

**Presbyakuze: imunocytochemické a neurochemické změny  
ve sluchovém systému, farmakologické ovlivnění**

**Doktorská dizertační práce z oboru neurovědy**

**MUDr. Ladislav Ouda**

**Ústav experimentální medicíny AV ČR**

**Školitel: Prof. MUDr. Josef Syka, DrSc.**

**Praha 2009**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych především rád poděkoval svému školiteli, prof. MUDr. Josefu Sykovi, DrSc., za jeho trpělivé a laskavé vedení během celého postgraduálního studia. Rovněž děkuji prof. MUDr. Rastislavu Drugovi DrSc., Mgr. Janě Burianové a MUDr. Oliveru Profantovi za pomoc v provedení experimentální části této práce. Můj dík patří ale též RNDr. Jiřímu Popelářovi, CSc., RNDr. Natalii Rybalko, CSc., Dr. Ing. Danielu Šutovi, MUDr. Janě Mazelové, Ph.D. a Janě Janouškové, Janu Kolářovi, Janu Setníčkovi a ostatním spolupracovníkům za cenné rady, podporu a vytvoření příjemného a tvůrčího prostředí v pracovním kolektivu.

Rovněž bych rád poděkoval i našim spolupracovníkům z Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D., RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D. a doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc., kteří se podíleli na projektu s farmakologickým ovlivněním presbyakuze.

## SEZNAM ZKRATEK

- ABR – objektivní audiometrie, akustickým podnětem vyvolané odpovědi mozkového kmene („auditory brainstem responses“)
- CB – kalbindin
- CR – kalretinin
- CBP – vápník vážící proteiny („calcium binding proteins“)
- CF – charakteristická frekvence
- CGM – corpus geniculatum mediale
- CI – colliculus inferior
- CCI – centrální jádro colliculus inferior
- dB SPL (sound pressure level) – hladina intenzity zvuku [dB SPL]= 20.log (P/P<sub>0</sub>), kde P<sub>0</sub> je základní akustický tlak (2. 10<sup>-5</sup> Pa).
- DCI – dorzální kůra colliculus inferior
- DPOAE – distorzní produkty otoakustické emise
- ECI – externí kůra colliculus inferior
- GABA – kyselina gamma-aminomáselná („gamma-aminobutyric acid“)
- GAD – glutamátdekarboxyláza
- HMG-CoA reduktáza – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktáza
- ICAM-1 – intercelulární adhezivní molekula – 1 („inter-cellular adhesion molecule“)
- IHC – vnitřní vlásková buňka („inner hair cell“)
- ir – imunoreaktivní
- LL – lemniscus lateralis
- LOC – laterální olivokochleární systém
- MLR – akustickým podnětem vyvolané odpovědi se střední latencí („middle-latency responses“)
- MOC – mediální olivokochleární systém
- mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina („messenger ribonucleic acid“)
- NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
- NC – nucleus cochlearis
- NCD – nucleus cochlearis dorsalis
- NCV – nucleus cochlearis ventralis
- NCVA – nucleus cochlearis ventralis anterior
- NCVP – nucleus cochlearis ventralis posterior
- NMCT – nucleus medialis corporis trapezoidei
- NO – oxid dusnatý
- NOS – syntáza oxidu dusnatého
- OAE – otoakustické emise
- OHC – vnější vlásková buňka („outer hair cell“)
- OS – oliva superior
- OSL – oliva superior lateralis

OSM – oliva superior medialis

PBS – fosfátový pufr

PECAM-1 – destičko(trombocytární)-endotheliální buněčná adhezivní molekula („platelet-endothelial cell adhesion molecule“)

PV – parvalbumin

S.E.M – střední chyba průměru („standard error of the mean“)

SOAE – spontánní otoakustické emise

SK – sluchová kůra (oblasti Te 1 + Te3 – pro účely této práce)

TBST – Tris-Buffered Saline Tween-20

Tween 20 – polyoxyethylensorbitanmonolaurát

Te 1,2,3 – anatomické oblasti sluchové kůry (primární, sekundární)

TEOAE – tranzientní otoakustické emise

VCAM-1 – cévní buněčná adhezivní molekula – 1 („vascular cell adhesion molecule“)

VIP – vazoaktivní intestinální peptid („vasoactive intestinal peptide“)

V1,2 – anatomické oblasti zrakové kůry (primární, sekundární)

ZK – zraková kůra (oblasti V1 + V2 – pro účely této práce)

# OBSAH

## 1. ÚVOD

### 1.1. Základní kapitoly z funkční anatomie a biochemie sluchového systému

1.1.1. Detekce zvuku - smyslové receptory .....	7
1.1.2. Centrální sluchový systém – aferentní dráha .....	10
1.1.3. Centrální sluchový systém – sluchová kůra .....	13
1.1.4. Centrální sluchový systém – eferentní dráha .....	16
1.1.5. Histochemie centrálního sluchového systému .....	17

### 1.2. Hodnocení funkce sluchového systému

1.2.1. Stanovení sluchových prahů .....	21
1.2.2. Otoakustické emise .....	22

### 1.3. Změny sluchu ve stáří – presbyakuze ..... 23 |

1.3.1. Kmeny zvířat užívaných k výzkumu stárnutí sluchu .....	24
1.3.2. Nitroušní komponenta presbyakuze .....	26
1.3.3. Terapeutické ovlivnění nitroušní presbyakuze .....	27
1.3.4. Centrální komponenta presbyakuze - elektrofyziologie .....	28
1.3.5. Centrální komponenta presbyakuze – histochemie .....	30

## 2. CÍLE PRÁCE ..... 33 |

## 3. MATERIÁL A METODY:

### 3.1. Testování rozdílů v počtu a morfologii NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře mladých a starých potkanů

3.1.1. Zvířata .....	35
3.1.2. Histochemie .....	35
3.1.3. Kvantitativní hodnocení a morfometrická analýza .....	35

### 3.2. Testování imunoreaktivity parvalbuminu v colliculus inferior, CGM a sluchové kůře mladých a starých potkanů dvou kmenů

3.2.1. Zvířata .....	36
3.2.2. PV – imunohistochemie .....	37

### 3.3. Testování imunoreaktivity GAD65 a 67 v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře mladých a starých potkanů dvou kmenů

3.3.1. Zvířata .....	37
3.3.2. GAD67 – imunohistochemie .....	38
3.3.3. GAD65 – imunohistochemie .....	38
3.3.4. GAD65 + 67 – western blot .....	39
3.3.5. Stereologie (PV + GAD) .....	40

### 3.4. Testování vlivu atorvastatinu na zpomalení poškození sluchu s věkem u dvou kmenů myši

3.4.1. Zvířata a celkový design experimentu .....	43
3.4.2. Anestézie .....	44
3.4.3. Měření sluchových prahů .....	44
3.4.4. Záznam a vyhodnocování DPOAE .....	45
3.4.5. Biochemie a imunohistochemie .....	47
3.4.6. Analýza imunohistochemie – stereologie .....	48

### 3.5. Statistická analýza ..... 49 |

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Rozdíly v morfologii a počtu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře mladých a starých potkanů

4.1.1. Morfologie a rozložení NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře .....	50
4.1.2. Změna tloušťky sluchové kůry .....	51
4.1.3. Počet NADPH-diaforáza pozitivních neuronů .....	51
4.1.4. Změny velikosti NADPH-diaforáza pozitivních somat ve stáří .....	52
4.1.5. Změny průměrné délky a počtu dendritických segmentů a změna počtu bifurkací dendritů ve stáří .....	52

### 4.2. Změny v imunoreaktivitě parvalbuminu v colliculus inferior, CGM a sluchové kůře u starých potkanů dvou kmenů

4.2.1. Colliculus inferior .....	54
4.2.2. Corpus geniculatum mediale .....	54
4.2.3. Sluchová kůra .....	57
4.2.4. Barvení podle Nissla .....	59

### 4.3. Změny v imunoreaktivitě a hladinách GAD65 a 67 v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře u starých potkanů dvou kmenů

4.3.1. Změny GAD65 a 67 ve stáří u kmene Long-Evans .....	59
4.3.1.1. Colliculus inferior .....	59
4.3.1.2. Sluchová kůra .....	62
4.3.1.3. Zraková kůra .....	62
4.3.2. Změny v GAD65 a 67 ve stáří u kmene Fischer 344 .....	64

### 4.4. Vliv atorvastatinu na zpomalení narůstajícího poškození sluchu s věkem u dvou kmenů myši

4.4.1. Sluchové prahy .....	65
4.4.2. Distorzní produkty otoakustických emisí .....	65
4.4.3. Hladiny cholesterolu v krvi .....	65
4.4.4. Expres zánětlivých markerů VCAM-1 a ICAM-1 .....	65

## 5. DISKUZE

### 5.1. Presbyakuze – histochemické změny ve sluchové dráze a farmakologické ovlivnění sensorineurální formy .....

### 5.2. Změny NADPH-diaforáza-pozitivních neuronů ve sluchové kůře starých potkanů kmene Long Evans .....

### 5.3. Změny v imunoreaktivitě parvalbuminu v colliculus inferior, CGM a sluchové kůře u starých potkanů dvou kmenů .....

### 5.4. Změny v imunoreaktivitě a hladinách GAD65 a 67 v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře u starých potkanů dvou kmenů .....

### 5.5. Vliv atorvastatinu na narůstající poškození sluchu s věkem u kmenů myši C57BL/6J a apoE-/- .....

## 6. SOUHRN PRÁCE .....

## 7. ZÁVĚRY .....

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....

## 9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ .....

## PŘÍLOHY – KOPIE VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

# 1. ÚVOD

## 1.1. Základní kapitoly z funkční anatomie a biochemie sluchového systému

### 1.1.1. Detekce zvuku - smyslové receptory

Zvuk se šíří prostředím jako vlnění. Podkladem šířícího se zvukového vlnění je mechanické kmitání molekul vzduchu, kapaliny nebo pevné látky. Smyslové orgány sluchu jsou tedy svou podstatou mechanoreceptory. Fyziologicky je zvuk mechanické vlnění pružného prostředí v takovém rozsahu intenzit a frekvencí, které je smyslovými orgány detekováno. Zatímco frekvenční rozsah sluchu u člověka je 16 Hz – 20 kHz (v dospělosti klesá horní hranice pod 16 kHz), používaná laboratorní zvířata (myš, potkan, morče, kočka), mají frekvenční rozsah daleko vyšší, do 40-60 kHz, kočka navíc detekuje i zvuk o nižší intenzitě než je schopen člověk (Syka a spol., 1981). Někteří savci mají frekvenční rozsah ještě vyšší, netopýr do oblasti 100–120 kHz (Suga, 1989; Koay a spol., 1997), ozubení kytovci dokonce až do 250 kHz (Au, 1993); velký rozsah sluchu u nich souvisí se speciální schopností echolokace. Na druhou stranu je třeba říci, že běžná laboratorní zvířata (vyjma kočky) mají oproti člověku výrazně horší vnímání zvuků o nízkých frekvencích (do 500 Hz). I zde ovšem někteří velcí savci (slon, velcí kytovci) člověka překonávají a vnímají zvuky i o frekvenci cca 5 Hz. Zatímco vnímání ultrazvuku našlo své největší uplatnění v echolokaci některých savců, infrazvuk se uplatňuje u druhů komunikujících na velké vzdálenosti (řádově až desítky kilometrů).

Schopnost detekovat zvuk nalézáme již u bezobratlých. Smyslové orgány ovšem vypadají jinak než u člověka. Například u hmyzu může být sluchový aparát umístěn na tykadlech, nohou či hrudní a zadečkové části těla. Sluchový orgán v tomto případě tvoří řádově desítky smyslových neuronů a zvenku je překryt jakousi analogií bubínku. Bývá často obklopen několika vzduchovými rezonančními komůrkami, které zesilují přijímaný signál (Stumpner a von Helversen, 2001). Přes poměrně jednoduchou stavbu ve srovnání se sluchovým aparátem obratlovců je i hmyz svým sluchem schopen např. zachytit netopýří sonar a reagovat na něj; v případě můry je zachycený ultrazvukový signál nervy převeden na svalovinu křídel a můra v únikové reakci padá k zemi (Jones a Waters, 2000).

U obratlovců má sluchové a rovnovážné ústrojí společný orgán. U primárně vodních obratlovců je to postranní smyslová čára, mechanoreceptor registrující vlnění vody. Receptorový orgán zde tvoří shluky obrvených buněk, neuromasty, které jsou soustředěny do

kanálků probíhajících horizontálně po stranách trupu a na hlavě se větvících (ryby), či jsou umístěny v řadě izolovaných jamek podél trupu (kruhoústí). Evoluční vztah postranní čáry k zakládajícímu se rovnovážnému ústrojí v podobě do lebky zanořeného blanitého labyrintu není úplně jasný. Tento labyrint je tvořen dvěma váčky vyplněnými endolymfou (sacculus a utriculus) a vybavenými obrveným smyslovým epitelem, který je podobný neuromastům postranní čáry. Z utrikulu vybíhají polokruhovitě kanálky (detekce úhlového zrychlení), u kruhoústých dva, u všech čelistnatců pak tři. Ze sakulu se vychlipuje třetí váček zvaný lagena, rovněž vybavený vlastní smyslovým epitelem, jehož prodloužením vzniká vlastní sluchový orgán suchozemských obratlovců. U plazů a ptáků se lagena postupně natolik prodloužila, že se z ní stala tenká a dlouhá trubice. U savců je tato trubice zatočená a vytváří základ blanitého hlemýždě. Vnější ucho, tvořené zvukovodem a ušním boltcem, se v plnosti objevuje až u savců. U plazů a ptáků je zvukovod krátký, u všech suchozemských obratlovců je však zakončený bubínkem. Přenos a transformaci zvuku ze vzdušného prostředí na kapalné prostředí vnitřního ucha zajišťuje ve středním uchu plazů a ptáků jedna kost, u savců již kosti tři (kladívko, kovadlinka, třmínek) (pro přehled viz Syka a spol., 1981; Nadol, 1988; Manley a spol., 2000; Veselovský, 2005).

Spirálovitě stočená trubice kostěného hlemýždě savců je rozdělena membránami blanitého hlemýždě (Reissnerovou a bazilární membránou) na scala vestibuli a scala tympani vyplněné perilymfou, uvnitř blanitého hlemýždě je scala media obsahující endolymfu (jedinou extracelulární tekutinu v organismu svým složením podobnou intracelulární tekutině). Ve scala media je na bazilární membráně uložený vlastní smyslový aparát, tzv. Cortiho orgán, který obsahuje specializované sluchové receptory – vláskové buňky (viz obr. 1). Vláskové buňky jsou uspořádány do podélných řad. Blíže k modiolu (centrálnímu kostěnému sloupku hlemýždě) je jedna řada vnitřních vláskových buněk (inner hair cell, IHC) blíže k zevní stěně hlemýždě jsou 3 řady vnějších vláskových buněk (outer hair cell, OHC). U potkana se nachází přibližně 1000 IHC a 3600 OHC, u myši 800 IHC a 2000 OHC, a u člověka pak více, přibližně 3500 IHC a 12000 OHC (podobně jako např. u delfína – Wever a spol., 1971). Počet aferentních a eferentních nervových buněk a neuronů spirálního ganglia je také výrazně druhově specifický; pro tabulkový přehled – viz Dannhof a Bruns (1993).

Podle klasické Bekesyho představy byl hlavní příčinou pro tonotopické uspořádání hlemýždě (vysoké frekvence zvukových podnětů způsobí maximální rozkmit bazilární membrány v oblasti baze hlemýždě, nízké v oblasti apexu) rozdíl mechanických vlastností bazilární membrány, která se od báze směrem k apexu rozšiřuje a její tuhost zároveň klesá. Díky tomu se s klesající frekvencí zvuku maximum rozkmitu membrány posouvá od baze

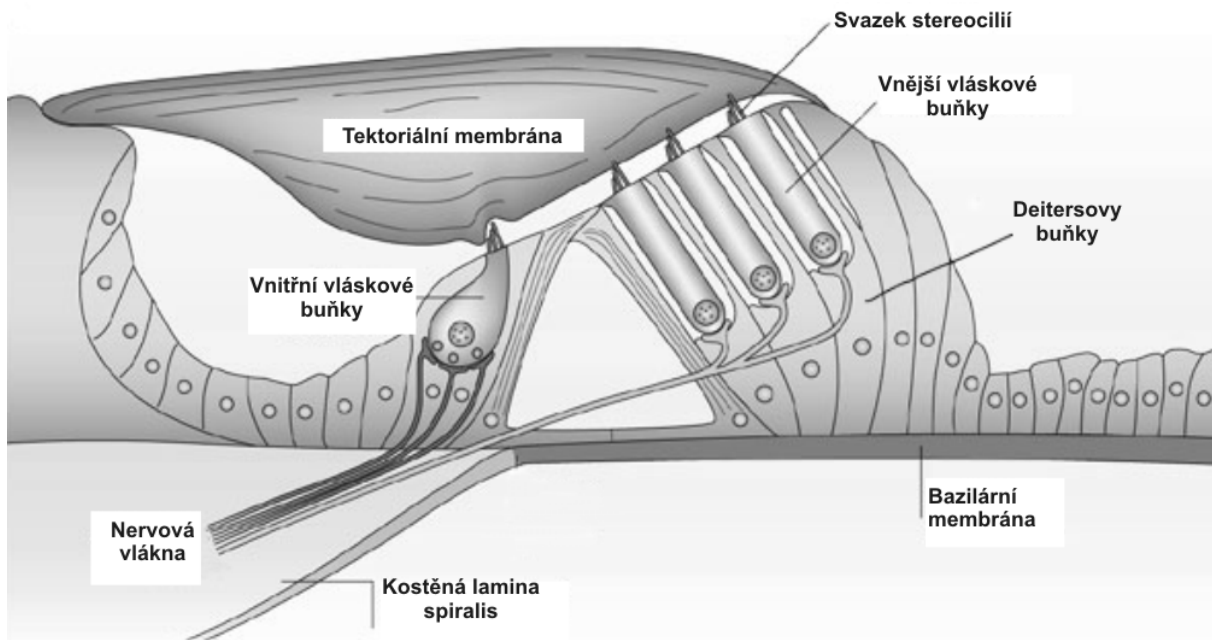


apikálním směrem. Gradient mechanických vlastností bazilární membrány však není dostačujícím vysvětlením tonotopie (Naidu a Mountain, 1998). Na rozlišení tónového spektra se podílí také aktivní rozkmitání stereocilií vnějších vláskových buněk (Kemp, 1998; Martin a spol., 2000). Tato role je jedinečná u savců, protože u ostatních obratlovců se vnější vláskové buňky nevyskytují. Ke stimulaci OHC tak nedochází pomalu se šířící vlnou v bazilární membráně, ale buňky samotné mají funkci vyladěných rezonátorů a reagují přímo na zvukové vlny, které se v kapalném prostředí endolymfy rychle šíří. Tato schopnost OHC zesílit vibrace v endolymfě se uplatňuje především při nízké intenzitě zvuku, kdy zesílení vibrací způsobí pohyb stereocilií IHC a vyvolá jejich podráždění (Braun, 1994). Pohyb bazilární membrány se uplatní až při vysoké intenzitě stimulu, kdy může rovněž pohlcovat přebytečnou vibrační energii křehkých stereocilií a zabraňovat tak jejich poškození (Kemp, 1998). Důsledky aktivního pohybu vnějších vláskových buněk lze snímat citlivým mikrofonem ze zevního zvukovodu jako tzv. otoakustické emise (OAE) (Kemp 1978, 1998, 2002).

Vnější vláskové buňky tak díky své pohyblivosti fungují jako zesilovač přicházejících zvukových signálů. Je to umožněno existencí specifických kontraktilních membránových proteinů, které jsou schopny aktivním prodloužením/zkrácením zareagovat na nervovou či mechanickou excitaci OHC. Pro tuto funkci se předpokládá klíčová úloha proteinu prestinu přítomného ve stěnách vnějších vláskových buněk (Dallos a spol., 2006; Ashmore, 2008). U myši se sníženou funkcí prestinu bylo prokázáno výrazné zhoršení motility OHC (Liberman a spol., 2002; Dallos a spol., 2008). Každá vnější vlásková buňka má na svém vrcholku až stovky stereocilií uspořádaných do rovnoběžných řad (seskupených do tvaru písmene V nebo W). Vrcholky nejdelších stereocilií jsou zakotveny v tektoriální membráně. Přibližně od 10 OHC odchází jedno vlákno sluchového nervu. Eferentní synaptické spojení je naproti tomu výrazně bohatší (viz níže – olivokochleární svazek v 1.1.4.).

Každá vnitřní vlásková buňka má několik desítek stereocilií, jejichž vrcholky nejsou zakotveny v tektoriální membráně. Na apikálním povrchu vnitřních vláskových buněk je za nejvyšší řadou stereocilií oblast, která není kryta kutikulární ploténkou – ta obsahuje bazální tělísko neboli rudimentární kinocilium. Excitaci vnitřních vláskových buněk vyvolá ohnutí jejich stereocilií směrem k bazálnímu tělísku (tj. směrem od modiolu). Ohnutí vlásků je spojeno s otevřením nesespecifických mechanicky řízených iontových kanálů a průtokem iontů, čímž v důsledku vysokého potenciálového rozdílu (160 mV – součet pozitivního endokochleárního potenciálu a negativity uvnitř buňky) vzniká proud iontů dovnitř buňky a na bazální straně buňky, která je ve styku s dendritem neuronu spirálního ganglia, se uvolní

synaptická vezikula a v nervovém vlákně vzniká akční potenciál. Jedna IHC je spojena s cca 20 vláknů sluchového nervu (pro přehled, viz Syka a spol., 1981; Moller, 2000).



Obr. 1 – Ilustrace uspořádání a inervace vláskových buněk v příčném řezu Cortiho orgánem. (Upraveno podle Fettiplace a Hackney, 2006).

### **1.1.2. Centrální sluchový systém – aferentní dráha**

Schematické znázornění sluchové dráhy viz obr. 2 (upraveno podle Netter, 1962). Pro přehled viz též Syka a spol. (1981), Moller (2000).

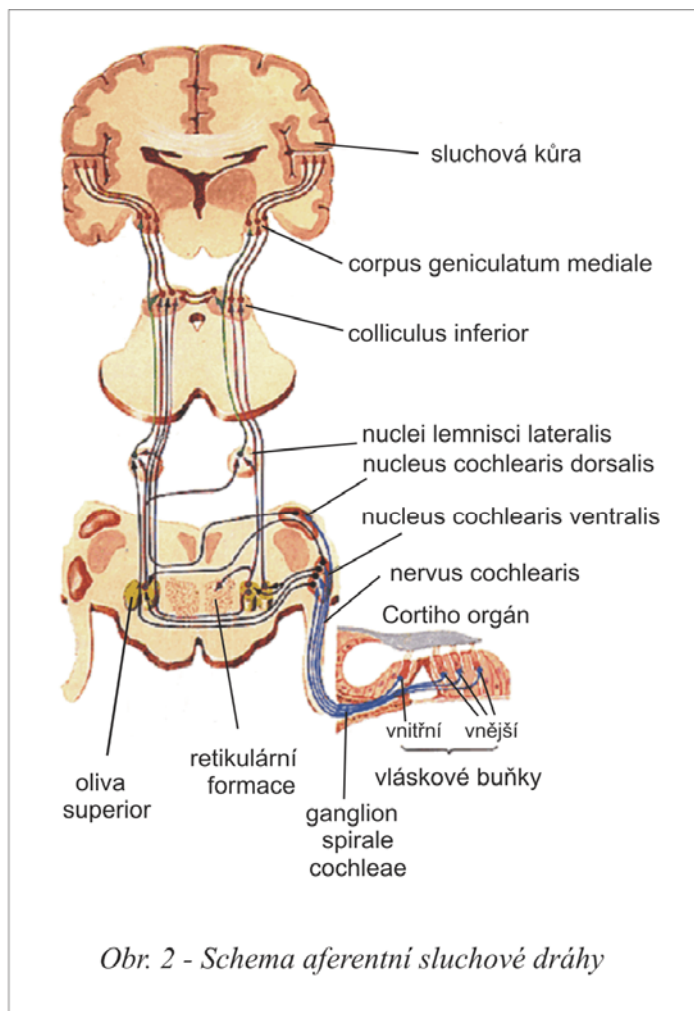
Prvním neuronem sluchové dráhy jsou buňky ve **spirálním gangliu**. Jejich dendrity začínají u vnitřních a vnějších vláskových buněk a jejich axony vytvářejí sluchový nerv (tj. sluchovou část n. vestibulocochlearis). V intenzitně-frekvenčních křivkách vláken sluchového nervu se odráží tonotopie bazilární membrány hlemýžďe – jednotlivá vlákna sluchového nervu jsou aktivována jen podněty o omezeném rozsahu frekvencí (Schmiedt, 1989; Liberman a spol., 1990; Leake a spol., 1992). Frekvence tónu, na které je práh excitace nervového vlákna nejnižší, se nazývá charakteristická frekvence (CF).

