASRa-F	věk	2	38,66 ***	3	31,70 ***	
ASRa-L	věk	3	38,82 ***	3	17,64 ***	
PPI-Y	kmen	1	41,56 ***	2	1,87 Ns	
PPI-M	kmen	1	10,65 *	2	0,61 Ns	
PPI-A	kmen	2	3,13 ns	2	0,14 Ns	
PPI-F	věk	2	5,18 *	2	3,01 Ns	
PPI-L	věk	3	38,27 ***	2	3,63 *	

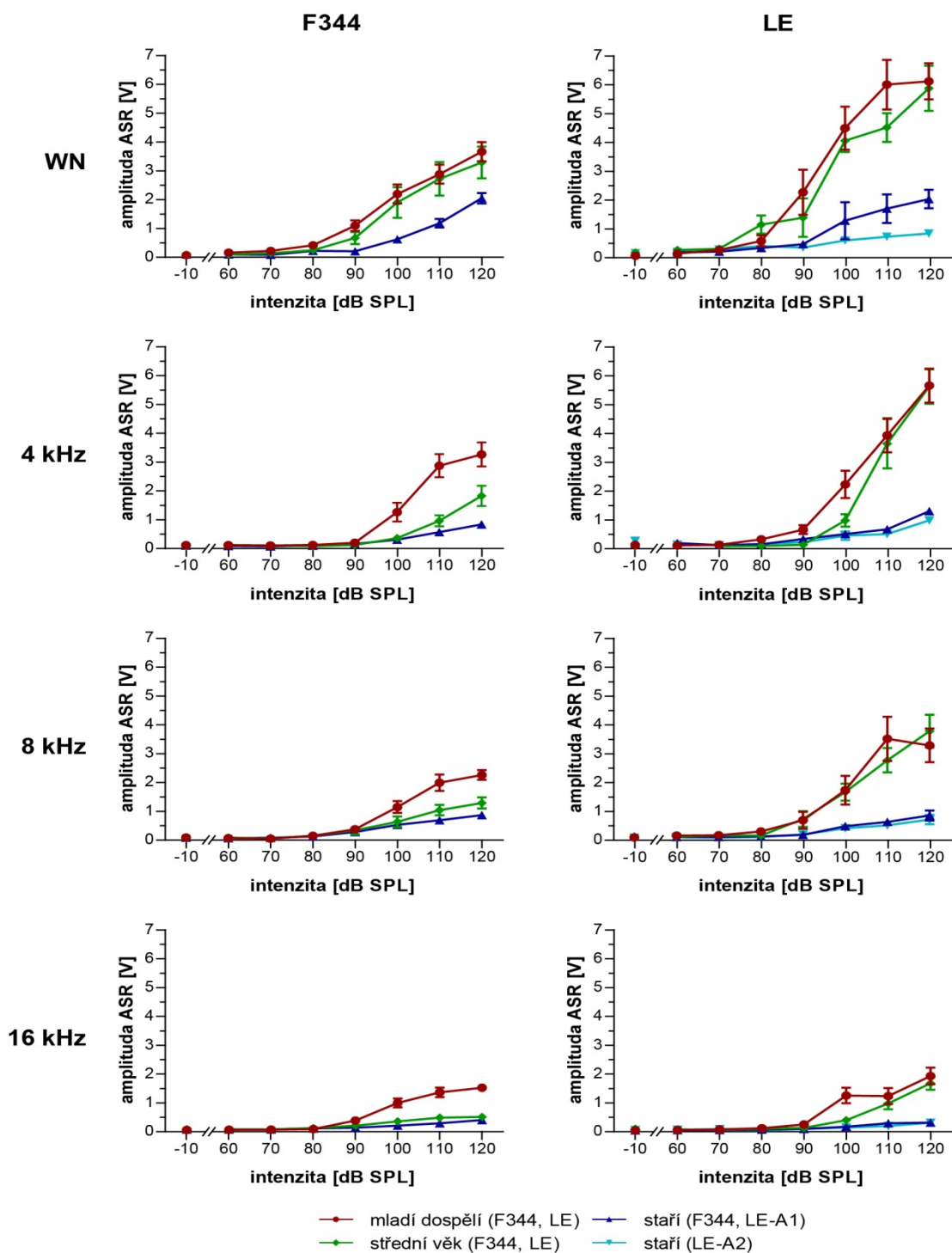
Tab. 1: Výsledky a hodnoty statistiky dvoufaktorové ANOVY s opakováním pro měření ABR (nahore), ASR (uprostřed) a PPI (dole).

ASRt – prahy ASR, ASRa – amplituda ASR, L – Long Evans, F – Fischer 344;

Y – mladí dospělí, M – střední věk, A – starší

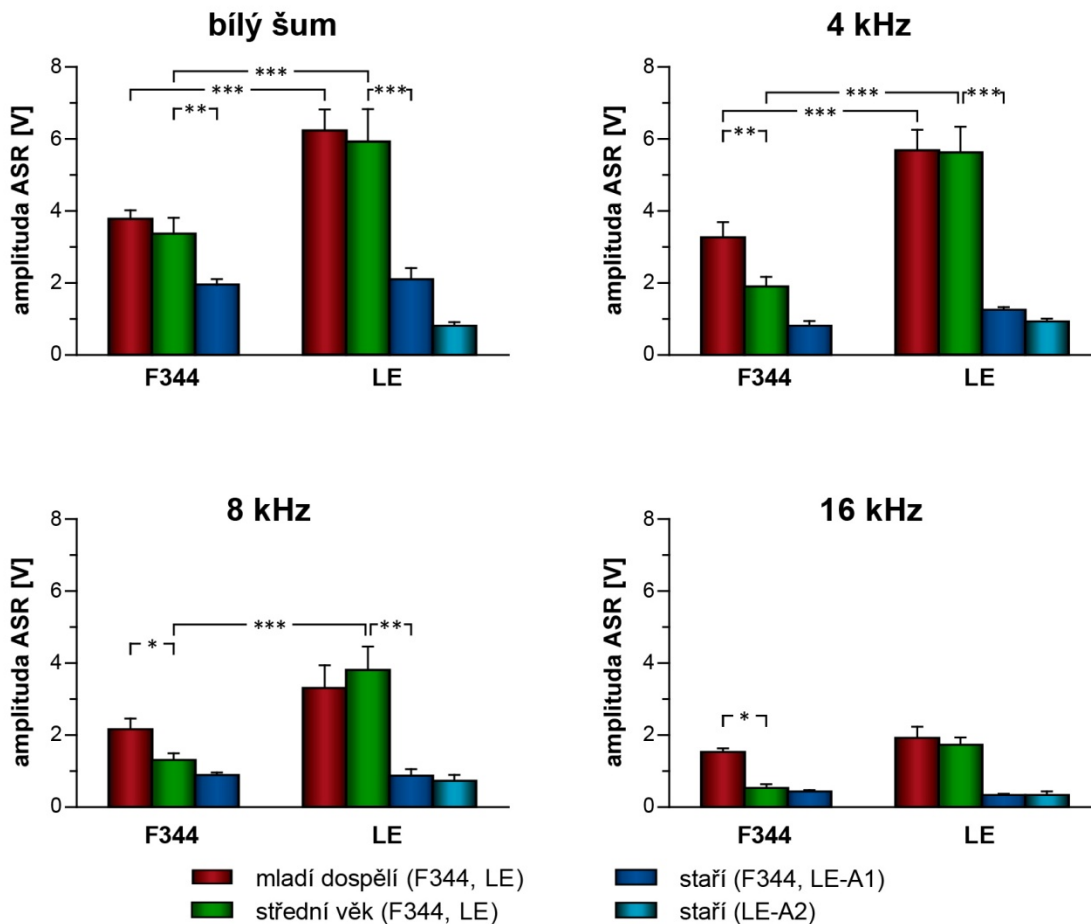
U obou kmenů potkanů síla odpovědi ASR značně závisela na spektrálním obsahu stimulu (viz například obr. 24). Obecně platí, že WN (bílý šum) a nízkofrekvenční tóny vyvolaly výrazně vyšší amplitudy ASR než vysokofrekvenční tóny. Odpovědi ASR na tónové podněty vykazovaly podobné rysy u obou kmenů potkanů: při tónech o frekvenci 4 kHz a 8 kHz byly významně odlišné pouze u mladých dospělých zvířat, na 4 kHz a 16 kHz byly významně odlišné ve skupinách mladých dospělých a středního věku, u tónů frekvence 8 kHz a 16 kHz nebyly významně odlišné v žádné věkové skupině. Reakce ASR na bílý šum se však u obou kmenů již lišily. U potkanů kmene LE nezpůsobil bílý šum významně rozdílný efekt v porovnání s tóny na frekvenci 4 kHz ve všech věkových skupinách. Vyvolal však vyšší amplitudy ASR v porovnání s tóny o 8 kHz u mladých dospělých a v porovnání s tóny na frekvenci 16 kHz u mladých dospělých a ve středním věku (viz tabulka 1, test ASRa-L). Nicméně potkani kmene F344 vykazovali amplitudy odpovědi na bílý šum větší v porovnání se všemi tónovými podněty u všech věkových skupin, s výjimkou pro tóny na frekvenci 4 kHz u skupiny mladých dospělých zvířat (viz tabulka 1, test ASRa-F).

Vzhledem k tomu, že průměrné hodnoty sluchových prahů ABR se v průběhu stárnutí zvýšily a průměrné amplitudy ASR se se stárnutím snížily, rozhodli jsme se tyto dva parametry korelovat. V každé věkové skupině u každého kmene potkana bylo použito ke kvantifikaci závislosti amplitudy ASR na ztrátě sluchu proložení lineární regresí. Jelikož v žádném případě lineární proložení nemělo směrnici statisticky významně odlišnou od nuly, můžeme dojít k závěru, že neexistuje významná závislost ASR amplitudy na ztrátě sluchu. Jinými slovy zvýšená hodnota prahu ABR neznamena obecně nižší ASR amplitudu.



Obr. 24: Závislosti amplitudy ASR na intenzitě zvukového podnětu (bílý šum (WN) a tónové stimuly o frekvenci 4, 8 a 16 kHz) u mladých dospělých, ve středním věku a starých potkanů kmene F344 a LE. Staří potkani kmene LE byli rozděleni do dvou podskupin: LE-A1 (24–26 měsíců) a LE-A2 (29–34 měsíců). Chybové úsečky představují S.E.M.





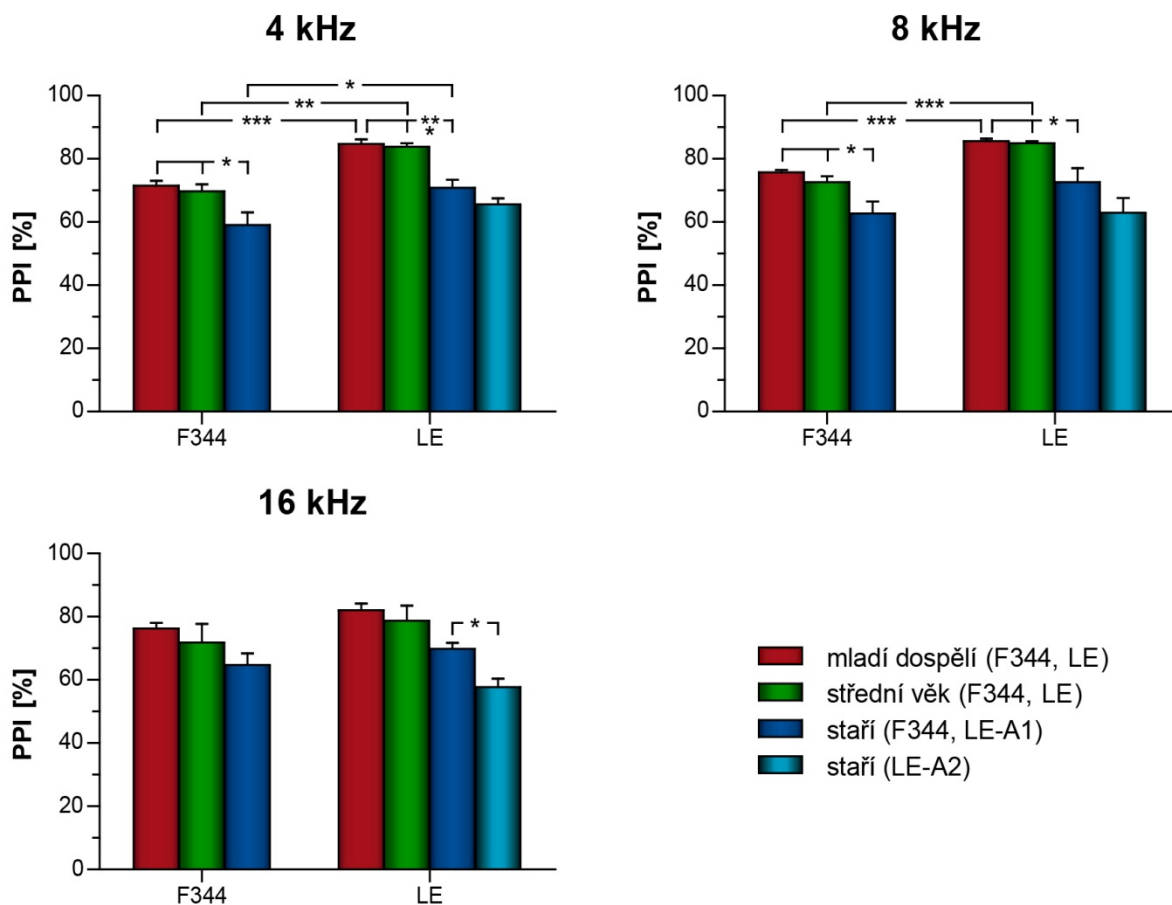
Obr. 25: Průměrná velikost amplitudy ASR, vyjádřená ve voltech, stanovená u bílého šumu a na frekvencích 4, 8 a 16 kHz při intenzitě zvukového podnětu 120 dB SPL u mladých dospělých, ve středním věku a starých potkanů kmene F344 a LE. Staří potkani kmene LE byli rozděleni do dvou podskupin: LE-A1 (24–26 měsíců) a LE-A2 (29–34 měsíců). Chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$ ).

#### 4.3.3. Prepulzní inhibice úlekové reakce na neočekávaný zvukový stimul

Výsledky ukázaly, že prepulzní inhibice tónem 75 dB SPL byla obecně méně účinná u potkanů F344 ve srovnání s potkany LE (viz obr. 26). Závisela jak na věku potkana, tak na frekvenci zvukového podnětu. U mladých dospělých potkanů bylo zjištěno významně menší potlačení ASR u potkanů F344 ve srovnání s potkany LE na všech testovaných frekvencích (viz tabulka 1, test PPI-Y). Ve středním věku se oba kmeny lišily pouze při frekvenci tónu 4 kHz

(viz tabulka 1, test PPI-M), zatímco srovnání starých zvířat neprokázalo rozdíl v žádném případě (skupiny starých zvířat F344, LE-A1 a LE-A2, viz tabulka 1, test PPI-A).

Podobně jako u ASR bylo i zde pozorováno snížení účinnosti PPI při stárnutí u obou kmenů (viz obr. 26). U F344 potkanů byla významná změna v PPI spojená se stárnutím pozorována pouze při porovnání mladých dospělých a starých zvířat (viz tabulka 1, test PPI-F). Stejně tak se u LE potkanů snížila PPI pouze v nejvyšším sledovaném věku (29–34 měsíců) a to u frekvence tónu 16 kHz (viz tabulka 1, test PPI-L).



Obr. 26: Hodnoty PPI u zvukových podnětů (tónové stimuly o frekvenci 4, 8 a 16 kHz) u mladých dospělých, ve středním věku a starých potkanů kmene F344 a LE. Staří potkani kmene LE byli rozděleni do dvou podskupin: LE-A1 (24–26 měsíců) a LE-A2 (29–34 měsíců).

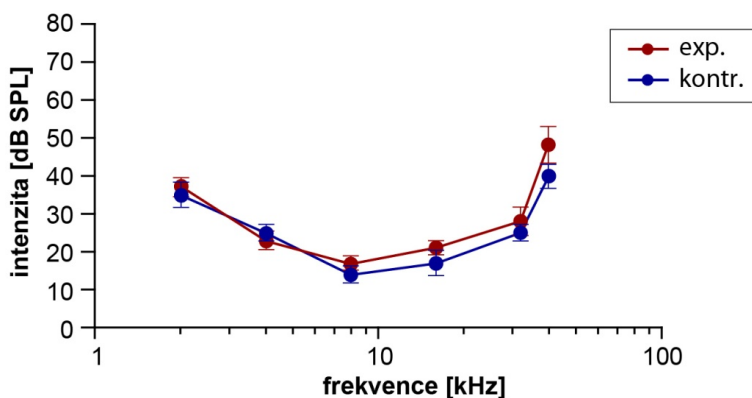
$PPI = [1 - (\text{amplituda ASR inhibovaná prepulzním tónem}) / (\text{amplituda ASR bez PPI})] \times 100 \%$ . Stoprocentní PPI tedy odpovídá úplnému potlačení ASR a vyšší hodnoty znamenají silnější PPI.

Chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$ ).

#### 4.4. Změny behaviorální reakce na zvukový podnět u dospělých potkanů vystavených v mládí krátké hlukové expozici

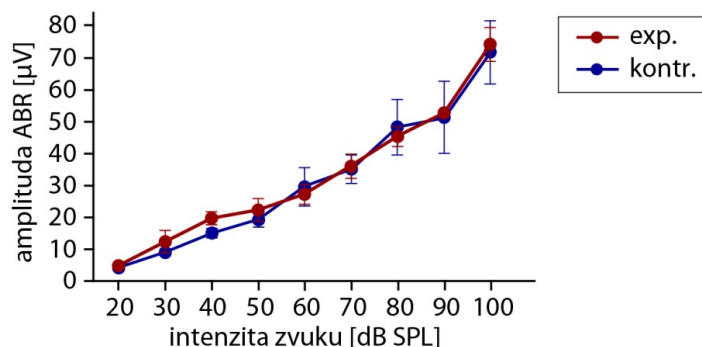
##### 4.4.1. Sluchové prahy a závislost amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu

Sluchové prahy byly měřeny 40. postnatální den u obou skupin experimentálních zvířat. Naměřené prahové hodnoty sluchu v rozmezí od 2 do 40 kHz u dospělých v mládí exponovaných (8 min, 125 dB SPL, 14. den) a kontrolních potkanů se statisticky významně nelišily (viz obr. 27).



Obr. 27: Audiogramy průměrných odpovědí ABR měřených u exponovaných ( $n=7$ ) a kontrolních ( $n=7$ ) zvířat. Obě křivky se téměř překrývají, sluchové prahy obou skupin potkanů se významně neliší. Chybové úsečky představují S.E.M.

Dále jsme při registraci ABR využili možnost zhodnotit funkci rozlišování intenzit zvuku také na úrovni periferního sluchového systému. Stanovili jsme tak průměrnou funkci závislosti amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu (amplitude-intensity function, AIF) u kontrolních a exponovaných zvířat. Protože posun sluchového prahu byl u exponovaných potkanů nejvýraznější na frekvenci 8 a 16 kHz, hodnotili jsme AIF na frekvenci 8 kHz. Přibližně tři týdny po hlukové expozici, kdy byly sluchové prahy exponovaných zvířat srovnatelné s prahy ABR kontrolních potkanů, porovnali jsme průměrné AIF mezi oběma experimentálními skupinami (obr. 28). Průběh funkce AIF mezi exponovanou a kontrolní skupinou zvířat se téměř nelišil ( $P>0,1$  na všech intenzitách zvukového podnětu). Tento výsledek podpořil náš předpoklad neporušené reprezentace intenzity zvuku na periferní úrovni sluchového systému.

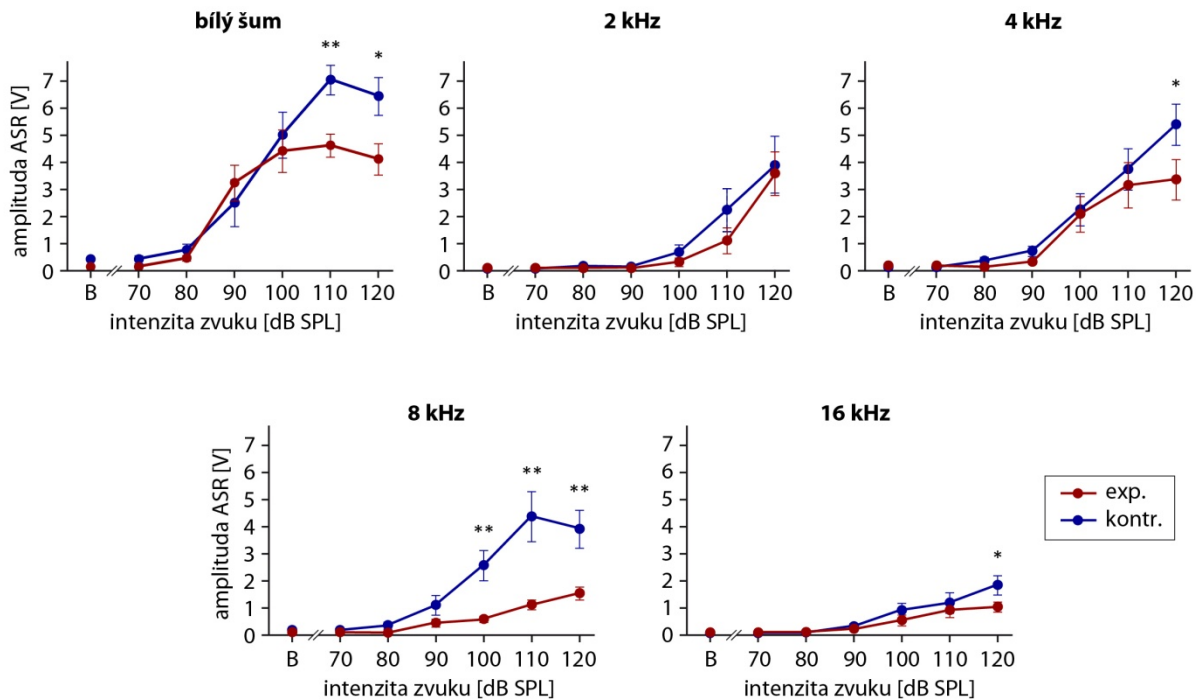


Obr. 28: Velikost amplitudy ABR v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (amplitude-intensity function, AIF). Průměrné funkce AIF na frekvenci 8 kHz registrované tři týdny po hlukové expozici u exponované (červená křivka) a kontrolní skupiny zvířat (modrá křivka); chybové úsečky představují S.E.M.

