

SOUHRN

Sluchový systém savců podléhá v průběhu života změnám spojeným se stárnutím. V první části této práce jsme v colliculus inferior (CI) a ve sluchové kůře prokázali signifikantní změny histo- a imunohistochemických markerů charakterizujících populaci inhibičních interneuronů, které souvisejí s centrální komponentou presbyakuze. Zároveň naše výsledky ukazují, že část těchto změn je zřejmě rysem provázejícím stárnutí mozku, zatímco k některým změnám dochází v návaznosti na primární pokles ascendentní stimulace z periferního smyslového orgánu (kochley). Testovali jsme za tímto účelem dva kmeny potkanů, Long Evans, s normálním průběhem stárnutí a dobře zachovanou funkcí sluchu do vysokého věku, a kmen Fischer 344, jehož zrychlené stárnutí provází také výrazné zhoršení sluchu.

Navazující součástí našeho přístupu k problematice byla práce, v níž jsme pozitivně ovlivnili rozvoj periferní, nitroušní, formy presbyakuze perorální aplikací léku, který by mohl zlepšit cévní zásobení kochley – atorvastatinu. Zvolili jsme k tomuto účelu kmen myši C57BL/6J, standardní model senzorieurální presbyakuze progredující již od 3. měsíce věku, a dále myši kmen apoE^{-/-}, standardní model aterogenní hypercholesterolemie.

Změny v pozitivitě nikotinamid adenin dinukleotid fosfát – diaforázy (NADPH-d)

Ve sluchové kůře starých potkanů kmene Long Evans jsme našli snížení počtu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů. Vzhledem k současnému výraznému ztenčení sluchové kůry o cca 40%, se ale NADPH-d-pozitivní neurony nacházely podstatně blíže u sebe, než tomu bylo u mladých zvířat. Staří potkani Long Evans byli v tomto případě cca o půl roku starší než v dalších experimentech (PV,GAD), kde jsme podobnou redukcí mozkové kůry již nezaznamenali. Dále jsme našli zvýšený počet dendritických segmentů i bifurkací připadajících na jeden neuron, zatímco průměrná délka jednoho dendritického segmentu se naopak zkrátila. Celková délka viditelných dendritů jednoho neuronu tak zůstala přibližně stejná jako u mladých zvířat. Pokles počtu a přestavba NADPH-d-pozitivních neuronů by mohly být příspěvkem či průvodním jevem změny funkce centrálního sluchového systému ve stáří.

Změny v imunoreaktivitě parvalbuminu (PV)

V CI u kmene Long Evans bylo nalezeno zvýšení počtu a optické denzity PV-ir neuronů, zatímco ve sluchové kůře byly změny nepříliš výrazné. U kmene Fischer 344 byla v colliculus inferior patrná spíše tendence ke snížení počtu PV-ir buněk a signifikantně se zmenšil objem jejich somat. Ve sluchové kůře starých potkanů tohoto kmene byly ale přítomny výrazné

ohniskové úbytky imunoreaktivních buněk, které vedly k celkovému poklesu průměrného počtu PV-ir neuronů. V řezech barvených podle Nissla přitom žádné úbytky neuronů nebyly patrné. Úbytek exprese parvalbuminu může být důsledkem poklesu stimulace z patologické kochley, protože však pokles počtu parvalbuminových neuronů byl u starých potkanů Fischer 344 pozorován i v retrosplenální a zrakové kůře, je možné ho dát i do souvislosti s patologickým průběhem stárnutí tohoto kmene. Naopak u potkanů Long Evans by zachovalá funkce sluchu ve stáří mohla mít vliv i na uchování funkční sítě parvalbuminových neuronů ve sluchové dráze.