Sluchový nerv opouští pyramidu spánkové kosti skrze meatus acusticus internus a v mostomozečkovém úhlu vstupuje v mozkovém kmeni do stejnostranného **kochleárního jádra** (NC), kde se větví a zásobuje ventrální kochleární jádro (které se dále dělí na anterior a posterior, NCVA a NCVP) a dorsální kochleární jádro (NCD). I zde je zachováno tonotopické uspořádání - vlákna sluchového nervu s nízkou charakteristickou frekvencí směřují převážně do ventrální části, se stoupající charakteristickou frekvencí jsou inervovány

dorzálnější oblasti, ale každé vlákno sluchového nervu se zakončuje ve všech třech hlavních jádrech (Rouiller a Ryugo, 1988; Leake a Snyder, 1989). U suchozemských savců se NCD významně uplatňuje v eliminaci sluchových artefaktů způsobených změnami pozice hlavy (vnějšího ucha) během orientace vzhledem ke směru zvuku. U mořských savců je naopak NCD zredukováno (Young a Davis, 2002). NC jako celek představuje u malých laboratorních zvířat poměrně velkou strukturu, u člověka je relativně malé. Hlavním neuropřenašečem na synapsích mezi vnitřními vláskovými buňkami a dendrity neuronů ganglion spirale, jakož i mezi vlákny sluchového nervu a neurony kochleárního jádra, je glutamát (Harada a spol., 1994; Nordang a spol., 2000). Aferentní projekce vystupují z kochleárních jáder do ipsilaterální i kontralaterální olivy superior a do kontralaterálního colliculus inferior. (Tsuji a Liberman, 1997; Syka a spol., 1981).

**Komplex olivy superior** tvoří mediální a laterální oliva superior (OSM a OSL), mediální, ventrální a laterální jádro trapézového tělesa a superiori paraolivární jádro. Komplex olivy superior představuje první úroveň sluchového systému, kde se integrují informace z obou uší, a tak je klíčový pro binaurální slyšení. Úloha OSM spočívá především v detekci časového zpoždění zvuku o nízké frekvenci, v OSL jsou zpracovávány rozdíly v intenzitě zvuku o vyšších frekvencích (u člověka se jedná o frekvence  $> 2$  kHz). Převážná část neuronů OSL reaguje na střední a vysoké frekvence, zatímco na nízké frekvence (pod 4 kHz) reaguje více než polovina neuronů OSM (Tsuchitani, 1977, 1982). Živočišné druhy s převážně vysokofrekvenčním rozsahem sluchu (myš, potkan, delfin, netopýr) mají mohutnější OSL a malou (nebo chybějící) OSM. Naproti tomu druhy, jejichž horní mez sluchového rozsahu je posunuta k nižším frekvencím (kam patří i člověk), mají dobře vyvinutou OSM a drobnou OSL (Irvine, 1986). Přes olivu superior se přepojuje i dráha středoušních reflexů (Thompson a Schofield, 2000). Z periolivárních sluchových jader hraje nejvýznamnější roli mediální jádro corpus trapezoideum (NMCT), kde se axony z kontralaterálního NCAV přepojují na obřích glutamatergních Heldových synapsích, které obklopují principální neurony v NMCT a vyznačují se extrémně krátkých synaptickým přenosem. Neurony v NMCT jsou pak inhibiční (glycinergní) a modulují svou projekcí excitační aferentaci, která přichází z ipsilaterálního NCAV přímo do OSM a OSL (Grothe a Sanes, 1994; Kopp-Scheinpflug a spol., 2008). NMCT je nejlépe vyvinuté u savců s vysokofrekvenčním rozsahem sluchu včetně hlodavců, u člověka je naopak vyvinuto podstatně méně.

Z komplexu olivy superior (či přímo z kochleárního jádra) probíhá ascendentní projekce ve svazku nazývaném lemniscus lateralis (LL), v jehož průběhu se část vláken přepojuje v jádrech laterálního lemnisku (Adams, 1979; Schwartz, 1992; Bajo a spol., 1993).



### **Colliculus inferior (CI)**

Colliculus inferior (CI), který je součástí tekta středního mozku a přepojují se v něm všechna vlákna LL. Na základě Golgiho a Nisslova barvení, myeloarchitektoniky a cytoarchitektoniky, je dělen obvykle na tři hlavní části (Morest a Oliver, 1984; Faye-Lund a Osen, 1985; Malmierca a spol., 1995) - centrální jádro (CCI) s typickou laminární strukturou, dorsální kůru (dále jen DCI) a laterálně a rostrálně lokalizovanou externí kůru (dále ECI). DCI i ECI mají třívrstevnou strukturu. Rozdělení na tyto tři části je viditelné v dalších histologických barveních, na cytochromoxidázu glutamátdekarboxylázu či vápník

vážíci proteiny. Většina aferentních projekcí z nižších jader sluchové dráhy (kochleárního jádra, komplexu olivy superior, jader laterálního lemnisku) končí v centrálním jádře CI (Diamond a spol., 1969; Druga a Syka, 1984; Kudo a Nakamura, 1988; Schneiderman a spol., 1988). CCI je součástí tzv. primárního vzestupného systému, ve kterém je mimo jiné zachována tonotopie. Naproti tomu v dorsální a částečně i v externí kůře CI končí největší část descendentní projekce z V. vrstvy sluchové kůry (Syka a spol., 1988; Druga a spol., 1997; Winer a spol., 1998). Slabá korová descendentní projekce byla prokázána i v centrálním jádře (Feliciano a Potasher, 1995). Externí jádro dostává aferentaci přes centrální jádro a má silné napojení na somatosenzorické struktury, ale i na colliculus superior, substantia nigra, a periakvaduktální šed' (Syka a Straschill, 1970; Tokunaga a spol., 1984). V ECI byl

u potkana popsán výskyt shluků malých oválných buněk a intenzivního neuropilu, které se u myši, kočky ani opic nevyskytují (Chernock a spol., 2004). Mohly by snad sloužit jako centra pro integraci somatosenzorických a sluchových podnětů v rámci prostorové orientace k podnětu. Vnitřní a komisurální spojení CI jsou velmi komplexní a zahrnují všechna podjádra (Saldana a Merchan, 1992). Vzhledem k rozsáhlým spojům CI do dalších struktur, je colliculus inferior označován i jako sluchové reflexní centrum (netýká se středoušních reflexů), které převádí reflexivní odpovědi na sluchové podněty na další motorické struktury včetně např. kontroly pohybu očí (spojení do colliculus superior, Syka a Radil-Weiss, 1971).

Hlavním výstupním traktem axonů z CCI je brachium CI, které obsahuje cca desetinásobek vláken než je počet vláken sluchového nervu. Hlavním neuropřenašečem na excitačních synapsích je opět glutamát (Syka a spol., 1981) Zároveň zde ale hraje roli i silně zastoupená inhibice v podobně interneuronů s mediátorem kyselinou gamma-aminomáselnou (GABA), které mají synaptický kontakt s neurony v corpus geniculatum mediale (Peruzzi a spol., 1997; Pollak a spol., 2002; Merchan a spol., 2005).

### **Corpus geniculatum mediale (CGM).**

CGM představuje diencephalickou část sluchové dráhy a vytváří sluchové přepojovací centrum thalamu. Všechna vlákna z CCI jsou v něm přepojována. Obecně se dělí na tři hlavní části: ventrální, dorzální a mediální (Winer a Morest, 1983a,b; Winer, 1984, Winer a spol., 1999). Ventrální část CGM se dělí na pars lateralis a pars ovoidea, obě charakterizované laminárním uspořádáním neuronů, které odráží tonotopické uspořádání. Ventrální CGM patří k primárním oblastem sluchové dráhy, aferentní projekce sem směřují převážně z ipsilaterálního CCI (Kudo a Niimi, 1978; Andersen a spol., 1980, Calford a Aitkin, 1983). Z ventrálního jádra CGM pokračují vlákna do tonotopicky uspořádané primární oblasti sluchové kůry A I. Dorzální a mediální část CGM patří k polymodálním sekundárním oblastem sluchové dráhy a směřují do nich projekce z colliculus superior, tegmenta a somatosenzorické dráhy. Vzestupné korové projekce z dorzální a mediální části CGM směřují ponejvíce do asociačních sekundárních sluchových polí mozkové kůry mimo A I (tj. mimo primární pole). U potkana ale z mediální části CGM směřují spoje i do striata a amygdaly (Le Doux a spol., 1985)

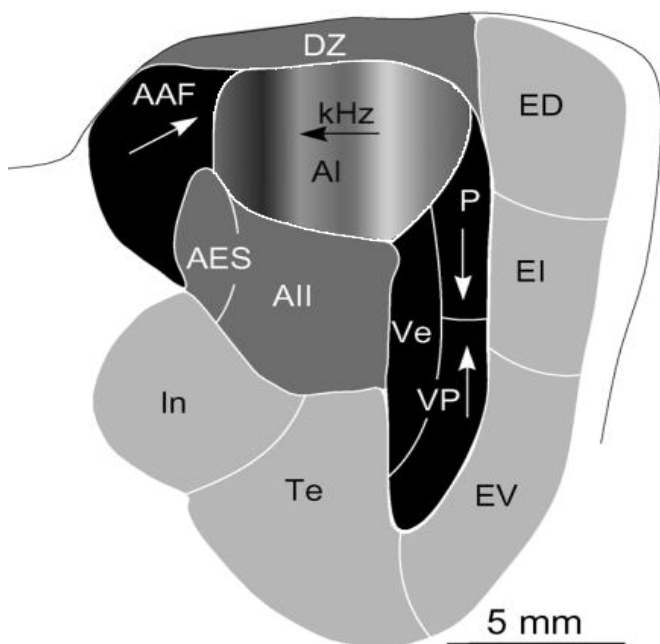
### **1.1.3. Centrální sluchový systém – sluchová kůra**

Sluchová kůra se u savců skládá z primární části - AI (s tonotopickým, tj. i kochleotopickým, uspořádáním) přijímající aferentaci z ventrální části CGM, a z částí sekundárních, případně i terciárních. Je zajímavé, že na rozdíl od morčete či myši (viz níže)

u potkana doposud detailní ustálené členění chybí. Na základě morfologické klasifikace byla u potkana popsána primární (Te1) a sekundární sluchová kůra – ventrální Te3 a posteriorní Te2 (Zilles, 1985). Novější atlasy (Paxinos a Watson, 1998; Swanson 1998) se pokoušejí více brát v úvahu elektrofyziologická měření a uvádějí podrobnější parcelaci. Primární AI oblast zde odpovídá zhruba velikosti Te1 podle Zillese, dále dvě ventrální oblasti - AuV (sluchová ventrální) a TeA (temporální asociační kůra), zhruba pokrývající oblast Te3 a částečně Te2, a konečně dorsální sluchové pole jako pás nad AI (AuD). V poslední době však detailnější elektrofyziologické mapování naznačuje komplikovanější strukturu odpovídající nálezům u dalších hlodavců (Kelly a Sally 1988; Doron a spol., 2002; Polley a spol., 2007). Nyní se podobné mapování provádí i na našem pracovišti. Vzhledem k této doposud neujasněné klasifikaci jsme pro analýzu uvedenou v této dizertační práci použili anatomickou klasifikaci Zillesovu, jejíž pole Te1 asi nejlépe odráží tonotopické jádro a Te3 prokázanou sekundární oblast odpovídající na složitější stimuly.

U jiných hlodavců, např. u myši či morčete, je komplikovanější klasifikace podobná výše načrtnuté již víceméně všeobecně přijata (Stiebler a spol., 1997; Wallace a spol., 2000a,b). U savců vybavených echolokací, např. u netopýra, je charakteristická přítomnost význačného specifického pole zpracovávajícího signály vlastního sonaru (Esser a Eirmann, 1999; Misawa a Suga, 2001). Velmi podrobně je sluchová kůra zmapována u kočky (Reale a Imig, 1980; Ribaupierre, 1997; Imaizumi a spol., 2004) – viz též obr. 3. Toto dělení patrně odráží rysy charakteristické pro obecné členění sluchové kůry savců. Tonotopické jádro je tvořené primární oblastí AI a jednou či dvěma dalšími sousedními oblastmi se zrcadlovou tonotopií a obsahuje neurony s krátkou latencí a úzkými prahovými křivkami, které odpovídají na čisté tóny. Toto jádro je z části nebo úplně obklopeno pásem („belt“) dalších sekundárních polí, která odpovídají spíše na komplexní zvuky než na čisté tóny či variabilně (Tian a spol., 2001). Na tento pás navazuje další, již tzv. terciární, pás polí („parabelt“), pravděpodobně z části polymodálního charakteru (Hackett a spol., 1998a). Možnost integrace sluchových vstupů se vstupy z jiných smyslových modalit se uvádí i pro některá pole v beltu (Lehman a spol., 2006; Smiley a spol., 2007; Hackett a spol., 2007). I u primátů bylo postupně doloženo elektrofyziologicky, cytoarchitektonicky, i histochemicky rozčlenění sluchové kůry do tonotopického jádra a obklopujících („beltových“) zón (Hackett a spol., 1998b; Kaas a Hackett, 2000; Jones, 2003; de la Mothe a spol., 2006).

U člověka sluchová kůra anatomicky odpovídá Brodmanovým areám 41 (Heschlův závit) a 42. Ve srovnávací anatomii byly nalezeny podobnosti v cytoarchitektonice se sluchovou kůrou u makaka a šimpanze (Hackett a spol., 2001, Sweet a spol., 2005;



Obr. 3 - Schematický pohled na organizaci sluchové kůry kočky. Kromě primární oblasti (AI) s vyznačeným gradientem (měňavě) tvoří jádrovou tonotopickou oblast anteriorní (AAF), posteriorní (P), ventrální (Ve) a ventroposteriorní (VP) sluchová pole (černě). Asociační netonotopickou oblast („belt“ - tmavošedě) tvoří sekundární sluchová kůra (AII), a dále AES (area ectosylvia anterior) a DZ (dorzální sluchová zóna). Konečně k terciární polymodální asociační oblasti („parabelt“ - světlešedě) patří pole v gyrus ectosylvius posterior – dorsální, intermediální a ventrální (ED, EI a EV), a dále část temporální (Te) a inzulární kůry (In). Tonotopický gradient je v polích, kde se vyskytuje, značen šipkou ve směru od nízkých frekvencí k vysokým.  
(Upraveno podle Schreiner a Winer, 2007).

(drah) naznačuje nejen hierarchické ale zároveň i paralelní zpracování informace ve sluchové kůře. Všechny korové oblasti jsou mezi sebou mnohočetně propojené (Winer a Lee, 2007; Lee a Winer, 2008). Existuje také teorie, že analogicky k situaci ve zrakové kůře i ve sluchové kůře existují proudy preferenčně zpracovávající informaci „kde“ (dorzální proud směřující do parietální kůry) a „co“ (temporální proud do parabeltových oblastí); oba proudy by pak měly splývat v prefrontálních oblastech (Kaas a Hackett, 1999; Kraus a Nicol, 2005). Tato teorie však nemá dosud obecnou podporu.

Zachovaná funkční sluchová kůra je nezbytná ke zpracování komplexních zvuků, jakými jsou nejen lidská řeč ale i řada zvířecích vokalizací, a jejichž charakteristickou

Fullerton a Pandya, 2007). S využitím nukleární magnetické rezonance (funkční NMR – hodnotící změny lokální perfuze) byla prokázána i parcelace centrální části lidské sluchové kůry na několik různých tonotopických polí (Tavalage a spol., 2004; Formisano a spol., 2003). Tonotopické uspořádání oblastí primární sluchové kůry u člověka bylo doloženo i studii s využitím pozitronové emisní tomografie (Lauter a spol., 1985; Zatorre a Belin, 2001) a jednofotonové emisní tomografie (Ottaviani a spol., 1997).

Ascendentní projekce přicházejí jednak z CGM-ventrale, a to především do IV. korové vrstvy AI (částečně i do III. vrstvy), a dále i z CGM-mediale (hlavně I. a VI. vrstva, všechny oblasti) a CGM-dorsale (všechny vrstvy, především beltové oblasti). Existence více paralelních ascendentních proudů

součástí jsou frekvenčně modulované zvuky (FM). Oboustranná ablace sluchové kůry vede k značnému zhoršení jejich zpracování (Kelly a Whitfield, 1971; Ohl a spol., 1999), navíc mizí i schopnost prostorového slyšení (Beitel a Kaas, 1993). Mimo jiné se ale ukázalo, že zpracování komplexních zvuků vykazuje funkční lateralizaci. U pískomila a potkana se pro zachování rozpoznání směru frekvenčně modulovaných zvuků ukázala významná hlavně pravá sluchová kůra (Wetzel a spol., 1998, Rybalko a spol., 2006), u dalších druhů byl ukázán význam levé sluchové kůry pro správné zpracování časových parametrů vnitrodruhové vokalizace (Geissler a Ehret, 2004, Poremba a spol., 2004). Specializace týkající se především levé hemisféry by mohla odrážet i evoluční prekurzor k lateralizaci center lidské řeči (Rybalko a spol., 2006). Celkově lze tedy říci, že lateralizace funkce hemisfér koncového mozku není výhradním rysem lidského mozku, ale lze jí nalézt v nějaké míře i u jiných savců. Pro zajímavost je možné navíc uvést, že u ptáků, přes odlišnou stavbu koncového mozku, je přítomna také lateralizace funkcí telencephala, např. kontrola zpěvní vokalizace u pěvců a různé další funkční specializace jsou umístěny pouze v jedné hemisféře (Wild, 1997; Rogers, 2008).

Ve sluchovém systému existuje též významné vzájemné propojení levé a pravé strany sluchové dráhy na úrovni jednotlivých etáží. Již na úrovni kochleárního jádra existuje spojení přímo s druhostranným kochleárním jádrem s dosud neznámou funkcí (Mast, 1973). Významné propojení existuje také na vyšších úrovních, mezi jádry laterálního lemnisku (Commissurae Probsti), mezi oběma CI, a obě hemisféry koncového mozku jsou spojeny pomocí corpus callosum, kterým probíhá i spojení mezi sluchovými korovými poli.

#### **1.1.4. Centrální sluchový systém – eferentní dráha**

Do současnosti byly ve sluchové dráze identifikovány tři hlavní descendentní (eferentní) systémy – kortikothalamická dráha (z V. a z VI. korové vrstvy), kortiko-kolikulo-kochleární dráha a konečně olivokochleární svazek (Smith a Spirou, 2002).

Kortikothalamická vlákna pyramidových buněk V. vrstvy (převážně z primární sluchové kůry) inervují CGM, CI i přímo kochleární jádra (Ojima, 1994; Weedman a Ryugo, 1996; Hefti a Smith, 2000). Je možné, že tato dráha umožňuje navíc i další přenos informací z primární sluchové kůry do asociačních oblastí sluchové kůry, nikoli přímo, ale zpětně přes struktury thalamu (Guillery, 1995). Kortikothalamická vlákna malých pyramidových buněk VI. vrstvy směřují převážně do CGM (Aitkin a Dunlop, 1969). Z dosavadních poznatků vyplývá, že vlákna této dráhy působí excitačně na neurony CGM vyladěné na stejnou



frekvenci a inhibičně na neurony vyladěné na rozdílnou frekvenci (Zhang a Suga, 1997; He, 1997).

Kortiko-kolikulární projekce z V. vrstvy sluchové kůry končí především v dorsální a externí kůře CI (bilaterálně) (Herbert a spol., 1991; Saldana a spol., 1996; Druga a spol., 1997). Colliculus inferior zároveň ale dostává thalamické descendentní projekce, které by mohly představovat fylogeneticky starou zpětnou vazbu thalamu na akustické tektum, předcházející vývojově kortiko-kolikulární projekci (Winer a spol., 2002). Z CI po přepojení pokračuje sestupná dráha dále k jádrům laterálního lemnisku, komplexu olivy superior a kochleárním jádrům (Spangler a Warr, 1991; Schofield a Cant, 1999).

Podle současných názorů se korové descendentní projekce uplatňují při selektivním soustředění pozornosti, frekvenční selektivitě, kódování intenzity, lokalizaci zvuku, porozumění řeči a rozeznávání tónů v šumu (Scharf a spol., 1987; Micheyl a Collet, 1996; Giraud a spol., 1997; Zhang a Suga, 2005). V poslední době se objevily zprávy o důsledcích dočasného funkčního vyřazení sluchové kůry na nižší centra sluchové dráhy. Po aplikaci tetradotoxinu na sluchovou kůru došlo ke komplexním změnám odpovědí neuronů ve stejnostranném colliculus inferior na akustické podněty (Nwabueze-Ogbo a spol., 2002; Popelář a spol., 2003).

Mediální a laterální olivokochleární systém tvoří olivokochleární projekci (MOC a LOC, pro přehled viz Warr, 1992). Příмым důsledkem stimulace MOC je cholinergní inhibice motility vnějších vláskových buněk (viz výše – role prestinu, Liberman a spol., 2002). K inhibici dochází vlivem vstupu  $Ca^{2+}$ , což vede k otevření kalcium dependentních draslíkových kanálů a hyperpolarizaci buňky (Oliver a spol., 2000). Následná redukce pohybů bazilární membrány, patrně díky snížení motility vnějších vláskových buněk, snižuje aktivitu vláken sluchového nervu a zužuje dynamický rozsah sluchu. Funkce olivokochleárního svazku je také experimentálně testovatelná pomocí tzv. kontralaterální suprese otoakustických emisí. Jde o jev, kdy kontralaterální akustická stimulace způsobí pokles amplitud otoakustických emisí (Puel a Rebillard, 1990; Berlin a spol., 1993; Hood a spol., 1996).

#### **1.1.5. Histochemie centrálního sluchového systému**

Vzhledem k nesmírné komplexnosti problematiky jsou uvedeny jen markery ve vyšších etážích sluchové dráhy, které souvisejí s tématem této dizertační práce.

Hlavním excitačním neurotransmiterem mozkové kůry i podkorových center je glutamát; zhruba 75% neuronů kůry je řazeno k excitačním neuronům, které se vyznačují poměrně uniformními cytoarchitektonickými, fyziologickými a molekulárními vlastnostmi

(Peters a Sethares, 1991; de Felipe a Fariñas, 1992). Zbýlých 20-30 % tvoří inhibiční neurony, jejichž hlavním neurotransmiterem je kyselina gamma-aminomáselná (GABA) (Hendry a spol., 1987; Ren a spol., 1992; de Felipe, 1993; Beaulieu, 1993; Gupta a spol., 2000; Markram a spol., 2004).

V posledních letech se nashromáždily poznatky o roli inhibičních sítí tvořených GABA-exprimujícími interneurony v různých částech mozku (Caspary a spol., 1995; Freund a Buszáki, 1996; Gupta a spol., 2000; Buzsáki a spol., 2007). Jde o interneurony řady morfologických typů, košíčkové buňky, bipolární, Martinottiho, chandelierové buňky a další, s vzájemně odlišnými elektrofyziologickými vlastnostmi, odlišnou expresí dalších látek (vápník vážících proteinů, somatostatinu, VIP a jiných) i odlišnou preferenční lokalizací buněk (pro přehled – Freund a Buszáki, 1996; Markram a spol., 2004). Rozložení GABA-imunoreaktivních (-ir) neuronů a GABA-ir vstupů ve sluchové kůře bylo poměrně detailně popsáno u koček a opic a lze shrnout, že GABA-ir neurony tvoří přibližně 20-25% celkové neuronální populace sluchové kůry a jsou přítomny ve všech korových vrstvách, procentuálně zdaleka nejvíce ve vrstvě I. (přes 90% všech neuronů), v dalších vrstvách mezi 27% (V.) až po 16% (VI.) (Hendry a spol., 1987; Prieto a spol., 1994a,b). Podobné relativní zastoupení, 20-30%, mají GABA-ir neurony i v colliculus inferior, detailně bylo popsáno především u kočky a potkana (Oliver a spol., 1994; Merchan a spol., 2005). Zajímavé je, že u malých hlodavců (a netopýrů) je v corpus geniculatum mediale přítomno jen velmi malé množství GABAergních neuronů (1-2% z celkového počtu). U koček a primátů naproti tomu GABAergní neurony tvoří cca 25%, tj. přibližně stejný podíl jako v CI a ve sluchové kůře (Winer a Larue, 1996; Huang a spol., 1999). Přitom v CI a sluchové kůře hlodavců je podíl inhibičních neuronů obdobný jako u ostatních (experimentálních) savců. To by mohlo naznačovat poněkud odlišnou roli CGM u hlodavců, mimo jiné i odlišně zprostředkovanou roli inhibice ve sluchové dráze, např. silnější úlohu inhibice již v colliculus inferior.