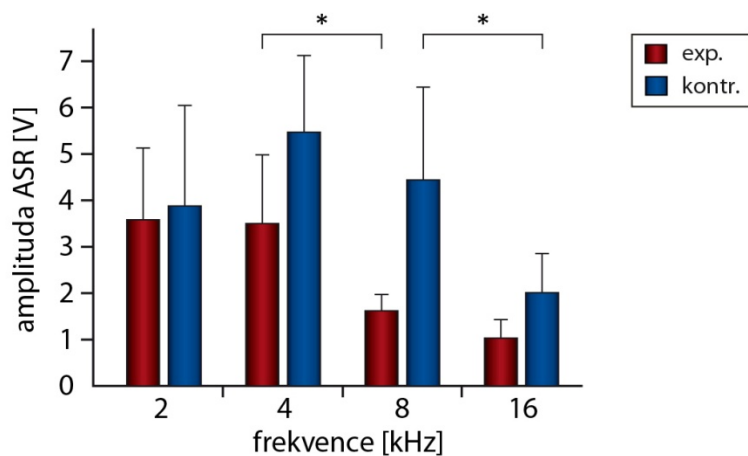
#### 4.4.2. Úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě

U dospělých potkanů obou experimentálních skupin jsme testovali vnímání zvuku prostřednictvím úlekové reakce na zvukový podnět (acoustic startle reflex, ASR). Průměrné amplitudy ASR vyvolané tónovými podněty o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz a bílým šumem ve skupině exponovaných a kontrolních zvířat jsou znázorněny na obr. 29. Prahy ASR u exponovaných a kontrolních potkanů nebyly výrazně odlišné: přibližně 100 dB SPL pro frekvenci 2 kHz, 80–90 dB SPL pro 4–16 kHz a 70 dB SPL pro bílý šum. Velikost amplitud ASR v okolí prahových hodnot byla u obou experimentálních skupin podobná. Naproti tomu amplitudy ASR vyvolané na vysokých intenzitách zvukových podnětů (110–120 dB SPL) byly u exponovaných potkanů statisticky významně nižší (s výjimkou amplitud ASR vyvolaných tónem o frekvenci 2 kHz, obr. 29).

V obou skupinách experimentálních zvířat byla zřetelná tendence poklesu amplitudy ASR v závislosti na vzrůstající frekvenci stimulu: vysokofrekvenční tóny vyvolaly výrazně menší amplitudu ASR v porovnání s tóny o nízké frekvenci (obr. 30). Zatímco u kontrolních potkanů došlo ke statisticky významnému poklesu amplitudy ASR na frekvenci 16 kHz ( $P < 0,05$ ), u exponovaných potkanů byla amplituda ASR významně redukována již na frekvenci 8 kHz ( $P < 0,05$ ) (obr. 30). Je třeba poznamenat, že ASR odpovědi na 16 kHz byly snadno zjištělné, neboť ASR amplitudy na prahové úrovni při reakci na podněty 16 kHz byly přibližně sedmkrát vyšší než průměrná amplituda referenční odpovědi. Tato hodnota odpovídá poměru signálu k šumu o více než 15 dB.



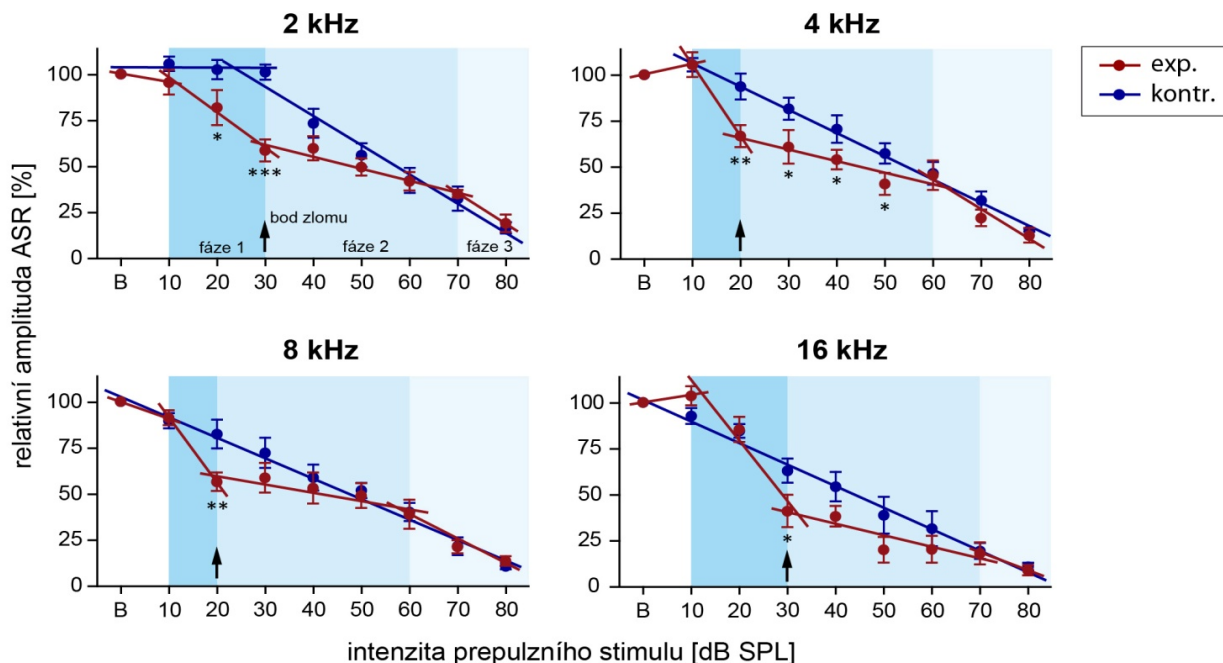
Obr. 29: Velikost amplitudy úlekové reakce na neočekávaný zvukový podnět v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (bílý šum a krátké tóny o frekvencích 2, 4, 8 a 16 kHz); „B“ – bez stimulace; chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ).



Obr. 30: Průměrná velikost amplitudy ASR, vyjádřená ve voltech, stanovená na frekvencích 2, 4, 8 a 16 kHz při intenzitě zvukového podnětu 120 dB SPL u exponovaných (červené sloupečky) a kontrolních (modré sloupečky) zvířat; chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ ).

#### 4.4.3. *Prepulzní inhibice úlekové reakce na neočekávaný zvukový stimul*

Účinek prepulzní inhibice (PPI) na velikost úlekové reakce (ASR) byl testován pomocí různých intenzit prepulzních tónů o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz. Obr. 31 znázorňuje průměrné relativní amplitudy ASR v závislosti na intenzitě prepulzního stimulu (funkce PPI). Amplituda ASR, která není inhibovaná prepulzním stimulem, odpovídá hodnotě 100 % (hodnota označená jako „B“ na ose x). Funkce PPI u exponovaných a kontrolních potkanů mají zřetelně odlišný průběh. Zatímco u kontrolních potkanů byl průběh funkce PPI charakterizován rovnoměrným poklesem, kterému v případě prepulzního stimulu 2 kHz předcházelo počáteční plateau (důsledek nedostatečného účinku prepulzní inhibice ASR na nízkých frekvencích zvukového podnětu). Naproti tomu u exponovaných potkanů se průběh funkce PPI vyznačoval strmým poklesem amplitudy ASR (tzn. výrazný efekt prepulzní inhibice) na nižších intenzitách prepulzního stimulu (20–30 dB SPL) následovaný fází pomalého poklesu amplitudy ASR (intenzita prepulzního stimulu od 20–30 dB SPL do 60–70 dB SPL), kdy úbytek intenzity prepulzního stimulu vedl pouze k nepatrným rozdílům ve velikosti amplitudy ASR. Statisticky významné rozdíly v průměrných hodnotách amplitud ASR mezi experimentálními skupinami byly detekovány na následujících úrovních intenzit prepulzní inhibice: 20 a 30 dB na 2 a 4 kHz, 20 dB na 8 kHz a 30 dB na 16 kHz.



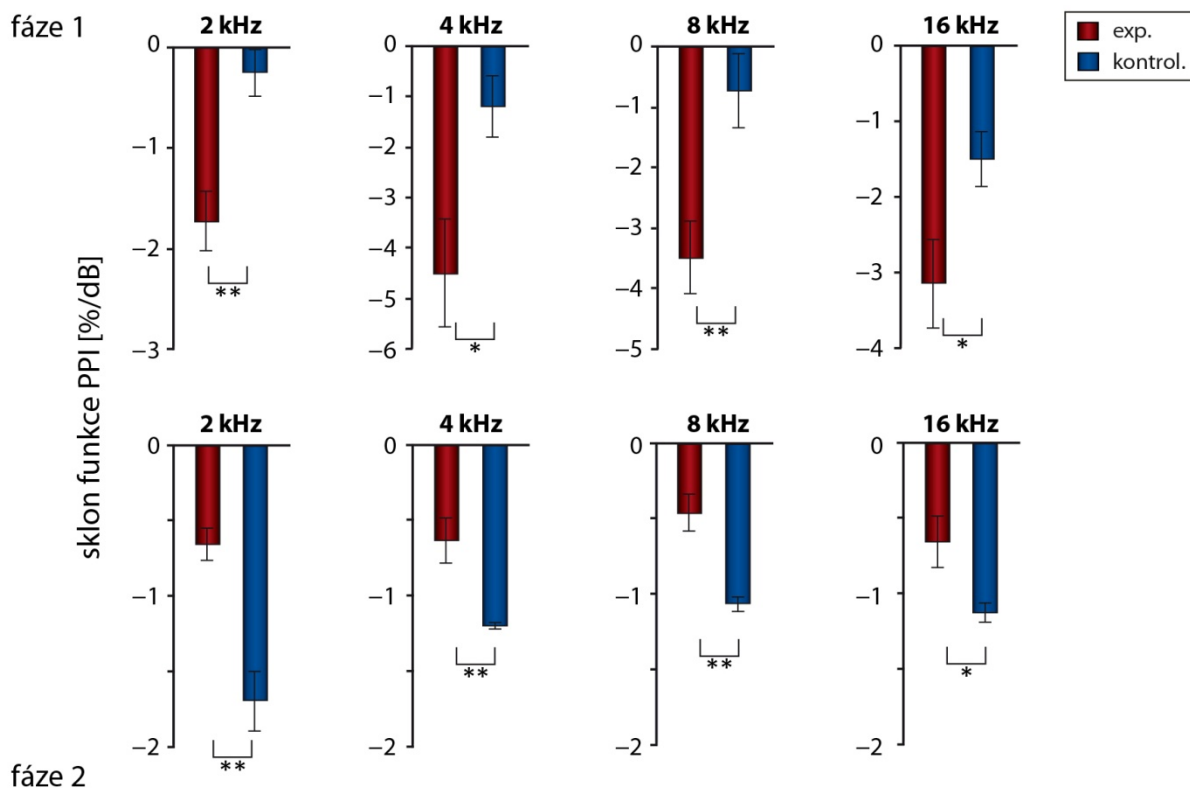
Obr. 31: Účinnost prepulzní inhibice: závislost průměrné relativní amplitudy ASR na intenzitě prepulzního stimulu (funkce PPI); 100 % odpovídá velikosti neinhibované amplitudy ASR (ASR bez prepulzního stimulu označená „B“ na ose x). Křivka lineární regrese pro skupinu kontrolních potkanů je znázorněna modrou čarou, pro skupinu kontrolních potkanů červenou čarou; první až třetí fáze průběhu funkce PPI jsou vymezeny odstíny modré barvy; chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$ ).

S ohledem na tvar funkce PPI u exponovaných potkanů jsme průběh rozdělili do tří intervalů (obr. 32 a 33). První fáze byla daná nejnižší intenzitou prepulzního stimulu, při které se velikost amplitudy ASR skoro nelišila od neinhibované, tedy 100% velikosti amplitudy ASR, a intenzitou tzv. bodu zlomu. Bod zlomu byl stanoven na úrovni prepulzní intenzity stimulu, kdy byla amplituda ASR statisticky významně menší než amplituda ASR vyvolaná o 10 dB nižší intenzitou prepulzního stimulu a zároveň byla statisticky významně větší než amplituda vyvolaná o 10 dB vyšší intenzitou prepulzního stimulu. Funkce PPI v první fázi byla charakterizovaná strmým poklesem amplitudy ASR. Druhá fáze začínala intenzitou bodu zlomu a pokračovala v rozmezí následujících 40 dB intenzit prepulzního stimulu. Průběh funkce PPI ve druhé fázi byl definován pomalým poklesem amplitudy ASR, kdy přírůstek 10 dB prepulzní intenzity ve většině případů nezpůsobil statisticky významný vzestup účinnosti PPI. Naproti tomu třetí fáze měla doznívající charakter a průběh funkce PPI se v této části mezi exponovanými a kontrolními zvířaty nijak nelišil.

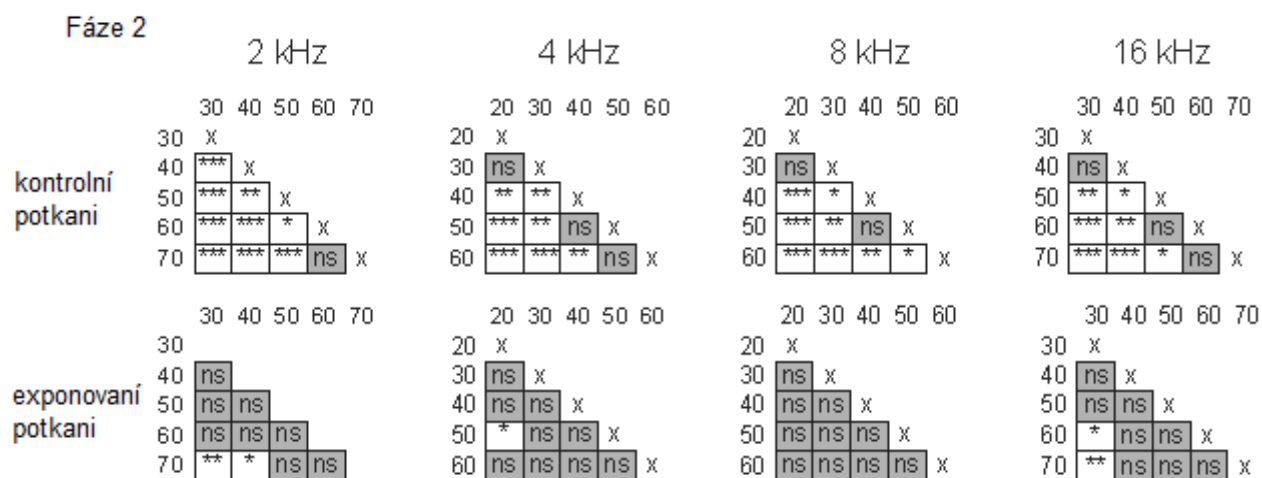
Pomocí kvantitativní analýzy jsme porovnali tvar funkce PPI u kontrolních a exponovaných zvířat v průběhu první a druhé fáze, kde byly funkce zřetelně odlišné. V obou fázích jsme zjistili rozdílný sklon funkcí PPI, a to u všech testovaných frekvencí PPI stimulů. Zatímco v porovnání s kontrolními potkany byl v první fázi průběhu sklon funkce PPI u exponovaných potkanů statisticky významně větší (obr. 32, horní panel), ve druhé fázi měla funkce PPI statisticky významně menší sklon u exponovaných zvířat ve srovnání s kontrolními zvířaty (obr. 32, spodní panel).

Na obrázku 33 je shrnuta statistická významnost rozdílů v účinnosti různých intenzit PPI stimulů na změnu amplitudy ASR v průběhu druhé fáze PPI u exponovaných a kontrolních zvířat. Z výsledků je patrné, že vzestup prepulzní intenzity o 10 nebo 20 dB nevedl u exponovaných zvířat ani v jednom případě ke statisticky významnému poklesu amplitudy ASR. Ani větší přírůstek intenzity prepulzního stimulu (>20 dB) často nezpůsobil žádnou výraznější změnu amplitudy ASR. Například rozdíl v účinnosti prepulzního stimulu (frekvence 8 kHz) na potlačení amplitudy ASR se mezi intenzitou prepulzního stimulu 20 a 60 dB SPL statisticky významně nelišil. Na rozdíl od kontrolní skupiny, kde byl nárůst intenzity prepulzního stimulu o 10 dB obvykle doprovázen statisticky významným poklesem amplitudy ASR a v případě nárůstu intenzity prepulzního stimulu o 20 dB byl statisticky významný pokles amplitudy přítomen pokaždé.





Obr. 32: Sklon funkce PPI. Horní panel znázorňuje sklon funkce PPI v první fázi průběhu, spodní panel ve druhé fázi průběhu; červené sloupečky - exponovaní potkani; modré sloupečky - kontrolní potkani. Rozdíly byly měřeny použitím nepárového t-testu v průběhu první fáze a regresní analýzy ve druhé fázi; chybové úsečky představují S.E.M.; (\* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ ).



Obr. 33: Analýza rozdílů v účinnosti různých intenzit prepulzních stimulů na změnu amplitudy ASR v průběhu druhé fáze PPI u exponovaných a kontrolních zvířat. Přírůstek intenzity 10 dB; frekvence prepulzních stimulů 2, 4, 8 a 16 kHz; ANOVA s Newman-Keuls post-hoc testem. (\* –  $P < 0,05$ , \*\* –  $P < 0,01$ , \*\*\* –  $P < 0,001$ , ns – nesignifikanční)

## 5. DISKUZE

### 5.1. *Změny v hladinách a v imunoreaktivitě proteinů GAD65 a 67 v CI, SK a ZK u starých potkanů dvou kmenů*

Naše výsledky prokázaly celkový pokles hladin proteinů GAD65 a GAD67 a významné změny v imunoreaktivitě GAD65 a GAD67 v *colliculus inferior* a ve sluchové kůře potkana během stárnutí. Snížil se počet GAD65 a 67-ir těl neuronů a poklesla jejich optická denzita. Získaná data vykazují víceméně stejnorodý charakter změn. Za prvé, změny spojené se stárnutím mají podobný průběh u obou izoform GAD, za druhé výsledky získané metodou western blot jsou podpořeny imunohistochemickými metodami. Za třetí jak v SK, tak v CI probíhaly změny obdobně. Souhrnně lze říci, že ve stáří exprese a zastoupení GAD u potkana klesá na podkorové i korové úrovni v podobné míře a tyto změny srovnatelně zasahují GAD65 i GAD67.

Předchozí práce rovněž popsaly úbytek v hladině GABA a GAD u CI a SK během stárnutí. Nižší počet GABA-ir buněk, pokles enzymatické aktivity GAD a v intenzitě uvolňování GABA ze synaptických zakončení byl u starých potkanů pozorován v centrálním jádře CI (Caspary et al., 1995; Caspary et al., 1990; Gutiérrez et al., 1994; Raza et al., 1994). Avšak námi pozorované snížení optické denzity GAD-ir neuronů v CI doposud v literatuře popsáno nebylo, ani jako snížení optické denzity GABA imunoreaktivity. Naproti tomu v případě sluchové kůry byl podobný pokles jako v našem případě zaznamenán u starých Fischer 344/Brown Norway F1 hybridů (Ling et al., 2005). Tito autoři navíc podpořili sníženou optickou denzitu GAD67-ir neuronů objevem poklesu hladiny mRNA pro GAD65 a 67. Pokles optické denzity těl neuronů může odrážet buď sníženou expresi daného proteinu nebo sníženou hustotu proteinu v buňce v důsledku zvětšení buněčného těla (Krzywkowski et al., 1995). Vzhledem k tomu, že jsme v našem experimentu neobjevili žádné změny v průměrném objemu somat GAD-ir neuronů, výsledky se kloní k alternativě snížené exprese. To je též v souladu s naším průkazem celkově snížených hladin GAD proteinů pomocí western blotu.

Námi pozorovaný pokles v počtu GAD-ir (GAD65 a GAD67) neuronů v CI a SK odpovídá nedávnému nálezu sníženému počtu PV-ir buněk v primární SK u Brown Norway/Fischer potkanů (de Villers-Sidani et al., 2010). Pokles nemůžeme jednoduše vysvětlit neselektivním, celkovým úbytkem neuronů. Předchozí práce z naší laboratoře stanovující počet

buněk v CI v řezech barvených podle Nissla u mladých a starých zvířat významný rozdíl v počtu neuronů nenašla (Ouda et al., 2008). To je v souladu s výsledky jiných autorů, kteří v průběhu stárnutí nezaznamenali signifikantní změny v počtu neuronů jak v *colliculus inferior*, tak ani v hipokampu a kůře (Helfert et al., 1999; Merrill et al., 2001; Poe et al., 2001; Stanley & Shetty, 2004). Sníženou optickou denzitu GAD-ir neuronů ve stáří můžeme spíše vysvětlit tak, že hlavní příčinou je pokles exprese obou sledovaných GAD izoform natolik, že v některých buňkách už klesla pod rozlišovací práh použité imunohistochemické metody. Ostatně i v práci popisující úbytek PV-ir neuronů (de Villers-Sidani et al., 2010) autoři uvádějí, že se během stárnutí v rámci PV-ir neuronů významně zvyšuje podíl slabě obarvených buněk.

Změny imunoreaktivity GAD65 a 67 popisované v mozkové kůře byly rovnoměrné ve všech korových vrstvách, což je také v souladu s výsledky předchozích autorů (Ling et al., 2005).