Změny v imunoreaktivitě a hladinách glutamátdekarboxylázy (GAD)

Ačkoliv PV-ir neurony tvoří významnou populaci GABAergních neuronů, změny v imunoreaktivitě GAD (izoforem GAD65 a 67), klíčového enzymu pro tvorbu GABA, byly ve stáří poněkud odlišné. Naše výsledky u starých potkanů kmene Long Evans i Fischer 344 shodně prokázaly v colliculus inferior i ve sluchové kůře výrazný a uniformní úbytek GAD65 a GAD67 zahrnující: snížení počtu GAD65 a GAD67 imunoreaktivních neuronů, snížení intenzity jejich imunoreakce a pokles hladin obou proteinů na polovinu hodnoty u mladých jedinců obou kmenů zjištěný pomocí western blotu. Méně výrazný pokles imunoreaktivity a hladin GAD jsme našli i ve zrakové kůře obou kmenů. Jsme tudíž oprávněni vyslovit hypotézu, že úbytek GAD v colliculus inferior a sluchové kůře ve stáří není závislý na redukcí aferentní stimulace z vnitřního ucha, ale přinejmenším částečně se jedná o charakteristický rys stárnoucího mozku.

Vliv atorvastatinu na progresi poškození sluchu u myši C57BL/6J a apoE^{-/-}

Citlivým a časným indikátorem zhoršení funkce vnějších vláskových buněk jsou změny v distorzních produktech otoakustických emisí (DPOAE). U myši kmene C57 jsme po 8-týdenní perorální aplikaci atorvastatinu našli vyšší amplitudy DPOAE než u kontrolních zvířat. Na vysokých frekvencích (19-27 kHz) byl tento rozdíl statisticky významný. Snížená exprese markerů zánětlivého endotelu v aortě zároveň potvrdila u těchto zvířat pozitivní vliv atorvastatinu na cévní výstelku. Současné zjištění nezměněných hladin cholesterolu ukázalo, že pozitivní efekt atorvastatinu není zprostředkovaný snížením hladin lipidů v krvi. Naopak u hypercholesterolemického kmene apoE^{-/-} nemělo podávání atorvastatinu za stejných podmínek žádný pozitivní efekt. Výsledky našeho experimentu tak ukazují, že atorvastatin může zpomalovat poškození funkce vnějších vláskových buněk u myši kmene C57; a tedy, že statiny mohou mít pozitivní účinek přinejmenším v případě senzorieurální formy presbyakuze.

SOUHRN

Sluchový systém savců podléhá v průběhu života změnám spojeným se stárnutím. V první části této práce jsme v colliculus inferior (CI) a ve sluchové kůře prokázali signifikantní změny histo- a imunohistochemických markerů charakterizujících populaci inhibičních interneuronů, které souvisejí s centrální komponentou presbyakuze. Zároveň naše výsledky ukazují, že část těchto změn je zřejmě rysem provázejícím stárnutí mozku, zatímco k některým změnám dochází v návaznosti na primární pokles ascendentní stimulace z periferního smyslového orgánu (kochley). Testovali jsme za tímto účelem dva kmeny potkanů, Long Evans, s normálním průběhem stárnutí a dobře zachovanou funkcí sluchu do vysokého věku, a kmen Fischer 344, jehož zrychlené stárnutí provází také výrazné zhoršení sluchu.

Navazující součástí našeho přístupu k problematice byla práce, v níž jsme pozitivně ovlivnili rozvoj periferní, nitroušní, formy presbyakuze perorální aplikací léku, který by mohl zlepšit cévní zásobení kochley – atorvastatinu. Zvolili jsme k tomuto účelu kmen myši C57BL/6J, standardní model senzorineurální presbyakuze progredující již od 3. měsíce věku, a dále myši kmen apoE^{-/-}, standardní model aterogenní hypercholesterolemie.

Změny v pozitivitě nikotinamid adenin dinukleotid fosfát – diaforázy (NADPH-d)

Ve sluchové kůře starých potkanů kmene Long Evans jsme našli snížení počtu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů. Vzhledem k současnému výraznému ztenčení sluchové kůry o cca 40%, se ale NADPH-d-pozitivní neurony nacházely podstatně blíže u sebe, než tomu bylo u mladých zvířat. Staří potkani Long Evans byli v tomto případě cca o půl roku starší než v dalších experimentech (PV,GAD), kde jsme podobnou redukcí mozkové kůry již nezaznamenali. Dále jsme našli zvýšený počet dendritických segmentů i bifurkací připadajících na jeden neuron, zatímco průměrná délka jednoho dendritického segmentu se naopak zkrátila. Celková délka viditelných dendritů jednoho neuronu tak zůstala přibližně stejná jako u mladých zvířat. Pokles počtu a přestavba NADPH-d-pozitivních neuronů by mohly být příspěvkem či průvodním jevem změny funkce centrálního sluchového systému ve stáří.