Kyselina gamma-aminomáselná je syntetizována dekarboxylací glutamátu, tato reakce je katalyzována enzymem glutamát dekarboxylázou (GAD). V savčím mozku se vyskytují dvě izoformy o molekulové hmotnosti 65000 a 67000 (neboli GAD65 a GAD67). Velká většina GABA-ir neuronů obsahuje obě izoformy, proto je GAD standardně používána jako indikátor přítomnosti a funkce GABA. Obě izoformy se ale liší ve své vnitrobuněčné lokalizaci a funkci. GAD65 se vyskytuje převážně v axonálních zakončeních a syntetizuje GABA pro vezikulární uvolňování, zatímco GAD67 je přítomna především v somatech neuronů a syntetizuje mimovezikulární GABA (Erlander a Tobin, 1991; Feldblum a spol., 1993, 1995; Esclapez a spol., 1994; Hendrickson a spol., 1994). Navíc jsou obě izoformy

patrně poněkud odlišně zapojeny do odpovědi na akutní a chronickou aktivaci inhibičních neuronů (Soghomonian a Martin, 1998; Wei a Wu, 2008).

Kromě hlavních excitačních či inhibičních neuropřenašečů existuje řada dalších přenašečů a látek s převážně neuromodulační a smíšenou funkcí. Jednou z významných nepeptidových molekul s neuromodulační funkcí je oxid dusnatý (NO), který obecně hraje roli v řadě fyziologických procesů v organismu. Jde o molekulu vytvářenou třemi izoformami (neuronální, cévní a endotheliální) syntázy oxidu dusnatého (NOS). Uvnitř buněk, přes aktivaci guanylyl cyklázy, NO spouští tvorbu druhého posla, cyklického guanosin monofosfátu (cGMP), s následnou rozličnou kaskádou fyziologických dějů (Bredt a spol., 1991, Dawson a Dawson, 1995; Bredt, 2003). Bylo prokázáno, že katalytická aktivita neuronální NOS zodpovídá za tzv. NADPH-diaforázovou (NADPH-d) aktivitu neuronální NOS a tedy že NADPH-d je NOS (Hope a spol., 1991). NOS pozitivní neurony lze tak rychle a poměrně levně zobrazit pomocí průkazu NADPH-diaforázy (Dawson a spol., 1991; Hope a spol., 1991; Valtschanoff a spol. 1993, Dawson a Dawson, 1995). Studie popisující rozložení NADPH-d/NOS exprimujících neuronů v centrálním nervovém systému naznačují, že jsou přítomny v mnoha podkorových i korových strukturách a jejich rozložení není zcela identické s žádným jiným systémem přenašečů (Vincent a Kimura, 1992; Rodrigo a spol., 1994; Xiao a spol., 1996; Yan a spol., 1996; Yan a Garey, 1997).

NADPH-d/NOS exprimující neurony jsou v neokortexu přítomny relativně homogenně (Egberongbe a spol., 1994; Hashikawa a spol., 1994; Kuchiiwa a spol., 1994). U potkana a opic ale byla prokázána i plošná a laminární specificita v rozložení NADPH-d/NOS-exprimujících neuronů (Franca a spol., 1995; Bidmon a spol., 1997; Barone a Kennedy, 2000). Bylo poukázáno i na jejich funkční vztah k mikrocévnímu parenchymálnímu řečišti v mozku (Estrada a de Felipe, 1998). Ve sluchovém systému potkana jsou tyto neurony přítomny především ve vyšších etážích sluchové dráhy (colliculus inferior, corpus geniculatum mediale, sluchová kůra – Druga a Syka, 1993). Ve sluchové kůře hlodavců patří tyto neurony především k tzv. „aspiny“ (bez dendritických trnů) nepyramidovým interneuronům, které významně kolokalizují s GABA, neuropeptidem Y a některými vápník vážícími proteiny (Kowall a spol., 1987; Vincent a Kimura, 1992; Rodrigo a spol., 1994; Bidmon a spol., 1997). Tato zjištění naznačují možnou úlohu exprese NO při zpracování akustické informace. Změny v počtu a rozložení NADPH-d pozitivních neuronů nastaly po experimentálních manipulacích. Například ablace sluchové kůry potkana měla za následek oboustranný pokles počtu NADPH-d pozitivních neuronů v colliculus inferior (Druga a Syka, 2001). V případě člověka se uvažuje i o významu změn v počtu

a rozložení NADPH-d pozitivních neuronů v souvislosti s některými onemocněními centrálního nervového systému jako je schizofrenie či Parkinsonova nemoc (Mollace a spol., 1995; Blum-Degen, 1999).

Výrazná metabolická aktivita, která provází činnost neuronů, může mimo jiné vést k intenzivnímu kolísání hladin nitrobuňčného vápníku. Narušení nitrobuňčné homeostázy vápníku může ovlivnit funkci i přežívání neuronů a představovat první krok v neuronální degeneraci (Foster a spol., 2007). Změny ve vápníkové homeostáze ve stárnoucím mozku jsou dávány do souvislosti s úbytkem funkční zdatnosti, ať již představují příčinu či průvodní jev (Khachaturian 1989; Verkhatsky a Toescu, 1998). Hlavními specifickými cytoplasmatickými pufrů vápníku v nervové buňce, které napomáhají k udržení homeostázy kalcia, jsou tzv. vápník vážící proteiny (CBP), kalbindin, parvalbumin a kalretinin (Gibson a Peterson, 1985; Feldman a spol., 1990; Baimbridge a spol., 1992; Villa a spol. 1994).

Rozložení buněk produkujících parvalbumin (PV) a kalbindin v centrálním nervovém systému potkana popsal poprvé Celio (1990). PV-ir neurony se nacházely ve většině částí centrálního sluchového systému s výjimkou corpus geniculatum mediale (Celio, 1990; Covenas a spol., 1991). Jejich rozložení je částečně komplementární k neuronům exprimujícím kalbindin, s dominantním zastoupením parvalbuminu v primárních a kalbindinu v sekundárních sluchových oblastech, jak bylo také popsáno u myši (Cruishank a spol., 2001), opic (Jones, 2003) a nakonec i u lidí (Tardiff a spol., 2003). Společný výskyt exprese kalbindinu, parvalbuminu a kalretininu v jedné buňce se týká jen velmi malého počtu neuronů (Celio 1990, Kubota a spol., 1994; Leuba a Saini, 1997; Kemppainen a spol., 2000) a tak tyto tři vápník vážící proteiny charakterizují tři převážně oddělené neuronální populace (Demeulemeester a spol., 1989; Rogers a Resibois, 1992). Obecně lze říci, že pro všechny tři zmíněné proteiny je typický výskyt v interneuronech (Golgi typ II) jejichž přenašečem je GABA. V tomto ohledu výrazně vyniká parvalbumin, jehož kolokalizace s GABA je téměř stoprocentní (Celio, 1986; Kosaka a spol., 1987; de Felipe a Jones, 1992; Ren a spol., 1992; Condé a spol., 1994; Kawaguchi a Kubota, 1998). Parvalbumin exprimující neurony tudíž představují svébytnou populaci GABA-ir neuronů, především košíčkových, ale také chandelierových buněk. Zároveň lze říci, že jde do značné míry o odlišnou populaci interneuronů než NADPH-diaforáza-exprimující neurony (Dun a spol., 1994; Morello a spol., 1997; Jinno a Kosaka, 2002).

V posledních letech přibývá prací dokládajících, že silně aktivní GABA-ir korové košíčkové buňky, které produkují parvalbumin, jsou generátorem tzv. gamma oscilací, které jsou klíčové pro vytvoření časového rámce zpracování informací v mozku (Kawaguchi

a Kubota, 1998; Bartos a spol., 2007). V hipokampu tyto parvalbumin exprimující buňky představují 20% GABA-ir interneuronů (Freund a Buzsáki, 1996) a vytvářejí extenzivní síť propojené pomocí gap junctions (Fukuda a spol., 2006). Pokles počtu či funkce těchto interneuronů byl popsán u několika významných onemocnění lidského mozku jako je schizofrenie a epilepsie (Lewis a spol., 2005; Woo a Lu, 2006). Na druhé straně, v lidském mozku jedinců ve vyšším věku, kteří netrpěli žádným psychiatrickým nebo neurodegenerativním onemocněním, nebyl nalezen žádný pokles počtu parvalbumin pozitivních buněk, zatímco poklesy v počtech kalbindin a kalretinin pozitivních neuronů prokázány byly (Bu a spol., 2003).

## **1.2. Hodnocení funkce sluchového systému**

V tomto přehledu jsou představeny především metody, které mají přímou souvislost s postupy užitými v této dizertační práci.

### **1.2.1. Stanovení sluchových prahů**

Objektivním prostředkem ke stanovení sluchových prahů jsou akustickým podnětem vyvolané (evokované) odpovědi. Jsou to projevy mozkové elektrické aktivity, které mají pevný časový vztah k definovaným zvukovým stimulům. Šíří se jako nervový vzruch ve sluchové dráze a lze je zaznamenat pomocí elektrod umístěných na povrchu hlavy.

K vlastnímu stanovení sluchových prahů se u zvířat nejčastěji užívá kmenových vyvolaných odpovědí ABR („Auditory Brainstem Response“). Vyznačují se velmi krátkým trváním odpovědi (řádově do 10 milisekund). Standardně je při jejich nahrávání přítomno 5 vln. Podle převažujících názorů I. a II. vlna odpovídá aktivitě distální a proximální části sluchového nervu, III. odpovídá aktivitě sluchového jádra, IV. odpovídá pravděpodobně aktivitě oliva superior a V. aktivitě colliculus inferior (Moller, 2000). Ke zvýraznění elektrických odpovědí se využívá metoda zprůměrnění. Zprůměrněním určitého množství odpovědí se zvýší poměr amplitudy odpovědi a amplitudy šumu pozadí. Můžeme obdobně zaznamenat i odpovědi se střední latencí (middle latency responses – MLR; 15-60 ms), které jsou považovány za projev aktivity thalamu a kůry.

Využitím snímání ABR v lidské objektivní audiometrii je tzv. audiometrie evokovaných kmenových odpovědí (BERA). U lidí se ale pro stanovení sluchového prahu standardně používají metody, jež mají subjektivní charakter, jako je tónová a slovní (řečová) audiometrie. Je vhodné si také uvědomit, že ve srovnání s malými experimentálními zvířaty (včetně kočky) je sluchová dráha u člověka podstatně delší, neboli i cestovní doba pro přenos

signálu je delší, což je mimo jiné významné pro interpretaci evokovaných odpovědí, zvláště v případě porovnávání s pokusnými zvířaty (Moller a Janneta, 1981; Moore, 1987).

### **1.2.2. Otoakustické emise**

Snímání otoakustických emisí (OAE) je objektivní metoda hodnotící projevy aktivního pohybu (elektromotility) vnějších vláskových buněk a tím i jejich funkční stav. Otoakustické emise představují velmi slabé zvuky (o 40 – 50 dB nižší než je intenzita stimulujícího zvuku), které lze zaznamenat v zevním zvukovodu citlivým mikrofonem. Jde o poměrně rutinní metodu užívanou i v lidské audiometrii, uplatňují se v diferenciální diagnóze poruch sluchu a jsou využívány např. při skriningovém vyšetření sluchu novorozenců (Kemp, 2002). Otoakustické emise byly poprvé popsány Kempem (Kemp, 1978, 1979) jako aktivně pozměněný odraz postupující vlny pohybem vnějších vláskových buněk. Do jaké míry a jakým způsobem se ale původní energie postupující vlny přesně podílí na vzniku otoakustických emisí, není doposud zcela jasné (Kemp, 1986; Rossi a kol., 1989; Fukazawa, 1992; Kemp, 2002).

Otoakustické emise lze vyvolat jako odpověď na akustické podněty (transientní OAE – TEOAE, OAE distorzního produktu – DPOAE), mohou ale být zaznamenány i bez akustické stimulace (spontánní OAE – SOAE).

- **SOAE** jsou úzkopásmové akustické signály vznikající na základě aktivní pohyblivosti OHC. Jejich výskyt je spojen s fyziologickým sluchovým prahem, je možné je zaznamenat zhruba u 50 % normálně slyšící populace. Mohou dosahovat kladných decibelových hodnot (dB SPL).

- **TEOAE** vznikají jako reakce na akustickou stimulaci krátkým podnětem, nejčastěji širokopásmovým klikem, proto jsou v literatuře rovněž nazývány „click – evoked OAE“ (Kemp, 1998). Protože akustický klik obsahuje široké spektrum frekvencí, mají i TEOAE komplexní charakter. Latence zaznamenávaných TEOAE odpovídají délce cesty, kterou musí absolvovat zvukové vlnění k dosažení specifického místa podél ductus cochlearis a k opětovnému návratu (Gelfand, 1997). Zatímco u lidí jsou TEOAE poměrně dobře vybavné u všech věkových skupin (ale mizí u sensorineurálních patologií sluchu), u hlodavců jsou detekovatelné např. u morčat a králíků, u potkanů a myši jsou vybavitelné jen sporadicky (Khvoles a spol., 1996).

- **DPOAE** jsou vyvolány nelineární interakcí simultánního působení dvou čistých tónů, tzv. „primaries“ o různých frekvencích  $f_1$ ,  $f_2$  (Kemp, 1998). Tyto frekvence musejí být blízké, ale ne příliš blízké, aby oba tóny (respektive obě postupující vlny) mohly spolu ve větší míře

interagovat a vytvářet tak distorzní produkty. Nejvyšší hodnoty DPOAE jsou naměřeny, pokud je poměr frekvencí  $f_2/f_1$  okolo 1,2. Amplitudy DPOAE jsou rovněž vyšší, pokud intenzita  $f_1$  převyšuje  $f_2$  o 10 – 15 dB. Důvodem pro to je, že v místě odpovídající frekvenci  $f_2$  bude pak energie postupujících vln obou tónů (o frekvencích  $f_1$  a  $f_2$ ) přibližně stejná. Díky tomu může docházet k rovnocenné nelineární interakci obou stimulů. Nejintenzivnější naměřená DPOAE svou frekvencí odpovídá vzorci  $2f_1 - f_2$  (tzv. kubický diferenční tón), ostatní kombinace mají nižší intenzitu (např.  $2f_2 - f_1$ , atd.). Původně se uvádělo, že nejintenzivnější DPOAE ( $2f_1 - f_2$ ) vzniká v místě geometrického průměru obou primárních frekvencí, které leží uprostřed mezi oblastmi maximálního rozkmitu bazilární membrány pro  $f_1$  a  $f_2$  frekvence (Gelfand, 1997). Skutečnost je ale komplikovanější a DPOAE (včetně  $2f_1 - f_2$ ) jsou spíše produkovány v celém pásu bazilární membrány od baze až po místo odpovídající  $f_2$ . Navíc je třeba vzít v potaz, že vytvořený distorzní produkt  $2f_1 - f_2$  se sám propaguje jako nová postupující vlna, která stimuluje své odpovídající místo na bazilární membráně (tj.  $2f_1 - f_2$ , apikálně od  $f_2$ ) a zde vytváří vlastní emisi, která dále interaguje s distorzními produkty. Celkově je otázka vzniku a následné interakce distorzních produktů OE velmi komplexní, pro bližší studium viz např. Berlin (1998), nicméně jejich experimentální i klinická aplikace pro hodnocení funkce sluchu je velmi užitečná.

Změny v DPOAE jsou citlivý indikátor změn funkce, poškození, či zániku vnějších vláskových buněk, a mohou odhalit skrytou kochleární patologii ještě dříve, než dojde k posunu sluchových prahů (Lichtenhan a spol., 2005; Davis a spol., 2005). DPOAE zaznamenáváme prakticky vždy u lidí i zvířat normálně slyšících, zcela chybí (v odpovídajícím frekvenčním rozmezí) v případě sensorineurální ztráty přesahující cca 40 – 60 dB (Harris, 1990; Oeken a Muller, 1995). U lidí i zvířat byl navíc popsán převažující obecný pokles DPOAE s věkem (Parham, 1997; Jimenez a spol., 1999; Kon a spol., 2000; Guimaraes a spol., 2004).

### **1.3. Změny sluchu ve stáří – presbyakuze**

Je dobře známo, že v průběhu stárnutí dochází ke zhoršování funkce sluchu savců včetně lidí označovanému jako presbyakuze. V lidské populaci představuje presbyakuze velmi významný zdravotní a sociální problém (Frisina a Frisina, 1997; Mazelová a spol., 2003; Gordon-Salant a spol., 2007). Nejčastěji se zprvu projevuje poruchou vnímání vysokých frekvencí, postupem času je porušeno i vnímání zvuků o střední a nižší frekvenci, zároveň ale dochází ke zhoršenému vnímání komplexních zvuků, jako např. lidské řeči, a to i v situacích, kdy je posun sluchových prahů velmi malý. K příslušným patologickým

změnám dochází na nitroušní (kochleární) úrovni, ale i v centrální sluchové dráze (pro celkový přehled presbyakuze viz Schuknecht a Gacek, 1993; Willot a spol., 2001; Syka, 2002; Gates a Mills, 2005; Ohlemiller a Frisina, 2008). Ačkoliv je termín obvykle používán v humánní problematice, z výše uvedené definice je jasné, že je jeho použití fakticky možné i u zvířecích modelů, i když v tomto případě chybí možnost hodnotit snížené porozumění řeči a subjektivní složku dopadů ztráty sluchu. Obecně se používá rozdělení presbyakuze podle lokalizace patologických změn na striální (metabolickou), senzoryneurální (zánik vláskových buněk) a neurální, která se může týkat jednak degenerace na úrovni spirálního ganglia a sluchového nervu, a v tom případě ještě patří k periferním komponentám presbyakuze, jednak se může týkat změn v centrálním nervovém systému, a pak tvoří centrální komponentu presbyakuze. Presbyakuze v důsledku snížení poddajnosti a následné ztuhlosti bazilární membrány Cortiho orgánu je dnes považována za pouze teoretický model. V mnoha případech je presbyakuze klasifikována jako smíšená, tedy z několika různých příčin podle způsobu vzniku. V dalším textu se budu zabývat vesměs pouze zjištěními u zvířecích modelů presbyakuze.

### **1.3.1. Kmeny zvířat užívaných k výzkumu stárnutí sluchu**

Zvířecí experimentální modely mají ve srovnání s člověkem výhodu vzhledem k poměrně krátké průměrné délce života malých experimentálních zvířat (2 roky myš, 3 roky potkan, 5 - 8 let morče), přesto se i v těchto případech často jedná o pokusy s celkově mnohem delším časovým rozvrhem oproti experimentům, kde je možné změnu v pokusné skupině zjistit bezprostředně po jednorázovém nebo krátkodobém zákroku či působení. Změny pozorované v průběhu stárnutí nejsou výrazně variabilní jen mezi jednotlivými druhy, ale i u různých kmenů v rámci jednoho živočišného druhu.

Mezi klasické zvířecí modely presbyakuze patří outbrední kmen pískomila mongolského, jehož audiometrický rozsah je srovnatelný s lidským (tj. maximální citlivost na frekvenci okolo 4 kHz) (Mills a spol., 1997; Schmiedt a spol., 1996; Boettcher a spol., 1993, 1995; Adams a Schulte, 1997). Navíc je obdobně jako u člověka velmi variabilní i sluchová ztráta, která se u těchto zvířat s rostoucím věkem objevuje. Dalším klasickým experimentálním zvířetem užívaným k výzkumu presbyakuze je inbrední (tj. geneticky uniformní) kmen myši C57BL/6J (Willott a spol., 1988b, 1993; Mc Fadden a Willott, 1994a,b; Willott, 1996; Walton a spol., 1998), jehož příslušníci trpí časným a progresivním zhoršováním sluchové funkce. U outbredního kmene myši CBA/CaJ bylo naopak zaznamenáno jen malé zhoršení sluchových prahů s rostoucím věkem (Willot, 1986; Willot a



spol., 1988a; Prosen a spol., 2003), přesto bylo u nich přítomné signifikantní zhoršení distorzních produktů otoakustických emisí (Varghese a spol., 2005).

Pokud se výsledky experimentů vztahují k lidské presbyakuzi, je třeba vzít samozřejmě v úvahu, že frekvenční maximum citlivosti sluchu myši leží kolem 16 kHz (Mikaelian, 1979; Henry a Chole, 1980). To samozřejmě platí i pro potkana (Syka a spol., 1996) a další druhy zvířat. Jiný rozsah slyšitelné oblasti znamená i např. jiný význam spojení „oblasti vyšších frekvencí“; pro člověka jde již o frekvence mnohdy jednoznačně ležící v oblasti ultrazvuku.

U potkana představuje Long Evans outbrední kmen s normálním průběhem stárnutí, dožívající se kolem 36 měsíců, s normálním sluchem v dospělosti a jen mírným úbytkem sluchové funkce ve stáří (Popelář a spol., 2003, 2006). Long Evans je tak jistou potkaní analogií myšího kmene CBA. Naproti tomu inbrední kmen Fischer 344 má zrychlený průběh stárnutí, které je doprovázeno výskytem četných patologií, a doba dožití jedinců tohoto kmene je kolem 24-28 měsíců (Sass a spol., 1975; v posledních desetiletích se uvádí spíše stále se zkracující doba dožití, viz Caspary a spol., 2008). Kmeny Long Evans a Fischer 344 představují dva kmene potkanů s velkou šíří morfologických, fyziologických a behaviorálních rozdílů. Například Fischer 344 vykazuje, podobně jako další inbrední kmene (Wistar, Sprague-Dawley a Dark-Agouti), velký kognitivní deficit v různých behaviorálních testech v Morrisově vodním bludišti, na rozdíl od divokých potkanů a kmene Long Evans (Harker a Whishaw, 2002). U starých zvířat Fischer 344 se často objevuje kardiomyopatie, fibróza a chronická intersticiální myokarditida a nefropatie (Coleman a spol., 1977; Goodman a spol., 1979). Potkani kmene Fischer 344 jsou tak často používaným inbredním kmenem i v toxikologii a v onkologickém výzkumu. Obvyklá je též degenerace sítnice vedoucí k silnému poškození zraku ve stáří (Di Loreto a spol., 1994). Co se týče sluchového systému, již dříve byla u kmene Fischer 344 popsána ve stáří degenerace struktur hlemýžďe spojená se zvýšením sluchového prahu (Simpson a spol., 1985; Keithley a spol., 1992) a posléze byla zjištěna také degenerace stria vascularis (Buckiová a spol., 2006, 2007). Ve srovnání se starými jedinci kmene Long Evans mají starci Fischer 344 velký posun sluchového prahu (v oblasti vyšších frekvencí až kolem 50 dB), výrazný pokles ve velikosti amplitudy vyvolaných kmenových odpovědí, vymizení distorzních produktů otoakustických emisí a pokles ve středoušní poddajnosti (Popelář a spol., 2003, 2006). Ve studiích specializovaných na biochemické aspekty presbyakuze jsou hojně užíváni potkani Fischer 344 či kříženci Fischer 344 x Norway F1 (Milbrandt a spol., 1994, 1996; Palombi a Caspary, 1996a,b,c) (viz též kapitola 1.3.6.)

Kromě kmenů sloužících jako standardní modely různých forem zhoršování sluchu ve stáří bylo zhoršení sluchu s věkem prokázáno i u řady dalších druhů a kmenů. Např. apoE deficientní kmen myši, sloužících standardně jako zvířecí model aterogenní hypercholesterolemie (Reddick a spol., 1994), u kterého byl sledován vztah mezi hypercholesterolemií a ztrátou sluchu (Guo a spol., 2005). Konečně i u primátů (mimo člověka) byl zjištěn posun sluchových prahů ve stáří, především v oblasti vyšších frekvencí (Bennet a spol., 1983).