Pozoruhodným nálezem z našeho experimentu je zarážející rozdíl v celkovém množství GAD mezi *colliculus inferior* a sluchovou kůrou, který jsme detekovali metodou western blot. Přibližně trojnásobná hladina proteinů GAD65 a GAD67 v *colliculus inferior* ve srovnání se zrakovou a sluchovou kůrou je ale v souladu s předchozími výsledky jiných autorů (Sheikh et al., 1999). Tyto ukazují podobný poměr v hladinách GAD zjištěných western blotem mezi středním mozkem a thalamem na jedné straně a neokortexem na straně druhé. Imunohistochemická analýza nenašla mezi CI a kůrou žádné významné rozdíly. Tato metoda není dostatečně citlivá, aby mohla dobře posuzovat imunoreaktivitu dendritického větvení a hodnotit GAD-ir punkta, které by mohly obsahovat významný podíl celkového množství GAD. Funkční význam vyššího množství GAD v CI může být spojen s velmi významnou rolí inhibice v CI a velkým zastoupením GABA-ir zakončení, jak popisují mnohé studie (Frisina, 2001; Gerken, 1996; Merchán et al., 2005; Pollak et al., 2002).

Kromě zvířat kmene Long Evans byly vyhodnocovány i zvířata kmene Fischer 344. Oba kmény se liší v množství morfologických, fyziologických a behaviorálních parametrů. Například zvířata kmene Fischer 344 stejně jako ostatní inbrední kmény (Wistar, Sprague-Dawley, Dark-Agouti) vykazují zhoršenou kognici v různých testech prostorové paměti v porovnání s divokými potkany nebo kmenem Long Evans (Harker & Whishaw, 2002). U potkanů kmene Fischer 344 nalézáme v porovnání s kmenem Long Evans výraznější zhoršení sluchové funkce během stárnutí. To se projevuje výraznějším posunem sluchových prahů, zeslabením DPOAE a snížením efektivity převodu zvuku (Popelar et al., 2003; Popelar et al., 2006). Mimo to

u stárnoucích potkanů Fischer 344 bylo pozorováno zhoršení funkce *stria vascularis* a *ligamentum spirale* (Buckiova et al., 2007), stejně tak jako zhoršení zrakové funkce dané retinální degenerací (DiLoreto et al., 1994). V kontrastu pak stojí náš výsledek, že jsme jak u stárnoucích potkanů kmene Fischer 344, tak u kmene LE pozorovali v hladinách proteinů GAD65 a 67 podobné změny. Jelikož i jiná studie popisuje podobný efekt stárnutí na hladinu GAD, a to u hybridních potkanů Fischer 344/Brown Norway (Ling et al., 2005), můžeme z toho vyvodit závěr, že změny v hladině GAD způsobené stárnutím probíhají v CI a SK obdobně bez ohledu na kmen potkanů. Podobná situace byla nalezena u myší. Sluchová funkce u myšího kmene CBA se s věkem zhoršuje pomalu – stejně jako u potkanů Long Evans. Naproti tomu myší kmen C57bl/6J vykazuje známky hluchoty již v raném věku (Parham, 1997; Spongr et al., 1997). Třebaže za těmito rozdíly stojí z větší části patologie vnitřního ucha, byly u obou kmenů myší nalezeny během stárnutí změny inhibiční funkce v porovnatelné míře (Felix & Portfors, 2007; Walton et al., 1998; Walton et al., 2002). Na základě uvedené literatury tedy můžeme říct, že námi pozorované změny v expresi GAD v CI a SK nezávisí primárně na periferní deafferentaci, ale mají, alespoň částečně, centrální původ.

Naše výsledky se do určité míry liší od studie, která sledovala změny v imunoreaktivitě parvalbuminu v CI a SK u potkanů kmene LE a F344 (Ouda et al., 2008). Tato práce nezjistila významný pokles v imunoreaktivitě parvalbuminu u potkanů kmene LE, avšak u potkanů kmene F344 došlo k výraznému poklesu v počtu PV-ir buněk ve sluchové kůře, což bylo nedávno ukázáno i u hybridních potkanů Brown Norway/Fischer (de Villers-Sidani et al., 2010). Vzhledem k tomu, že buňky v CNS, které exprimují PV tvoří subpopulaci GABAergních neuronů (Freund & Buzsáki, 1996; Kosaka et al., 1987; Kubota et al., 1994), mohli bychom očekávat, že změny v hladině PV a GAD mají podobný charakter. Nicméně toto očekávání se nenaplnilo ani v jiných studiích, a tak byly při stárnutí zaznamenány rozdílné změny u imunoreaktivity PV a expresi GAD například v septu, hipokampu a senzomotorické kůře (Krzywkowski et al., 1995; Potier et al., 2006; Shi et al., 2006; Vela et al., 2003). Jisté vysvětlení by mohlo spočívat v nedávném překvapivém objevu, že ne všechny PV-ir neurony jsou zároveň GABAergní (Jinno & Kosaka, 2004).

Zraková kůra vykazala rovněž změnu v inhibičním systému během stárnutí. Úbytek GAD imunoreaktivity a hladin proteinů je v souladu s pracemi jiných autorů, např. (Hua et al., 2008), kteří našli snížený počet GABA-ir buněk ve zrakové kůře starých koček (a celkový počet

neuronů barvených podle Nissla byl přitom nezměněn). Snížená funkce GABAergního systému ve zrakové kůře byla nalezena u starých opic (Hua et al., 2008; Leventhal et al., 2003; Schmolesky et al., 2000). V naší práci jsme metodou western blot zjistili, že pokles GAD ve zrakové kůře je ve srovnání s SK a CI relativně menší, což může signalizovat odlišný průběh stárnutí GABAergního systému v různých částech mozku, konkrétně i v jednotlivých sensorických korových oblastech. Snížená funkce GABA systému během stárnutí byla prokázána také v hipokampu (Ling et al., 2005; Shetty & Turner, 1998; Shi et al., 2004; Stanley & Shetty, 2004), naproti tomu nebyla nalezena v septu, v sensorimotorické a parietální kůře (Krzywkowski et al., 1995; Ling et al., 2005; Poe et al., 2001; Shi et al., 2006). Je tedy jasné, že stárnutí nemusí být nutně doprovázeno stejným poklesem hladiny GABA (GAD) ve všech oblastech mozku, což je ostatně podpořeno např. nálezy pomocí magnetické rezonanční spektroskopie u člověka (Grachev et al., 2001).

Pokles inhibičního působení GABA v centrální části sluchové dráhy může mít několik funkčních důsledků. Snížení inhibice vede k rozšíření excitačních oblastí, úbytku úzce laděných receptivních polí, tedy neuronů s úzkými prahovými křivkami, a nárůstu počtu komplexních receptivních polí, jak bylo popsáno v elektrofyziologických studiích CI a SK (Palombi & Caspary, 1996a; Palombi & Caspary, 1996b; Palombi & Caspary, 1996c; Turner et al., 2005a; Turner et al., 2005b; Walton et al., 2002). Podle autorů by tyto změny mohly vést k propouštění většího množství šumu do celého centrálního sluchového systému, a to by mohlo v důsledku zhoršit mj. rozlišení časových parametrů komplexních zvuků včetně lidské řeči (Fitzgibbons & Gordon-Salant, 1994; Gordon-Salant et al., 2007; Gordon-Salant et al., 1994; Grose et al., 2006). Snížené časové rozlišování pak zvyšuje prahy pro detekci mezery v šumu (tj. mezera musí být delší, aby byla rozpoznána) a zhoršuje se rozlišování změn délky trvání těchto mezer v šumu (Snell, 1997; Suta et al., 2011).

Dohromady naše data s ohledem na citovanou literaturu vybízejí k závěru, že snížení úrovně GABA v průběhu stárnutí významně přispívá ke zhoršování sluchu pozorovanému u savců a u člověka nazývanému jako presbyakuze.

## **5.2. Změny v hladinách a v imunoreaktivitě proteinů CB a CR v CI, SK, ZK a CGM u starých potkanů dvou kmenů**

Vápník vážící proteiny CB a CR představují spolu s parvalbuminem hojně využívané markery různých neuronálních populací v CNS, obzvláště v inhibičních systémech, kde je neuropřenašečem GABA. K rozšíření poznatků o změnách v centrální části sluchového systému, ke kterým jsme v předchozím experimentu došli při vyhodnocování obsahu GAD během stárnutí, jsme v tomto experimentu hodnotili změny neuronálních populací obsahující CB a CR. I zde jsme porovnávali výsledky mezi kmenem Long Evans a kmenem Fischer 344.

Naše výsledky prokázaly výrazné snížení hladiny proteinů CB a CR, stejně tak snížení počtu i objemu CB-ir a CR-ir neuronů v průběhu stárnutí v horních etážích sluchové dráhy u potkanů kmene Long Evans a Fischer 344. Stejně jako v předchozím experimentu s hladinou GAD i zde naměřená data vykazují uniformní charakter těchto změn. Za prvé pozorované změny byly obdobné jak v podkorových, tak korových oblastech centrální sluchové dráhy, ale také i ve zrakové kůře. Za druhé stárnutím způsobené změny vykazovaly u obou sledovaných kmenů podobné výsledky. Za třetí data získaná metodou western blot byla v zásadě ve shodě s daty získanými imunohistochemickými metodami. A v neposlední řadě pokles v hladinách CB byl výraznější než u CR.

Náš nález snížené hladiny CB a sníženého počtu CB-ir neuronů v průběhu stárnutí v centrální části sluchové dráhy a ve ZK je v souladu s předchozími studii ukazujícími, že v průběhu stárnutí dochází k úbytku CB-ir v různých oblastech mozku. U křečků během stárnutí dochází ke snížené expresi mRNA pro kalbindin-D28k, zatímco exprese mRNA pro CR a PV zůstává nezměněna (Kishimoto et al., 1998). Další studie (Shetty & Turner, 1998) prokázala současný pokles CB-, PV- a CR-ir neuronů v hipokampu stárnoucích potkanů kmene F344. V perirhinální kůře potkanů kmene Sprague-Dawley byl zaznamenán v průběhu stárnutí výrazný pokles CB-ir neuronů, zatímco počet CR-ir a PV-ir neuronů zůstal nezměněn (Moyer et al., 2011). Průběh změn v hladině CB během stárnutí byl zkoumán rovněž v mozečku, v *bulbus olfactorius* a *nucleus basalis Meynerti* (Geula et al., 2003; Iacopino & Christakos, 1990; Kishimoto et al., 1998).

Zdá se, že během stárnutí jsou změny v expresi CR složitější a nejednoznačnější než v případě CB. V kochleárním jádře myši BALB/c se v průběhu stárnutí významně snížil počet

PV- a CR-ir neuronů, zatímco u CB-ir buněk k poklesu nedošlo (Idrizbegovic et al., 2006). U CI byla nalezena závislost změn na kmenu myši (hodnotily se myši CBA a C57bl/6J). Myši kmene CBA, které mají zachován sluch až do pozdního věku, měly dokonce zvýšenou hladinu CR-ir neuronů v CI, naproti tomu u obou kmenů došlo k poklesu počtu CB-ir neuronů (Zettel et al., 1997). Vzestup v počtu CR-ir neuronů v CI myši kmene CBA do určité míry kontrastuje s našimi výsledky týkajícími se poklesu počtu CR-ir neuronů v CI u kmene Long Evans. Důvod tohoto rozdílu není jasný. Nicméně může odrážet mezidruhové rozdíly stejně tak jako diskutovanou nejednoznačnost změn v expresi CR během stárnutí.

Potkani kmene LE a F344, které jsme v našich experimentech použili, představují dva kmeny s velkým množstvím morfologických, fyziologických a behaviorálních rozdílů (Harker & Whishaw, 2002). Zatímco potkani kmene LE mají zachovaný sluch až do pozdního věku, potkani kmene F344 představují model rychle stárnoucích zvířat s časným nástupem poruch sluchu (Popelar et al., 2003; Popelar et al., 2006; Syka, 2010). Mezi patologické změny, které stojí v pozadí zhoršování sluchu daného věkem u F344 potkanů, patří změny ve středním a vnitřním uchu (Buckiova et al., 2007; Popelar et al., 2006) a narušení funkce prestinu ve vnějších vláskových buňkách starých zvířat (Chen et al., 2009).

Nicméně navzdory různě zachované funkci periferní části sluchového systému vykazali potkani kmene LE i kmene F344 téměř shodné změny v hladinách CB a CR. V předchozím experimentu jsme u obou kmenů našli podobný, stárnutím způsobený, pokles hladiny glutamátdekarboxylázy. Stejně jako u právě diskutovaných výsledků, došlo i v případě GAD k poklesu v počtu GAD pozitivních neuronů v CI a SK doprovázenému značným poklesem hladin proteinů v CI, SK, ale také ZK u obou kmenů potkanů, jak prokázala analýza western blot. Tyto výsledky naznačují, že určité změny ve sluchové dráze v CNS během stárnutí nemusí být zcela závislé na ztrátě periferních vstupů, ale mohou představovat (alespoň částečně) vlastnost stárnoucího mozku. Na druhou stranu navzdory skutečnosti, že neurony exprimující PV tvoří významnou část populace GABAergních buněk v CI a SK u potkana (Fredrich et al., 2009; Gonchar & Burkhalter, 1997), stárnutím způsobené změny u PV-ir neuronální populace byly u LE potkanů spíše mírné, zatímco se u starých F344 projeví výrazným úbytkem PV-ir neuronů zvláště v SK (Ouda et al., 2008).

Expresí hlavních vápník vázících proteinů (CB, CR a PV) v centrální části sluchové dráhy probíhá v GABAergních neuronech, s výjimkou CB. Současná přítomnost CB, PV a CR

v jednom neuronu je velmi vzácná. Všechny tyto tři proteiny vytvářejí tři různé neuronální populace (Demeulemeester et al., 1989; Gonchar & Burkhalter, 1997; Gonchar et al., 2007; Jinno & Kosaka, 2006; Kubota et al., 1994). Tyto neuronální populace se také mezi sebou liší morfologií neuronů, synaptickým zapojením, elektrofyziologickými vlastnostmi a funkcí v neuronálních sítích (Markram et al., 2004). To se pak může projevit v jejich různých rolích a různých projevech změn během stárnutí včetně různé ovlivnitelnosti dané kmenem potkana.

Jak je již dříve uvedeno, CB nemusí nutně patřit ke GABAergní neuronální populaci. O některých slabě obarvitelných CB-ir neuronech v povrchových korových vrstvách je známo, že patří k pyramidálním neuronům (DeFelipe, 1997; Kawaguchi & Kubota, 1998; Kubota et al., 1994; van Brederode et al., 1991). Tato skutečnost je zvláště důležitá v případě CGM, jelikož u potkanů tato sluchová oblast obsahuje jen velmi málo GABAergních neuronů (Winer et al., 1996). Naproti tomu v CGM je pozorováno CB-ir neuronů velké množství, a to i v porovnání s CI a s SK, tudíž většina z nich nemůže být GABAergních. Na druhou stranu jen velmi málo PV-ir a CR-ir neuronů se vyskytuje v potkaním CGM, jak ukazuje nejen tato práce, ale také předešlé experimenty (Ouda et al., 2008). Nicméně během stárnutí došlo k poklesu počtu CB-ir neuronů ve všech třech studovaných sluchových strukturách, tedy CI, CGM a SK.

Zajímavým objevem prezentovaného experimentu je velký regionální rozdíl v obsahu proteinů stanovený metodou western blot, který detekoval zhruba dvojnásobně vyšší hladinu kalbindinu v SK než v CI a ZK a téměř dvojnásobně vyšší hladinu kalretininu v CI než v SK a ZK. O funkčním významu těchto rozdílů můžeme zatím jen spekulovat. Lze říci, že regionální rozdíly u CR kopírují výsledky, ke kterým jsme došli při stanovování hladiny GAD při stárnutí – hladina proteinu GAD je v CI v porovnání s SK a ZK rovněž výrazně zvýšená, a to téměř trojnásobně. Na druhou stranu vyšší hladina CB v SK může jednoduše odrážet množství CB v neuronech včetně intenzivně obarveného neuropilu v povrchových korových vrstvách. Nicméně tento argument nemůžeme použít při porovnávání SK a ZK.

Pokud porovnáme výsledky z western blotu a imunohistochemie, dospějeme k závěru, že imunohistochemie našla výraznější změny. Tento efekt můžeme alespoň z části vysvětlit rozdílnou interpretací imunohistochemických dat. Musíme brát totiž v úvahu nejen změny v celkovém počtu imunoreaktivních neuronů, ale také intenzitu barvení (proměnná, která je zcela závislá na kalibraci vzhledem k pozadí) a objemy obarvených neuronů. Změny v celkových hladinách proteinů stanovených imunohistochemicky jsou proto hůře interpretovatelné a jejich



přímé porovnání s výsledky western blotu není možné. Ostatně na tento fakt upozorňují i jiní autoři, kteří při analýze VVP použili, stejně jako my, současně imunohistochemii a western blot (Choi et al., 2010; Kim et al., 2010; Lee et al., 2013; Ng et al., 1996). Přesto je kvalitativní shoda mezi výsledky obou metod evidentní. Z technických důvodů jsme nemohli provést analýzu western blotem v CGM, a proto nemůžeme říct, zda imunohistochemicky určený výraznější pokles CB-ir neuronů v CGM oproti SK a ZK byl spojený i s výraznějším poklesem v hladině proteinu CB, tak jak by ji stanovila metoda western blot.

Jak ukazují klinické i experimentální studie, existuje spojitost mezi regulací intracelulárního vápníku, změnami v hladinách intracelulárních VVP a neurodegenerativními a neuropsychiatrickými onemocněními (Hurley et al., 2013; Mattson, 2007; Woo & Lu, 2006). Například u myšího modelu Alzheimerovy choroby byl nalezen pokles CB imunoreaktivity v hipokampu, který koreloval s narušením hipokampově závislého učení (Palop et al., 2003; Palop et al., 2011). Snížení obsahu VVP bylo také objeveno u osob s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou (Mikkonen et al., 1999). Na druhou stranu pokles v počtu CB-ir a CR-ir neuronů byl pozorován v různých neokortikálních oblastech, a to včetně sluchové kůry, u stárnoucích lidí bez příznaků psychiatrického nebo neurologického onemocnění (Bu et al., 2003). Jelikož VVP mohou hrát výraznou roli v neuroprotektivitě a udržování neuronální funkce (Foster, 2007; Mattson et al., 1991; Verkhratsky & Toescu, 1998), jejich snižující se exprese během stárnutí může neuronální funkci narušit a snížit odolnost neuronů vůči různým onemocněním.

Na důsledky stárnutím způsobeného poklesu CB a CR ve sluchové dráze musíme pohlížet především jako na změny v inhibičním systému, které zajišťuje GABA, neboť VVP exprimující neurony jsou jeho součástí. Tento systém pak ovlivňuje různé populace korových pyramidálních neuronů. Konkrétně velké pyramidové neurony v V. vrstvě mající úzce laděné prahové frekvenční křivky se většinou vyznačují malým množstvím inhibičních vstupů na svých somatech (Hefti & Smith, 2000; Hefti & Smith, 2003), což naznačuje, že se na ně neváží PV-ir košikové buňky s vysokofrekvenční (fast-spiking) aktivitou, ale mohou být pod vlivem jiných GABAergních neuronů, které se synapticky pojí především na dendrity pyramidálních buněk – tedy právě CB-ir a CR-ir neuronů (Freund & Buzsáki, 1996; Markram et al., 2004). U pyramidálních neuronů s úzkým rozpětím prahových křivek dochází v průběhu stárnutí ke snížení počtu a stability jejich „V/U“ receptivních polí a snížení reaktivity na začátek zvukového

stimulu (Turner et al., 2005a). Nabízí se tedy vysvětlení, že jednou z příčin zhoršení jejich funkce by mohla být stárnutím způsobená změna v počtu a funkci CB-ir a CR-ir buněk.

### ***5.3. Změny v úlekové reakci na zvukový stimul a prepulzní inhibici během stárnutí potkanů dvou kmenů***

V této experimentální části jsme vyhodnocovali vliv stárnutí na behaviorální koreláty sluchové funkce u potkanů kmene Long Evans jako modelu fyziologického stárnutí a u potkanů kmene Fischer 344 jako modelu zrychleného stárnutí. Použili jsme jednak měření prahů ABR a dále pak dvou behaviorálních metodik – testu úlekové reakce na neočekávaný zvukový podnět a testu prepulzní inhibice této úlekové reakce.

Naše výsledky ukazují, že mezi potkany kmene Long Evans a Fischer 344 dochází k rozdílným změnám v úlekové reakci na zvukový stimul během stárnutí. Potkani F344 mají menší ASR amplitudy než potkani LE téměř ve všech případech zvukové stimulace. ASR amplitudy u potkanů F344 ve srovnání s kmenem LE klesají během stárnutí rychleji. Stejně tak prepulzní inhibice se manifestuje u F344 potkanů méně než u LE. Nicméně relativní pokles PPI při stárnutí je u obou kmenů podobný a signifikantního snížení PPI se dosahuje pouze starých zvířat.

Mezikmenové rozdíly v PPI a ASR byly pozorovány jak u potkanů, tak i u myší (Błaszczuk & Tajchert, 1996; Glowa & Hansen, 1994; McCaughan et al., 1999; Ouagazzal et al., 2006; Swerdlow et al., 2004; van den Buuse et al., 2003; Varty & Higgins, 1994). Přehled rozdílů v amplitudách ASR je popsán v práci Glowa a Hansen (1994), v níž je porovnán ASR na úlekový podnět o intenzitě 110 dB u 46 potkaních kmenů. Jejich data korespondují s našimi výsledky, které ukazují, že amplituda ASR je u LE potkanů výrazně větší než u kmene F344. Tento mezikmenový rozdíl může mít několik příčin. Webb et al. (2003) zjistili, že potkani kmene F344 se liší v morfologických, sensorických a pohybových vlastnostech oproti potkanům kmene LE, Lewis, Sprague-Dawley a Wistar. Podle jejich pozorování jsou F344 potkani menšího věku, mají zmenšenou abdukcii zadních končetin a jsou citlivější na mechanickou stimulaci končetin než ostatní kmeny. Ačkoliv je anatomická dráha úlekové reakce relativně jednoduchá, může být ovlivněna výše uvedenými skutečnostmi, které do ní mohou zasahovat, jak v aferentní, tak

v eferentní části. Naše data nabízejí analogii těm, které popisují Ison a Allen (2003). Ti našli nižší asymptotickou úroveň úlekové reakce u C57bl/6J myši v porovnání s kmenem CBA. Tyto kmeny se v případě výzkumu stárnutí sluchové funkce často uvádějí jako analogické potkaním kmenům F344 a LE.