Změny v imunoreaktivitě parvalbuminu (PV)

V CI u kmene Long Evans bylo nalezeno zvýšení počtu a optické denzity PV-ir neuronů, zatímco ve sluchové kůře byly změny nepříliš výrazné. U kmene Fischer 344 byla v colliculus inferior patrná spíše tendence ke snížení počtu PV-ir buněk a signifikantně se zmenšil objem jejich somat. Ve sluchové kůře starých potkanů tohoto kmene byly ale přítomny výrazné

ohniskové úbytky imunoreaktivních buněk, které vedly k celkovému poklesu průměrného počtu PV-ir neuronů. V řezech barvených podle Nissla přitom žádné úbytky neuronů nebyly patrné. Úbytek exprese parvalbuminu může být důsledkem poklesu stimulace z patologické kochley, protože však pokles počtu parvalbuminových neuronů byl u starých potkanů Fischer 344 pozorován i v retrosplenální a zrakové kůře, je možné ho dát i do souvislosti s patologickým průběhem stárnutí tohoto kmene. Naopak u potkanů Long Evans by zachovalá funkce sluchu ve stáří mohla mít vliv i na uchování funkční sítě parvalbuminových neuronů ve sluchové dráze.

Změny v imunoreaktivitě a hladinách glutamátdekarboxylázy (GAD)

Ačkoliv PV-ir neurony tvoří významnou populaci GABAergních neuronů, změny v imunoreaktivitě GAD (izoforem GAD65 a 67), klíčového enzymu pro tvorbu GABA, byly ve stáří poněkud odlišné. Naše výsledky u starých potkanů kmene Long Evans i Fischer 344 shodně prokázaly v colliculus inferior i ve sluchové kůře výrazný a uniformní úbytek GAD65 a GAD67 zahrnující: snížení počtu GAD65 a GAD67 imunoreaktivních neuronů, snížení intenzity jejich imunoreakce a pokles hladin obou proteinů na polovinu hodnoty u mladých jedinců obou kmenů zjištěný pomocí western blotu. Méně výrazný pokles imunoreaktivity a hladin GAD jsme našli i ve zrakové kůře obou kmenů. Jsme tudíž oprávněni vyslovit hypotézu, že úbytek GAD v colliculus inferior a sluchové kůře ve stáří není závislý na redukcí aferentní stimulace z vnitřního ucha, ale přinejmenším částečně se jedná o charakteristický rys stárnoucího mozku.

Vliv atorvastatinu na progresi poškození sluchu u myši C57BL/6J a apoE^{-/-}

Citlivým a časným indikátorem zhoršení funkce vnějších vláskových buněk jsou změny v distorzních produktech otoakustických emisí (DPOAE). U myši kmene C57 jsme po 8-týdenní perorální aplikaci atorvastatinu našli vyšší amplitudy DPOAE než u kontrolních zvířat. Na vysokých frekvencích (19-27 kHz) byl tento rozdíl statisticky významný. Snížená exprese markerů zánětlivého endotelu v aortě zároveň potvrdila u těchto zvířat pozitivní vliv atorvastatinu na cévní výstelku. Současné zjištění nezměněných hladin cholesterolu ukázalo, že pozitivní efekt atorvastatinu není zprostředkovaný snížením hladin lipidů v krvi. Naopak u hypercholesterolemického kmene apoE^{-/-} nemělo podávání atorvastatinu za stejných podmínek žádný pozitivní efekt. Výsledky našeho experimentu tak ukazují, že atorvastatin může zpomalovat poškození funkce vnějších vláskových buněk u myši kmene C57; a tedy, že statiny mohou mít pozitivní účinek přinejmenším v případě senzorineurální formy presbyakuze.