### **1.3.2. Nitroušní komponenta presbyakuze**

**Striální (metabolická)** – příčinou je pozvolná degenerace stria vascularis. K degeneraci dochází na úrovni baze, případně i apexu kochley a šíří se do střední části, může mít ohniskový, nesouvislý charakter výskytu. V důsledku degenerace marginálních a intermediálních buněk stria vascularis je indukována ztráta funkce  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPázy}$  a následně snížení endokochleárního potenciálu. Jak již jméno napovídá, stria vascularis má bohaté cévní zásobení a vysoký metabolický obrat. Zhoršení krevního průtoku se pravděpodobně významně podílí na její degeneraci, a tak i na poškození sluchu, jak o tom svědčí i histopatologické studie na pískomilech (Gratton a Schulte, 1995, Seidman a spol., 1999). Významnou degenerací stria vascularis se vyznačuje např. i potkaní kmen Fischer 344, kde nacházíme akumulaci apoptotických buněk v bazální vrstvě vedoucí k odchlípení stria vascularis od spirálního ligamenta (Buckiová a spol., 2006, 2007), ačkoliv u tohoto kmene se na rychlém zhoršení sluchu připojuje i vliv středoušní patologie (Popelář a spol., 2006). Pokles endokochleárního potenciálu o hodnotu kolem 20 mV vede k posunu sluchového prahu v celém frekvenčním spektru, nejvíce ale v oblasti vysokých frekvencí (až 40-50 dB). Fakt, že přímé podání látek do kochley, které dočasně upravilo endokochleární potenciál, nastolilo i zlepšení sluchových prahů, vedl k teorii striální presbyakuze jako tzv. mrtvé baterie („dead battery“) (Gratton a Schulte, 1995; Spelman a spol., 2004).

**Senzorineurální** – hlavní patologickou složkou je v tomto případě zánik vnitřních nebo vnějších vláskových buněk. Častou příčinou je vystavení hluku (akutní, ale mnohem častěji dlouhodobé a opakované), vliv ototoxických látek (některá antibiotika, atd.) a dále některé dědičné patologie. Typickým projevem je ztráta sluchu v oblasti vyšších frekvencí. U člověka začíná prudší sklon audiogramu nejprve ve frekvencích vyšších, nežli jsou frekvence řeči, proto je porozumění řeči zprvu zachovááno. Standardním zvířecím modelem tohoto typu presbyakuze je kmen myši C57BL/6J (Henry, 1984; Parham, 1997, Syka 2002). Snížení počtu vnějších a vnitřních vláskových buněk je u tohoto kmene detekovatelné již

od 3 měsíců věku a postupuje od apexu dále do středu kochley (Spongr a spol., 1997). U C57BL/6J myši byly ovšem rovněž popsány patologické změny cévní vodivosti ve vnitřním uchu (Brown a spol., 1995). Stárnutí samotné není zřejmě nutně spojené s význačnou ztrátou vláskových buněk, jak dokazují studie u potkana (Popelář a spol., 2006) či pískomila (Mills a spol., 1997). Z genů, které se na tomto typu poškození sluchu se stárnutím mohou podílet, je zvažována např. role genu Ahl, který je přítomen i u kmene C57BL/6J a který je dáván do souvislosti i s citlivostí na poškození vyvolané hlukem (Johnson a spol., 1997; Ohlemiller, 2002; Harding a spol., 2005).

**Neurální** – Protože degenerace sluchového nervu a buněk spirálního ganglia bývá studována v jedné řadě s kochleárními komponentami presbyakuze, oddělují ji od neurálních změn, které se týkají centrálního sluchového systému, na nichž mohou mít, zvláště ve vyšších etážích, podíl i změny provázející stárnutí centrální nervové soustavy jako celku. Izolovaná a primární forma poškození v této oblasti je poměrně vzácná, vesměs pouze jako jednostranná, následkem úrazu či neurinomu (nádor sluchového nervu). Degenerace zde bývá častěji sekundární, následuje mnohdy s odstupem po zničení smyslových buněk, a tak je např. limitujícím faktorem pro voperování kochleárního implantátu. Patří sem i asynchronní aktivita vláken sluchového nervu, snad v souvislosti s porušením synaptického spojení s vláskovými buňkami (Hellstrom a Schmiedt, 1990; Bohne a spol., 1990; Schucknecht a Gacek, 1993).

### **1.3.3. Terapeutické ovlivnění nitroušní presbyakuze**

Přežití a funkce sensorických orgánů se zvyšujícím se věkem závisí na řadě faktorů. Zásadní význam má mimo jiné zachování dostatečného krevního zásobení a tak přísunu kyslíku a živin, zhoršení v tomto přísunu se může podílet na sensorineurální i striální formě presbyakuze. Silně vaskularizované epithelium ve stria vascularis je totiž zdrojem kladných endokochleárních potenciálů a vysokých hladin draslíku v endolymfě, dvou nezbytných podmínek normální funkce vnějších a vnitřních vláskových buněk (Melichar a Syka, 1987). Histologické studie u pískomilů pak dodávají důkazy, že cévní poškození se na s věkem spjaté ztrátě sluchu skutečně podílí (Gratton a Schulte, 1995; Seidman a spol., 1999).

Mezi patologické procesy spojené se stárnutím, které ve svém důsledku znamenají snížení přísunu krve k orgánům těla včetně smyslových orgánů, patří např. diabetes mellitus (II. typu). Vede k rozvoji mikroangiopatie a neuropatie s následnou degenerací buněk spirálního ganglia a stria vascularis (Maia a Campos, 2005, Frisina a spol., 2006). Další z dobře známých patologických procesů spojených se stárnutím je ateroskleróza. Patologické změny, ke kterým při jejím rozvoji dochází v cévách, zahrnují dysfunkci a zánětlivé

poškození cévní výstelky – endothelu a akumulaci lipidů pod ní, následované v daném místě proliferací cévních hladkých svalových buněk a kolagenové matrix (Mestas a Ley, 2008). V důsledku čehož dochází ke zmenšení světlosti cévy a snížení krevního průtoku. Zpomalení aterosklerotického procesu v malých cévách sensorických orgánů by tak mohlo pomoci ke zpomalení ztráty sluchu ve stáří. Aterosklerotický proces probíhá také ve velkých cévách, kde vede kupříkladu k rozvoji kardiovaskulární patologie. U lidí již byl nalezen statistický vztah mezi vyššími hladinami cholesterolu a presbyakuzí, i mezi presbyakuzí a výskytem kardiovaskulárních onemocnění (Gates a spol., 1993; Villares a spol., 2005).

Mezi léky standardně a úspěšně užívanými v léčbě a prevenci kardiovaskulárních onemocnění patří statiny (Shepherd a spol., 1995; Davignon, 2001). Statiny primárně účinkují jako kompetitivní inhibitory 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy, klíčového enzymu v biosyntéze cholesterolu, ale také látek podílejících se na buněčné aktivitě a proliferaci, což má klíčový význam pro potlačení patologických změn cévního endothelu a vzniku aterosklerotických lézí. Jejich aplikace by tak mohla zlepšit i cévní zásobení smyslových orgánů (Liao, 2005).

Z dalších faktorů, které se pravděpodobně podílejí na rozvoji presbyakuze a kde již byly podniknuty pokusy o terapeutickou manipulaci, je možné zmínit především následující. Vzhledem k teorii, že se na stárnutí organismu podílí akumulující se působení volných radikálů kyslíku, byly také se smíšeným úspěchem podniknuty pokusy ovlivnit rozvoj presbyakuze pomocí aplikace antioxidantů (Derin a spol., 2004; Le a Keithley, 2007) či kalorickou restrikcí (Seidman, 2000). V případech, kde je známa genetická souvislost s konkrétní formou poškození sluchu v průběhu stárnutí, se zkoumají již i možnosti přímého dodání chybějícího genu do kochle, jako je tomu u genu Ahl (Izumikawa a spol., 2005). Dále se hledají např. geny, které mají vztah k apoptóze vláskových buněk (Tadros a spol., 2008). Celkově jsou ale pokusy o terapeutické působení na rozvoj presbyakuze teprve v rané fázi.

Terapeutické ovlivnění rozvoje periferních forem presbyakuze může mít ale význam i vzhledem k možné návaznosti některých složek centrální presbyakuze na předchozím poškození kochleárních funkcí. K rozpracování možností přímého ovlivnění centrální komponenty presbyakuze bude třeba detailně objasnit procesy a změny, které její rozvoj provázejí, k čemuž se snaží přispět i experimenty uvedené v této dizertační práci.

#### **1.3.4. Centrální komponenta presbyakuze - elektrofyziologie**

Co se týče centrální komponenty presbyakuze, předpokládá se, že je u člověka i dalších savců úzce spojena především se zhoršeným zpracováváním parametrů komplexních zvuků v

centrálním nervovém systému (Dubno a spol., 1984; Fitzgibbons a Gordon-Salant, 1994; Schneider a spol., 1994; Snell, 1997; Strouse a spol., 1998; Tremblay a spol., 2002, 2003; Ostroff a spol., 2003). Komplexní zvuky, obsahující časově se rychle a nepřetržitě měnící parametry frekvence a amplitudy, jsou charakteristickou součástí nejen lidské řeči, ale i zvířecích vokalizací. Zachování přesného zpracování časových a spektrálních rysů komplexních zvuků má pro daný subjekt často životně důležitý význam. Pro zpracování komplexních zvuků je klíčová funkce inhibičních okruhů, které se podílejí na jemném vyladění a zaostření odpovědi neuronů na rychle se měnící parametry zvuku (Walton a spol., 1997; Strouse a spol., 1998; Krishna a Semple, 2000; Liang a spol., 2002; Caspary a spol., 2002b; Mazelová a spol., 2003).

Jelikož pro zpracování komplexních zvuků se ukazuje nezbytné zachování funkce vyšších etáží sluchové dráhy, předně pak sluchové kůry (a včetně i jejích sekundárních oblastí) (Rauschecker, 1998; Johnsrude a spol., 2000; Eggermont 2001; Suga, 2006, Kudoh a spol., 2006; Engineer a spol., 2008), pokles inhibice zprostředkované kyselinou gamma-aminomáselnou (GABA), která je hlavním inhibičním neurotransmiterem v centrálním nervovém systému, může přispívat k poškození sluchu ve stáří. V poslední době skutečně přibývá prací dokládajících snižující se funkci GABAergní inhibice s věkem.

V elektrofyziologii byly již dříve u C57BL/6J myši popsány změny aktivity neuronů v CI (Willott, 1984, 1986). Snížení citlivosti k vysokým frekvencím (v souvislosti s kochleárními změnami) vedlo ke změně charakteristické frekvence neuronů CCI (od pásma vysokých frekvencí ke středním frekvencím, na těchto změněných frekvencích byly pozorovány nižší prahy než prahy pro tytéž střední frekvence u topicky odpovídajících neuronů mladých myši). Záznam aktivity jednotlivých neuronů u starých zvířat ale odhalil další změny, především méně přesné zpracování komplexních zvuků v důsledku rozšířených excitačních polí v colliculus inferior (Palombi a Caspari 1996a,b,c; Walton a spol., 1998; Walton a spol., 2002; Simon a spol., 2004). Zajímavé je, že toto zhoršení inhibiční funkce v sluchové dráze bylo prokázáno podobnou měrou pro oba myší kmeny, C57 i CBA (McFadden a Willott, 1994; Walton a spol., 1998, 2002; Simon a spol., 2004; Felix a Portfors, 2007), přestože jinak se oba kmeny výrazně liší mírou zachování sluchu ve stáří, a tudíž nelze tuto změnu inhibiční funkce připsat pouze kochleárním změnám.

Měřením aktivity jednotlivých neuronů a skupin neuronů byly ve sluchové kůře zjištěny v principu obdobné změny jako v CI, zatímco při podobném měření ve ventrálním jádře NC nebyla výše uvedený posun citlivosti ke středním frekvencím přítomný (Willott a spol., 1991, 1993). Nověji Turner a spol. (2005a) zjistili, že v V. vrstvě primární sluchové kůry ubývá tzv.

V/U úzce naladěných receptivních polí neuronů na charakteristické frekvence, tj. neuronů s úzkými prahovými křivkami, a přibývá receptivních polí komplexně naladěných, tj. přibývá neuronů odpovídajících v širším rozmezí frekvencí, u kterých se navíc zvyšuje i jejich excitabilita. Tyto dva různé typy receptivních polí fungují vedle sebe i v mladé primární sluchové kůře jako zřejmě dva odlišné systémy zpracování akustické informace a mají pravděpodobně i odlišné další projekce. Neurony s úzkými receptivními poli jsou spojeny s descendentním systémem kortiko-thalamické dráhy (Winer a spol., 1998; Winer a Prieto, 2001; Turner a spol., 2005a), zatímco neurony s komplexními receptivními poli se podílejí více na kortiko-kortikálním spojení a spíše než předchozí (V/U) dostávají přímé inhibiční vstupy, které zřejmě ve stáří ztrácejí (Hefti a Smith, 2000; Hefti a Smith, 2003; Turner a spol., 2005b). Ubývání V/U polí a zvýšení počtu hyperexcitabilních komplexních polí by podle uvedených autorů mělo vést k většímu propouštění šumu do celého korového zpracování a vnímání zvuku. To je v souladu s pozorovanými jevy, které doprovázejí i lidskou presbyakuzi.

### **1.3.5. Centrální komponenta presbyakuze - histochemie**

V souladu se závěry plynoucími z elektrofyziologie, histochemické práce přinášejí ze stárnoucí sluchové dráhy nálezy změněných hladin inhibičních neurotransmiterů GABA (resp. GAD, smíšeně obou izoform, nebo GAD65 a GAD67 každé zvláště) a glycinu, a dále změny strukturálních podjednotek GABA<sub>A</sub> a B receptorů a jejich vazebné síly. Již v kochleárním jádře byl zaznamenán pokles hladin glycinu u starých myší kmene C57, ne však u kmene CBA (Willott a spol., 1997). S věkem zhoršená funkce glycinových receptorů v NC byla prokázána u kmene potkanů Fischer 344 (Krenning a spol., 1998). Ve vyšších etážích sluchové dráhy je již hlavním inhibičním neurotransmiterem kyselina gamma-aminomáselná (GABA). Nejvíce prací v tomto směru pochází z Casparyho laboratoře ve Springfieldu. U starých potkanů kmene Fischer 344 byl popsán pokles počtu GABA-ir neuronů v centrálním jádře CI (CCI) doprovázený snížením enzymatické aktivity GAD a poklesem uvolňování GABA ze synaptických zakončení (Caspary a spol., 1990; Raza a spol., 1994, Caspary a spol., 1995). Dále byl v CCI popsán úbytek GABA-ir synaptických zakončení, bez úbytku v celkovém počtu všech neuronů (barvení podle Nissla) (Helfert a spol., 1999). Navíc byl pozorován i pokles vazebné intenzity GABA<sub>A</sub> a GABA<sub>B</sub> receptorů společně se změnami v proporčním složení jejich bílkovinných podjednotek, a to u starých potkanů kmene Fischer 344 i Sprague-Dawley (Gutierrez a spol., 1994; Milbrandt a spol., 1994, 1996, 1997; Caspary a spol., 1999; Schmidt a spol., 2008). Konečně, ve sluchové kůře

byl prokázán pokles hladin GAD65 a 67 mRNA a pokles optické denzity GAD67-ir neuronů u hybridních potkanů Fischer 344/Brown Norway (Ling a spol., 2005). V souhrnu lze říci, že jsou prokazovány změny na presynaptické i postsynaptické úrovni GABAergního systému.

V tomto ohledu není ale známo, zda toto snížení funkce GABAergního systému ve stáří je primárně závislé na zhoršující se funkci periferního smyslového orgánu (jak se zdá být závislé u funkce glycinergního přenosu v nucleus cochlearis – Willot a spol., 1997). Tedy zda je důsledkem snížené ascendentní aktivace, anebo zda je tato změna spíše centrálního původu, a tedy je rysem charakteristickým pro stárnoucí mozek. Víceméně všechny histochemické práce do současnosti testovaly zvířecí kmeny s velkou ztrátou sluchu ve stáří. Dosud tak nebyly u těchto změn popsány žádné případné mezikmenové rozdíly v rámci jednoho druhu experimentálních zvířat, což je rozdílná situace od nálezů změřených hladin vápník vázících proteinů ve stáří, kde takové rozdíly již popsány byly (Zettel a spol., 1997; Idrizbegovic a spol. 2001, 2004). Přitom, jak již bylo řečeno, jsou vápník vázící proteiny ve velké míře současně exprimovány v týchž neuronech jako neurotransmitter GABA (Kosaka a spol., 1987; Kawaguchi a Kubota, 1998).

Změny v hladinách vápník vázících proteinů v neuronech byly v širším pohledu popsány v řadě korových a podkorových centrech mozku stárnoucích laboratorních zvířat. Hwang a spol. (2003) našel pokles počtu PV-ir neuronů včetně jejich morfologických změn v olfaktorickém bulbu starých potkanů. U starých potkanů byl pokles PV-ir neuronů a jejich zmenšení popsáno v cingulární kůře (Krzywkowski a spol., 1995). Významný pokles počtu CB exprimujících buněk a naopak malé změny ve výskytu PV-ir neuronů, byly pozorovány v hipokampu starých králíků (De Jong a spol., 1996). V mozku křečků (mozeček, striatum a hipokampus) s narůstajícím věkem klesla produkce mRNA pro CB, zatímco produkce mRNA pro CR a PV zůstala nezměněná (Kishimoto a spol., 1998). Ve sluchovém systému byly tyto změny popsány v kochleárních jádrech a v colliculus inferior u myši. Mimo jiné se ukázalo, že změny jsou v NC u všech tří proteinů výrazně specifické podle použitého laboratorního kmene myši (Idrizbegovic a spol., 2003,2004) a pro kalretinin tomu tak bylo i v colliculus inferior (Zettel a spol., 1997, 2001). V kontextu těchto nálezů byla uvedenými autory vznesena otázka potřeby zachování tvorby těchto proteinů (nebo některého z nich) ve stále aktivních neuronech ve stáří, tj. mimo jiné v důsledku zachované funkční aferentace.

Doposud se histochemické studie plně neshodují v názoru, k jakým změnám dochází ve stáří u NADPH-diaforáza/NOS-pozitivních neuronů, které byly některými autory považovány za poměrně stabilní systém (Huh a spol, 1997a). Častěji však byl popsán pokles počtu pozitivních neuronů, např. v mozkové kůře a striatu potkanů. Tyto studie naznačovaly

i proběhlou přestavbu dendritického větvení (Yamada a spol., 1996; Cha a spol., 1998). Byly již navrženy hypotézy o vazbě mezi změnami v počtu a funkci NADPH-diaforáza/NOS-pozitivních neuronů a následným zhoršením funkce somatosenzorického, čichového (Necchi a spol., 2002) a sluchového systému (Reuss a spol., 2000). Někteří autoři předpokládají, že změny v produkci NO by mohly představovat obecně významný faktor v rámci stárnutí centrálního nervového systému (Kirkwood a Kowald, 1997; McCann a spol., 1998; Yamada a Nabeshima, 1998).



## 2. CÍLE PRÁCE

V naší práci jsme se pokusili objasnit, jaké změny se objevují u potkana ve sluchové dráze s narůstajícím věkem, a to v neurochemických markerech systému inhibičních GABAergních interneuronů, které by mohly souviset s centrální komponentou presbyakuze.

Nejprve jsme s využitím markeru NADPH-diaforázy sledovali kvantitativní a kvalitativní morfologické změny populace interneuronů exprimujících ve sluchové kůře hlodavců neuromodulátor NO. Zároveň jsme využili i možnost zhodnotit, zda se u velmi starých jedinců potkaního kmene Long Evans vyskytují atrofické změny mozkové kůry.

Zajímala nás dále závislost změn ve stáří na zachovalé či nezachovalé funkci sluchu, a proto jsme do dalších studií zařadili zástupce dvou kmenů potkana s velmi rozdílnou mírou zachovalosti sluchové funkce s věkem, tj. Long Evans a Fischer 344. Vzhledem k významu parvalbumin exprimující subpopulace GABA-ir neuronů jsme se rozhodli sledovat změny imunoreaktivity parvalbuminu ve vyšších etážích stárnoucí sluchové dráhy, v colliculus inferior, corpus geniculatum mediale a sluchové kůře u obou kmenů.

Dále jsme se zajímali o změny celkové GABAergní neurotransmise ve stáří, a proto sledovali hladiny obou izoform klíčového enzymu pro tvorbu GABA, glutamátdekarboxylázy (GAD). Především nás zajímal stav u kmene Long Evans, který doposud na změny GABAergního systému ve stáří nebyl testován. Jednalo se o to, zda i kmen potkana se zachovanou sluchovou funkcí bude mít nález poklesu hladin GAD. Odlišnost změn jsme chtěli porovnat s nálezy u potkanů Fischer 344, kde byl pokles GABAergní funkce ve stáří již dříve zaznamenán. Hladiny a imunoreaktivita GAD65 a GAD67 byly sledovány v colliculus inferior, ve sluchové a ve zrakové kůře.

Dále jsme se pokusili v experimentu také o farmakologické ovlivnění presbyakuze. V našem případě se jednalo o periferní, senzoryneurální formu presbyakuze u standardního myšího modelu kmene C57BL/6J. Protože v případě tohoto modelu presbyakuze je třeba vzít v úvahu vliv aterosklerotického poškození cév s věkem, byla užitá látka ze skupiny statinů, standardních léků užívaných v humánní medicíně v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Jako indikátorů sluchové funkce jsme použili sledování sluchových prahů pomocí kmenových vyvolaných odpovědí (ABR) a také záznam distorzních produktů otoakustických emisí (DPOAE), které indikují stav vnějších vláskových buněk. Stejný experiment byl proveden i se vzorkem mladých apoE<sup>-/-</sup> myší, standardního zvířecího modelu aterogenní hypercholesterolemie. Účinek atorvastatinu na cévní stěnu byl ověřen u obou kmenů stanovením aktivity endotheliálních zánětlivých markerů.

## **Pracovní hypotézy experimentů byly formulovány následujícím způsobem:**

### **I. NADPH – diaforáza**

- Mění se ve stáří počet a distribuce NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v oblasti sluchové kůry potkana?
- Vzhledem k dobrému zobrazení dendritického větvení – mění se jeho charakter ve stáří a mění se morfologie NADPH-diaforáza pozitivních buněčných somat?
- Jsou přítomny u velmi starých potkanů kmene Long-Evans atrofické změny mozkové kůry?

### **II. PARVALBUMIN**

- Mění se v průběhu stárnutí počet neuronů exprimujících parvalbumin a jejich distribuce v CI, CGM a SK potkana?
- Mění se ve stáří velikost, morfologie a intenzita exprese u těchto parvalbuminových neuronů?
- Jsou tyto změny specifické v závislosti na použitém kmeni potkana? (Long-Evans vs Fischer 344)

### **III. GLUTAMÁTDEKARBOXYLÁZA**

- Mění se ve stáří počet neuronů exprimujících glutamátdekarboxylázu (GAD65 a GAD67) a jejich distribuce v CI, SK a ZK potkana?
- Mění se ve stáří velikost, morfologie a intenzita exprese u GAD-ir neuronů?
- Mění se ve stáří celkové hladiny glutamátdekarboxylázy (GAD65 a GAD67) v CI, SK a ZK?
- Jsou tyto změny specifické v závislosti na použitém kmeni potkana? (Long-Evans vs Fischer 344)

### **IV. ATORVASTATIN – farmakologické ovlivnění**

- Může podání atorvastatinu ovlivnit rychlý nástup poškození sluchu u mladých myši kmene C57/BL/6J?
- Může podávání atorvastatinu ovlivnit poškození sluchu i u myši apoE-/- ?
- Korelují u experimentálních zvířat změny v hladinách cholesterolu v krvi a v expresi endotheliálních zánětlivých markerů s funkčními nálezy?

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1. Testování rozdílů v počtu a morfologii NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře mladých a starých potkanů**

##### **3.1.1. Zvířata**

Do tohoto experimentu byli zařazeni potkani kmene Long Evans staří 3 (n=5) a 36 měsíců (n=6). Všechna zvířata pocházela z areálové chovné stanice a od 2 měsíců věku byla chována za standardních podmínek v areálovém zvěřinci. Žádná zvířata neměla během chovu známky středoušní infekce a 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. Mladí potkani vážili 250-300g a staří 400-500g.

##### **3.1.2. Histochemie**

Zvířata v hluboké anestezii (pentobarbital, 50 mg/kg, intraperitoneálně) byla transkardiálně perfundována nejprve fyziologickým roztokem a poté 4% roztokem paraformaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH = 7,4). Do 15 minut po perfuzi byly vyňaty mozky, postfixovány 1h v témže fixativu (4° C) a poté nasyceny v 30% roztoku sacharózy ve fosfátovém pufru (PBS) přes noc při téže teplotě. Na zmrazovacím mikrotomu byly nakrájeny frontální řezy ze zájmových oblastí o tloušťce 40  $\mu$ m.