Naše výsledky ukazují, že ASR závisí na frekvenci podnětu. Ve shodě s předchozími daty (Błaszczuk & Tajchert, 1997; Pilz et al., 1987) bílý šum a tóny o nízkých frekvencích způsobí větší odpovědi než vysokofrekvenční zvukové podněty. U obou kmenů závisí ASR amplitudy rovněž na věku. V průběhu stárnutí se snižují, což je v souladu s výsledky předešlých studií u hlodavců (Ison et al., 2007; McFadden et al., 2010; Ouagazzal et al., 2006; Varty et al., 1998; Willott et al., 1988) a lidí (Ellwanger et al., 2003; Ludewig et al., 2003). Nicméně pokles v úlekových odpovědích nastal u potkanů F344 ve srovnání s LE v ranějším věku. Z toho, že F344 potkani středního věku mají podobnou úlekovou reakci jako staří potkani F344, zatímco potkani LE středního věku mají podobnou úlekovou reakci jako mladí dospělí potkani LE, můžeme usuzovat, že u F344 zvířat dochází k časnějšímu nástupu presbyakuze.

Dynamika změn souvisejících s věkem v ASR amplitudě byla u F344 potkanů jiná pro tónové podněty a pro bílý šum. Na rozdíl od tónových podnětů byl u bílého šumu pozorován pokles v ASR pouze u skupiny starých potkanů. Rozdíly v reakci na tónové podněty a šum během stárnutí byly rovněž pozorovány u myši s časným nástupem poškození sluchu (Ison & Allen, 2003; McCaughran et al., 1999). Autoři vysvětlili tento jev reorganizací tonotopického uspořádání v CNS daného stárnutím způsobenou ztrátou sluchu ve vysokých frekvencích, které má behaviorální důsledky pouze pro sinusoidální úlekové podněty. Podobně předpokládáme, že reakce na šumové podněty mohou zamaskovat změny způsobené stárnutím, které by jinak byly patrné, pokud bychom použili k úleku tónové podněty.

Možným zdrojem mezikmenových rozdílů během stárnutí může být různý nástup a různá míra poškození kochley daná věkem a projevující se úbytkem sluchu. Jak naše data ukazují, ABR audiogramy u LE potkanů zaznamenaly pouze malý nesignifikantní posun sluchových prahů a to až do věku 24–26 měsíců. K významnému posunu prahů došlo až u nejstarších potkanů kmene LE, tzn. ve věku 29–34 měsíců. U F344 potkanů došlo k posunu prahů dříve a byl výraznější. Prahy u potkanů F344 ve středním věku (12 až 14 měsíců) byly porovnatelné s prahy u nejstarších LE potkanů (29 až 34 měsíců). Podobný relativně časný pokles citlivosti sluchu u F344 potkanů byl popsán v několika studiích (Backoff & Caspary, 1994; Popelar et al., 2003;

Popelar et al., 2006). Abychom určili, zda jsou změny ASR během stárnutí důsledkem zhoršení sluchové funkce, vyhodnotili jsme závislost ASR amplitudy na úbytku sluchové funkce během stárnutí. Naše výsledky v mnoha směrech naznačují, že ASR amplituda není přímo závislá na sluchové senzitivitě. Mladí dospělí potkani obou kmenů měli podobnou citlivost sluchu na frekvencích pod 16 kHz, a přesto vykazovali různé ASR amplitudy. Naopak ve věku 24 až 26 měsíců měly oba dva kmeny zcela rozdílné prahy slyšení, avšak podobné amplitudy ASR. Statistická analýza nenašla u žádné skupiny, ani v jednom kmeni, spojitost mezi ASR amplitudou a prahem ABR. Můžeme tak říci, že úbytek sluchu během stárnutí není determinujícím faktorem pro zeslabení ASR. Navíc během stárnutí či po posttraumatickém poškození sluchu může dojít k sluchovému recruitmentu a hyperakuzi (Carlson & Willott, 1996; Ison & Allen, 2003; Ison et al., 2007; Popelar et al., 2008). Ani u myši stejného věku, ale s různým nástupem poškození sluchu, nebyla nalezena přímá závislost amplitudy ASR na sluchových prazích (McCaughan et al., 1999; Ouagazzal et al., 2006).

K pozorovanému snížení amplitudy ASR může přispívat několik druhů změn, ke kterým dochází během stárnutí. Zhoršení funkce vnitřního ucha se vyskytuje zároveň se zhoršením funkce centrální části sluchové dráhy a spolu se zhoršením funkce motoriky. Zhoršení motorických funkcí během stárnutí je u potkanů dobře popsáno. Dochází k postupnému poklesu svalového tonu a snížení pohybové aktivity (Altun et al., 2007; Campbell & Gaddy, 1987; Gage et al., 1984), které se liší u různých kmenů. Některé skutečnosti svědčí pro závislost poklesu funkce sluchové dráhy v CNS během stárnutí na kmeni potkanu. Například výraznější pokles ABR amplitud byl zaznamenán u starých F344 potkanů než u stejně starých potkanů LE (Popelar et al., 2006). Navíc u nich byla zaznamenána rychlejší změna v latencích mezi píky (Popelar et al., 2006). U potkanů F344 bylo prodloužení latencí mezi píky pozorováno už ve věku 20 měsíců, zatímco u potkanů LE k nim došlo až po 30 měsících života.

Míra úlekové reakce může být rovněž ovlivněna poškozením kognice, paměti a selektivní pozornosti, které byly pozorovány během stárnutí v behaviorálních studiích u potkanů různých kmenů (Ando & Ohashi, 1991; Gage et al., 1984; Roux et al., 1994). Je zřejmé, že pokles ASR amplitud úzce souvisí s neurochemickými, neuroanatomickými a metabolickými změnami, které u potkanů během stárnutí pozorujeme (Hauger et al., 1994; Sapolsky et al., 1983; Yau et al., 1995). Stojí za povšimnutí, že u F344 potkanů dochází k neurochemickým změnám v centrálním

sluchovém systému již během prvního roku života (Milbrandt et al., 1994; Milbrandt & Caspary, 1995).

Další faktor, který by mohl způsobovat změny v ASR amplitudách, je tělesná hmotnost (Błaszczuk & Tajchert, 1996). V našem experimentu byla průměrná hmotnost F344 potkanů (u každé věkové skupiny) zhruba o 50 gramů menší, než u stejně starých potkanů kmene LE, což mohlo způsobit nižší amplitudy ASR u F344 potkanů. Nicméně skutečnost, že stářím způsobené změny v amplitudě ASR a hmotnost potkanů se pohybují opačným směrem (potkani středního věku vážili více než mladí dospělí, zatímco měli nižší ASR) naznačuje, že tělesná hmotnost za změnami v ASR amplitudě během stárnutí nestojí.

Rozdíly mezi kmenem F344 a LE vyvstaly rovněž při analýze PPI. Abychom eliminovali možné rozdíly ve slyšitelnosti prepulzních stimulů u různých potkanů, kteří měli různé prahy slyšení, byly v naší studii použity prepulzní tóny o hlasitosti 75 dB, což je o 5 dB méně než prahy ASR. Prepulzní inhibice se považuje za formu sensorimotorického zpracování, které odráží základní inhibiční procesy regulující sensorický vstup do mozku (Geyer & Braff, 1987; Swerdlow et al., 2004). Předchozí studie ukázaly, že různé kmeny hlodavců vykazují různou PPI (Ouagazzal et al., 2006; Paylor & Crawley, 1997; Varty & Higgins, 1994). Podle autorů je příčinou tohoto mezikmenového rozdílu (stejně jako v případě ASR) genetické pozadí (Geyer et al., 2002; Ouagazzal et al., 2006). Naše výsledky ukazují, že PPI je méně účinné u F344 potkanů než u LE. Naproti tomu Swerdlow (2004) dospěl k výsledkům úplně opačným. Tento rozdíl lze stěží vysvětlit pouhým odkazem na rozdílnost experimentální procedury (např. ve spektrální charakteristice prepulzních a úlekových stimulů, intenzitě prepulzu, v designu pokusu apod.).

U obou kmenů došlo během stárnutí ke snížení účinnosti PPI. Nicméně v kontrastu ke změnám v ASR během stárnutí měly změny v PPI u obou kmenů stejný průběh, tzn. pokles v účinnosti inhibice byl statisticky významný pouze u starých potkanů. To je v souladu s naším předchozím nálezem, kde u obou kmenů potkanů dochází během stárnutí ke snížení hladin GAD65 a 67. Rovněž výsledek doplňuje další naši studii, v níž jsme prokázali sníženou PPI u myši postrádající parvalbumin, tedy s narušenou funkcí inhibice (Popelář et al., 2013). Avšak celkově doposud publikovaná data týkající se změn PPI během stárnutí netvoří jednoznačný obrázek. Obecný názor, že fyziologické stárnutí musí být doprovázeno globálním poklesem inhibiční funkce (Woodruff-Pak, 1997), nebyl dostatečně potvrzen. Někteří autoři zjistili, že

během stárnutí k změně PPI u lidí nedochází (Harbin & Berg, 1983; Ludewig et al., 2003). Avšak podle Ellwanger et al. (2003) má funkce průběhu změn v PPI během stárnutí u lidí tvar obráceného U (nejvyšší PPI je ve středním věku). Podobně jako u našich výsledků, Varty et al. (1998) publikovali objev, že staří F344 potkani (22 měsíců) mají snížené PPI v porovnání s dospělými a mladými potkany. Nicméně analogická studie u myši CBA nenalezla signifikantní efekt věku v PPI (Varty et al., 1998).

#### **5.4. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět u potkanů vystavených v mládí hluku**

Naším cílem bylo zjistit behaviorální reaktivitu na zvukové podněty v dospělosti po hlukové expozici v raném věku, která by mohla odrážet změněný charakter reprezentací různých frekvencí zvuku v CI tak, jak je popisují Pierson a Snyder-Keller (1994).

Výsledky našich experimentů opravdu odhalily u dospělých potkanů, kteří byli v kritické periodě vystaveni hlukovému stimulu, odlišné behaviorální odpovědi na zvukové podněty při testování úlekové reakce na neočekávaný podnět a při testování její prepulzní inhibice. To nám napovídá, že ranou expozicí došlo k zásahu do systémů, které zpracovávají intenzitu zvuku a rozhodují o vnímání jeho hlasitosti.

Jak je známo z předchozí studie vypracované v naší laboratoři (Grécová et al., 2009), hluková expozice (8 min, 125 dB SPL) ve 14. postnatálním dni, která byla použita i v současném experimentu, způsobuje okamžité zvýšení sluchových prahů. Kontrolní, neexponovaní potkani dosahují prahových hodnot mezi 60 a 80 dB SPL, zatímco u exponovaných zvířat se prah zvýší o 15–20 dB v celém rozsahu slyšitelných frekvencí. U kontrolních zvířat se pak prahy přiblíží hodnotám pro dospělé potkany během několika málo dní, avšak exponovaní potkani jich dosáhnou až za 2–3 týdny. Pro vysvětlení dočasného zhoršení sluchu po hlukové expozici se nabízí dva mechanismy: jednak může dojít k poškození Cortiho orgánu tím, že expozice vyvolá lézi stereocílií a jednak může dojít k nadměrnému výlevu glutamátu, který se projevuje zduřením aferentních terminálů vázících se k vnitřním vláskovým buňkám (typ 1 aferentních dendritů) (Canlon et al., 1987; Pujol & Puel, 1999; Robertson, 1983). Úbytek zvukových podnětů z periferie pak znamená sníženou aktivaci centrální části sluchové dráhy, což vede k výrazným

změnám sluchové funkce, jak je již popsáno v mnoha studiích (Chen, 1978; Henry, 1972; Salvi et al., 2000; Saunders & Chen, 1982).

Pro interpretaci výsledků je zásadní, že jsme v našem experimentu nezjistili mezi skupinou kontrolních a exponovaných zvířat výraznější rozdíly jak v samotných prazích slyšení, tak ani v prazích ASR. Proto můžeme vysvětlit námi objevenou sníženou úlekovou reakci u exponovaných zvířat na frekvencích 4–16 kHz přímočařeji. I vzhledem k experimentu provedenému dříve v naší laboratoři (Bures et al., 2010) se zdá, že za sníženou amplitudou ASR může stát snížená neuronální excitabilita. V práci Bures et al. (2010) bylo u zvířat po stejné hlukové zátěži v mládí jako v našem případě provedeno elektrofyziologické měření v CI. Hlukem exponovaná zvířata pak měla sníženou úroveň maximální odezvy neuronů, užší dynamické rozpětí závislosti frekvence odpovědi na intenzitě a nižší počet monotónně reagujících neuronů.

Náš výsledek, že tóny o vyšších frekvencích vyvolávají nižší amplitudy ASR než tóny nižších frekvencí, odpovídá předchozím studiím (Błaszczuk & Tajchert, 1997; Carlson & Willott, 1996; Pilz et al., 1987). Vysvětlení tohoto jevu můžeme hledat ve tvaru prahových křivek sluchových neuronů, neboť neurony v kochleárním jádře jsou nejenom citlivé na svou charakteristickou frekvenci, ale reagují i na hlasité podněty o nízkých frekvencích (Evans, 1975). Vysoké amplitudy ASR na nízkofrekvenční podněty mohou odrážet samotný informační význam zvukového podnětu (Błaszczuk & Tajchert, 1997). Je pravdou, že potkani jsou citlivější na vysoké frekvence a komunikují převážně ultrazvukovými vokalizacemi. Avšak vnímají zvuky v mnohem větší šíři frekvencí a vokalizace v nízkých frekvencích u nich představují důležitý signál při vyjádření bolesti (Jourdan et al., 1995). Vysoké ASR při nízkofrekvenčních zvucích tak může potkanům pomáhat v přežití v jejich přirozeném prostředí.

Jak u exponovaných, tak u kontrolních skupin jsme zaznamenali nepřímou úměru mezi frekvencí úlekového podnětu a velikostí ASR. Nicméně nejvýraznější pokles amplitud ASR byl u kontrolních potkanů při 16 kHz, zatímco u exponovaných potkanů se objevil již při 8 kHz. A tak je zajímavé, že třebaže u obou skupin není rozdíl v prazích slyšení a prazích ASR, je u exponovaných potkanů ovlivněno ASR při vyšších frekvencích úlekového podnětu. Podobné výsledky byly nalezeny u C57bl/6J myši s geneticky podmíněným úbytkem sluchu během stárnutí, který se projevuje zvláště ve vysokých frekvencích (Parham & Willott, 1988). U těchto zvířat se pokles v ASR amplitudách objevil při frekvencích 4 až 16 kHz již v prvním roce života, při současném zachování normálních sluchových prahů.

Pierson a Snyder-Keller (1994) ukázali, že potkani v P 14 mají část sluchového systému, která se věnuje zpracování vysokých frekvencí, méně dozralou než tu, která zpracovává nízkofrekvenční zvuky. Zvukové trauma tak hlavně ovlivní ty části systému, které jsou ještě ve vývoji, zatímco dozralé oblasti zůstanou relativně netknuty. Několik studií ukázalo, že vyvíjející se sluchový systém obecně vykazuje sníženou excitabilitu v porovnání s dospělým stavem (Brugge & O'Connor, 1984; Moore & Irvine, 1980). Proto pokles amplitud ASR vysokých frekvencí pozorovaných v našem experimentu můžeme brát jako projev zastaveného vývoje oblastí zpracovávajících vysoké frekvence, který byl zapříčiněn zvukovým traumatem.

Při zkoumání vlivu rané expozice hluku na prepulzní inhibici ASR v dospělosti jsme objevili u exponovaných zvířat několik významných anomálií. Zatímco u kontrolních zvířat dochází při vzestupu intenzity prepulzního podnětu k lineárnímu vzestupu účinnosti PPI, u exponovaných zvířat má PPI funkce složitější průběh a můžeme u ní rozlišit tři fáze. První fáze je patrná při nízkých intenzitách prepulzu (20 až 30 dB SPL) a vyznačuje se u exponovaných zvířat výraznější inhibicí ASR, což může odrážet jejich abnormální citlivost ke zvuku v lehce nadprahových úrovních. Druhou fází vymezujeme pro hodnoty intenzity prepulzu až k 60 až 70 dB SPL a vyznačuje se malým, leč nesignifikantním, posunem účinnosti PPI. To můžeme interpretovat tak, že exponovaná zvířata vnímají tyto prepulzní zvuky jako stejně hlasité. Ve třetí fázi (intenzita prepulzu >70 dB SPL) už exponovaná i kontrolní zvířata zvyšují účinnost PPI s rostoucí intenzitou prepulzu stejnou měrou.

Zvýšená účinnost PPI u tónů nízké intenzity (při středních frekvencích zvuku) byla také popsána u potkanů po ototoxickém poškození neomycinem (Young & Fechter, 1983) a u C57bl/6J myši během dospívání (Carlson & Willott, 1996; Parham & Willott, 1988). Tento nález vysvětlují Carlson a Willot (1996) jako projev zvýšené vnímavosti určitých zvuků, která nastane díky plasticitě v centrální části sluchové dráhy navozené poškozením sluchu (Kaas, 1991; Popelár et al., 1994; Salvi et al., 2000).

Odlíšný charakter PPI pozorovaný u našich exponovaných zvířat je zjevným důsledkem plasticity, kterou během raného vývoje vyvolá expozice hluku. Změněná PPI je pak behaviorálním výstupem anomální reprezentace hlasitosti zvuku. Třebaže mechanismus, jakým je v mozku řízena PPI, není kompletně prostudován, většina autorů se shodne na tom, že neuroanatomický substrát zahrnuje CI, *colliculus superior* a další centrální sluchové struktury, včetně sluchové kůry (Carlson & Willott, 1996; Ison & Hammond, 1971; Swerdlow et al., 2001).



Z toho pak můžeme usoudit, že pozorované změny ve funkci PPI odráží především změny v centrální části sluchové dráhy. Předchozí elektrofyziologická studie provedená na stejném paradigmatu s ranou hlukovou expozicí (Grécová et al., 2009) nabízí několik analogií s naší behaviorální studií. Zatímco prahy odpovědí CI neuronů byly u kontrolních a exponovaných zvířat porovnatelné, velikosti maximálních odpovědí byly u exponovaných potkanů nižší. U exponovaných zvířat také funkce závislosti neuronální aktivity na intenzitě zvuku dosáhla saturace při nižších zvukových intenzitách. To odpovídá užšímu dynamickému rozpětí a strmějšímu nástupu této intenzitní funkce. Vzhledem k těmto elektrofyziologickým datům a výsledkům imunohistochemické studie (Pierson & Snyder-Keller, 1994) můžeme tvrdit, že behaviorální změny v ASR a PPI jsou spojeny se změnami zpracování zvukového signálu na úrovni *colliculus inferior*. Zároveň však nemůžeme vyloučit mírné patologické změny v kochleě a sluchovém nervu způsobené expozicí hluku během kritické periody. Nicméně normální hodnoty DPOAE, které naznačují zachovanou funkci vnějších vláskových buněk (Grécová et al., 2009) a normální prahy ABR a nezměněná funkce závislosti amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu, které naznačují správné zpracování akustických podnětů na úrovni mozku kmene, svědčí o tom, že hluková expozice během raného vývoje nezpůsobí výraznější poškození periferní části sluchového systému v dospělosti, ale spíše se projeví změnami v centrální části sluchového systému.

### **5.5. Souhrnná diskuze výsledků**

V souhrnu lze naše data prezentovaná v této dizertační práci chápat jako určitý příspěvek výzkumu změn v centrální části sluchového systému během presbyakuze. V současnosti se na změny v CNS ve stáří pohlíží nejen z hlediska kvantitativního úbytku neuronů, ale i jednotlivých neurotransmiterových systémů (Banay-Schwartz et al., 1989; Caspary et al., 2008; Tadros et al., 2007a). Průběh změn je o to složitější, že dochází i k různým kompenzačním mechanismům (Gray et al., 2014; Tadros et al., 2007b). Sluchový systém, který využívá precizního časoprostorového kódování při přenosu a zpracování nervových impulzů, je závislý především na správné funkci a součinnosti excitačních a inhibičních procesů. Stále přibývá důkazů, že ve stáří dochází u pokusných zvířat ke změnám především v inhibičních dějích (Caspary et al., 2008). Naše data tento předpoklad potvrzují: Metodou western blot jsme našli výrazně sníženou

expresi obou izoforem GAD, enzymu katalyzujícího syntézu GABA, a to v *colliculus inferior* i sluchové kůře. Naproti tomu úbytek ve zrakové kůře byl menší. K podobnému výsledku jsme dospěli při vyhodnocování morfologických a kvantitativních změn GAD-ir neuronů. O úbytku GABA inhibice svědčí i výsledky ze studie zaměřené na změny v hladinách CB při stárnutí. Jak již bylo uvedeno, CB-ir neurony nemusí být vždy nutně GABAergní, ale z větší části mezi ně patří, a tak změny v CB můžeme dávat do souvislosti se změnou v GABA. Opět jsme metodou western blot prokázali, že dochází k výraznému úbytku CB v CI, SK, ale i ZK a pomocí imunohistochemie zjistili pokles v počtu CB-ir neuronů a jejich optické denzity ve sledovaných strukturách, které navíc zahrnovaly i CGM. Změny týkající se CR měly obdobný charakter, nebyly však tak výrazné. V souvislosti se sníženou funkcí inhibice tedy dochází i ke snižování hladiny CB a CR, což může vést k neurotoxickému působení zvýšené hladiny intracelulárního vápníku. Je zajímavé, že ve výše uvedených případech jsme nenalezli významnější rozdíl u starých zvířat mezi rychlestárnoucím kmenem Fischer 344 a fyziologicky stárnoucími potkany kmene Long Evans. Nenaplnil se tedy předpoklad, že F344 zvířata budou mít změny během stárnutí výraznější, jak ukázala předchozí studie hodnotící obsah parvalbuminu (Ouda et al., 2008). Nicméně naše výsledky jsou do jisté míry ve shodě s dalším zde prezentovaným experimentem, který hodnotil stárnutí obou kmenů behaviorálně – pomocí testu úlekové reakce a její inhibice pomocí prepulzu. Pokud vezmeme v úvahu věkovou skupinu, kterou jsme hodnotili v předchozích experimentech, tzn. zvířata cca 24-30 měsíců stará, tak ani v případě ASR a PPI nenalzáme výraznější rozdíly mezi kmeny. Pouze v amplitudě ASR na tónový podnět o frekvenci 4 kHz. Mezi oběma kmeny totiž pozorujeme největší rozdíly ve středním věku (12–14 měsíců), kdy u kmene Fischer 344 dochází již k výrazným degenerativním změnám souvisejícím se zrychleným průběhem stárnutí (Syka, 2010), zatímco zvířata kmene LE v tomto věku nevykazují významnější známky stárnutí. Je však třeba zdůraznit, že u starých zvířat obou kmenů dochází k posunu prahových křivek ABR, který je u kmene F344 výraznější. Neboli stará zvířata F344 oproti LE hůře slyší. Za zhoršením prepulzní inhibice může stát snížení GABA, respektive GAD, které ukázal náš první experiment. PPI je totiž do značné míry závislé na fungující GABA transmissi (Yeomans et al., 2010). Opačný případ jsme zaregistrovali v experimentu, kde jsme sledovali vliv rané expozice hlukovému stimulu na behaviorální výkonnost v testu ASR a PPI. Při shodných křivkách ABR u exponované i neexponované skupiny se objevilo v behaviorálním testu několik významných rozdílů. Amplitudy ASR byly

u exponovaných zvířat menší u vysokých hlasitostí bílého šumu a tónových stimulů o frekvenci  $\geq 4$  kHz a účinnost PPI byla u exponovaných zvířat signifikantně vyšší při nízkých intenzitách prepulzu (20–30 dB SPL) oproti kontrolním zvířatům. Stejně jako v předchozích experimentech i zde předpokládáme, že za pozorovanými rozdíly stojí změny v centrální části sluchového systému, v tomto případě především narušená funkce *colliculus inferior* (Bures et al., 2010; Grécová et al., 2009; Pierson & Snyder-Keller, 1994).