Volné řezy byly následně preinkubovány v roztoku obsahujícím 0,8 % Tritonu X, 1,25 mg/ml malátu sodného, 0,5 mg/ml  $\beta$  – NADPH, a 1,0 mg/ml tetrazoliové modři (nitroblue tetrazolium) po dobu 60 min při teplotě 37° (vše Sigma). Následně byly řezy omyty v PBS, nataženy na sklíčka, vysušeny a překryty.

##### **3.1.3. Kvantitativní hodnocení a morfometrická analýza**

Analýza byla soustředěna na sluchovou kůru, na oblasti Te3 a Te1. Data získaná ze zrakové oblasti (V1,2) jsme použili jako přídatnou kontrolu pro zhodnocení početních změn ze dvou sensorických oblastí kůry. Hranice jednotlivých anatomických struktur byly určeny podle příslušných anatomických atlasů (Zilles, 1985; Paxinos a Watson, 1998). U každého zvířete bylo vybráno 10 řezů v rozmezí od -4,2 mm do -5,8 mm od bregmy a 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 jsme zvolili proloženou linii procházející horním (dorzálním) okrajem diencephala v daném řezu. Ve zrakové kůře jsme vybrali vzorky ve vzdálenosti mezi  $-5,0$  až po  $-6,5$  mm od bregmy. Pro zjištění počtu NADPH-d pozitivních buněk bylo použito dvojrozměrné počítání v náhodně umístěném hodnotícím rámečku o velikosti  $0,044 \text{ mm}^2$  (rámeček byl vyrytý přímo v okuláru, velikost pozorované plochy tkáně ohraničené rámečkem závisela na zvoleném objektivu, zde při užití 40x). Celkově byly neurony spočítány u mladých zvířat v 480 (Te1+3) a 327(V1,2) a u starých zvířat v 385 (Te1+3) a 385 (V1,2) hodnotících rámečcích.

K počítání buněk byl použit světelný mikroskop Leica DMRXA. Pomocí digitální kamery (Optronics,  $1600 \times 1200$  pixelů) byl obraz převáděn na monitor počítače a zde byla prováděna morfometrická analýza v programu QWin. Tloušťku sluchové a zrakové kůry jsme měřili jako kolmou spojnicí mezi povrchem mozku a rozhraním VI. korové vrstvy s bílou hmotou. Celkový počet měření činil u mladých zvířat 58 (sluchová kůra) a 45 (zraková kůra) a u starých zvířat 64 (sluchová kůra) a 55 (zraková kůra). Morfometrická analýza neuronů byla prováděna pouze ve sluchové kůře, 300 neuronů u mladých a 372 neuronů u starých zvířat bylo použito pro detailní analýzu. Dopředu určeným kritériem pro nevyločení vybraného neuronu z této analýzy byla přítomnost dobře viditelného dendritického větvení a viditelný nucleolus. V poloze maximálního zaostření jádra bylo buněčné tělo a dendrity obkresleny kurzorem na obrazovce monitoru a automaticky byly změřeny morfologické parametry. Pomocí softwaru QWin byly měřeny tyto parametry: a) plocha řezů somaty buněk, b) průměrná délka jednotlivých dendritických segmentů, c) počet viditelných dendritických segmentů a e) počet míst rozvětvení dendritů.

### ***3.2. Testování imunoreaktivity parvalbuminu v colliculus inferior, CGM a sluchové kůře mladých a starých potkanů dvou kmenů***

#### **3.2.1. Zvířata**

Do experimentu bylo zařazeno 19 potkanů (10 Long Evans, 3-5 měsíců starých  $n=5$ , 27-30 měsíců starých  $n=5$ , 9 Fischer 344, 3-5 měsíců starých  $n=5$  a 22 měsíců starých  $n=4$ ). Všechna zvířata kmene Fischer 344 byla získána ve věku 2 měsíců z Charles River Deutschland (Charles RiverWiga GmbH, Sulzfeld, Germany) a pak chována za standardních podmínek v areálovém zvěřinci. Všechna zvířata kmene Long Evans pocházela z areálové chovné stanice a od 2 měsíců věku byla chována za standardních podmínek v areálovém

zvěřinci. Žádná zvířata neměla během chovu známky středoušní infekce a 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. Mladí potkani obou kmenů vážili přibližně 200-300g a staří mezi 400-600g.

### **3.2.2. PV – imunohistochemie**

Zvířata v hluboké anestézii (pentobarbital 50mg/kg, intraperitoneálně) byla transkardiálně perfundována nejprve fyziologickým roztokem a poté 4% roztokem paraformaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH = 7,4). Do 15 minut po perfuzi byly vyjmuty mozky, postfixovány 1h v témže fixativu (4° C) a poté nasyceny v 30% roztoku sacharózy ve fosfátovém pufru (PBS) přes noc při téže teplotě. Na zmrazovacím mikrotomu byly nakrájeny frontální řezy ze zájmových oblastí o tloušťce 40 µm.

Volné řezy byly následně preinkubovány v blokovacím roztoku (kozí sérum – Vector) a poté inkubovány 48 h v PBS (4° C) obsahujícím anti-parvalbumin (1:1000, Sigma, St. Louis, MO). Poté byly řezy inkubovány s biotinylovanou sekundární protilátkou (1:200, Vector) po dobu 90 min a následně s avidin-peroxidázovým komplexem (1:100, Vektor) po dobu 1h, vše při laboratorní teplotě. Peroxidázová reakce byla zviditelněna 0,02% diaminobenzidinem s 0,01% hydrogen peroxidázou (3 min). Řezy byly namontovány na sklíčka, vysušeny a překryty.

U jednoho zvířete z každé skupiny (věk a kmen) byl vybrán každý druhý řez pro barvení podle Nissla z důvodu zjištění případných změn celkového počtu neuronů a dále pro pomocnou orientaci při určování hranic jednotlivých korových oblastí. Řezy byly inkubovány 10 minut v roztoku krezylové violeti (0,2g krezylové violeti + 100ml destilované vody + 200 µl 10% kyseliny octové), poté opláchnuty v destilované vodě a krátce ponořeny do diferenciačního roztoku (1 ml 10% kyseliny octové v 100 ml 70% ethanolu), vysušeny a překryty.

## ***3.3. Testování imunoreaktivity GAD65 a 67 v colliculus inferior, sluchové a zrakové kůře mladých a starých potkanů dvou kmenů***

### **3.3.1 Zvířata**

Do experimentu bylo zařazeno 42 potkanů (30 Long Evans, 3-5 měsíců starých n=15, 30-35 měsíců starých n=15, 12 Fischer 344, 3-5 měsíců starých n=7 a 24 měsíců starých n=5).

Všechna zvířata kmene Fischer 344 byla pořízena ve věku 2 měsíců z Charles River Deutschland (Charles RiverWiga GmbH, Sulzfeld, Germany) a pak chována za standardních podmínek v areálovém zvěřinci. Všechna zvířata kmene Long Evans pocházela z areálové chovné stanice a od 2 měsíců věku byla chována za standardních podmínek v areálovém zvěřinci. Žádná zvířata neměla během chovu známky středoušní infekce a 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. Mladí potkani obou kmenů vážili 200-300g a staří 400-600g.

### **3.3.2. GAD67 – imunohistochemie**

Long Evans potkani, 3-5 (n=5) a 30-35 (n=5) měsíců staří, a Fischer 344 potkani, 3-5 (n=5) a 24 (n=3) měsíců staří, 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). Do 15 minut po perfuzi byly vyjmuty mozky, postfixovány 1h v témže fixativu (4° C) a poté nasyceny v 30% roztoku sacharózy ve fosfátovém pufru (PBS) přes noc při téže teplotě. Na zmrazovacím mikrotomu byly nakrájeny ze zájmových oblastí frontální řezy o tloušťce 40 µm.

Volné řezy byly následně preinkubovány v blokovacím roztoku 1h (kozí sérum – Vector) a poté inkubovány 24 h v PBS (4° C) obsahujícím anti-GAD67 (myší monoklonální, 1:2000, Chemicon). Poté byly řezy inkubovány s biotinylovanou sekundární protilátkou (1:200, Vector) po dobu 1h a následně s avidin-peroxidázovým komplexem (1:100, Vektor) po dobu 1h, vše při laboratorní teplotě. Peroxidázová reakce byla zviditelněna 0,05% diaminobenzidinem s 0,01% hydrogen peroxidázou (3 min). Řezy byly namontovány na sklíčka, vysušeny a překryty.

### **3.3.3. GAD65 – imunohistochemie**

Long Evans potkani, 3-5 (n=4) a 30-35 (n=4) měsíců staří, byli podrobena stejné proceduře jako vedoucí k přípravě histologických řezů u potkanů pro barvení na GAD67.

Volné řezy byly následně preinkubovány v blokovacím roztoku 1h (kozí sérum – Vector) a poté inkubovány 72 h v PBS (4° C) obsahujícím anti-GAD65 (králičí polyklonální, 1:750, Chemicon) a 1% blokovací kozí sérum. Poté byly řezy inkubovány s biotinylovanou sekundární protilátkou (1:200, Biosource) po dobu 1h a následně s avidin-peroxidázovým komplexem (1:100, Vektor) po dobu 1h, vše při pokojové teplotě. Peroxidázová reakce byla

zviditelněna 0,05% diaminobenzidinem s 0,01% hydrogen peroxidázou (3 min). Řezy byly namontovány na sklíčka, vysušeny a překryty.

#### **3.3.4. GAD65 + 67 - western blot**

Pro tento druh analýzy byli užití Long Evans potkani, 3-5 (n=6) a 30-35 (n=6) měsíců staří, a Fischer 344 potkani, 4 (n=2) a 24 (n=2) měsíců staří. Zvířata v hluboké anestézii (ketamin 35 mg/kg + xylazin 6 mg/kg, intramuskulárně) byla dekapitována, jejich mozky rychle vyjmuty a ponořeny do ledově chladného fyziologického roztoku. Následně byly z obou hemisfér urychleně odebrány CI a oblasti sluchové a zrakové kůry. Odebrané vzorky zahrnovaly vždy celý CI (tedy centrální jádro a externí i dorzální kůru v jednom celku), sluchové oblasti kůry Te1+Te3 (Zilles, 1985) a zhruba rozsah zrakových oblastí V1+V2 (Paxinos a Watson, 1998). Všechny tkáňové vzorky byly v mikrozkrumavkách okamžitě vloženy do ledu a uloženy zmrazené při teplotě -80°C až do doby dalšího zpracování počínajíc homogenizací.

Tkáně byly homogenizovány Potter-Elvehjemovým homogenizátorem s teflonovým pístem za intenzivního chlazení v homogenizačním pufru 0.05 M Tris-NaCl (pH 7.4) s inhibitory proteáz. Homogenát jsme centrifugovali 10 minut při 10 000 x g při teplotě 4°C. Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bylo provedeno Bradfordovou metodou s použitím hovězího sérového albuminu (BSA) jako standardu. Vzorky (cytosolická frakce) jsme zředili vzorkovým pufrům obsahujícím 10% glycerol, 2% dodecyl sulfát sodný (SDS), 0.05% bromphenolovou modř a 4M dithiotreitol a 10 minut inkubovali ve vodní lázni při teplotě 80°C. Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo prováděno 150 minut při 30 mA na 1 gel na plochých polyakrylamidových gelech v prostředí SDS v elektroforetické soustavě Mini-Protean II (Bio-Rad), kde koncentrace akrylamidu v gelu byla 3%. Elektropřenos proteinů na nitrocelulóзовé membrány (Amersham, Biosciences) byl proveden v elektropřenosové soupravě (Bio-Rad Mini Protean II transblot) v transferovém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 0,1% SDS) při 350 mA po 60 minut při teplotě 4°C. Membrány byly inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě v blokovacím roztoku 5% nízkotučného mléka v TBST (10% Tris-NaCl s 0,05% Tween 20, pH 7,5). Po promytí (3x krátce 3x5 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 při laboratorní teplotě inkubovány 2 hod v roztoku sekundární protilátky konjugované oxidační metodou s křenovou

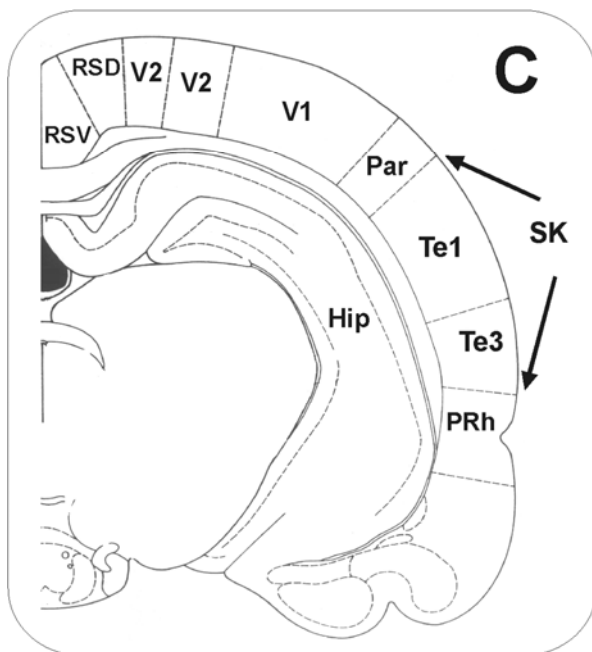
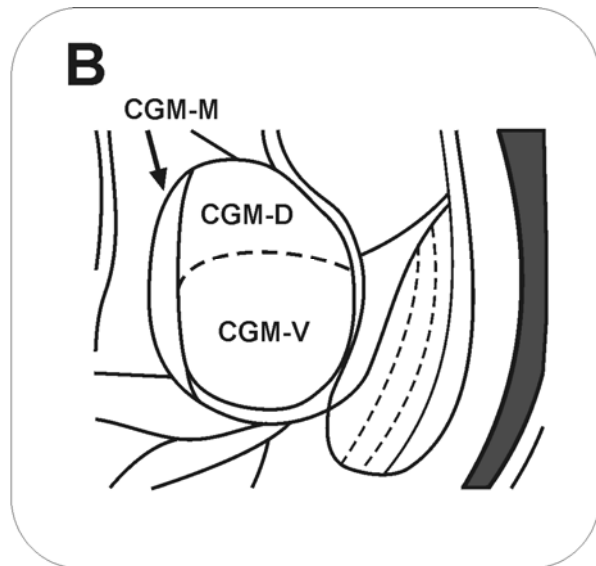
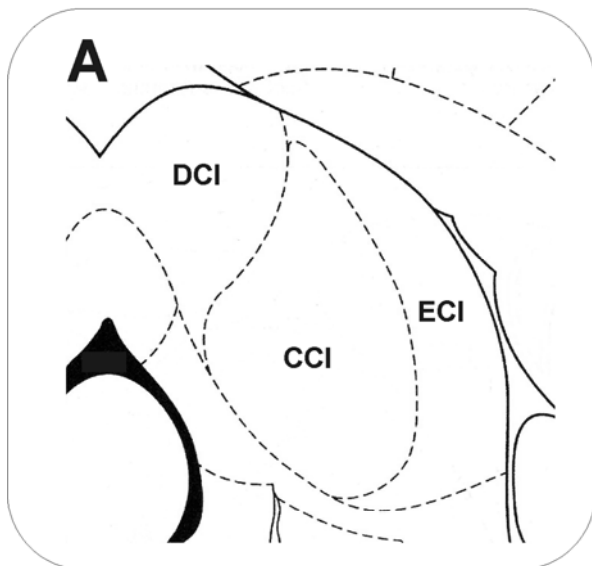
peroxidásou (anti-myší IgG 1:7500, Upstate a anti-králičí IgG 1:3333, Chemicon v TBST). Membrány po imunodetekci byly promyty a po 2 hodinové inkubaci v TBST byla provedena metoda zesílené chemiluminiscence (ECL). Detekční roztok byl připraven smícháním roztoku A (luminol) a B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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. Dále byly filmy naskenovány v proslém světle (Canon CanoScan 8400F). Pro zjištění relativního množství GADu a aktinu v jednotlivých vzorcích, jsme použili program ImageQuant. Hladiny GAD65 a GAD 67 byly vypočítány jako podíl optické denzity požadovaného proteinu oproti aktinu. Množství 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, GAD 67 a aktinu, byl použit roztok barevných standardů molekulových hmotností (Invitrogen).

### **3.3.5. Stereologie (PV + GAD)**

Imunoreaktivita byla analyzována v řezech, které obsahovaly CI, CGM a sluchovou kůru (Te1 a Te3) v případě parvalbuminu, a v řezech, které obsahovaly CI, sluchovou a zrakovou kůru v případě GAD. Vzhledem k negativním výsledkům analýzy corpus geniculatum mediale v řezech barvených na parvalbumin (minimální počet pozitivních buněk, žádné změny) a vzhledem k očekávaně negativním výsledkům i u analýzy na změny v GAD, nebylo již CGM v další práci analyzováno a místo něj byla v práci na GAD naopak systematicky vyšetřována i zraková kůra, aby mohla být plnohodnotně zařazena do výsledků. Hranice jednotlivých anatomických struktur byly určeny podle příslušných anatomických atlasů (Zilles, 1985; Paxinos a Watson, 1998) a s pomocí řezů barvených podle Nissla (především ohraničení sluchové kůry) (viz též obr. 4 A,B,C).

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. V CGM byly vybrány řezy mezi -5,0 až -6,2 mm od bregmy. 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. A konečně ve zrakové kůře (GAD) jsme vybrali vzorky mezi -5,0 až po -6,5 mm od bregmy.





Obr. 4 (A,B,C) – Topografický přehled CI, CGM a mozkové kůry a jejich vnitřního členění. Obrázek upraven pro naše účely podle Paxinos a Watson (1998) a Zilles (1985).

(A) – bregma -8,8 mm; (B) – bregma -5,0 mm; (C) – bregma -4,8 mm.

Par – parietální kůra; Hip – hipokampus; PRh – perirhinální kůra; V1,2 – zraková kůra (primární a sekundární); RSD, RSV – retrosplenální kůra, dorzální a ventrální; CGM-D,V,M – corpus geniculatum mediale, dorzální, ventrální a mediální část.

Pro vlastní kvantitativní vyhodnocení změn imunoreaktivity parvalbuminu a GAD ve stáří jsme již použili stereologické metody vylučující zkreslení, tzv. optický disektor (West a spol., 1991; Mayhew a Gundersen, 1996), a ne pouze 2D hodnocení jako v práci na NADPH-diaforázu. Stereologické metody je možné využít pro odhady celkového objemu objektu, plochy povrchu objektu, délky lineárních útvarů a počtu částic v tkáni. Základem pro používání stereologických metod je využívání principu nestranného systematického náhodného výběru. Stereologická analýza tedy využívá principů geometrické pravděpodobnosti a výsledek, který je získán, není přesnou hodnotou, nýbrž jejím odhadem, který ale 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. Pro celkový přehled problematiky, viz Howard a Reed (1998).

V posledních letech se užití stereologie stává zlatým standardem, protože se vyhýbá některým zkreslením, ke kterým dochází při klasickém 2D vyhodnocování. Například, pokud se ve zkoumané tkáni oproti kontrolnímu vzorku zmenšil objem buněk, pak při užití čistě 2D metody hodnocení může docházet k systematické chybě. Menší objekt má totiž menší pravděpodobnost, že bude v daném tenkém řezu zachycen. Tudiž by v tomto případě byl počet buněk podhodnocen a jejich průměrná velikost uměle nadhodnocena. Výsledek zároveň ukáže arteficiálně menší počet buněk ve srovnání s kontrolou, ačkoliv ve skutečnosti se tento počet vůbec nezměnil. Vliv tohoto zkreslení se i při 2D analýze velmi výrazně zmenšuje, pokud je zkoumaný tkáňový řez významně silnější než největší počítané objekty, které se v něm nacházejí, a zároveň, pokud jsou počítané objekty výrazně kontrastní a tedy viditelné i mimo tenkou ohniskovou rovinu. Díky tomu je velmi pravděpodobné, že v naší předchozí práci s barvením na NADPH-diaforázu bylo vzniklé zkreslení minimální. Řez byl 3-4 krát silnější než největší zjištěná somata neuronů a intenzivně zbarvené buňky pomocí průkazu NADPH-diaforázy byly dobře viditelné (a počítané) i pokud se nacházely mimo ohniskovou rovinu (tedy v celé tloušťce řezu, což je fakticky základ pro optický disektor, často nebývá v praxi tzv. 2D počítání čistě dvourozměrné, ale mimovolně bere v potaz některé 3D aspekty).

K hodnocení jsme použili světelný mikroskop Leica DMRXA spojený s digitální kamerou (Optronics, 1600 x 1200 pixelů), která převáděla obraz na monitor počítače. Obrazovou analýzu jsme provedli pomocí softwaru NeuroLucida (MicroBrightField, USA). Mikroskop Leica DMRXA byl vybaven motorizovaným stolkem umožňujícím pohyb ve směru os X a Y, posun ve směru osy Z byl řízen digitálním mikroposuvem spjatým přímo s mikroskopem Leica. 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 ( $3880 \mu\text{m}^2$ ), výška optického disektoru byla konstantních  $5 \mu\text{m}$ . Horní a dolní hranice řezu byly zběžně prohlédnuty, zda v nich nejsou ztracena buněčná jádra (viz Andersen a Gundersen, 1999), pro vyloučení takto vzniklého zkreslení bylo prvních a posledních přibližně  $5 \mu\text{m}$  řezu vyloučeno z analýzy. Bylo počítáno průměrně 200 neuronů na zvíře, zvlášť pro colliculus inferior, zvlášť pro sluchovou a zvlášť pro zrakovou kůru (v CGM bylo málo PV-ir neuronů, takže na jedno zvíře jich bylo počítáno kolem 30). Každý neuron v hodnotícím rámečku byl započítán v okamžiku, kdy jeho jádro bylo v maximálním

zaostření. V této poloze bylo buněčné tělo obkresleno kurzorem na obrazovce monitoru a automaticky byly změřeny morfologické parametry a optická denzita. Hodnocena byla jen PV-ir a GAD-ir somata větší než 5  $\mu\text{m}$  a s viditelným jádrem.

Ačkoliv počítání neuronů bylo nezkreslené, měření jejich objemu mohlo být spojeno s malou chybou. Vzhledem k faktu, že šlo o frontální řezy, nebyl zcela splněn požadavek na izotropní či vertikální rovnoměrně náhodnou polohu řezů (viz Mayhem a Gundersen, 1996). Nicméně ve starší práci (Gundersen a spol., 1988), autoři argumentují, že chyba v tomto případě by měla být zanedbatelná. Objem jednotlivých somat neuronů byl určen pomocí tzv. nukleátoru. 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 jádro buňky v maximálním ohnisku (Mayhem a Gundersen, 1996). Spočítán byl objem přibližně 60 somat na jednu strukturu (CI, SK, ZK) pro každé jednotlivé zvíře (v CGM v průměru pouze kolem 10).

Variace v intenzitě nespecifického imunoznačení v pozadí ovlivňuje samozřejmě výsledné hodnoty optické denzity (= intenzity imunoreakce) neuronových těl. Např. na řezu více nespecificky nabarveném jsou i více, arteficiálně, denzní buněčná těla. Je tedy třeba provést normalizaci. Vzhledem k tomu, že ve studiích zabývajících se stárnutím neexistuje v mozku struktura, která by mohla být považována za indiferentní (tj. nedotčenou stárnutím), počítali jsme normalizovanou hodnotu optické denzity v každém řezu jako podíl mezi průměrnou optickou denzitou analyzovaných PV-ir a 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 a spol. (2005). V naprosté většině případů bylo u daného neuronu na první pohled jasné, zda je imunopozitivní. U malého počtu nejistých neuronů byl proveden další krok, 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 vyloučeny.

### ***3.4. Testování vlivu atorvastatinu na zpomalení poškození sluchu s věkem u dvou kmenů myší***

#### **3.4.1. Zvířata a celkový design experimentu**

Veškerá péče o zvířata a experimenty byly provedeny v souladu s principy péče o laboratorní zvířata a v souladu s předpisy etické komise Ústavu experimentální medicíny,

Akademie věd ČR, Farmakologické fakulty Univerzity Karlovy v Praze a Helsinskou deklarací. Do experimentu byly zařazeny kmeny myši C57BL/6J a apoE<sup>-/-</sup>. Myši byly chovány v pravidelném cyklu světla a tmy (12h) a měly neomezený přístup k vodě. Hmotnost myši obou kmenů v průběhu pokusu se pohybovala kolem 15-20g.

C57BL/6J myši (n=34) byly odstaveny ve věku 4 týdnů a náhodně rozděleny do dvou skupin. Kontrolní skupina (n=17) byla krmena 8 týdnů normální dietou, zatímco experimentální skupina (n=17) dostávala každý den 10 mg/kg atorvastatinu (Zentiva, Praha) ve speciálně upravených peletách (atorvastatin byl homogenně rozmixován do sušené drti standardní diety, pelety pak byly ručně připraveny přidáním vody a zpracováním kuliček) po stejnou dobu 8 týdnů.

ApoE<sup>-/-</sup> myši (n=16) se podrobily identické proceduře (po 4 týdnech odstaveny, rozděleny do dvou skupin n=8, jedna kontrolní, jedna s atorvastatinem 10 mg/kg na den). Těchto 8 týdnů byly myši všech skupin chovány odděleně, po jedné v každé kličce a celkově dostávaly cca 6g své diety na den. Dávkování atorvastatinu v této studii bylo stanoveno na základě dávek užitých v předchozí práci s atorvastatinem na myších (Laufs a spol., 2000). Na konci testovacího období byly všem zvířatům v anestézii změřeny kmenové vyvolané odpovědi (ABR) a distorzní produkty otoakustických emisí (DPOAE). Poté byla zvířata usmrcena. U všech apoE<sup>-/-</sup> myši a u 16 C57BL/6J myši (8 atorvastatinových, 8 kontrolních) byly stanoveny hladiny cholesterolu v krvi a určena míra exprese intercelulárního adhezivního markeru ICAM-1 a cévního adhezivního markeru VCAM-1 v řezech z aorty.

### **3.4.2 Anestézie**

Pro měření sluchových prahů a otoakustických emisí byly myši uvedeny do anestézie pomocí intramuskulární aplikace směsi ketaminu (50mg/kg; Calypsol, Gedeon Richter) a xylazinu (8mg/kg; Sedazine, Fort Dodge). Anestézie byla nezbytná pro zajištění klidu zvířete při měření a pro vyloučení svalových artefaktů. Po dobu měření byla zvířata položena na vyhřívané podložce, která udržovala tělesnou teplotu na 38 °C. Měření sluchových prahů a otoakustických emisí se odehrávala ve zvukově stíněné bezdozvukové komoře.

### **3.4.3. Měření sluchových prahů**

ABR byly získány pomocí tří jehel z nerez oceli, umístěných podkožně nad temeno (aktivní elektroda), a za pravý a levý mastoideus (referenční a zemnicí elektroda). Signál z elektrod byl zesílen pomocí WPI DAM 60 diferenciálního předzesilovače (filtry 300 Hz – 10 kHz, zisk 80 dB) a zpracován v Tucker Davis Technologies (TDT) systému (16 bitový

analogově/digitální převodník, vzorkovací frekvence 50 kHz). Odpovědi byly zprůměrněny s využitím BioSig softwaru.

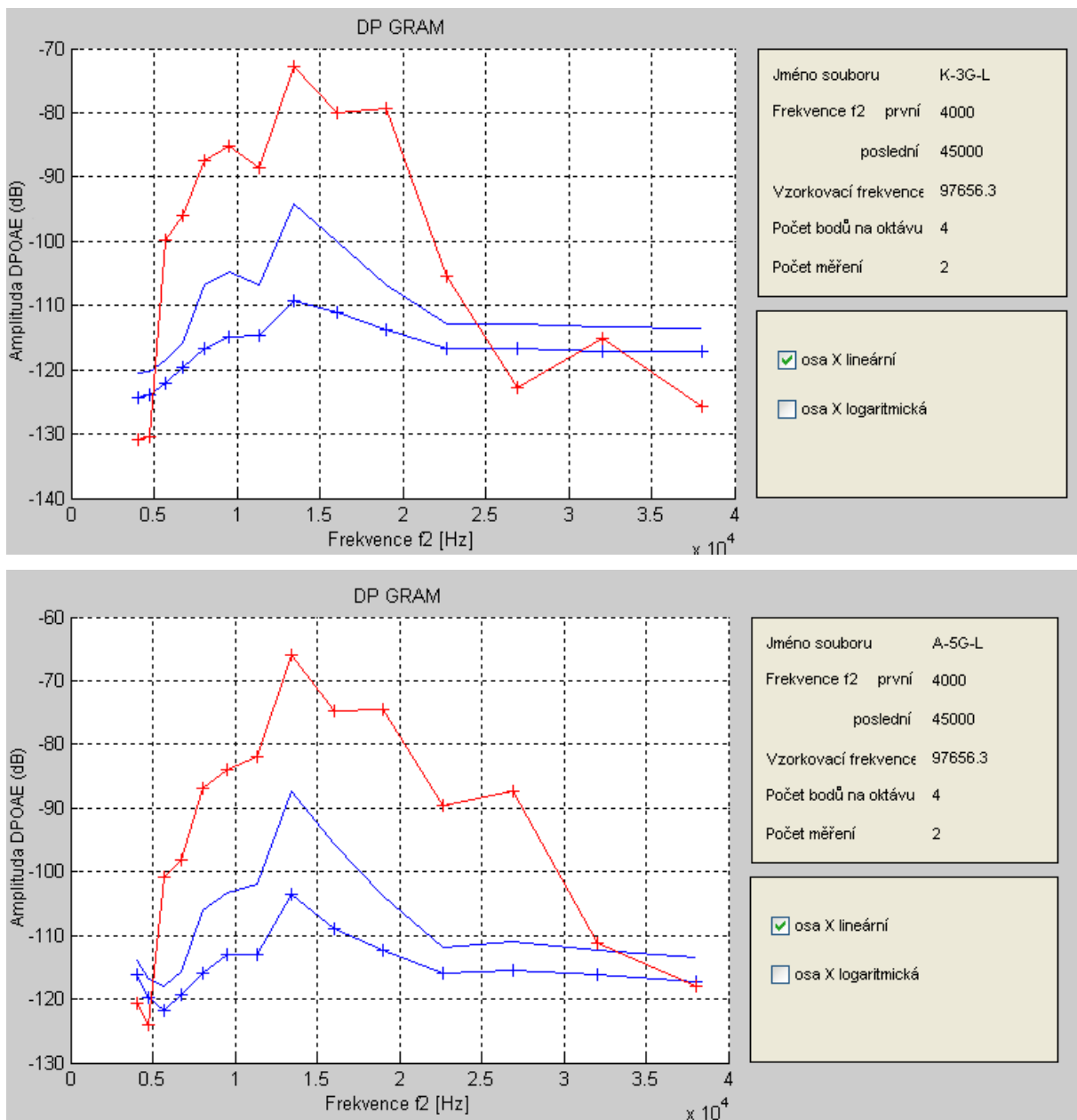
Podněty pro akustickou stimulaci byly generovány počítačově řízeným systémem TDT a přiváděny do volného pole ve zvukově stíněné komoře pomocí dvoupásmového reproduktorového systému (Tesla ARN 5614 woofer – nízké frekvence, a Motorola KSN-1005 tweeter – vysoké frekvence) umístěného ve vzdálenosti 70 cm před hlavou testovaného zvířete. Pro stanovení sluchových prahů jsme jako stimuly užívali širokopásmové kliky a čisté tóny frekvencí v rozmezí 4 – 51 kHz (trvání 5 ms, časy náběhu a poklesu 2 ms). 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 500 vyvolaných odpovědí při opakování podnětů 20/s.

#### **3.4.4. Záznam a vyhodnocování DPOAE**

Záznam distorzních produktů otoakustických emisí (DPOAE) byl proveden pomocí sondy systému Etymotic (Etymotic research, Elk Grove Village). Sonda Etymotic byla pomocí plastového adaptéru upevněna do vnější části zvukovodu. K stimulaci sloužily dva piezoelektrické stimulatory připojené plastovými trubičkami k sondě. Podněty pro vyvolání distorzních produktů otoakustických emisí (podle vzorce  $2f_1 - f_2$ ) byly dva primární tóny ( $f_2/f_1=1,21$ , o intenzitách  $L_1=60$  a  $L_2=50$  dB SPL). Tyto primární tóny,  $f_1$  a  $f_2$ , byly generovány v TDT Systém III. Signál z mikrofonu sondy Etymotik byl zesílen nízkošumovým mikrofonním zesilovačem (ER-10B, zisk 40 dB) a zpracován v TDT Systém III (vzorkovací frekvence 100 kHz). Testování bylo provedeno v rozsahu frekvencí 4,0 – 40 kHz ( $f_2$  tón) s krokem po  $\frac{1}{4}$  oktávy a bylo vždy dvakrát opakováno pro zprůměrnění odpovědi na danou frekvenci. DPOAE byly změřeny v obou uších každého zvířete.

Po ukončení měření byly DP-gramy (funkce závislosti velikosti DPOAE na měnící se frekvenci stimulu) zkonstruovány pomocí námi vytvořeného vyhodnocovacího programu v programovém prostředí MATLAB (MathWorks). Výsledné rozlišení DP-gramů činilo čtyři body na oktávu ve frekvenčním rozmezí 4 – 40 kHz ( $f_2$  tón), viz též obr. 5.

Hodnoty DPOAE, hodnoty šumu i první směrodatné odchylky šumu byly odečteny programem v rámci vypracování jednotlivých DP-gramů. Hodnoty byly následně přepočteny pro každou zobrazenou frekvenci na základě kalibrace (podle hodnot získaných v tzv. umělém uchu).



Obr. 5 – Ilustrační příklad dvou originálních DP-gramů zkonstruovaných ve vyhodnocovacím programu v programovém prostředí MATLAB. Horní obrázek ukazuje DP-gram z levého ucha jedné kontrolní myši C57BL/6J, dolní obrázek tvoří DP-gram z levého ucha jedné myši C57BL/6J ze skupiny krmené atorvastatinem.

Červeně – hodnoty DPOAE, modře (s křížky) – průměrný šum pozadí, modře (bez křížků) – první směrodatná odchylka šumu pozadí.

Velikost amplitudy DPOAE pro danou frekvenci jsme pak vypočetli jako rozdíl mezi naměřenou hodnotou DPOAE a odpovídající hodnotou první směrodatné odchylky průměrného šumu pozadí (rozumí se „první kladné odchylky“, tj. té o vyšší intenzitě než je průměrná hodnota šumu). Odpovědi, které dosahovaly pouze hodnot menších než první směrodatná odchylka hodnoty šumu, nebyly považovány za DPOAE, ale za šum pozadí.

Ucho, ve kterém nejsou v důsledku patologických změn DPOAE při dané frekvenci  $f_2$  vůbec vybavitelné, bude při tomto testování poskytovat jako odpověď náhodnou hodnotu v rozsahu blízkém šumu pozadí. Stanovení průměrné hodnoty šumu pozadí jako kritéria pro přítomnost DPOAE (Jimenez a spol., 1999) je tudíž méně přísné. Parham (1997) ve své práci s CBA a C57 myšmi volil jako kritérium fixní hranici 3 dB nad průměrem šumu, nám se jevilo vhodnější se přizpůsobovat měnícímu se rozptylu šumu, a proto byla jako kritérium užitá první směrodatná odchylka šumu. Pro jistotu jsme si ale ověřili, že statisticky významné výsledky uvedené v 4.4.2. by byly plně průkazné i při použití kritéria od Parham (1997) či od Jimenez a spol. (1999).

### **3.4.5. Biochemie a imunohistochemie**

Po předávkování éterem byly subjektům kardiální punkcí odebrány vzorky krve pro stanovení hladin cholesterolu. Následně byla urychleně odebrána část aorty (kořen a oblouk) a tkáňové vzorky byly okamžitě vloženy do média OCT (Optimal Cutting Temperature; Leica, Prague, Czech Republic) a v něm zmrazeny a uchovány v tekutém nitrogen 2-methylbutanu při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Celková koncentrace cholesterolu byla stanovena konvečním diagnostickým kitem (Lachema, Brno) a spektrofotometrickou analýzou (cholesterol na 510 nm) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden). Aorta byla pro stanovení ICAM-1 a VCAM-1 na kryostatu nakrájena v sériových řezech ( $7\mu\text{m}$ ) a řezy umístěny na želatinová sklíčka. Řezy byly vysušeny a poté fixovány 20 min v acetonu při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vnitřní peroxidázová aktivita byla blokována 0,3% peroxidem ve fosfátovém pufru (PBS,  $\text{pH} = 7,4$ ) po dobu 15 min. Po vyblokování nespecifické reaktivity 10% koňským sérem (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) v PBS po dobu 30 minut, byly řezy 1h inkubovány v primární protilátce (viz níže). Pro dalším opláchnutí v PBS, byly řezy inkubovány s biotinylovanou koňskou anti-kozí IgG protilátkou nebo oslí anti-ovčí IgG protilátkou v přítomnosti 200 mg/ml myší IgG. Reakce byla zviditelněna pomocí HRP-konjugovaného biotin-avidinového komplexu a diaminobenzidin tetrachloridu jako substrátu. Specificita imunobarvení byla ověřena barvením pomocí neimuního izotypu imunoglobulinu. Jako primární protilátky byly použity: monoklonální potkaní anti-CD31 (PECAM-1, 1:100), dále monoklonální potkanní anti-CD106 (VCAM-1; 1:100) a monoklonální křeččí protilátka anti-CD54 (ICAM-1; 1:200). Všechny protilátky pocházely z BD Pharminge (USA).

### **3.4.6. Analýza imunohistochemie – stereologie**

Oblast PECAM-1 exprese byla považována za celkovou plochu endothelia (PECAM-1 je indikátor cévní výstelky, jinak též nazýván CD31). Tudíž pak oblast ICAM-1 a VCAM-1 exprese indikovala podíl aktivovaného endothelia (Nachtigal a spol., 2004). Vyhodnocení bylo provedeno na mikroskopu Nikon Eclipse E200 spojeném s digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa) a softwarem LUCIA 5.0 (Laboratory Imaging, Praha). Vlastní stereologické vyhodnocení bylo provedeno v PointGrid modulu ELLIPSE softwaru (ViDiTo, Kosice).

Ke zjištění celkové plochy exprese ICAM-1 a VCAM-1 v cévním endotheliu byla použita stereologická metoda založená na principu počítání průsečíků. Padesát po sobě následujících sériových řezů aortou silných 7  $\mu\text{m}$  vytvořilo referenční objem o celkové délce cévy 0,35 mm. Tento referenční objem zahrnoval několik řezů obsahujícím poloměsíčitou chlopeň v kořeni aorty a dále několik řezů aortální oblouku (tj. vzestupné aorty). První řez pro každé imunohistochemické barvení byl náhodně vybrán z první desítky řezů referenčního objemu a následně každý desátý řez od něj byl nabarven. K odhadu velikosti plochy v rovině byla použita bodová testovací mřížka a tedy metoda průsečíkového počítání nestranným systematickým náhodným výběrem s konstantním krokem (Weibel, 1979; West a spol., 1991; Mayhew a Gundersen, 1996).

Výsledná celková plocha činila:  $\text{est}A = a \times P$ , kde parametr „a“ charakterizuje testovací mřížku a P je počet průsečíků s pozitivní imunoreakcí (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1). Takto byly vypočítány plochy exprese pro jednotlivá imunobarvení. Podíl aktivovaného endothelia byl vypočítán podle vzorce:  $\text{est}P = \text{area}(Y)/\text{area}(\text{PECAM}) \times 100\%$ ; kde area (Y) je plocha exprese VCAM-1 nebo ICAM-1 v endotheliu a area (PECAM) je plocha exprese PECAM-1.



### **3.5. Statistická analýza**

V práci s NADPH-diaforázou, parvalbuminem a GAD jsme ke statistické analýze rozdílů v jednotlivých nálezech mezi skupinami mladých a starých zvířat použili neparametrický dvoustranný Mann-Whitney test v programu GraphPad Prism 4.0, a to jak pro histochemii a imunohistochemii, tak i pro western blot.

V práci s GAD byly navíc z dat western blotu 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 v některé struktuře se snížila hladina proteinů ve stáří signifikantně více než v jiných) pomocí jednocestného ANOVA testu a Bonfferoniho korelačního testu v programu GraphPad Prism 4.0.

V práci s aplikací atorvastatinu jsme pro statistické vyhodnocení rozdílů sluchových prahů a DPOAE použili jednocestný ANOVA test a Bonfferoniho korelační test (ke stanovení signifikance rozdílů mezi odpovídajícími jednotlivými frekvencemi u kontrolních a atorvastatinových zvířat) opět v programu GraphPad Prism 4.0. Výsledky biochemické a imunohistochemické analýzy byly testovány pomocí nepárového t-testu v programu SigmaStat 3.0.

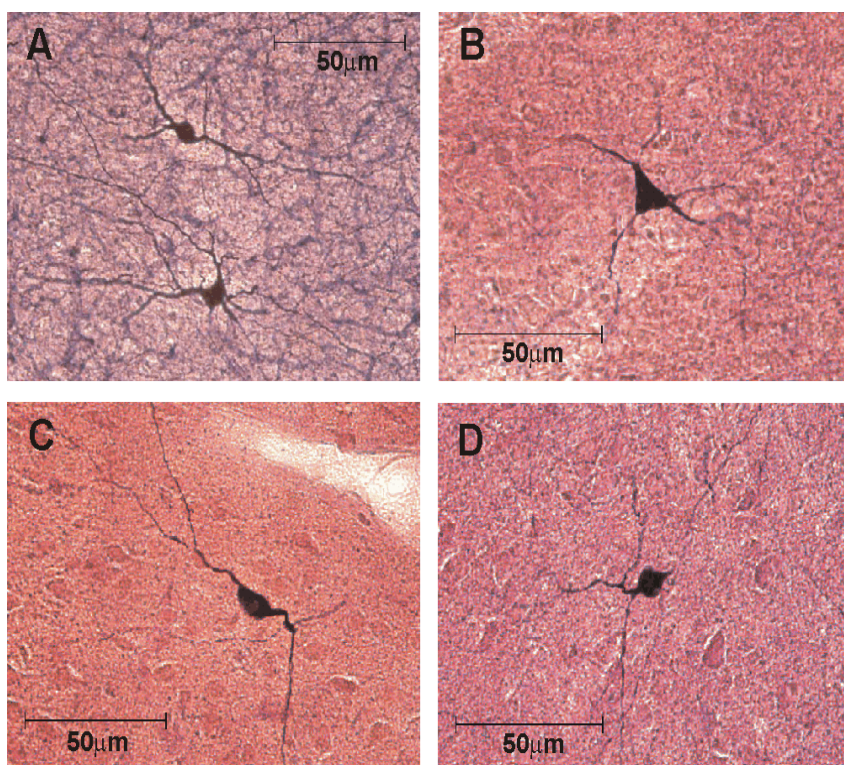
Chybové úsečky vždy představují S.E.M. Ve všech testech jsme pouze hodnoty  $P < 0,05$  považovali za signifikantní. V každém statistickém testu bylo každé zvíře reprezentováno jen jedním číslem, aby byla zajištěna vzájemná nezávislost dat vstupujících do testu (tj. např. 5 číselných údajů představujících průměrnou optickou denzitu PV-ir neuronů v CI u 5-ti mladých zvířat bylo statisticky srovnáváno s 5-ti číselnými údaji představujícími totéž u 5-ti starých zvířat).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Rozdíly v morfologii a počtu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře mladých a starých potkanů

#### 4.1.1. Morfologie a rozložení NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře

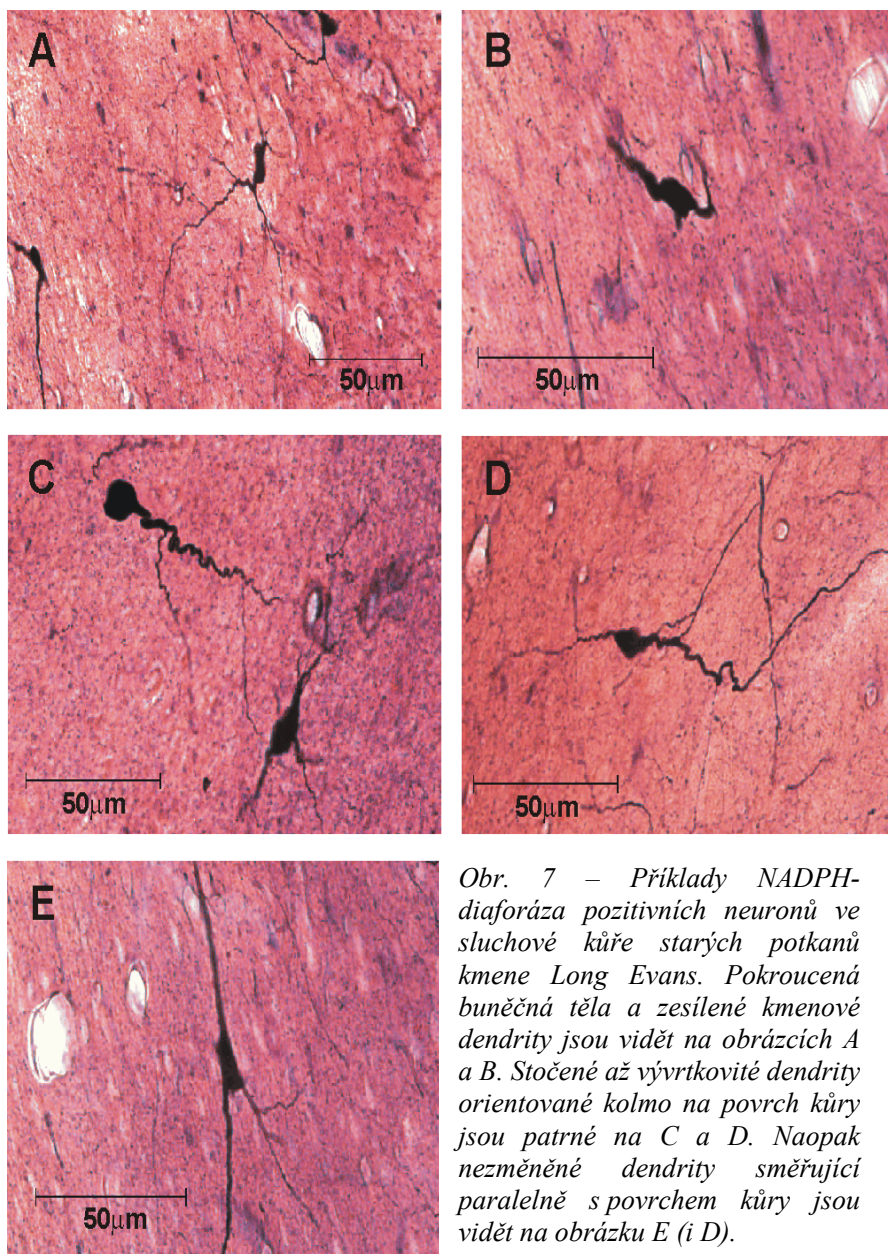
NADPH-diaforáza pozitivní neurony se u mladých i starých zvířat nacházely v II. – VI. korové vrstvě, přičemž zcela chyběly ve vrstvě I. Řídce se vyskytující pozitivní neurony byly přítomny i v bílé hmotě pod VI. korovou vrstvou. Statisticky lze říci, že větší množství NADPH-diaforáza pozitivních buněk se nacházelo v povrchových vrstvách – 65% (II.-IV.), méně ve vrstvách hlubokých – 35% (V.-VI. vrstva). Somata pozitivních neuronů byla orientována různým způsobem, celkově šlo o poměrně heterogenní populaci neuronů s nejčastějším zastoupením multipolárních (37%), větvenitých (30%), triangulárních (14%) a oválných (13%) elementů (obr. 6 A-D). Typické pyramidové neurony se nebarvily na NADPH-diaforázu nikdy. Většina neuronů mladých zvířat měla chudší větvení, bez trnů, a mířící do všech směrů.



Obr. 6 – Přehled hlavních typů NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře mladých potkanů kmene Long Evans: A) oválný (nahore) a multipolární (dole) neuron, B) triangulární neuron, C) větvenitý neuron, D) oválný neuron.