Námi pozorované změny v centrální části sluchového systému při stárnutí, tzn. snížená inhibice zprostředkovaná GABA a snížení CB by mohly stát v pozadí výrazného narušení časových charakteristik zvukového podnětu, jako je zhoršení detekce mezer v šumu (Suta et al., 2011). Předkládaná práce tedy v mnoha ohledech doplňuje a navazuje na výsledky naší laboratoře (Bures et al., 2010; Popelář et al., 2013; Profant et al., 2013a; Profant et al., 2014).

## 6. SOUHRN PRÁCE

Změny v centrální části sluchové dráhy spojené se stárnutím a s poškozením sluchové funkce ohlušením v raném věku představují důležitou a dosud poměrně málo zmapovanou oblast ve výzkumu presbyakuze. V naší práci jsme při stárnutí popsali změny v hladinách glutamátdekarboxylázy, kalbindinu a kalretininu ve vyšších etážích sluchové dráhy a změny v úlekové reakci na neočekávaný podnět a její prepulzní inhibici. Zároveň jsme porovnávali změny u fyziologicky stárnoucího kmene potkanů Long Evans a kmene potkanů se zrychleným stárnutím Fischer 344. Efekt rané expozice hluku na stav sluchové funkce v dospělosti jsme rovněž hodnotili úlekovou reakcí na neočekávaný podnět a její prepulzní inhibici. V souvislosti se stárnutím naše výsledky podporují hypotézu o selektivním úbytku GABA inhibice ve sluchovém systému, nabízejí možný příspěvek poklesu hladin kalbindinu a kalretininu při presbyakuzi, popisují kmenově závislé zhoršování úleku na neočekávaný podnět a jeho prepulzní inhibici a v souvislosti s efektem rané expozice hluku poukazují na možné změny v centrální části sluchové dráhy v dospělosti, které stojí v pozadí v odlišné reaktivitě na neočekávaný podnět a na jeho prepulzní inhibici.

### **Změny v imunoreaktivitě a hladinách glutamátdekarboxylázy (GAD)**

V současné literatuře panuje shoda, že centrální komponenta presbyakuze souvisí s celkovým úbytkem funkce inhibičního systému (Turner et al., 2005a). Dosud publikované práce na toto téma vesměs testovaly kmeny, které se ve stáří vyznačují velkou ztrátou sluchu periferního původu (Caspary et al., 2008). Následkem čehož byla dosud preferována hypotéza, že útlum GABAergní inhibice ve sluchové dráze primárně souvisí se ztrátou aferentní stimulace. V naší práci jsme sledovali pomocí GAD, klíčového enzymu pro syntézu GABA, změny GABAergního systému v *colliculus inferior* a sluchové kůře. Rozhodli jsme se testovat tyto změny u kmene Long Evans, který se vyznačuje jen mírnou ztrátou sluchu ve stáří, a ověřit mezikmenové rozdíly na rychle stárnoucím kmenu potkanů Fischer 344.

Naše výsledky prokázaly v *colliculus inferior* a ve sluchové kůře starých potkanů výrazný a uniformní úbytek GAD65 a GAD67 zahrnující: pokles celkových hladin obou proteinů (o 40–50 %,  $P < 0,01$ ) prokázaný pomocí western blotu, snížení počtu GAD65 a GAD67 imunoreaktivních neuronů (o 5–15 %) a snížení intenzity jejich imunoreakce (o 15–25 %,  $P < 0,01$ ).

$P < 0,05$ ). Změny byly velmi podobné u obou testovaných kmenů potkanů, u kmene Long Evans i u vzorku zvířat kmene Fischer 344, ačkoliv míra zachovaného slyšení se u starých jedinců obou kmenů výrazně liší. Jsme tudíž oprávněni vyslovit hypotézu, že úbytek GAD v *colliculus inferior* a sluchové kůře ve stáří primárně nesouvisí s redukcí aferentní stimulace z vnitřního ucha, ale přinejmenším částečně je přímo rysem stárnoucího centrálního sluchového systému.

### **Změny v hladinách a imunoreaktivitě u kalbindinu (CB) a kalretininu (CR)**

Kalbindin i kalretinin, třebaže nejsou výlučně exprimovány v GABAergních buňkách, jsou spojovány především s nimi. Stejně jako v případě GABA, i u CB a CR se uvažuje jako o hlavních markerech stárnoucího sluchového systému. Třebaže existují mnohé studie na myších, doposud chyběla charakteristika změn CB a CR ve vyšších etážích sluchového systému u potkana. I zde jsme porovnávali kmen Long Evans s kmenem Fischer 344, abychom osvětlili, do jaké míry jsou případné změny dány aferentním poškozením. Naše výsledky ukázaly, že u obou kmenů došlo k podobným změnám. Hladina kalbindinu se snížila zhruba o polovinu ve všech sledovaných strukturách (CI, SK, ZK) a bez ohledu na kmen. CB-ir buněk ubylo v DCI (21 % u LE, 18 % u F344) a ECI (16 %, resp. 13 %), stejně tak jako v SK (14 %, resp. 16 %). Úbytek v hladině CR byl nižší než u CB, u všech sledovaných struktur se pohyboval kolem 20 %. Buněčné změny CR-ir byly významné pouze v DCI a ECI.

Pokles exprese vápníkových proteinů během stárnutí může přispívat k takové změně buněčného prostředí, která činí neurony náchylnější k dysfunkci a degeneraci. Jelikož se jedná z větší části o GABAergní neurony, doplňuje tento experiment předchozí výsledky a zdůrazňuje narušenou GABA inhibici během stárnutí. Zároveň poukazuje na její centrální původ, neboť u obou kmenů potkanů došlo k podobným poklesům. Výsledky jsou zajímavé i vzhledem k možným terapeutickým zásahům. Právě změny v hladině VVP v centrální části sluchové dráhy a změny v GABA transmissi mohou představovat cíl pro léčbu lidské presbyakuze.

### **Změny v úlekové reakci na zvukový stimul (ASR) a prepulzní inhibici (PPI) během stárnutí potkanů dvou kmenů**

Naše data ukazují, že potkani kmene F344, kteří slouží jako model rychlého stárnutí, vykazují jiný průběh změn v ASR během stárnutí než potkani kmene LE, kteří představují model fyziologického stárnutí. Zvýšení prahů slyšení a snížení reaktivity ASR se u F344 potkanů

objevuje již ve středním věku, zatímco u LE potkanů se zvířata středního věku od mladých dospělých neliší. Co se týká PPI, oba kmeny vykazují podobný trend změn během stárnutí navzdory různé účinnosti PPI mezi kmeny. Je třeba zdůraznit, že změny v ASR při stárnutí u F344 potkanů závisí na frekvenci úlekového podnětu. V případě čistých tónů je pokles amplitud ASR výrazný už u potkanů středního věku, zatímco u bílého šumu dochází k pomalejšímu poklesu, který je signifikantní pouze u starých zvířat. Výsledky naznačují, že vyhodnocování ASR a její potlačení zvukovým prepulzním podnětem může sloužit jako objektivní měřítko stárnutím způsobených změn v chování ovládaným zvukovými podněty. Obzvláště ASR na tónové podněty se ukazuje jako vhodný indikátor centrální presbyakuze.

### **Změny v úlekové reakci na zvukový stimul (ASR) a prepulzní inhibici (PPI) měřené v dospělosti po expozici hluku během raného vývoje**

U potkanů Long Evans expozice hlukovému stimulu (8 min, 125 dB SPL) v kritické periodě (P 14) neovlivní v dospělosti křivku prahů ABR v porovnání s neexponovanými zvířaty. Jak jsme dále v testu ASR prokázali, prahové hodnoty amplitud ASR byly pro obě skupiny srovnatelné v rámci všech testovaných frekvencí (2, 4, 8 a 16 kHz). Nadprahové velikosti amplitud ASR byly rovněž srovnatelné mezi experimentálními skupinami, ovšem amplitudy ASR vyvolané maximálními intenzitami (110–120 dB SPL) byly v případě exponovaných zvířat statisticky významně menší (s výjimkou 2 kHz). V obou experimentálních skupinách byla zřetelná tendence poklesu amplitudy ASR se stoupající frekvencí zvukového stimulu. U kontrolní skupiny zvířat byl tento pokles statisticky významný na frekvenci 16 kHz, u skupiny exponovaných zvířat byl přítomen již na frekvenci 8 kHz ( $P < 0,05$ ). Domníváme se, že menší maximální amplitudy ASR u exponovaných zvířat jsou ukazatelem nezralosti centrálního sluchového systému. Podobně i redukované amplitudy ASR na frekvenci 8 kHz připisujeme na úkor narušenému vývoji centrálního sluchového systému.

Účinnost prepulzní inhibice byla testovaná pomocí prepulzních stimulů o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz. Zatímco průměrná velikost ASR u kontrolních zvířat pozvolna klesala v závislosti na intenzitě zvukového stimulu (funkce PPI), tvar křivky PPI u exponovaných zvířat byl odlišný: prudký pokles amplitudy ASR (tj. zvýšená účinnost prepulzního stimulu) na nízkých prepulzních intenzitách (20–30 dB SPL) byl vystřídán fází velmi pomalého poklesu amplitudy ASR (od 20–30 dB SPL do 60–70 dB SPL), kdy vzestup intenzity prepulzního stimulu vyvolal jen

velmi malé změny amplitud ASR. Zvýšená citlivost na nízké intenzity prepulzního stimulu, kterou vystřídala zhoršená schopnost rozlišování intenzit zvuku v rozsahu středních intenzit, naznačovala u exponovaných zvířat porušené vnímání hlasitosti, které korespondovalo se změnami reprezentace intenzity detekované na úrovni neuronů CCI exponovaných zvířat.

## SUMMARY

Changes in the central auditory system related to aging or early development noise exposure represent an important and still poorly understood aspect of presbycusis. In the present thesis, we describe age related changes in glutamate decarboxylase, calbindin, and calretinin levels in the upper parts of the auditory pathway, and age related changes in acoustic startle reaction and prepulse inhibition. Furthermore, we compared Long Evans rats, as an example of natural aging, with the Fischer 344 strain, as an example of accelerated aging. The effect of noise exposure in early development was also assessed using the acoustic startle response and prepulse inhibition. Our results have the following implications. They support the hypothesis that aging would be accompanied by substantial GABA inhibition decline in auditory system. In addition, they show that there is decline of calbindin and calretinin as well. And last, they describe a strain-dependent disruption of the acoustic startle response and prepulse inhibition, revealing significant effects in adults after early noise exposure.

### **Changes in levels and immunoreactivity of glutamate decarboxylase**

Currently, there is a general consensus that an overall deterioration of inhibitory function underlies central presbycusis (Turner et al., 2005a). Studies published so far have used strains with massive auditory function disruption of peripheral origin (Caspary et al., 2008). Consequently it was hypothesised that the deterioration of GABA inhibition throughout the auditory pathway is primarily caused by a loss of afferent stimulation. In the present thesis, we assessed changes in GABA in the inferior colliculus and auditory cortex by evaluating GAD levels, a key enzyme in GABA synthesis. Moreover, these changes were compared between the two rat strains.

Our results demonstrated the following significant and uniform changes of both GAD isoforms (65 and 67) in the inferior colliculus and auditory cortex: a decline of both protein levels (40–50%,  $P < 0,01$ ) evaluated using western blot, a decrease in number of GAD65 and 67-ir neurons (5–15%), and a decrease in their immunoreactivity (15–25%,  $P < 0,05$ ). Changes in LE rats were similar to those of F344 rats despite the different auditory condition of both strains at given ages. Therefore, we may tentatively suggest that the age-related decline in GAD expression



in the IC and AC does not depend primarily on peripheral deafferentation, but is, at least partially, of central origin.

### **Changes in levels and immunoreactivity of calbindin and calretinin**

Calbindin and calretinin, though not exclusively expressed in GABAergic neurons, are usually associated with the GABAergic system. Similarly to GABA, their changes are considered the hallmarks of an aging auditory system. In spite of several studies conducted with mice, there was a lack of any description of CB and CR age-related changes in the upper parts of the auditory pathway in rats. Analogous to our previous study, we compared LE and F344 strains to evaluate whether or not the condition was of peripheral origin. Our results confirm that the changes do not depend on the strain. Levels of CB declined by half in all studied structures (inferior colliculus, auditory cortex, visual cortex) regardless of strain. Numbers of CB-ir neurons decreased in the dorsal cortex (by 21% and 18%, in LE and F344 rats, respectively) and external cortex (16% and 13%, respectively) of the inferior colliculus, as well as in the auditory cortex (14% and 16%, respectively). The decline in CR level was not so severe, reaching approximately 20% in all structures. Changes in CR-ir reached significance only in the dorsal and external cortex of the inferior colliculus.

A reduction in the expression of calcium binding proteins during aging may contribute to a higher vulnerability of cells to dysfunction and degeneration. These cells are GABAergic in most cases, which underlies the disrupted inhibition that occurs during aging and further supplements our previous work. Moreover, it speaks in favor of the condition having a central origin as both strains displayed similar declines. The results may point to potential therapeutic intervention. The changes in calcium binding proteins and GABA transmission during aging may represent a target in treatment of human presbycusis.

### **Age-related changes in acoustic startle response (ASR) and prepulse inhibition (PPI) in two rat strains**

Our data showed different age-related patterns of change in naturally aging Long Evans rats and the Fischer 344 strain with accelerated aging. Threshold shifts and lower ASR appear in F344 rats already at middle age whereas the equivalent LE rats do not differ from that of younger ones. Both strains displayed a similar tendency of age-related decline in PPI, despite

its different efficacy between strains. It is important to note that age-related changes in ASR depends on the frequency of the startle stimulus. In the case of pure tones, the decline in ASR is already apparent in middle aged rats, but reactivity to white noise declines significantly not earlier than in old rats. The results suggest that ASR and PPI may serve as an objective measure of age-related changes of behavior controlled by sound stimuli. This particularly holds true for tonal ASR which might be a suitable marker of central presbycusis.

### **Changes in ASR and PPI in adult rats exposed to loud noise during early development**

Exposure to noise (8 min, 125 dB SPL) during the critical period (P 14) of the auditory system does not affect ABR thresholds in Long Evans rats compared to unexposed animals. Moreover, both groups have comparable amplitudes of ASR across all the studied frequencies (2, 4, 8 a 16 kHz). Furthermore amplitudes above thresholds did not differ between groups, except for maximal intensities of sound stimuli (110–120 dB SPL) which elicited lower responses in exposed rats (except 2 kHz). Both groups demonstrated a decline in ASR amplitude with increasing frequency of the sound stimulus. However, such a decline was significant only at 16 kHz in control rats, but in exposed rats it was already present from frequencies of 8 kHz ( $P < 0,05$ ). We assume the lower maximum ASR amplitudes in exposed rats to be a manifestation of an immature central auditory system. Likewise, reduced ASR amplitudes at 8 kHz can be ascribed to impaired development of the central auditory system. Efficacy of PPI was evaluated by prepulse stimuli at frequencies of 2, 4, 8, and 16 kHz. While the average ASR slowly decreased with increasing intensity of the sound stimulus (PPI function), the shape of the PPI curve for exposed rats was different. A steep decline in ASR amplitude (i.e. high efficacy of PPI) at low intensities of prepulse (20–30 dB SPL) was followed by a very slow decline (from 20–30 dB SPL to 60–70 dB SPL), demonstrated by small changes in ASR amplitude with increasing intensity of prepulse stimuli. Heightened sensitivity to low intensities of the prepulse stimuli followed by a compromised ability to discriminate middle range intensities suggests a disrupted loudness perception in exposed rats, that corresponds to changes in representation of the intensity detected by neurons in CCI.

## 7. ZÁVĚRY

### I. Stárnutí a GAD65 a GAD67

- hladina obou proteinů se s věkem výrazně snižuje ve všech studovaných strukturách: *colliculus inferior*, sluchová a zraková kůra
- v průběhu stárnutí dochází k signifikantnímu úbytku GAD67-ir neuronů v centrálním jádře *colliculus inferior* a k úbytku jejich optické denzity v centrálním jádře *colliculus inferior* a ve sluchové kůře
- při stárnutí dochází k signifikantnímu úbytku GAD65-ir neuronů ve sluchové kůře, k úbytku jejich optické denzity v centrálním jádře a externí kůře *colliculus inferior* a ve sluchové a zrakové kůře
- v *colliculus inferior* je hladina obou izoform zhruba třikrát vyšší než ve sluchové kůře, bez ohledu na stáří
- u rychle stárnoucího kmene Fischer 344 jsou výsledky podobné jako u výše uvedených výsledků kmene Long Evans

### II. Stárnutí a kalbindin a kalretinin

- hladina kalbindinu se se stárnutím snižuje v *colliculus inferior*, sluchové a zrakové kůře
- počet CB-ir neuronů se snižuje především v dorzální kůře *colliculus inferior*, ventrální části *corpus geniculatum mediale* a primární sluchové kůře (Te1)
- průměrný objem somat CB-ir neuronů klesá v dorzální kůře *colliculus inferior* a ventrální části *corpus geniculatum mediale*
- hladina kalretininu se v průběhu stárnutí významně mění pouze v *colliculus inferior*
- počet CR-ir neuronů klesá v dorzální kůře *colliculus inferior*, objem jejich somat klesá v externí a dorzální kůře *colliculus inferior*
- obecně nejsou výraznější rozdíly mezi kmenem Long Evans a Fischer 344

### III. Vliv stárnutí na úlekovou reakci a prepulzní inhibici

- během stárnutí dochází ke zhoršení sluchových prahů u potkanů kmene Fischer 344 dříve než u kmene Long Evans
- potkani kmene Fischer 344 mají menší úlekovou reakci než potkani Long Evans téměř na všechny testované zvukové podněty
- velikost úlekové reakce klesá u potkanů Fischer 344 ve srovnání s kmenem Long Evans během stárnutí rychleji
- prepulzní inhibice je slabší u potkanů kmene Fischer 344 než u kmene Long Evans
- pokles prepulzní inhibice při stárnutí je u obou kmenů podobný a signifikantní snížení se projeví pouze u starých zvířat
- mezi sluchovými prahy a velikostí úlekové reakce nebyla potvrzena závislost

### IV. Vliv krátké expozice hluku během kritické periody vývoje na úlekovou reakci a prepulzní inhibici

- sluchové prahy potkanů vystavených v mládí hluku a potkanů bez expozice se od sebe v dospělosti významně neliší
- velikost úlekové reakce na stimulaci bílým šumem a tónovými stimuly o frekvenci  $\geq 4$  kHz je u zvířat exponovaných hlukem v raném období vývoje menší než u kontrolních potkanů
- prepulzní inhibice je u exponovaných zvířat signifikantně vyšší při nízkých intenzitách prepulzu (20–30 dB SPL) oproti kontrolním zvířatům