Naopak mnoho NADPH-d pozitivních neuronů u starých zvířat mělo deformovaná a často i protažená somata a tlustší kmenové dendrity (obr. 7 A,B). Dendritické výběžky byly převážně zvlněné, někdy jakoby amputované a v některých případech měly vysloveně podobu vývrtky (obr. 7 C,D). Deformované byly převážně ty dendrity, které směřovaly kolmo na povrch mozkové kůry, zatímco dendrity směřující

paralelně s povrchem sluchové kůry byly nezměněny (obr. 7 E). Rozložení pozitivních neuronů v korových vrstvách sluchové kůry bylo ale jinak podobné distribuci u mladých zvířat. Barvení bylo u obou skupin zvířat intenzivní, s malou variabilitou, takže pozitivita (či negativita) buněk byla vizuálně jednoznačná. Velmi zřetelně bylo nabarveno soma a dendritické větvení včetně počáteční části axonu do vzdálenosti přes 100  $\mu\text{m}$ , což umožnilo jeho další analýzu.



Obr. 7 – Příklady NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře starých potkanů kmene Long Evans. Pokroucená buněčná těla a zesílené kmenové dendrity jsou vidět na obrázcích A a B. Stočené až vývrtkovité dendrity orientované kolmo na povrch kůry jsou patrné na C a D. Naopak nezměněné dendrity směřující paralelně s povrchem kůry jsou vidět na obrázku E (i D).

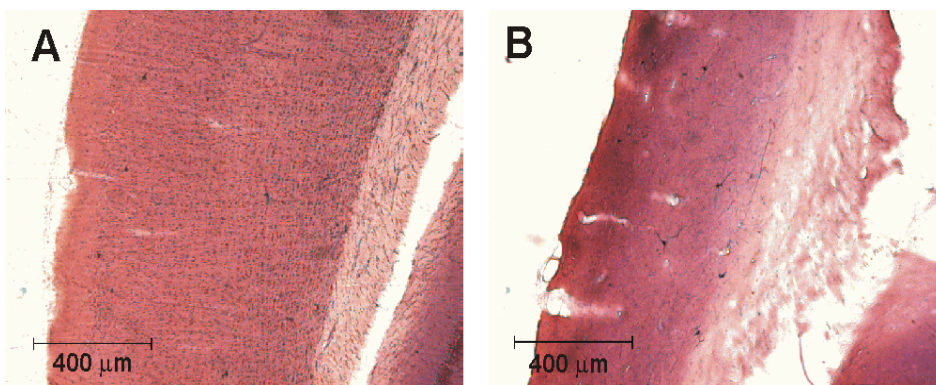
#### 4.1.2. Změna tloušťky sluchové kůry

Zřetelným znakem, celkem dobře viditelným již pouhým okem, bylo nápadné zmenšení tloušťky sluchové kůry u starých zvířat (obr. 8). Zatímco u mladých zvířat byla průměrná tloušťka sluchové kůry  $1230 \pm 16 \mu\text{m}$ , u starých potkanů to bylo jen kolem  $666 \pm 24 \mu\text{m}$  ( $P < 0.001$ ) (obr. 9A). Podobná situace byla přítomna i ve zrakové kůře, jejíž tloušťka u mladých zvířat činila  $1348 \pm 11 \mu\text{m}$  a u starých pouze  $782 \pm 25 \mu\text{m}$  ( $P < 0,001$ ).

#### 4.1.3. Počet NADPH-diaforáza pozitivních neuronů

Průměrný počet NADPH-d pozitivních neuronů ve sluchové kůře činil  $7,55 / \text{mm}^2$  pro mladá zvířata, zatímco pro stará zvířata již  $11,82 / \text{mm}^2$  (obr. 9B). Ve zrakové kůře byl

u mladých potkanů počet pozitivních neuronů 5,44 / mm<sup>2</sup> a u starých zvířat 8,85 / mm<sup>2</sup>. Takže ve stáří došlo k razantnímu zvýšení počtu pozitivních buněk na milimetr čtvereční, o 57% ve sluchové a o 63% ve zrakové kůře (oboje P<0,01). Pokud ovšem vezmeme v úvahu současně naměřené ztenčení mozkové kůry, po přepočítání je zřetelné, že ve skutečnosti došlo k absolutnímu poklesu počtu NADPH-d pozitivních neuronů, a to o 15% (P=0,03) ve sluchové a o 6% (nesignifikantní) ve zrakové kůře. Uvedený závěr jsme ověřili dodatečným spočítáním celkového počtu pozitivních neuronů ve 30-ti vybraných řezech (15 u mladých, 15 u starých zvířat), kde jsme nepočítali počet buněk na danou plochu, ale absolutní počet buněk uvnitř anatomických hranic Te1+Te3 v daném řezu. Tímto způsobem jsme došli k výsledku, že počet NADPH-d pozitivních neuronů je u starých zvířat ve sluchové kůře nižší o 13% (P<0,05), tedy prakticky ke stejné hodnotě jako postupem uvedeným výše. Stejně jako u níže probíraných výsledků se průběh těchto změn mezi areami Te1 a Te3 signifikantně neliší.



*Obr. 8 – Ilustrační fotografie dokumentuje rozdílné tloušťky sluchové kůry u mladých (A) a velmi starých zvířat (B) v našem pokuse.*

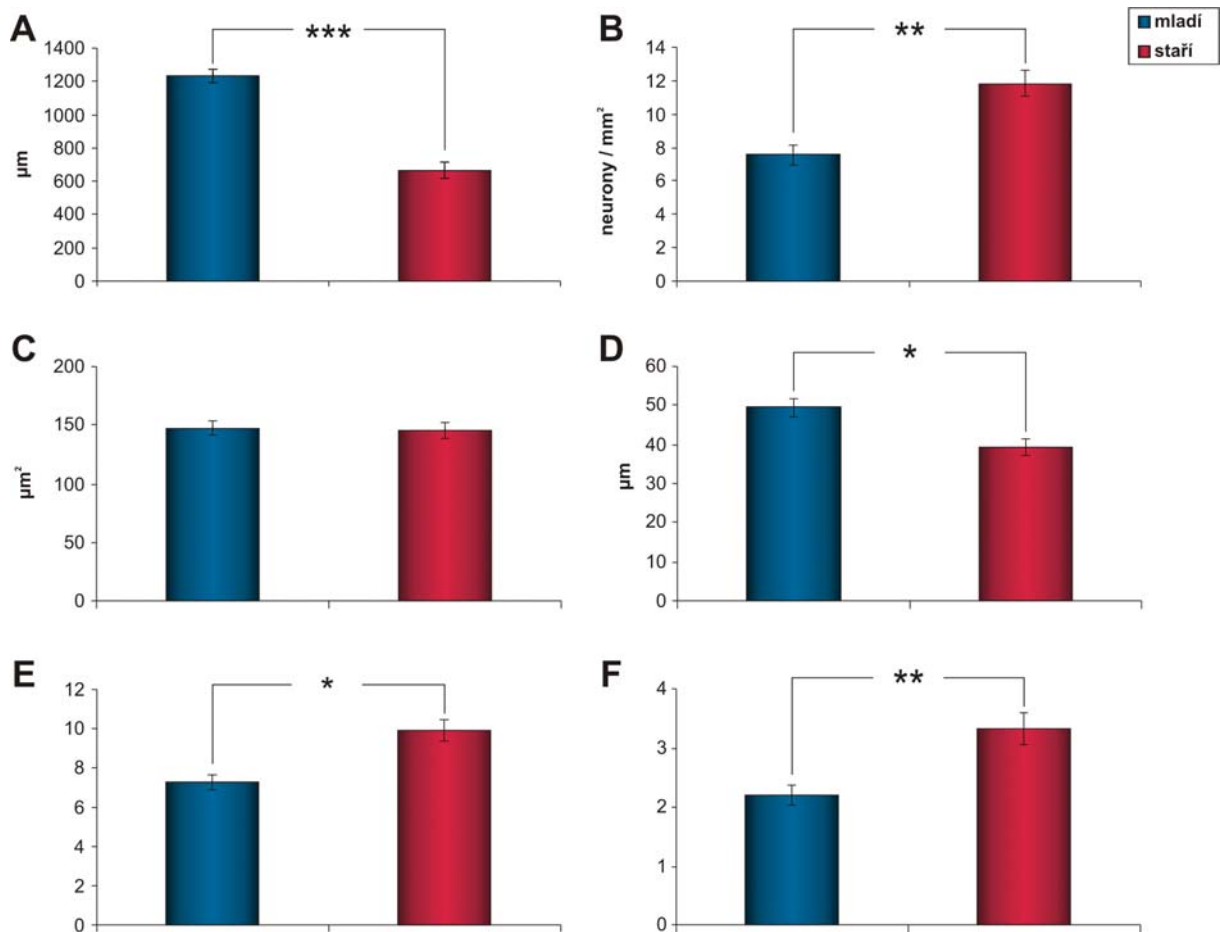
#### **4.1.4. Změny velikosti NADPH-diaforáza pozitivních somat stáří**

Naproti tomu průměrná velikost somat pozitivních buněk (měřená jako porovnání ploch průřezů somaty neuronů viditelných v daném řezu) se nijak nezměnila. Činila  $147,5 \pm 4,4 \mu\text{m}^2$  u mladých a  $145,5 \pm 5,6 \mu\text{m}^2$  u starých potkanů (obr. 9C).

#### **4.1.5. Změny průměrné délky a počtu dendritických segmentů a změna počtu bifurkací dendritů ve stáří**

Průměrná délka viditelných segmentů dendritického větvení ve stáří poklesla o 21%. U mladých zvířat činila  $49,57 \pm 2,39 \mu\text{m}$ , u starých jedinců jen  $39,33 \pm 1,49 \mu\text{m}$  (P=0,015) (obr. 9D). Naproti tomu průměrný počet dendritických segmentů a počet míst dendritického rozvětvení jedno neuronu se u starých potkanů zvýšil. V případě dendritického větvení šlo ve velké většině případů o bifurkace (počet trifurkací, atd., byl minimální), proto o něm bude dále referováno jako o počtu bifurkací. Průměrný počet dendritických segmentů připadajících

na jeden neuron vzrostl ze  $7,29 \pm 0,37$  u mladých na  $9,92 \pm 0,54$  u starých zvířat ( $P=0,015$ ) (obr. 9E). Průměrný počet bifurkací jednoho neuronu se zvýšil z  $2,21 \pm 0,16$  u mladých na  $3,32 \pm 0,26$  u starých potkanů ( $P=0,002$ ) (obr. 9F). Vynásobeno dohromady, počet segmentů x jejich délka, průměrná celková délka viditelných segmentů jednoho neuronálního stromu činila u mladých potkanů  $367,8 \mu\text{m}$  a u starých  $386,1 \mu\text{m}$ . S věkem tedy došlo k nesignifikantnímu růstu průměrné délky dendritického větvení jednoho neuronu o cca 5%.



Obr. 9 – Výsledky kvantitativní analýzy NADPH-diaforáza pozitivních neuronů u mladých (modré sloupečky) a starých (červené sloupečky) zvířat ve sluchové kůře.

A) Průměrná tloušťka sluchové kůry u mladých a starých zvířat

B) Početní hustota NADPH-diaforáza pozitivních neuronů

C) Průměrná velikost průřezu somaty NADPH-d pozitivních neuronů

D) Průměrná délka dendritických segmentů NADPH-diaforáza pozitivních neuronů

E) Průměrný počet dendritických segmentů připadajících na jeden NADPH-d pozitivní neuron

F) Průměrný počet bifurkací připadajících na jeden NADPH-diaforáza pozitivní neuron

(\* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ , \*\*\* -  $P < 0,001$ )

## **4.2. Změny v imunoreaktivitě parvalbuminu v colliculus inferior, CGM a sluchové kůře u starých potkanů dvou kmenů**

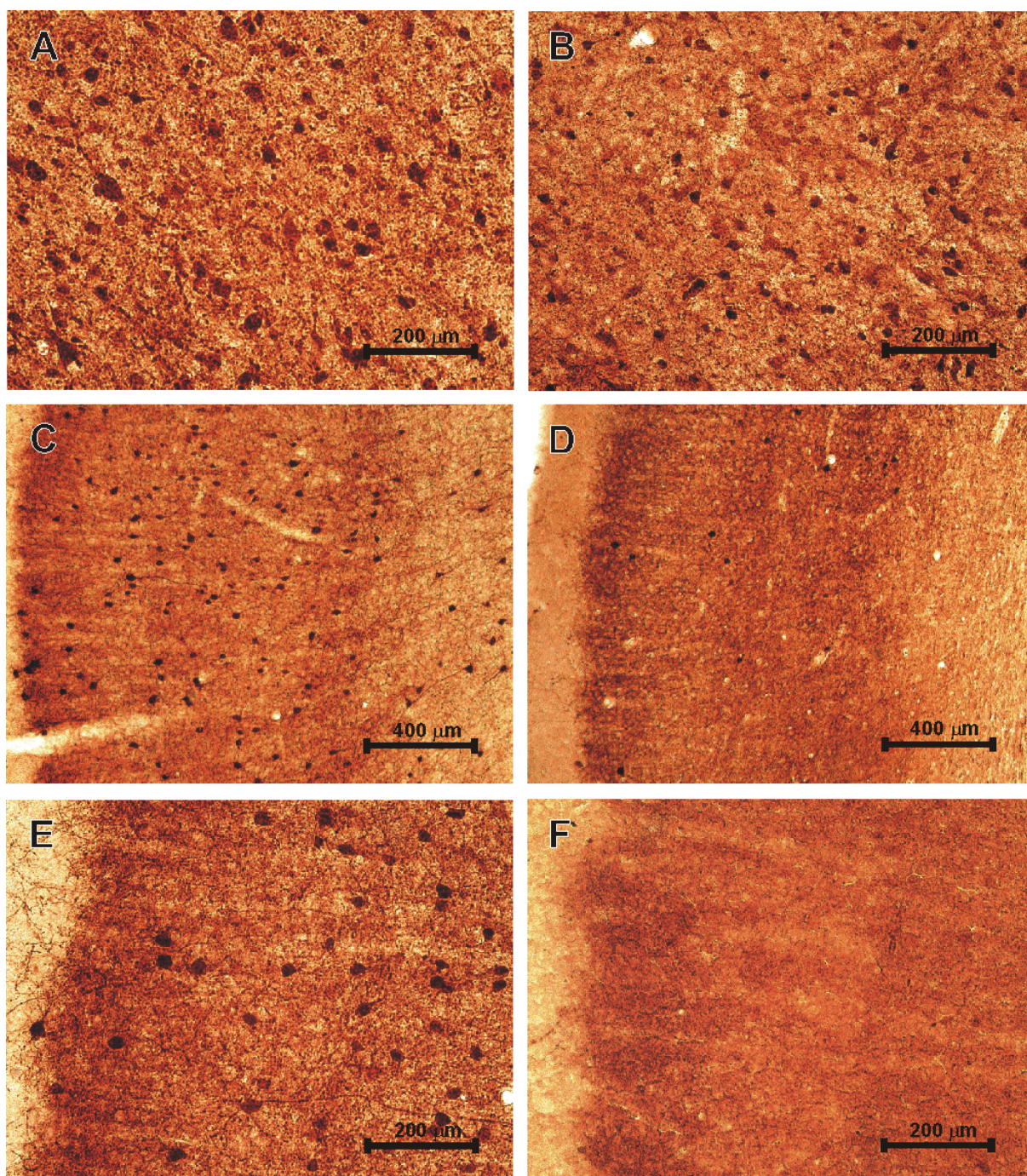
### **4.2.1. Colliculus inferior**

PV-ir neurony byly přítomny ve všech třech oddílech colliculus inferior. V centrálním jádře (CCI) převažovaly oválné a diskovité neurony s různou velikostí buněčných těl. Imunoreaktivita somat kolísala od nízké po velmi intenzivní. Většina pozitivních neuronů v externí kůře (ECI) patřila buď k velkým větveným neuronům nebo středně velkým oválným až kulatým neuronům. Shluky malých PV-ir oválných neuronů a tmavě zbarveného neuropilu (Chernock a spol., 2004) byly dobře viditelné ve většině zkoumaných zvířat. Proporčně nejvíce PV-ir neuronů bylo přítomno v CCI (5520/mm<sup>3</sup>) následně pak v ECI (3750/mm<sup>3</sup>), zatímco v dorsální kůře (DCI) jich bylo přítomno jen poměrně málo (720/mm<sup>3</sup>). Průměrný objem somat byl největší v ECI (1260 μm<sup>3</sup>), pak v CCI (990 μm<sup>3</sup>) a nejmenší v DCI (810 μm<sup>3</sup>). Všechna uvedená data platí pro mladá zvířata kmene Long Evans, nicméně u mladých zvířat kmene Fischer 344 byla situace obdobná.

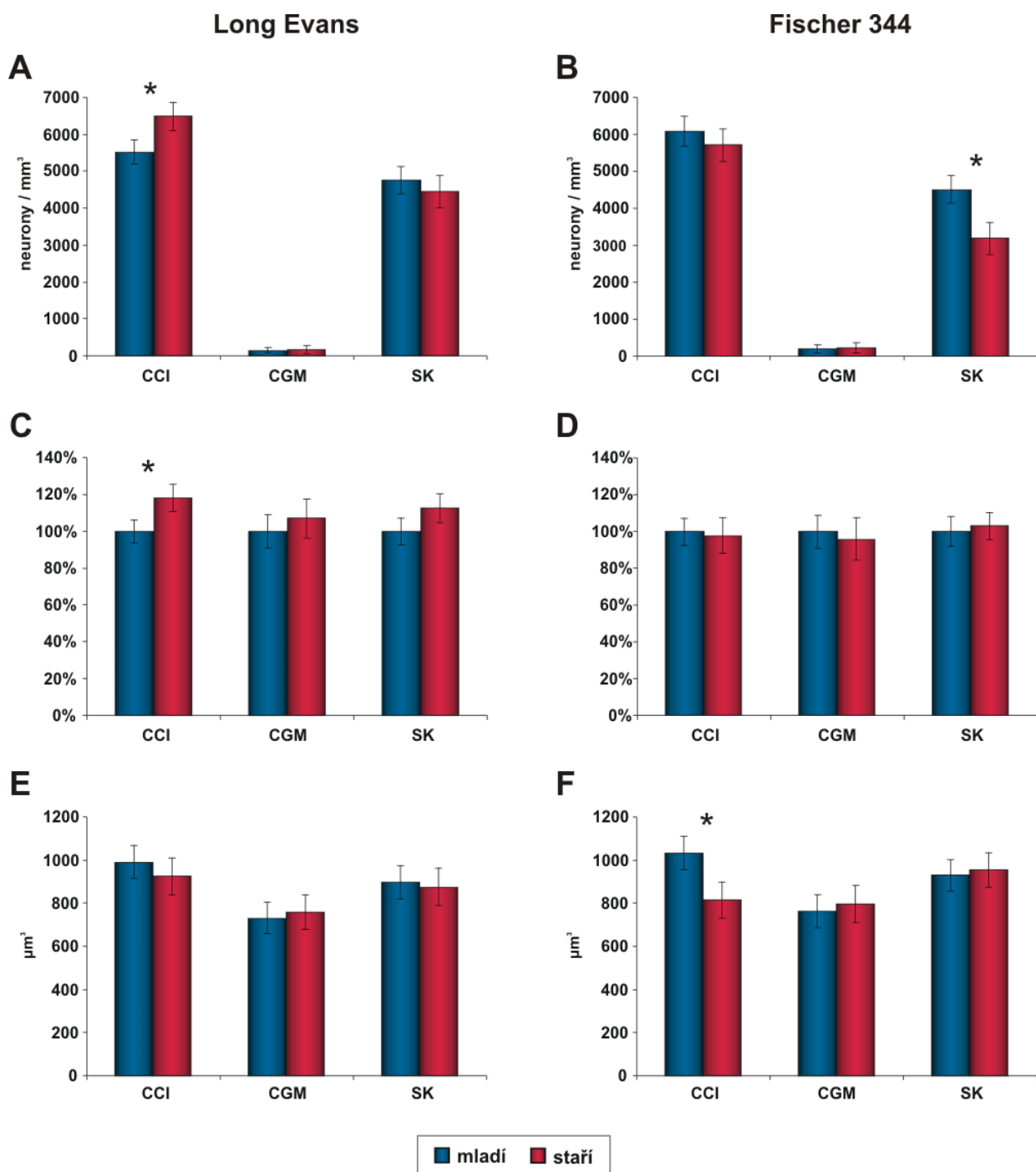
Se stářím se významné změny objevily pouze v centrálním jádře CI (obr. 10 A,B). U starých Long Evans se zvýšil počet PV-ir neuronů o 19% (P=0,03; obr. 11 A) a zároveň se zvýšila i optická denzita jejich somat o 18% (P=0,03; obr. 11 C). Objem somat naopak mírně poklesl (7%, z 990 μm<sup>3</sup>, nesignifikantní; obr. 11 E). U starých zvířat kmene Fischer 344 se naopak projevila nesignifikantní tendence ke snížení počtu parvalbumin pozitivních buněk, které svou průměrnou optickou denzitu nezměnily, ale zato ve srovnání s velikostí somat u mladých potkanů tohoto kmene výrazně zmenšily svůj průměrný objem o 21%, (z 1030 na 815 μm<sup>3</sup>), (P=0,03; obr. 11 F). Tyto změny se nezdály být přednostně specifické pro nějaký konkrétní typ neuronů.

### **4.2.2. Corpus geniculatum mediale**

Ve ventrální i dorsální části CGM se nacházelo jen velice málo parvalbuminových neuronů, převážně malých, oválných a s nízkou intenzitou zbarvení. U mladých zvířat obou kmenů činil jejich počet přibližně 120-150/mm<sup>3</sup> ve ventrální a 100-130/mm<sup>3</sup> v dorsální části. Průměrný objem buněčných těl se pohyboval kolem 750-800 μm<sup>3</sup> pro obě části. Pouze menší část řezů CGM obsahovala vůbec nějaké parvalbuminové neurony. V mediální části CGM pak nebyly přítomny vůbec, a to u žádného z pokusných zvířat. U starých zvířat obou kmenů jsme v parvalbuminové imunoreaktivitě CGM žádné signifikantní změny nenalezli (obr. 11 A-F).



*Obr. 10 (A-F) – Srovnání imunoreaktivity parvalbuminu u mladých (A,C,E) a starých (B,D,F) potkanů kmene Fischer 344 v centrálním jádře CI (A,B) a v primární sluchové kůře – Te 1: C,D – všechny korové vrstvy, E,F – pouze II.- IV. vrstva. Obrázky C a E, kde je normální přítomnost PV-ir neuronů, lze postavit do kontrastu se záběry na D a F, kde se PV-ir neurony vyskytují jen sporadicky.*



Obr. 11 – Výsledky kvantitativního vyhodnocení imunoreaktivitu parvalbuminu u kmene Long Evans (A,C,E) a Fischer 344 (B,D,F). Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata. Chybové úsečky představují S.E.M.