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Aitkin L, Tran L, Syka J (1994). The responses of neurons in subdivisions of the inferior colliculus of cats to tonal, noise and vocal stimuli. *Exp Brain Res* **98**: 53-64
2. Altman JA, Syka J, Shmigidina GN (1970). Neuronal activity in the medial geniculate body of the cat during monaural and binaural stimulation. *Exp Brain Res* **10**: 81-93
3. Altschuler R, Shore S (2010). Central auditory neurotransmitters. In *The Oxford Handbook of Auditory Science. The Auditory Brain.*, Rees A, Palmer A (eds), Vol. 2, 4, pp 65 - 89. New York Oxford University Press Inc.
4. Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B (2007). Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav* **92**: 911-923
5. Andersen BB, Gundersen HJ (1999). Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. *J Microsc* **196**: 69-73
6. Ando S, Ohashi Y (1991). Longitudinal study on age-related changes of working and reference memory in the rat. *Neurosci Lett* **128**: 17-20
7. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K (1997). Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6496-6499
8. Atencio CA, Schreiner CE (2008). Spectrotemporal processing differences between auditory cortical fast-spiking and regular-spiking neurons. *J Neurosci* **28**: 3897-3910
9. Au WWL (2004). The Dolphin Sonar: Excellent Capabilities In Spite of Some Mediocre Properties. *AIP Conference Proceedings* **728**: 247
10. Backoff PM, Caspary DM (1994). Age-related changes in auditory brainstem responses in Fischer 344 rats: effects of rate and intensity. *Hear Res* **73**: 163-172
11. Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* **15**: 303-308
12. Bajo VM, Merchán MA, López DE, Rouiller EM (1993). Neuronal morphology and efferent projections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus in the rat. *J Comp Neurol* **334**: 241-262
13. Banay-Schwartz M, Lajtha A, Palkovits M (1989). Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements. I. Glutamate and related amino acids. *Neurochem Res* **14**: 555-562
14. Barkat TR, Polley DB, Hensch TK (2011). A critical period for auditory thalamocortical connectivity. *Nat Neurosci* **14**: 1189-1194
15. Bartlett EL, Smith PH (1999). Anatomic, intrinsic, and synaptic properties of dorsal and ventral division neurons in rat medial geniculate body. *J Neurophysiol* **81**: 1999-2016
16. Bartos M, Vida I, Jonas P (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* **8**: 45-56
17. Beasley CL, Zhang ZJ, Patten I, Reynolds GP (2002). Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biol Psychiatry* **52**: 708-715
18. Bielefeld EC, Coling D, Chen GD, Li M, Tanaka C, Hu BH, Henderson D (2008). Age-related hearing loss in the Fischer 344/NHsd rat substrain. *Hear Res* **241**: 26-33
19. Blatow M, Caputi A, Burnashev N, Monyer H, Rozov A (2003). Ca<sup>2+</sup> buffer saturation underlies paired pulse facilitation in calbindin-D28k-containing terminals. *Neuron* **38**: 79-88
20. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
21. Brugge JF, O'Connor TA (1984). Postnatal functional development of the dorsal and posteroventral cochlear nuclei of the cat. *J Acoust Soc Am* **75**: 1548-1562
22. Bu J, Sathyendra V, Nagykerly N, Geula C (2003). Age-related changes in calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Neurol* **182**: 220-231
23. Buckiova D, Popelar J, Syka J (2007). Aging cochleas in the F344 rat: morphological and functional changes. *Exp Gerontol* **42**: 629-638
24. Bures Z, Grécová J, Popelár J, Syka J (2010). Noise exposure during early development impairs the processing of sound intensity in adult rats. *Eur J Neurosci* **32**: 155-164
25. Burianova J, Ouda L, Profant O, Syka J (2009). Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* **44**: 161-169

26. Błaszczyk J, Tajchert K (1996). Sex and strain differences of acoustic startle reaction development in adolescent albino Wistar and hooded rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **56**: 919-925
27. Błaszczyk JW, Tajchert K (1997). Effect of acoustic stimulus characteristics on the startle response in hooded rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **57**: 315-321
28. Cai R, Guo F, Zhang J, Xu J, Cui Y, Sun X (2009). Environmental enrichment improves behavioral performance and auditory spatial representation of primary auditory cortical neurons in rat. *Neurobiol Learn Mem* **91**: 366-376
29. Cai R, Zhou X, Guo F, Xu J, Zhang J, Sun X (2010). Maintenance of enriched environment-induced changes of auditory spatial sensitivity and expression of GABAA, NMDA, and AMPA receptor subunits in rat auditory cortex. *Neurobiol Learn Mem* **94**: 452-460
30. Caine SB, Geyer MA, Swerdlow NR (1991). Carbachol infusion into the dentate gyrus disrupts sensorimotor gating of startle in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **105**: 347-354
31. Caine SB, Geyer MA, Swerdlow NR (1992). Hippocampal modulation of acoustic startle and prepulse inhibition in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **43**: 1201-1208
32. Campbell BA, Gaddy JR (1987). Rate of aging and dietary restriction: sensory and motor function in the Fischer 344 rat. *J Gerontol* **42**: 154-159
33. Canlon B, Illing R, Walton J (2010). Cell Biology and Physiology of the Aging Central Auditory Pathway. In *The Aging Auditory System*, Gordon-Salant S, Frisina RD, Popper AN, Fay RR (eds), Vol. 34, 3, pp 39-74. Springer New York
34. Canlon B, Miller J, Flock A, Borg E (1987). Pure tone overstimulation changes the micromechanical properties of the inner hair cell stereocilia. *Hear Res* **30**: 65-72
35. Cant NB, Benson CG (2003). Parallel auditory pathways: projection patterns of the different neuronal populations in the dorsal and ventral cochlear nuclei. *Brain Res Bull* **60**: 457-474
36. Caputi A, Rozov A, Blatow M, Monyer H (2009). Two calretinin-positive GABAergic cell types in layer 2/3 of the mouse neocortex provide different forms of inhibition. *Cereb Cortex* **19**: 1345-1359
37. Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K, Tsai LH, Moore CI (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* **459**: 663-667
38. Carlson S, Willott JF (1996). The behavioral salience of tones as indicated by prepulse inhibition of the startle response: relationship to hearing loss and central neural plasticity in C57BL/6J mice. *Hear Res* **99**: 168-175
39. Carr CE, Edds-Walton PL, Masland RH, Albright TD, Dallos P, Oertel D, Firestein S, Beauchamp GK, Bushnell MC, Basbaum AI, Kaas JH, Gardner EP (2008). 3.30 - Vertebrate Auditory Pathways. In *The Senses: A Comprehensive Reference*, pp 499-523. New York: Academic Press
40. Caspary DM, Holder TM, Hughes LF, Milbrandt JC, McKernan RM, Naritoku DK (1999). Age-related changes in GABA(A) receptor subunit composition and function in rat auditory system. *Neuroscience* **93**: 307-312
41. Caspary DM, Hughes LF, Ling LL (2013). Age-related GABAA receptor changes in rat auditory cortex. *Neurobiol Aging* **34**: 1486-1496
42. Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF (2008). Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol* **211**: 1781-1791
43. Caspary DM, Milbrandt JC, Helfert RH (1995). Central auditory aging: GABA changes in the inferior colliculus. *Exp Gerontol* **30**: 349-360
44. Caspary DM, Raza A, Lawhorn Armour BA, Pippin J, Arnerić SP (1990). Immunocytochemical and neurochemical evidence for age-related loss of GABA in the inferior colliculus: implications for neural presbycusis. *J Neurosci* **10**: 2363-2372
45. Celio MR (1986). Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* **231**: 995-997
46. Celio MR (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**: 375-475
47. Chang EF, Merzenich MM (2003). Environmental noise retards auditory cortical development. *Science* **300**: 498-502
48. Chang HT, Kuo H (1991). Calcium-binding protein (calbindin D-28k) immunoreactive neurons in the basal forebrain of the monkey and the rat: relationship with the cholinergic neurons. *Adv Exp Med Biol* **295**: 119-126
49. Chen CS (1978). Acoustic trauma-induced developmental change in the acoustic startle response and audiogenic seizures in mice. *Exp Neurol* **60**: 400-403
50. Chen GD, Li M, Tanaka C, Bielefeld EC, Hu BH, Kermany MH, Salvi R, Henderson D (2009). Aging outer hair cells (OHCs) in the Fischer 344 rat cochlea: function and morphology. *Hear Res* **248**: 39-47

51. Choi JH, Lee CH, Yoo KY, Hwang IK, Lee IS, Lee YL, Shin HC, Won MH (2010). Age-related changes in calbindin-D28k, parvalbumin, and calretinin immunoreactivity in the dog main olfactory bulb. *Cell Mol Neurobiol* **30**: 1-12
52. Christopher Kirk E, Smith DW (2003). Protection from acoustic trauma is not a primary function of the medial olivocochlear efferent system. *J Assoc Res Otolaryngol* **4**: 445-465
53. Cipolloni PB, Peters A (1979). The bilaminar and banded distribution of the callosal terminals in the posterior neocortex of the rat. *Brain Res* **176**: 33-47
54. Clerici WJ, Coleman JR (1990). Anatomy of the rat medial geniculate body: I. Cytoarchitecture, myeloarchitecture, and neocortical connectivity. *J Comp Neurol* **297**: 14-31
55. Cotter D, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G, MacMillan L, Everall I (2002). The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* **51**: 377-386
56. Coveñas R, De León M, Alonso JR, Arévalo R, Lara J, Aijón J (1991). Distribution of parvalbumin-immunoreactivity in the rat thalamus using a monoclonal antibody. *Arch Ital Biol* **129**: 199-210
57. D'Orlando C, Celio MR, Schwaller B (2002). Calretinin and calbindin D-28k, but not parvalbumin protect against glutamate-induced delayed excitotoxicity in transfected N18-RE 105 neuroblastoma-retina hybrid cells. *Brain Res* **945**: 181-190
58. Dallos P (2008). Cochlear amplification, outer hair cells and prestin. *Current Opinion in Neurobiology* **18**: 370-376
59. Dannhof BJ, Bruns V (1993). The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear Res* **66**: 8-22
60. de Jong GI, Naber PA, Van der Zee EA, Thompson LT, Disterhoft JF, Luiten PG (1996). Age-related loss of calcium binding proteins in rabbit hippocampus. *Neurobiol Aging* **17**: 459-465
61. de Villers-Sidani E, Alzghoul L, Zhou X, Simpson KL, Lin RC, Merzenich MM (2010). Recovery of functional and structural age-related changes in the rat primary auditory cortex with operant training. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 13900-13905
62. de Villers-Sidani E, Chang EF, Bao S, Merzenich MM (2007). Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. *J Neurosci* **27**: 180-189
63. Decker MW, Curzon P, Brioni JD (1995). Influence of separate and combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety, and locomotor activity in rats. *Neurobiol Learn Mem* **64**: 156-168
64. DeFelipe J (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* **14**: 1-19
65. Demeulemeester H, Vandesande F, Orban GA, Heizmann CW, Pochet R (1989). Calbindin D-28K and parvalbumin immunoreactivity is confined to two separate neuronal subpopulations in the cat visual cortex, whereas partial coexistence is shown in the dorsal lateral geniculate nucleus. *Neurosci Lett* **99**: 6-11
66. DiLoreto D, Cox C, Grover DA, Lazar E, del Cerro C, del Cerro M (1994). The influences of age, retinal topography, and gender on retinal degeneration in the Fischer 344 rat. *Brain Res* **647**: 181-191
67. Dong G, Gross K, Qiao F, Ferguson J, Callegari EA, Rezvani K, Zhang D, Gloeckner CJ, Ueffing M, Wang H (2012). Calretinin interacts with huntingtin and reduces mutant huntingtin-caused cytotoxicity. *J Neurochem* **123**: 437-446
68. Dorf DS, Curtin JW (1982). Early cleft palate repair and speech outcome. *Plast Reconstr Surg* **70**: 74-81
69. Doron NN, Ledoux JE (1999). Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* **412**: 383-409
70. Douek E, Dodson HC, Bannister LH, Ashcroft P, Humphries KN (1976). Effects of incubator noise on the cochlea of the newborn. *Lancet* **2**: 1110-1113
71. Druga R, Syka J (1984a). Ascending and descending projections to the inferior colliculus in the rat. *Physiol Bohemoslov* **33**: 31-42
72. Druga R, Syka J (1984b). Neocortical projections to the inferior colliculus in the rat. (An experimental study using anterograde degeneration techniques). *Physiol Bohemoslov* **33**: 251-253
73. Druga R, Syka J (1984c). Projections from auditory structures to the superior colliculus in the rat. *Neurosci Lett* **45**: 247-252
74. Druga R, Syka J (1993). NADPH-diaphorase activity in the central auditory structures of the rat. *Neuroreport* **4**: 999-1002
75. Druga R, Syka J (2001). Effect of auditory cortex lesions on NADPH-diaphorase staining in the inferior colliculus of rat. *Neuroreport* **12**: 1555-1559

76. Druga R, Syka J, Rajkowska G (1997). Projections of auditory cortex onto the inferior colliculus in the rat. *Physiol Res* **46**: 215-222
77. Druga R, Syka J, Rajkowska-Markow G (1988). Localization of Cortical Neurons Projecting to the Inferior Colliculus in the Rat and Guinea Pig. In *Auditory Pathway*, Syka J, Masterton RB (eds), 41, pp 293-298. Springer US
78. Ellwanger J, Geyer MA, Braff DL (2003). The relationship of age to prepulse inhibition and habituation of the acoustic startle response. *Biol Psychol* **62**: 175-195
79. Evans EF (1975). Cochlear Nerve and Cochlear Nucleus. In *Auditory System*, Keidel W, Neff W (eds), Vol. 5 / 2, 1, pp 1-108. Springer Berlin Heidelberg
80. Falk SA, Farmer JC (1973). Incubator noise and possible deafness. *Arch Otolaryngol* **97**: 385-387
81. Felix RA, Portfors CV (2007). Excitatory, inhibitory and facilitatory frequency response areas in the inferior colliculus of hearing impaired mice. *Hear Res* **228**: 212-229
82. Fenton MB, Bell GP (1981). Recognition of species of insectivorous bats by their echolocation calls. *Journal of Mammalogy* **62**: 233-243
83. Figueredo-Cardenas G, Harris CL, Anderson KD, Reiner A (1998). Relative resistance of striatal neurons containing calbindin or parvalbumin to quinolinic acid-mediated excitotoxicity compared to other striatal neuron types. *Exp Neurol* **149**: 356-372
84. Fitzgibbons PJ, Gordon-Salant S (1994). Age effects on measures of auditory duration discrimination. *J Speech Hear Res* **37**: 662-670
85. Foster TC (2007). Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* **6**: 319-325
86. Fredrich M, Reisch A, Illing RB (2009). Neuronal subtype identity in the rat auditory brainstem as defined by molecular profile and axonal projection. *Exp Brain Res* **195**: 241-260
87. Freund TF, Buzsáki G (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**: 347-470
88. Frisina RD (2001). Subcortical neural coding mechanisms for auditory temporal processing. *Hear Res* **158**: 1-27
89. Fritsch B, Pan N, Jahan I, Duncan JS, Kopecky BJ, Elliott KL, Kersigo J, Yang T (2013). Evolution and development of the tetrapod auditory system: an organ of Corti-centric perspective. *Evolution & Development* **15**: 63-79
90. Fung SJ, Fillman SG, Webster MJ, Shannon Weickert C (2014). Schizophrenia and bipolar disorder show both common and distinct changes in cortical interneuron markers. *Schizophr Res*
91. Gage FH, Kelly PA, Björklund A (1984). Regional changes in brain glucose metabolism reflect cognitive impairments in aged rats. *J Neurosci* **4**: 2856-2865
92. Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ (2010). Validating  $\gamma$  oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry* **68**: 1100-1106
93. Gandal MJ, Edgar JC, Klook K, Siegel SJ (2012). Gamma synchrony: towards a translational biomarker for the treatment-resistant symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology* **62**: 1504-1518
94. Gates GA, Mills JH (2005). Presbycusis. *Lancet* **366**: 1111-1120
95. Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H (1993). Development of hearing in neonatal rats: air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* **69**: 236-242
96. Gerken GM (1996). Central tinnitus and lateral inhibition: an auditory brainstem model. *Hear Res* **97**: 75-83
97. Geula C, Bu J, Nagykerly N, Scinto LF, Chan J, Joseph J, Parker R, Wu CK (2003). Loss of calbindin-D28k from aging human cholinergic basal forebrain: relation to neuronal loss. *J Comp Neurol* **455**: 249-259
98. Geula C, Schatz CR, Mesulam MM (1993). Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D28k within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience* **54**: 461-476
99. Geyer MA, Braff DL (1987). Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. *Schizophr Bull* **13**: 643-668
100. Geyer MA, McIlwain KL, Paylor R (2002). Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. *Mol Psychiatry* **7**: 1039-1053
101. Glowa JR, Hansen CT (1994). Differences in response to an acoustic startle stimulus among forty-six rat strains. *Behav Genet* **24**: 79-84
102. Gonchar Y, Burkhalter A (1997). Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cereb Cortex* **7**: 347-358
103. Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A (2007). Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat* **1**: 3



104. Gordon-Salant S, Fitzgibbons PJ, Friedman SA (2007). Recognition of time-compressed and natural speech with selective temporal enhancements by young and elderly listeners. *J Speech Lang Hear Res* **50**: 1181-1193
105. Gordon-Salant S, Lantz J, Fitzgibbons P (1994). Age effects on measures of hearing disability. *Ear Hear* **15**: 262-265
106. Grachev ID, Swarnkar A, Szeverenyi NM, Ramachandran TS, Apkarian AV (2001). Aging alters the multichemical networking profile of the human brain: an in vivo (1)H-MRS study of young versus middle-aged subjects. *J Neurochem* **77**: 292-303
107. Gratton MA, Bateman K, Cannuscio JF, Saunders JC (2008). Outer- and middle-ear contributions to presbycusis in the Brown Norway rat. *Audiol Neurootol* **13**: 37-52
108. Gray DT, Engle JR, Recanzone GH (2014). Age-related neurochemical changes in the rhesus macaque cochlear nucleus. *J Comp Neurol* **522**: 1527-1541
109. Gray DT, Rudolph ML, Engle JR, Recanzone GH (2013). Parvalbumin increases in the medial and lateral geniculate nuclei of aged rhesus macaques. *Front Aging Neurosci* **5**: 69
110. Grose JH, Hall JW, Buss E (2006). Temporal processing deficits in the pre-senescent auditory system. *J Acoust Soc Am* **119**: 2305-2315
111. Grécová J, Bures Z, Popelár J, Suta D, Syka J (2009). Brief exposure of juvenile rats to noise impairs the development of the response properties of inferior colliculus neurons. *Eur J Neurosci* **29**: 1921-1930
112. Gulyás AI, Hájos N, Freund TF (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* **16**: 3397-3411
113. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**: 379-394
114. Gutiérrez A, Khan ZU, Morris SJ, De Blas AL (1994). Age-related decrease of GABAA receptor subunits and glutamic acid decarboxylase in the rat inferior colliculus. *J Neurosci* **14**: 7469-7477
115. Han YK, Köver H, Insanally MN, Semerdjian JH, Bao S (2007). Early experience impairs perceptual discrimination. *Nat Neurosci* **10**: 1191-1197
116. Harbin TJ, Berg WK (1983). The effects of age and prestimulus duration upon reflex inhibition. *Psychophysiology* **20**: 603-610
117. Harding GW, Bohne BA, Vos JD (2005). The effect of an age-related hearing loss gene (Ahl) on noise-induced hearing loss and cochlear damage from low-frequency noise. *Hear Res* **204**: 90-100
118. Harker KT, Whishaw IQ (2002). Place and matching-to-place spatial learning affected by rat inbreeding (Dark-Agouti, Fischer 344) and albinism (Wistar, Sprague-Dawley) but not domestication (wild rat vs. Long-Evans, Fischer-Norway). *Behav Brain Res* **134**: 467-477
119. Hauger RL, Thrivikraman KV, Plotsky PM (1994). Age-related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 344 rats. *Endocrinology* **134**: 1528-1536
120. Heffner HE, Heffner RS, Contos C, Ott T (1994). Audiogram of the hooded Norway rat. *Hearing Research* **73**: 244-247
121. Hefti BJ, Smith PH (2000). Anatomy, physiology, and synaptic responses of rat layer V auditory cortical cells and effects of intracellular GABA(A) blockade. *J Neurophysiol* **83**: 2626-2638
122. Hefti BJ, Smith PH (2003). Distribution and kinetic properties of GABAergic inputs to layer V pyramidal cells in rat auditory cortex. *J Assoc Res Otolaryngol* **4**: 106-121
123. Heizmann CW, Braun K (1992). Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* **15**: 259-264
124. Helfert RH, Sommer TJ, Meeks J, Hofstetter P, Hughes LF (1999). Age-related synaptic changes in the central nucleus of the inferior colliculus of Fischer-344 rats. *J Comp Neurol* **406**: 285-298
125. Henry KR (1972). Pinna reflex thresholds and audiogenic seizures: developmental changes after acoustic priming. *J Comp Physiol Psychol* **79**: 77-81
126. Hernández O, Rees A, Malmierca MS (2006). A GABAergic component in the commissure of the inferior colliculus in rat. *Neuroreport* **17**: 1611-1614
127. Hof PR, Glezer II, Condé F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM (1999). Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J Chem Neuroanat* **16**: 77-116
128. Hoffman HJ (1979). Survival distributions for selected laboratory rat strains and stocks. In *Development of the rodent as a model system for aging*, Gibson DC, Adelman RC, Finch C (eds). Washington, D.C.: U.S.: DREW Pub. No. (NIH)

129. Houston R, Boonman A, Jones G (2004). Do echolocation signal parameters restrict bats' choice of prey? In *Echolocation in Bats and Dolphins*, Thomas J, Moss C, Vater M (eds), pp 339 - 345. Chicago University Press
130. Howard CV, Reed MG (1998). *Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy*, Oxford: BIOS Scientific.
131. Hu BH, Yang WP, Bielefeld EC, Li M, Chen GD, Henderson D (2008). Apoptotic outer hair cell death in the cochleae of aging Fischer 344/NHsd rats. *Hear Res* **245**: 48-57
132. Hua T, Kao C, Sun Q, Li X, Zhou Y (2008). Decreased proportion of GABA neurons accompanies age-related degradation of neuronal function in cat striate cortex. *Brain Res Bull* **75**: 119-125
133. Hubel DH, Wiesel TN (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* **160**: 106-154
134. Hughes LF, Turner JG, Parrish JL, Caspary DM (2010). Processing of broadband stimuli across A1 layers in young and aged rats. *Hear Res* **264**: 79-85
135. Hurley MJ, Brandon B, Gentleman SM, Dexter DT (2013). Parkinson's disease is associated with altered expression of CaV1 channels and calcium-binding proteins. *Brain* **136**: 2077-2097
136. Iacopino AM, Christakos S (1990). Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4078-4082
137. Idrizbegovic E, Salman H, Niu X, Canlon B (2006). Presbycusis and calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of BALB/c mice. *Hear Res* **216-217**: 198-206
138. Insanally MN, Köver H, Kim H, Bao S (2009). Feature-dependent sensitive periods in the development of complex sound representation. *J Neurosci* **29**: 5456-5462
139. Ison JR, Allen PD (2003). Low-frequency tone pips elicit exaggerated startle reflexes in C57BL/6J mice with hearing loss. *J Assoc Res Otolaryngol* **4**: 495-504
140. Ison JR, Allen PD, O'Neill WE (2007). Age-related hearing loss in C57BL/6J mice has both frequency-specific and non-frequency-specific components that produce a hyperacusis-like exaggeration of the acoustic startle reflex. *J Assoc Res Otolaryngol* **8**: 539-550
141. Ison JR, Hammond GR (1971). Modification of the startle reflex in the rat by changes in the auditory and visual environments. *J Comp Physiol Psychol* **75**: 435-452
142. Iwasa H, Potsic WP (1982). Maturation change of early, middle, and late components of the auditory evoked responses in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* **90**: 95-102
143. Jenkins WM, Masterton RB (1982). Sound localization: effects of unilateral lesions in central auditory system. *J Neurophysiol* **47**: 987-1016
144. Jinno S, Kosaka T (2004). Parvalbumin is expressed in glutamatergic and GABAergic corticostriatal pathway in mice. *J Comp Neurol* **477**: 188-201
145. Jinno S, Kosaka T (2006). Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res* **56**: 229-245
146. Jourdan D, Ardid D, Chapuy E, Eschalier A, Le Bars D (1995). Audible and ultrasonic vocalization elicited by single electrical nociceptive stimuli to the tail in the rat. *Pain* **63**: 237-249
147. Kaas JH (1991). Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu Rev Neurosci* **14**: 137-167
148. Kai N, Niki H (2002). Altered tone-induced Fos expression in the mouse inferior colliculus after early exposure to intense noise. *Neurosci Res* **44**: 305-313
149. Kavanagh GL, Kelly JB (1987). Contribution of auditory cortex to sound localization by the ferret (*Mustela putorius*). *J Neurophysiol* **57**: 1746-1766
150. Kawaguchi Y, Kubota Y (1998). Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience* **85**: 677-701
151. Kawase T, Delgutte B, Liberman MC (1993). Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J Neurophysiol* **70**: 2533-2549
152. Kazee AM, West NR (1999). Preservation of synapses on principal cells of the central nucleus of the inferior colliculus with aging in the CBA mouse. *Hear Res* **133**: 98-106
153. Kelly JB, Glazier SJ (1978). Auditory cortex lesions and discrimination of spatial location by the rat. *Brain Res* **145**: 315-321
154. Kelly JB, Kavanagh GL (1986). Effects of auditory cortical lesions on pure-tone sound localization by the albino rat. *Behav Neurosci* **100**: 569-575
155. Kelly JB, Sally SL (1988). Organization of auditory cortex in the albino rat: binaural response properties. *J Neurophysiol* **59**: 1756-1769

156. Kim SA, Jeon JH, Son MJ, Cha J, Chun MH, Kim IB (2010). Changes in transcript and protein levels of calbindin D28k, calretinin and parvalbumin, and numbers of neuronal populations expressing these proteins in an ischemia model of rat retina. *Anat Cell Biol* **43**: 218-229
157. Kimura A, Donishi T, Sakoda T, Hazama M, Tamai Y (2003). Auditory thalamic nuclei projections to the temporal cortex in the rat. *Neuroscience* **117**: 1003-1016
158. Kishimoto J, Tsuchiya T, Cox H, Emson PC, Nakayama Y (1998). Age-related changes of calbindin-D28k, calretinin, and parvalbumin mRNAs in the hamster brain. *Neurobiol Aging* **19**: 77-82
159. Knudsen EI, Konishi M (1978). A neural map of auditory space in the owl. *Science* **200**: 795-797
160. Koch M (1999). The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* **59**: 107-128
161. Koch M, Schnitzler HU (1997). The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res* **89**: 35-49
162. Kodsi MH, Swerdlow NR (1997). Regulation of prepulse inhibition by ventral pallidal projections. *Brain Res Bull* **43**: 219-228
163. Koka K, Read HL, Tollin DJ (2008). The acoustical cues to sound location in the rat: measurements of directional transfer functions. *J Acoust Soc Am* **123**: 4297-4309
164. Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987). GABAergic neurons containing the Ca<sup>2+</sup>-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* **419**: 119-130
165. Kotak VC, DiMattina C, Sanes DH (2001). GABA(B) and Trk receptor signaling mediates long-lasting inhibitory synaptic depression. *J Neurophysiol* **86**: 536-540
166. Kral A (2013). Auditory critical periods: A review from systems perspective. *Neuroscience* **247**: 117-133
167. Kretschmer BD, Koch M (1998). The ventral pallidum mediates disruption of prepulse inhibition of the acoustic startle response induced by dopamine agonists, but not by NMDA antagonists. *Brain Res* **798**: 204-210
168. Krieg WJ (1946a). Connections of the cerebral cortex; the albino rat; structure of the cortical areas. *J Comp Neurol* **84**: 277-323
169. Krieg WJ (1946b). Connections of the cerebral cortex; the albino rat; topography of the cortical areas. *J Comp Neurol* **84**: 221-275
170. Krieg WJ (1947). Connections of the cerebral cortex; the albino rat; extrinsic connections. *J Comp Neurol* **86**: 267-394
171. Krzywkowski P, De Bilbao F, Senut MC, Lamour Y (1995). Age-related changes in parvalbumin- and GABA-immunoreactive cells in the rat septum. *Neurobiol Aging* **16**: 29-40
172. Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994). Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* **649**: 159-173
173. Kungel M, Koch M, Friauf E (1996). Cysteamine impairs the development of the acoustic startle response in rats: possible role of somatostatin. *Neurosci Lett* **202**: 181-184
174. Kvasnák E, Popelár J, Syka J (2000). Discharge properties of neurons in subdivisions of the medial geniculate body of the guinea pig. *Physiol Res* **49**: 369-378
175. Langbauer WR, Payne KB, Charif RA, Rapaport L, Osborn F (1991). African elephants respond to distant playbacks of low-frequency conspecific calls. *Journal of Experimental Biology* **157**: 35-46
176. Ledoux JE, Ruggiero DA, Forest R, Stornetta R, Reis DJ (1987). Topographic organization of convergent projections to the thalamus from the inferior colliculus and spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* **264**: 123-146
177. LeDoux JE, Ruggiero DA, Reis DJ (1985). Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. *J Comp Neurol* **242**: 182-213
178. Lee HJ, Wallani T, Mendelson JR (2002). Temporal processing speed in the inferior colliculus of young and aged rats. *Hear Res* **174**: 64-74
179. Lee YJ, Yan BC, Park JH, Ahn JH, Kim IH, Lee JC, Lee HY, Kim YM, Won MH, Cho JH (2013). Differences of calcium binding proteins immunoreactivities in the young hippocampal CA1 region from the adult following transient ischemic damage. *J Neurol Sci* **326**: 40-47
180. Leventhal AG, Wang Y, Pu M, Zhou Y, Ma Y (2003). GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* **300**: 812-815
181. Liang CL, Sinton CM, Sonsalla PK, German DC (1996). Midbrain dopaminergic neurons in the mouse that contain calbindin-D28k exhibit reduced vulnerability to MPTP-induced neurodegeneration. *Neurodegeneration* **5**: 313-318
182. Liang ZQ, Wang XX, Wang Y, Chuang DM, DiFiglia M, Chase TN, Qin ZH (2005). Susceptibility of striatal neurons to excitotoxic injury correlates with basal levels of Bcl-2 and the induction of P53 and c-Myc immunoreactivity. *Neurobiol Dis* **20**: 562-573

183. Ling LL, Hughes LF, Caspary DM (2005). Age-related loss of the GABA synthetic enzyme glutamic acid decarboxylase in rat primary auditory cortex. *Neuroscience* **132**: 1103-1113
184. Liu BH, Wu GK, Arbuckle R, Tao HW, Zhang LI (2007). Defining cortical frequency tuning with recurrent excitatory circuitry. *Nat Neurosci* **10**: 1594-1600
185. Ludewig K, Ludewig S, Seitz A, Obrist M, Geyer MA, Vollenweider FX (2003). The acoustic startle reflex and its modulation: effects of age and gender in humans. *Biol Psychol* **63**: 311-323
186. Maciag D, Hughes J, O'Dwyer G, Pride Y, Stockmeier CA, Sanacora G, Rajkowska G (2010). Reduced density of calbindin immunoreactive GABAergic neurons in the occipital cortex in major depression: relevance to neuroimaging studies. *Biol Psychiatry* **67**: 465-470
187. Malmierca MS (2003). The structure and physiology of the rat auditory system: an overview. *Int Rev Neurobiol* **56**: 147-211
188. Malmierca MS, Blackstad TW, Osen KK, Karagülle T, Molowny RL (1993). The central nucleus of the inferior colliculus in rat: a Golgi and computer reconstruction study of neuronal and laminar structure. *J Comp Neurol* **333**: 1-27
189. Malmierca MS, Merchán MA (2004). Auditory System. In *The Rat Nervous System*, Paxinos G (ed). San Diego, California: Elsevier Academic Press
190. Malmierca MS, Merchán MA, Henkel CK, Oliver DL (2002). Direct projections from cochlear nuclear complex to auditory thalamus in the rat. *J Neurosci* **22**: 10891-10897
191. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**: 793-807
192. Martin del Campo HN, Measor KR, Razak KA (2012). Parvalbumin immunoreactivity in the auditory cortex of a mouse model of presbycusis. *Hear Res* **294**: 31-39
193. Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP (1996). Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* **16**: 4457-4467
194. Mattson MP (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* **6**: 337-350
195. Mattson MP, Rychlik B, Chu C, Christakos S (1991). Evidence for calcium-reducing and excitatory-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **6**: 41-51
196. Mayhew TM, Gundersen HJ (1996). If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat* **188 ( Pt 1)**: 1-15
197. McCaughan J, Bell J, Hitzemann R (1999). On the relationships of high-frequency hearing loss and cochlear pathology to the acoustic startle response (ASR) and prepulse inhibition of the ASR in the BXD recombinant inbred series. *Behav Genet* **29**: 21-30
198. McFadden SL, Zulas AL, Morgan RE (2010). Age-dependent effects of modafinil on acoustic startle and prepulse inhibition in rats. *Behav Brain Res* **208**: 118-123
199. Meinecke DL, Peters A (1987). GABA immunoreactive neurons in rat visual cortex. *J Comp Neurol* **261**: 388-404
200. Mendelson JR, Lui B (2004). The effects of aging in the medial geniculate nucleus: a comparison with the inferior colliculus and auditory cortex. *Hear Res* **191**: 21-33
201. Mendelson JR, Ricketts C (2001). Age-related temporal processing speed deterioration in auditory cortex. *Hear Res* **158**: 84-94
202. Merchán M, Aguilar LA, Lopez-Poveda EA, Malmierca MS (2005). The inferior colliculus of the rat: quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine. *Neuroscience* **136**: 907-925
203. Merrill DA, Chiba AA, Tuszyński MH (2001). Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *J Comp Neurol* **438**: 445-456
204. Metherate R, Kaur S, Kawai H, Lazar R, Liang K, Rose HJ (2005). Spectral integration in auditory cortex: mechanisms and modulation. *Hear Res* **206**: 146-158
205. Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T (2009). Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* **12**: 444-453
206. Micheyl C, Morlet T, Giraud AL, Collet L, Morgon A (1995). Contralateral suppression of evoked otoacoustic emissions and detection of a multi-tone complex in noise. *Acta Otolaryngol* **115**: 178-182
207. Mikkonen M, Alafuzoff I, Tapiola T, Soininen H, Miettinen R (1999). Subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28K immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **92**: 515-532

208. Milbrandt JC, Albin RL, Caspary DM (1994). Age-related decrease in GABAB receptor binding in the Fischer 344 rat inferior colliculus. *Neurobiol Aging* **15**: 699-703
209. Milbrandt JC, Caspary DM (1995). Age-related reduction of [3H]strychnine binding sites in the cochlear nucleus of the Fischer 344 rat. *Neuroscience* **67**: 713-719
210. Milbrandt JC, Hunter C, Caspary DM (1997). Alterations of GABAA receptor subunit mRNA levels in the aging Fischer 344 rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* **379**: 455-465
211. Miller RJ (1995). Regulation of calcium homeostasis in neurons: the role of calcium-binding proteins. *Biochem Soc Trans* **23**: 629-632
212. Mojumder DK, Wensel TG, Frishman LJ (2008). Subcellular compartmentalization of two calcium binding proteins, calretinin and calbindin-28 kDa, in ganglion and amacrine cells of the rat retina. *Mol Vis* **14**: 1600-1613
213. Moore DR, Irvine DR (1980). Development of binaural input, response patterns, and discharge rate in single units of the cat inferior colliculus. *Exp Brain Res* **38**: 103-108
214. Moreno H, Burghardt NS, Vela-Duarte D, Masciotti J, Hua F, Fenton AA, Schwaller B, Small SA (2012). The absence of the calcium-buffering protein calbindin is associated with faster age-related decline in hippocampal metabolism. *Hippocampus* **22**: 1107-1120
215. Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC (1994). Does the calcium binding protein calretinin protect dopaminergic neurons against degeneration in Parkinson's disease? *Brain Res* **668**: 62-70
216. Moyer JR, Furtak SC, McGann JP, Brown TH (2011). Aging-related changes in calcium-binding proteins in rat perirhinal cortex. *Neurobiol Aging* **32**: 1693-1706
217. Møller A, R. (2000). Hearing: Its Physiology and Pathophysiology. Academy Press, p. 515.
218. Müller A, Kukley M, Stausberg P, Beck H, Müller W, Dietrich D (2005). Endogenous Ca<sup>2+</sup> buffer concentration and Ca<sup>2+</sup> microdomains in hippocampal neurons. *J Neurosci* **25**: 558-565
219. Nadol JB (1988). Comparative anatomy of the cochlea and auditory nerve in mammals. *Hear Res* **34**: 253-266
220. Nayagam BA, Muniak MA, Ryugo DK (2011). The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems. *Hear Res* **278**: 2-20
221. Neimark MA, Andermann ML, Hopfield JJ, Moore CI (2003). Vibrissa resonance as a transduction mechanism for tactile encoding. *Journal of Neuroscience* **23**: 6499-6509
222. Nelken I (2004). Processing of complex stimuli and natural scenes in the auditory cortex. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 474-480
223. Ng MC, Iacopino AM, Quintero EM, Marches F, Sonsalla PK, Liang CL, Speciale SG, German DC (1996). The neurotoxin MPTP increases calbindin-D28k levels in mouse midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Mol Brain Res* **36**: 329-336
224. Noreña AJ, Gourévitch B, Gourevich B, Aizawa N, Eggermont JJ (2006). Spectrally enhanced acoustic environment disrupts frequency representation in cat auditory cortex. *Nat Neurosci* **9**: 932-939
225. Nwabueze-Ogbo FC, Popelár J, Syka J (2002). Changes in the acoustically evoked activity in the inferior colliculus of the rat after functional ablation of the auditory cortex. *Physiol Res* **51 Suppl 1**: S95-S104
226. Ogita ZI, Markert CL (1979). A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **99**: 233-241
227. Oliver DL, Winer JA, Beckius GE, Saint Marie RL (1994). Morphology of GABAergic neurons in the inferior colliculus of the cat. *J Comp Neurol* **340**: 27-42
228. Ouagazzal AM, Reiss D, Romand R (2006). Effects of age-related hearing loss on startle reflex and prepulse inhibition in mice on pure and mixed C57BL and 129 genetic background. *Behav Brain Res* **172**: 307-315
229. Ouda L, Druga R, Syka J (2008). Changes in parvalbumin immunoreactivity with aging in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* **43**: 782-789
230. Ouda L, Nwabueze-Ogbo FC, Druga R, Syka J (2003). NADPH-diaphorase-positive neurons in the auditory cortex of young and old rats. *Neuroreport* **14**: 363-366
231. Ouda L, Syka J (2012). Immunocytochemical profiles of inferior colliculus neurons in the rat and their changes with aging. *Front Neural Circuits* **6**: 68
232. Palombi PS, Caspary DM (1996a). GABA inputs control discharge rate primarily within frequency receptive fields of inferior colliculus neurons. *J Neurophysiol* **75**: 2211-2219
233. Palombi PS, Caspary DM (1996b). Physiology of the aged Fischer 344 rat inferior colliculus: responses to contralateral monaural stimuli. *J Neurophysiol* **76**: 3114-3125
234. Palombi PS, Caspary DM (1996c). Physiology of the young adult Fischer 344 rat inferior colliculus: responses to contralateral monaural stimuli. *Hear Res* **100**: 41-58

235. Palop JJ, Jones B, Kekoni L, Chin J, Yu GQ, Raber J, Masliah E, Mucke L (2003). Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9572-9577
236. Palop JJ, Mucke L, Roberson ED (2011). Quantifying biomarkers of cognitive dysfunction and neuronal network hyperexcitability in mouse models of Alzheimer's disease: depletion of calcium-dependent proteins and inhibitory hippocampal remodeling. *Methods Mol Biol* **670**: 245-262
237. Parham K (1997). Distortion product otoacoustic emissions in the C57BL/6J mouse model of age-related hearing loss. *Hear Res* **112**: 216-234
238. Parham K, Willott JF (1988). Acoustic startle response in young and aging C57BL/6J and CBA/J mice. *Behav Neurosci* **102**: 881-886
239. Paxinos G, Watson C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th edn. San Diego; London: Academic.
240. Paylor R, Crawley JN (1997). Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. *Psychopharmacology (Berl)* **132**: 169-180
241. Payne KB, Langbauer WR, Thomas EM (1986). Infrasonic calls of the asian elephant (*Elephas-maximus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **18**: 297-301
242. Peruzzi D, Bartlett E, Smith PH, Oliver DL (1997). A monosynaptic GABAergic input from the inferior colliculus to the medial geniculate body in rat. *J Neurosci* **17**: 3766-3777
243. Petrovický P (2002). *Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi. III. svazek. Neuroanatomie, smyslová ústrojí a kůže*, Martin, SK: Vydavatelstvo Osveta.
244. Pierson M, Snyder-Keller A (1994). Development of frequency-selective domains in inferior colliculus of normal and neonatally noise-exposed rats. *Brain Res* **636**: 55-67
245. Pierson MG, Swann J (1991). Ontogenetic features of audiogenic seizure susceptibility induced in immature rats by noise. *Epilepsia* **32**: 1-9
246. Pilz PK, Schnitzler HU, Menne D (1987). Acoustic startle threshold of the albino rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* **101**: 67-72
247. Poe BH, Linville C, Brunso-Bechtold J (2001). Age-related decline of presumptive inhibitory synapses in the sensorimotor cortex as revealed by the physical disector. *J Comp Neurol* **439**: 65-72
248. Pollak GD, Burger RM, Park TJ, Klug A, Bauer EE (2002). Roles of inhibition for transforming binaural properties in the brainstem auditory system. *Hear Res* **168**: 60-78
249. Poon PW, Chen X (1992). Postnatal exposure to tones alters the tuning characteristics of inferior collicular neurons in the rat. *Brain Res* **585**: 391-394
250. Popelar J, Grecova J, Rybalko N, Syka J (2008). Comparison of noise-induced changes of auditory brainstem and middle latency response amplitudes in rats. *Hear Res* **245**: 82-91
251. Popelar J, Groh D, Mazelova J, Syka J (2003). Cochlear function in young and adult Fischer 344 rats. *Hear Res* **186**: 75-84
252. Popelar J, Groh D, Pelánová J, Canlon B, Syka J (2006). Age-related changes in cochlear and brainstem auditory functions in Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging* **27**: 490-500
253. Popelar J, Mazelová J, Syka J (2002). Effects of electrical stimulation of the inferior colliculus on 2f1-f2 distortion product otoacoustic emissions in anesthetized guinea pigs. *Hear Res* **170**: 116-126
254. Popelár J, Erre JP, Aran JM, Cazals Y (1994). Plastic changes in ipsi-contralateral differences of auditory cortex and inferior colliculus evoked potentials after injury to one ear in the adult guinea pig. *Hear Res* **72**: 125-134
255. Popelár J, Nwabueze-Ogbo FC, Syka J (2003). Changes in neuronal activity of the inferior colliculus in rat after temporal inactivation of the auditory cortex. *Physiol Res* **52**: 615-628
256. Popelár J, Syka J (1982). Response properties of neurons in the inferior colliculus of the guinea-pig. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **42**: 299-310
257. Popelár J, Groh D, Syka J (2005). Age-related changes in cochlear function in young and adult Fischer 344 rats. In *Plasticity and signal representation in the auditory system*, Syka J, Merzenich M (eds), 20, pp 227-232. Springer US
258. Popelár J, Rybalko N, Burianová J, Schwaller B, Syka J (2013). The effect of parvalbumin deficiency on the acoustic startle response and prepulse inhibition in mice. *Neurosci Lett* **553**: 216-220
259. Potier B, Jouvenceau A, Epelbaum J, Dutar P (2006). Age-related alterations of GABAergic input to CA1 pyramidal neurons and its control by nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampus. *Neuroscience* **142**: 187-201

260. Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994). Morphology and spatial distribution of GABAergic neurons in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol* **344**: 349-382
261. Profant O, Balogová Z, Dezortová M, Wagnerová D, Hájek M, Syka J (2013a). Metabolic changes in the auditory cortex in presbycusis demonstrated by MR spectroscopy. *Exp Gerontol* **48**: 795-800
262. Profant O, Burianová J, Syka J (2013b). The response properties of neurons in different fields of the auditory cortex in the rat. *Hear Res* **296**: 51-59
263. Profant O, Škoch A, Balogová Z, Tintěra J, Hlinka J, Syka J (2014). Diffusion tensor imaging and MR morphometry of the central auditory pathway and auditory cortex in aging. *Neuroscience* **260**: 87-97
264. Pujol R, Puel JL (1999). Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci* **884**: 249-254
265. Purves D (2004). *Neuroscience*: Sinauer Associates Incorporated.
266. Rasmussen GL (1946). The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *The Journal of Comparative Neurology* **84**: 141-219
267. Raza A, Milbrandt JC, Arneric SP, Caspary DM (1994). Age-related changes in brainstem auditory neurotransmitters: measures of GABA and acetylcholine function. *Hear Res* **77**: 221-230
268. Reynolds GP, Abdul-Monim Z, Neill JC, Zhang ZJ (2004). Calcium binding protein markers of GABA deficits in schizophrenia--postmortem studies and animal models. *Neurotox Res* **6**: 57-61
269. Richardson BD, Ling LL, Uteshev VV, Caspary DM (2013). Reduced GABA(A) receptor-mediated tonic inhibition in aged rat auditory thalamus. *J Neurosci* **33**: 1218-1227a
270. Richman LC, Eliason MJ, Lindgren SD (1988). Reading disability in children with clefts. *Cleft Palate J* **25**: 21-25
271. Robertson D (1983). Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear Res* **9**: 263-278
272. Roger M, Arnault P (1989). Anatomical study of the connections of the primary auditory area in the rat. *J Comp Neurol* **287**: 339-356
273. Rogers JH (1987). Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol* **105**: 1343-1353
274. Romand R, Avan P (1997). Anatomical and Functional Aspects of the Cochlear Nucleus. In *The Central Auditory System*, Ehret G, Romand R (eds). New York: Oxford University Press
275. Romanski LM, LeDoux JE (1993). Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb Cortex* **3**: 515-532
276. Rossiter SJ, Zhang S, Liu Y (2011). Prestin and high frequency hearing in mammals. *Commun Integr Biol* **4**: 236-239
277. Roth B, Bruns V (1992). Postnatal development of the rat organ of Corti. II. Hair cell receptors and their supporting elements. *Anat Embryol (Berl)* **185**: 571-581
278. Roux S, Hubert I, Lenègre A, Milinkevitch D, Porsolt RD (1994). Effects of piracetam on indices of cognitive function in a delayed alternation task in young and aged rats. *Pharmacol Biochem Behav* **49**: 683-688
279. Rubenstein JL, Merzenich MM (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* **2**: 255-267
280. Rybalko N, Bureš Z, Burianová J, Popelář J, Grécová J, Syka J (2011). Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. *Physiol Behav* **102**: 453-458
281. Rybalko N, Suta D, Nwabueze-Ogbo F, Syka J (2006). Effect of auditory cortex lesions on the discrimination of frequency-modulated tones in rats. *Eur J Neurosci* **23**: 1614-1622
282. Rybalko N, Suta D, Popelář J, Syka J (2010). Inactivation of the left auditory cortex impairs temporal discrimination in the rat. *Behav Brain Res* **209**: 123-130
283. Rybalko N, Syka J (2001). Susceptibility to noise exposure during postnatal development in rats. *Hear Res* **155**: 32-40
284. Ryugo DK, Killackey HP (1974). Differential telencephalic projections of the medial and ventral divisions of the medial geniculate body of the rat. *Brain Res* **82**: 173-177
285. Ryugo DK, Parks TN (2003). Primary innervation of the avian and mammalian cochlear nucleus. *Brain Res Bull* **60**: 435-456
286. Sakai T, Oshima A, Nozaki Y, Ida I, Haga C, Akiyama H, Nakazato Y, Mikuni M (2008). Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology* **28**: 143-150

287. Salvi RJ, Wang J, Ding D (2000). Auditory plasticity and hyperactivity following cochlear damage. *Hear Res* **147**: 261-274
288. Sanes DH, Constantine-Paton M (1985). The sharpening of frequency tuning curves requires patterned activity during development in the mouse, *Mus musculus*. *J Neurosci* **5**: 1152-1166
289. Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1983). Corticosterone receptors decline in a site-specific manner in the aged rat brain. *Brain Res* **289**: 235-240
290. Sass B, Rabstein LS, Madison R, Nims RM, Peters RL, Kelloff GJ (1975). Incidence of spontaneous neoplasms in F344 rats throughout the natural life-span. *J Natl Cancer Inst* **54**: 1449-1456
291. Saunders JC, Chen CS (1982). Sensitive periods of susceptibility to auditory trauma in mammals. *Environ Health Perspect* **44**: 63-66
292. Scharfman HE, Schwartzkroin PA (1989). Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science* **246**: 257-260
293. Schmolesky MT, Wang Y, Pu M, Leventhal AG (2000). Degradation of stimulus selectivity of visual cortical cells in senescent rhesus monkeys. *Nat Neurosci* **3**: 384-390
294. Schreiner CE, Read HL, Sutter ML (2000). Modular organization of frequency integration in primary auditory cortex. *Annu Rev Neurosci* **23**: 501-529
295. Schuknecht HF, Gacek MR (1993). Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **102**: 1-16
296. Shaw EAG (1974). Transformation of sound pressure level from free field to eardrum in horizontal plane. *Journal of the Acoustical Society of America* **56**: 1848-1861
297. Sheets LP, Dean KF, Reiter LW (1988). Ontogeny of the acoustic startle response and sensitization to background noise in the rat. *Behav Neurosci* **102**: 706-713
298. Sheikh SN, Martin SB, Martin DL (1999). Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain. *Neurochem Int* **35**: 73-80
299. Shetty AK, Turner DA (1998). Hippocampal interneurons expressing glutamic acid decarboxylase and calcium-binding proteins decrease with aging in Fischer 344 rats. *J Comp Neurol* **394**: 252-269
300. Shi CJ, Cassell MD (1997). Cortical, thalamic, and amygdaloid projections of rat temporal cortex. *J Comp Neurol* **382**: 153-175
301. Shi L, Argenta AE, Winseck AK, Brunso-Bechtold JK (2004). Stereological quantification of GAD-67-immunoreactive neurons and boutons in the hippocampus of middle-aged and old Fischer 344 x Brown Norway rats. *J Comp Neurol* **478**: 282-291
302. Shi L, Pang H, Linville MC, Bartley AN, Argenta AE, Brunso-Bechtold JK (2006). Maintenance of inhibitory interneurons and boutons in sensorimotor cortex between middle and old age in Fischer 344 X Brown Norway rats. *J Chem Neuroanat* **32**: 46-53
303. Shim HJ, Lee LH, Huh Y, Lee SY, Yeo SG (2012). Age-related changes in the expression of NMDA, serotonin, and GAD in the central auditory system of the rat. *Acta Otolaryngol* **132**: 44-50
304. Sibille E, Morris HM, Kota RS, Lewis DA (2011). GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* **14**: 721-734
305. Sigmund L, Hanák V, Pravda O (1994). *Zoologie strunatců*, Praha: Karolinum.
306. Sinex DG, López DE, Warr WB (2001). Electrophysiological responses of cochlear root neurons. *Hear Res* **158**: 28-38
307. Smith PH (1992). Anatomy and physiology of multipolar cells in the rat inferior collicular cortex using the in vitro brain slice technique. *J Neurosci* **12**: 3700-3715
308. Smith PH, Uhlrich DJ, Manning KA, Banks MI (2012). Thalamocortical projections to rat auditory cortex from the ventral and dorsal divisions of the medial geniculate nucleus. *J Comp Neurol* **520**: 34-51
309. Snell KB (1997). Age-related changes in temporal gap detection. *J Acoust Soc Am* **101**: 2214-2220
310. Soghomonian JJ, Martin DL (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* **19**: 500-505
311. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature* **459**: 698-702
312. Soontornniyomkij V, Risbrough VB, Young JW, Soontornniyomkij B, Jeste DV, Achim CL (2012). Hippocampal calbindin-1 immunoreactivity correlate of recognition memory performance in aged mice. *Neurosci Lett* **516**: 161-165
313. Spoenclin H (1969). Innervation patterns in the organ of corti of the cat. *Acta Otolaryngol* **67**: 239-254
314. Spoenclin H (1972). Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol* **73**: 235-248



315. Spongr VP, Flood DG, Frisina RD, Salvi RJ (1997). Quantitative measures of hair cell loss in CBA and C57BL/6 mice throughout their life spans. *J Acoust Soc Am* **101**: 3546-3553
316. Spreafico R, Hayes NL, Rustioni A (1981). Thalamic projections to the primary and secondary somatosensory cortices in cat: single and double retrograde tracer studies. *J Comp Neurol* **203**: 67-90
317. Stanley DP, Shetty AK (2004). Aging in the rat hippocampus is associated with widespread reductions in the number of glutamate decarboxylase-67 positive interneurons but not interneuron degeneration. *J Neurochem* **89**: 204-216
318. Steinert JR, Kopp-Scheinpflug C, Baker C, Challiss RA, Mistry R, Haustein MD, Griffin SJ, Tong H, Graham BP, Forsythe ID (2008). Nitric oxide is a volume transmitter regulating postsynaptic excitability at a glutamatergic synapse. *Neuron* **60**: 642-656
319. Sun Y, Farzan F, Barr MS, Kirihara K, Fitzgerald PB, Light GA, Daskalakis ZJ (2011).  $\gamma$  oscillations in schizophrenia: mechanisms and clinical significance. *Brain Res* **1413**: 98-114
320. Suta D, Popelář J, Burianová J, Syka J (2013). Cortical representation of species-specific vocalizations in guinea pig. *PLoS One* **8**: e65432
321. Suta D, Rybalko N, Pelánová J, Popelář J, Syka J (2011). Age-related changes in auditory temporal processing in the rat. *Exp Gerontol* **46**: 739-746
322. Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL (2001). Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* **156**: 194-215
323. Swerdlow NR, Shoemaker JM, Crain S, Goins J, Onozuka K, Auerbach PP (2004). Sensitivity to drug effects on prepulse inhibition in inbred and outbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* **77**: 291-302
324. Syka J (2002). Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. *Physiol Rev* **82**: 601-636
325. Syka J (2010). The Fischer 344 rat as a model of presbycusis. *Hear Res* **264**: 70-78
326. Syka J, Popelář J (1984). Inferior colliculus in the rat: neuronal responses to stimulation of the auditory cortex. *Neurosci Lett* **51**: 235-240
327. Syka J, Popelář J, Kvasnák E, Astl J (2000). Response properties of neurons in the central nucleus and external and dorsal cortices of the inferior colliculus in guinea pig. *Exp Brain Res* **133**: 254-266
328. Syka J, Radil-Weiss T (1971). The role of tectum in oculomotor mechanisms in cat. *Act Nerv Super (Praha)* **13**: 109-110
329. Syka J, Radionova EA, Popelář J (1981a). Discharge characteristics of neuronal pairs in the rabbit inferior colliculus. *Exp Brain Res* **44**: 11-18
330. Syka J, Robertson D, Johnstone BM (1988). Efferent descending projections from the inferior colliculus in guinea pig. In *Auditory Pathway*, Syka J, Masterton RB (eds), 42, pp 299-303. Springer US
331. Syka J, Straschill M (1970). Activation of superior colliculus neurons and motor responses after electrical stimulation of the inferior colliculus. *Exp Neurol* **28**: 384-392
332. Syka J, Voldřich L, Vrabec F (1981b). *Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu*, 1 edn. Praha: Avicenum.
333. Tadros SF, D'Souza M, Zettel ML, Zhu X, Lynch-Erhardt M, Frisina RD (2007a). Serotonin 2B receptor: upregulated with age and hearing loss in mouse auditory system. *Neurobiol Aging* **28**: 1112-1123
334. Tadros SF, D'Souza M, Zettel ML, Zhu X, Waxmonsky NC, Frisina RD (2007b). Glutamate-related gene expression changes with age in the mouse auditory midbrain. *Brain Res* **1127**: 1-9
335. Takahashi K, Nagai T, Kamei H, Maeda K, Matsuya T, Arai S, Mizoguchi H, Yoneda Y, Nabeshima T, Takuma K, Yamada K (2007). Neural circuits containing pallidotegmental GABAergic neurons are involved in the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. *Biol Psychiatry* **62**: 148-157
336. Tian N, Petersen C, Kash S, Baekkeskov S, Copenhagen D, Nicoll R (1999). The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12911-12916
337. Tooney PA, Chahl LA (2004). Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**: 273-278
338. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354
339. Trussell LO (1997). Cellular mechanisms for preservation of timing in central auditory pathways. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 487-492
340. Turecek R, Trussell LO (2002). Reciprocal developmental regulation of presynaptic ionotropic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13884-13889

341. Turner JG, Hughes LF, Caspary DM (2005a). Affects of aging on receptive fields in rat primary auditory cortex layer V neurons. *J Neurophysiol* **94**: 2738-2747
342. Turner JG, Hughes LF, Caspary DM (2005b). Divergent response properties of layer-V neurons in rat primary auditory cortex. *Hear Res* **202**: 129-140
343. van Brederode JF, Helliesen MK, Hendrickson AE (1991). Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calbindin-D28k in the sensorimotor cortex of the rat. *Neuroscience* **44**: 157-171
344. van den Buuse M, Simpson ER, Jones ME (2003). Prepulse inhibition of acoustic startle in aromatase knock-out mice: effects of age and gender. *Genes Brain Behav* **2**: 93-102
345. Varty GB, Hauger RL, Geyer MA (1998). Aging effects on the startle response and startle plasticity in Fischer F344 rats. *Neurobiol Aging* **19**: 243-251
346. Varty GB, Higgins GA (1994). Differences between three rat strains in sensitivity to prepulse inhibition of an acoustic startle response: influence of apomorphine and phencyclidine pretreatment. *J Psychopharmacol* **8**: 148-156
347. Vaughan DW (1977). Age-related deterioration of pyramidal cell basal dendrites in rat auditory cortex. *J Comp Neurol* **171**: 501-515
348. Vaughan DW, Vincent JM (1979). Ultrastructure of neurons in the auditory cortex of ageing rats: a morphometric study. *J Neurocytol* **8**: 215-228
349. Vela J, Gutierrez A, Vitorica J, Ruano D (2003). Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J Neurochem* **85**: 368-377
350. Verkhratsky A, Toescu EC (1998). Calcium and neuronal ageing. *Trends Neurosci* **21**: 2-7
351. Walton JP, Frisina RD, O'Neill WE (1998). Age-related alteration in processing of temporal sound features in the auditory midbrain of the CBA mouse. *J Neurosci* **18**: 2764-2776
352. Walton JP, Simon H, Frisina RD (2002). Age-related alterations in the neural coding of envelope periodicities. *J Neurophysiol* **88**: 565-578
353. Wang AY, Lohmann KM, Yang CK, Zimmerman EI, Pantazopoulos H, Herring N, Berretta S, Heckers S, Konradi C (2011). Bipolar disorder type I and schizophrenia are accompanied by decreased density of parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons in the parahippocampal region. *Acta Neuropathol* **122**: 615-626
354. Webb AA, Gowribai K, Muir GD (2003). Fischer (F-344). rats have different morphology, sensorimotor and locomotor abilities compared to Lewis, Long-Evans, Sprague-Dawley and Wistar rats. *Behav Brain Res* **144**: 143-156
355. Weedman DL, Ryugo DK (1996). Pyramidal cells in primary auditory cortex project to cochlear nucleus in rat. *Brain Res* **706**: 97-102
356. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* **231**: 482-497
357. Westerink RH, Beekwilder JP, Wadman WJ (2012). Differential alterations of synaptic plasticity in dentate gyrus and CA1 hippocampal area of Calbindin-D28K knockout mice. *Brain Res* **1450**: 1-10
358. Willott JF, Parham K, Hunter KP (1988). Response properties of inferior colliculus neurons in young and very old CBA/J mice. *Hear Res* **37**: 1-14
359. Winer JA, Kelly JB, Larue DT (1999). Neural architecture of the rat medial geniculate body. *Hear Res* **130**: 19-41
360. Winer JA, Larue DT (1988). Anatomy of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons and axons in the rat medial geniculate body. *J Comp Neurol* **278**: 47-68
361. Winer JA, Saint Marie RL, Larue DT, Oliver DL (1996). GABAergic feedforward projections from the inferior colliculus to the medial geniculate body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8005-8010
362. Woo NH, Lu B (2006). Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders. *Neuroscientist* **12**: 43-56
363. Woodruff-Pak DS (1997). *The Neuropsychology of Aging*: Wiley
364. Wu HC, Lecain E, Chiappini I, Yang TH, Tran Ba Huy P (2003). Influence of auditory deprivation upon the tonopic organization in the inferior colliculus: a Fos immunocytochemical study in the rat. *Eur J Neurosci* **17**: 2540-2552
365. Xu J, Yu L, Cai R, Zhang J, Sun X (2010a). Early continuous white noise exposure alters auditory spatial sensitivity and expression of GAD65 and GABAA receptor subunits in rat auditory cortex. *Cereb Cortex* **20**: 804-812

366. Xu J, Yu L, Zhang J, Cai R, Sun X (2010b). Early continuous white noise exposure alters l-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit glutamate receptor 2 and gamma-aminobutyric acid type a receptor subunit beta3 protein expression in rat auditory cortex. *J Neurosci Res* **88**: 614-619
367. Yau JL, Olsson T, Morris RG, Meaney MJ, Seckl JR (1995). Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience* **66**: 571-581
368. Yeomans JS, Bosch D, Alves N, Daros A, Ure RJ, Schmid S (2010). GABA receptors and prepulse inhibition of acoustic startle in mice and rats. *Eur J Neurosci* **31**: 2053-2061
369. Yeomans JS, Frankland PW (1995). The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res Brain Res Rev* **21**: 301-314
370. Young JS, Fechter LD (1983). Reflex inhibition procedures for animal audiometry: a technique for assessing ototoxicity. *J Acoust Soc Am* **73**: 1686-1693
371. Zettel ML, Frisina RD, Haider SE, O'Neill WE (1997). Age-related changes in calbindin D-28k and calretinin immunoreactivity in the inferior colliculus of CBA/CAJ and C57Bl/6 mice. *J Comp Neurol* **386**: 92-110
372. Zhang H, Cai R, Zhang J, Pan Y, Sun X (2009). Environmental enrichment enhances directional selectivity of primary auditory cortical neurons in rats. *Neurosci Lett* **463**: 162-165
373. Zhang LI, Bao S, Merzenich MM (2001). Persistent and specific influences of early acoustic environments on primary auditory cortex. *Nat Neurosci* **4**: 1123-1130
374. Zhang LI, Bao S, Merzenich MM (2002). Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2309-2314
375. Zhang Y, Zhao Y, Zhu X, Sun X, Zhou X (2013). Refining cortical representation of sound azimuths by auditory discrimination training. *J Neurosci* **33**: 9693-9698
376. Zilles K (1985). *The cortex of the rat: a stereotaxic atlas*, Berlin; New York: Springer-Verlag.
377. Zilles K, Zilles B, Schleicher A (1980). A quantitative approach to cytoarchitectonics. VI. The areal pattern of the cortex of the albino rat. *Anat Embryol (Berl)* **159**: 335-360

## 9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

**Publikace v impaktovaných časopisech, které jsou podkladem dizertační práce a příspěvky jednotlivých spoluautorů:**

1. **Burianova J**, Ouda L, Profant O, Syka J: Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol*, 2009; 44(3): 161–9.  
**(IF 3,91)**

**Příspěvky v experimentální části:**

Odběr vzorků pro western blot: Profant O, Ouda L

Western blot: **Burianova J**

Vyhodnocení western blotu: **Burianova J**

Perfuze: Ouda L

Vyhodnocení imunohistochemických preparátů: Ouda L

Statistická analýza dat: **Burianova J**, Ouda L

**Příspěvky v teoretické části:**

Vedení pokusů a supervize manuskriptu: Syka J

2. Ouda L, **Burianova J**, Syka J: Age-related changes in calbindin and calretinin immunoreactivity in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol*, 2012; 47 (7): 497–506.  
**(IF 3,91)**

**Příspěvky v experimentální části:**

Odběr vzorků pro western blot: Ouda L

Western blot: **Burianova J**

Vyhodnocení western blotu: **Burianova J**

Perfuze: Ouda L

Vyhodnocení imunohistochemických preparátů: Ouda L

Statistická analýza dat: **Burianova J**, Ouda L

**Příspěvky v teoretické části:**

Vedení pokusu a supervize manuskriptu: Syka J

- Rybalko N, Bures Z, **Burianova J**, Popelar J, Poon PWF, Syka J: Age-related changes in the acoustic startle reflex in Fischer 344 and Long Evans rats. *Exp. Gerontol*, 2012; 47(12): 966-973.

**(IF 3,91)**

**Příspěvky v experimentální části:**

Elektrofyzilogický záznam ABR: **Burianova J**, Rybalko N, Poon PWF

Behaviorální testování ASR a PPI: **Burianova J**

Vyhodnocování dat: **Burianova J**, Rybalko N

Statistická analýza dat: Bures Z, **Burianova J**

**Příspěvky v teoretické části:**

Vedení pokusu a supervize manuskriptu: Popelar J, Syka J

- Rybalko N, Bures Z, **Burianova J**, Popelar J, Grecova J, Syka J: Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. *Physiol Behav*, 2011; 102(5): 453–8.

**(IF 3,16)**

**Příspěvky v experimentální části:**

Elektrofyzilogický záznam ABR: Grecova J, Popelar J

Behaviorální testování ASR a PPI: **Burianova J**

Vyhodnocování dat: **Burianova J**, Rybalko N

Statistická analýza dat: Bures Z, **Burianova J**

**Příspěvky v teoretické části:**

Vedení pokusu a supervize manuskriptu: Syka J

**Ostatní publikace:**

- Profant O, **Burianova J**, Syka J: The response properties of neurons in different fields of the auditory cortex in the rat. *Hear Res*, 2013; 296:51-9.

**(IF 2,54)**

- Suta D, Popelar J, **Burianova J**, Syka J.: Cortical representation of species-specific vocalizations in guinea pig. *PLoS One*, 2013; 8(6):e65432.

**(IF 3,73)**

- Popelar J, Rybalko N, **Burianova J**, Schwaller B and Syka J: The effect of parvalbumin deficiency on the acoustic startle response and prepulse inhibition in mice. *Neuroscience Letters*, 2013;553: 216–220.

**(IF 2,03)**

- Klevstig MJ, Markova I, **Burianova J**, Kazdova L, Pravenec M, Novakova O, Novak F.: Role of FAT/CD36 in novel PKC isoform activation in heart of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*, 2011; 357(1-2): 163–9.

**(IF 2,33)**