A, B) Počet PV-ir neuronů v CCI, CGM a sluchové kůře (Te1+Te3) u mladých a starých zvířat

C, D) Optická denzita PV-ir somat v CCI, CGM a sluchové kůře (Te1+Te3) u mladých a starých zvířat

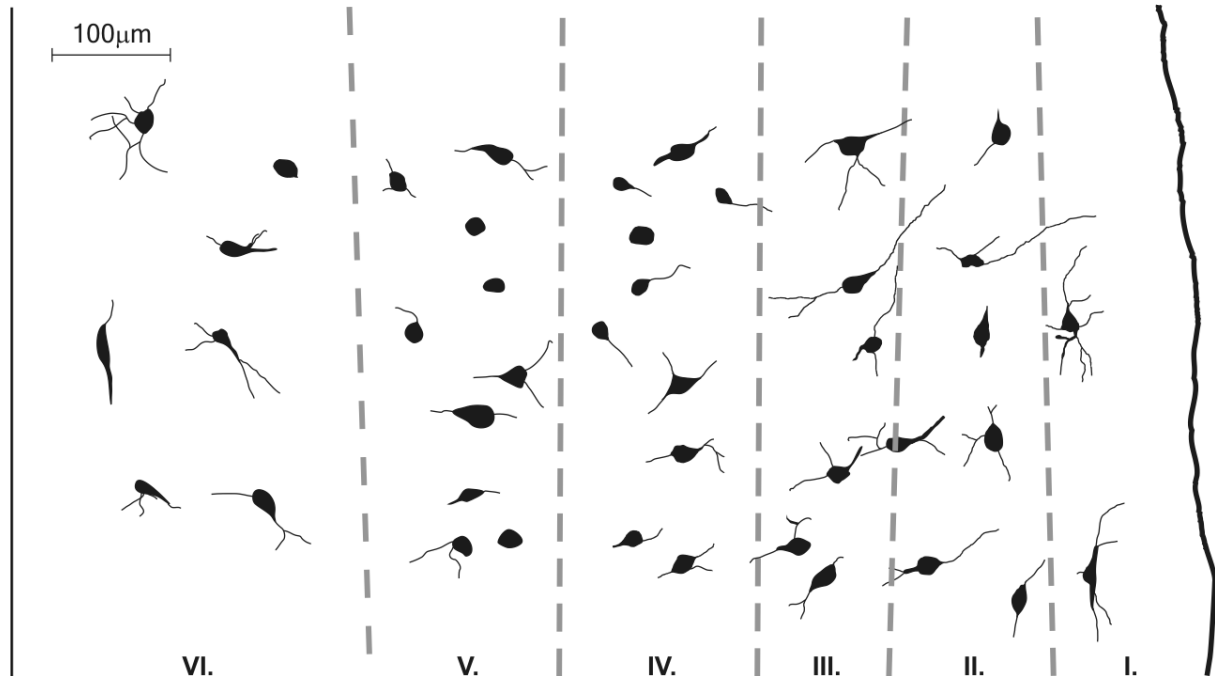
E, F) Průměrný objem PV-ir somat v CCI, CGM a sluchové kůře (Te1+Te3) u mladých a starých zvířat

(\* -  $P < 0,05$ )



### 4.2.3. Sluchová kůra

U obou kmenů se PV-ir neurony nacházely ve všech korových vrstvách, přičemž v I. vrstvě se nacházelo jen několik pozitivních neuronů a vláken. Optická denzita neuropilu byla nejvyšší ve vrstvách II. a IV., následovány V. a III. vrstvou. V VI. vrstvě byla optická denzita neuropilu zdaleka nejnižší (obr. 10 C). V průměru bylo zbarvení neuropilu intenzivnější v oblasti Te1 než v Te3, nicméně optická denzita buněčných somat byla v obou korových oblastech stejná. PV-ir neurony ve sluchové kůře byly vesměs střední velikosti a střední až výrazné intenzity imunoreakce, bez signifikantního rozdílu mezi jednotlivými korovými vrstvami. Variabilita ve velikostech somat a intenzitě nabarvení byla ve srovnání s CI o něco menší. Většina buněk patřila k oválným a multipolárním elementům, občas se vyskytovaly i triangulární a větvenité buňky. Nabarvení dendritů bylo nekonstantní, jen u některých neuronů bylo možné primární dendrity diferencovat až do vzdálenosti několika desítek  $\mu\text{m}$  od těla buňky, především v případě větvenitých neuronů s hlavními výběžky kolmými k povrchu kůry (obr. 12). Počet neuronů byl o něco nižší v hlubokých vrstvách (V.-VI.), zvláště v oblasti Te3. Žádné statistické rozdíly mezi Te1 a Te3 jsme nenalezli. Tyto obecné rysy bylo možno najít u mladých i starých zvířat obou kmenů.



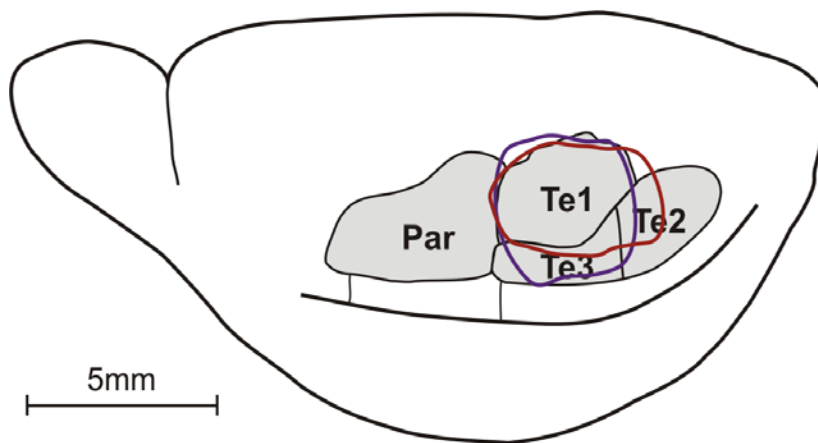
Obr. 12 – Schematický obrázek vytvořený pomocí camera lucida. Zachycuje morfologii neuronů (přednostně zakresleny neurony s lépe viditelným dendritickým větvením) u jednoho mladého potkana (Long Evans) v jednotlivých korových vrstvách. Poměr tloušťky jednotlivých vrstev je schematicky upraven. Nákres morfologie GAD-ir neuronů by byl velice podobný.

U starých potkanů jsme ale našli nové charakteristické rysy. V případě Long Evans jsme při analýze řezů občas v Te1 i Te3 našli místa, kde byl počet PV-ir neuronů výrazně zredukován (o více než 50% oproti průměru u mladých zvířat), zatímco v jejich okolí se počet buněk významně nezměnil. To mělo za následek poměrně malé a celkově nesignifikantní snížení průměrného počtu PV-ir neuronů ve stáří. Optická denzita ani objem pozitivních buněčných somat se s věkem nezměnily (obr. 11 A,C,E). Nebyl ani rozdíl mezi změnami v Te1 a Te3.

Naproti tomu u starých potkanů kmene Fischer 344 byla ohniska, kde byl počet PV-ir neuronů výrazně zredukován (více než o 50%), mnohem častější. Postižené oblasti zahrnovaly všechny korové vrstvy. V některých případech nebyly v daném řezu přítomny vůbec žádné pozitivní neurony (obr. 10 D,F). Celkově se týkalo více než jedné třetiny řezů a při sériovém zkoumání řezů následujících za sebou vyplynulo, že deficitní oblasti zaujímaly někdy podstatnou část sluchové arey Te1 nebo Te3 (obr. 13). Alespoň v jedné hemisféře u všech zkoumaných starých potkanů kmene Fischer 344 byly tyto změny v nějaké míře přítomny. Celkově byly obě hemisféry i obě sluchová pole (Te1 a Te3) postiženy v průměru stejně.

To mělo za následek, že u starých zvířat kmene Fischer 344 průměrný počet parvalbuminových buněk ve sluchové kůře výrazně poklesl, a to o 31% ( $P=0,015$ , obr. 11 B). Pozorovaný deficit nás vedl k otázce, zda k podobným poklesům nedochází i v dalších částech mozkové kůry, především v sensorické oblasti. Neprováděli jsme v tomto případě detailní analýzu jako v případě sluchové kůry, jen orientační prohlížení řezů a odhad počtu buněk v některých polích. Ve zrakové oblasti (V1 a V2) starých zvířat byl také nalezen evidentní úbytek a místní výpadky v přítomnosti parvalbuminových buněk v rozsahu srovnatelném s úbytky ve sluchové kůře. Pokles jsme zaznamenali i v retrosplenální kůře. Optická denzita a průměrný objem zbývajících PV-ir neuronů se přitom proti hodnotám naměřených u mladých potkanů signifikantně nezměnil (cca  $950 \mu\text{m}^3$  u Long Evans a  $900 \mu\text{m}^3$  u Fischer 344 potkanů) (obr. 11 D,F).

Pokud jde o srovnání obou kmenů mezi sebou (tj. mladá vs. mladá a stará vs. stará zvířata), žádné statistické rozdíly, krom menšího počtu PV-ir buněk u starých potkanů kmene Fischer 344 (ve srovnání se starými potkany kmene Long Evans,  $P=0,02$ ), jsme nenalezli.



Obr. 13 – Schematický boční pohled na mozek potkana s dvěma vyznačenými oblastmi (v 3D zasahují všechny korové vrstvy), kde byla zaznamenána markantní redukce počtu PV-ir neuronů u dvou starých zvířat kmene Fischer 344.

Rozsah oblastí lze porovnat s rozsahem sluchových polí (Te1, Te2, Te3; a Par – parietální kůra, Zilles, 1985). Hnědá čára – potkan FG1, fialová čára – potkan FR2.

#### **4.2.4. Barvení podle Nissla**

V řezech barvených podle Nissla jsme nezaznamenali signifikantní změnu celkového počtu neuronů s věkem ani u jednoho vyšetřovaného kmene. Neurony byly identifikovány podle přítomnosti nabarveného perikarya. Počet neuronů se pohyboval kolem 90 000/mm<sup>3</sup> v CCI, 55 000/mm<sup>3</sup> v CGM a 75 000/mm<sup>3</sup> ve sluchové kůře pro oba kmene a obě věkové kategorie. Právě tak nedošlo u starých zvířat ani ke zmenšení plochy průřezů colliculus inferior a CGM, ale ani k statisticky významnému ztenčení sluchové kůry, na rozdíl od předchozího experimentu (4.1.2), kdy byla ale analyzována ještě o půl roku starší zvířata (Long Evans).

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

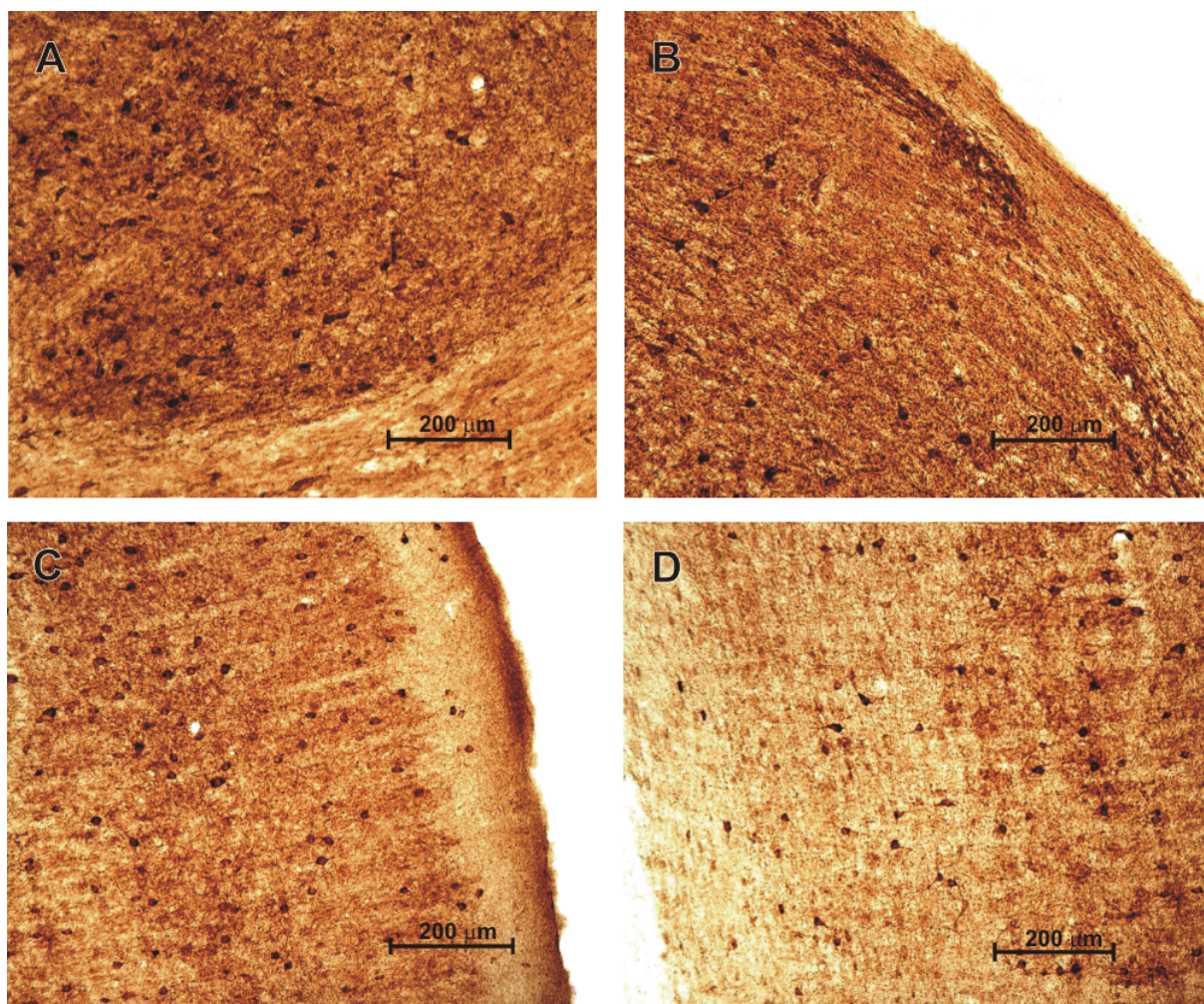
#### **4.3.1. Změny GAD65 a 67 ve stáří u kmene Long-Evans**

##### **4.3.1.1. Colliculus inferior**

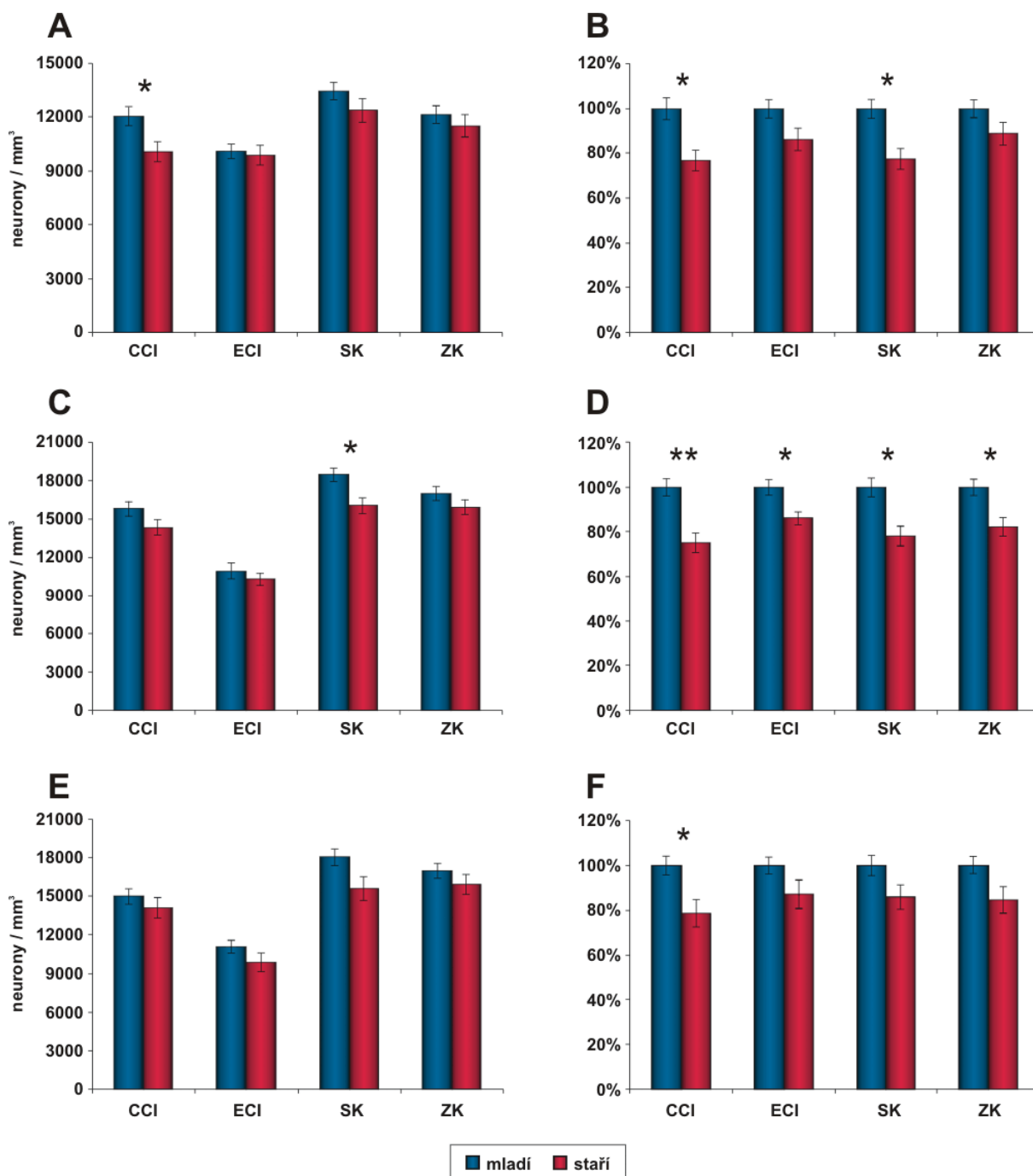
GAD65 a GAD67-ir neurony se nacházely ve všech třech oddílech CI (pro detailnější rozbor, viz Oliver a spol., 1994). Celkově lze říci, že jejich morfologie byla podobná parvalbuminovým neuronům, které jsme sledovali v předcházejícím experimentu. Variabilita tvarů, velikosti a intenzity nabarvení somat GAD-ir buněk byla charakteristická pro centrální jádro, velké větvenité a menší oválné neurony spolu se shluky intenzivně nabarveného neuropilu a malých neuronů (Chernock a spol., 2003) pro externí kůru, a řídké zastoupená populace malých GAD-ir buněk pro dorzální kůru (obr. 14 A,B).

Statisticky významné změny byly ve spojení se stárnutím zjištěny pouze v centrálním jádře a externí kůře (obr. 15 A-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, byť 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 zvířat. Žádnou změnu v průměrné velikosti somat jsme v CI starých zvířat nenalezli.

Z analýzy pomocí western blotu vyplynul při srovnání s mladými zvířaty velmi výrazný pokles hladin obou proteinů, GAD65 i GAD67 o 51% a 49% (oboje  $P=0,002$ ) (obr. 16). Analyzované vzorky zahrnovaly celý colliculus inferior, tedy všechny tři podčásti, tudíž nelze říci, jak velké byly změny v samotném CCI, kde podle histochemie byly poklesy nejvýraznější.



*Obr. 14 – Ilustrační obrázek imunoreaktivitu GAD67 v CCI (A), ECI (B) a v povrchových a hlubokých vrstvách sluchové kůry (C,D) u mladého potkana kmene Long Evans. V barvení na GAD byly změny ve stáří homogenní, okem nikterak nápadné, obrázek je proto určen pro demonstraci samotného barvení a ne pro demonstraci změn.*



Obr. 15 – Výsledky kvantitativního vyhodnocení imunoreaktivity GAD65 a GAD67 u kmene **Long Evans** (A,B,C,D) a **Fischer 344** (E,F). Modré sloupčky označují mladá zvířata, červené stará zvířata. Chybové úsečky představují S.E.M.

A, B) Počet a optická denzita 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 denzita 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 denzita GAD67-imunoreaktivních neuronů v CCI, ECI, SK a ZK u mladých (n=5) a starých (n=3) zvířat kmene Fischer 344

(\* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ )

#### 4.3.1.2. Sluchová kůra

Nezávisle na věku studovaných zvířat byly GAD65 a 67-ir neurony přítomny ve všech korových vrstvách, s výraznějším zastoupením ve vrstvách povrchových (I. – IV.) (pro detailní popis, viz Prieto a spol., 1994a,b). Právě tak bylo v povrchových vrstvách výraznější i barvení neuropilu, krom málo intenzivní I. vrstvy (obr. 14 C,D). Barvení dendritického větvení bylo nestálé, většinou bylo možné pozorovat alespoň primární dendrity, občas bylo možné některý dendrit sledovat až do vzdálenosti 50-100  $\mu\text{m}$ . Rozdíl mezi Te1 a Te3 areami nebyl patrný a stejně tak i změny spojené se stárnutím postihovaly obě oblasti v průměru stejně.

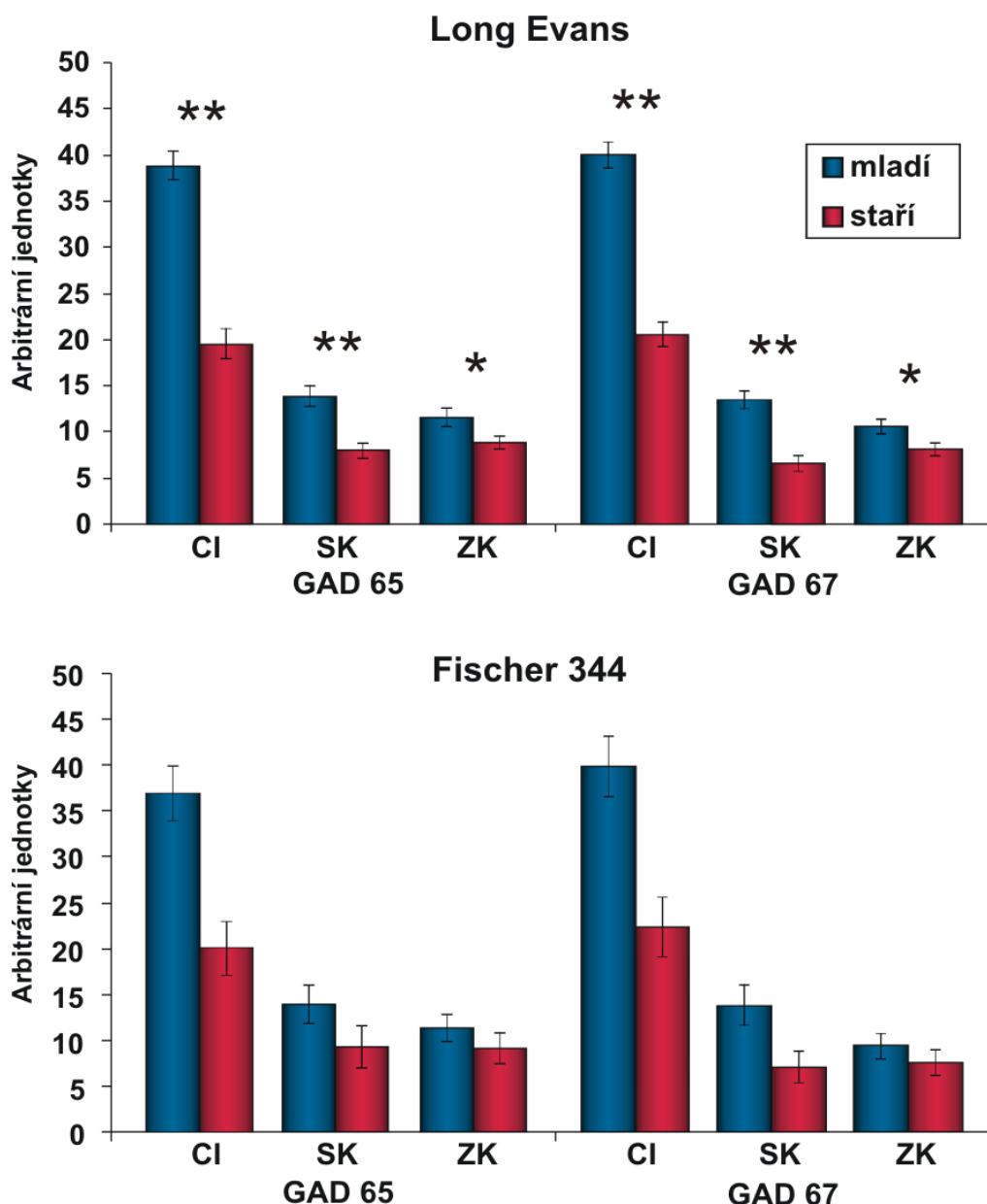
Imunohistochemická analýza ukázala u starých zvířat pokles v optické denzitě neuronů srovnatelný s poklesem v CI. Optická denzita GAD65-ir somat klesla o 20% ( $P=0,015$ ) a GAD67-ir somat o 22% ( $P=0,015$ ). Počet GAD65-ir buněk se snížil jen nevýznamně (o 8%), u GAD67-ir neuronů byl o něco výraznější (13%,  $P=0,03$ ). Neproklázali jsme žádnou specificky odlišnou změnu v určité korové vrstvě. Pokles počtu buněk byl na rozdíl od úbytku parvalbuminových neuronů tentokrát homogenní a bez jakýchkoliv fokálních rozdílů (obr. 15 A-D).

Z výsledků získaných western blotem vyplynul opět značný pokles hladin obou GAD izoform u starých potkanů při srovnání s mladými jedinci. Hladiny poklesly u GAD65 o 43% a u GAD67 o 52% (oboje  $P=0,002$ ) (obr. 16). Vzorčky pro western blot obsahovaly Te1 a Te3 oblasti dohromady. Ukázalo se také, že hladiny obou GAD proteinů v CI byly skoro třikrát vyšší než ve sluchové kůře, a to u mladých i u starých zvířat ( $P<0,001$ ). Rozdíly mladí vs. staří i rozdíly mezi CI a SK (a ZK) jsou dobře viditelné i na obr. 17.

#### 4.3.1.3 Zraková kůra

GAD65 a GAD67-ir neurony se nacházely ve všech korových vrstvách a jejich rozložení, optická denzita buněk, i imunoreaktivita neuropilu byly velmi podobné nálezům ve sluchové kůře.

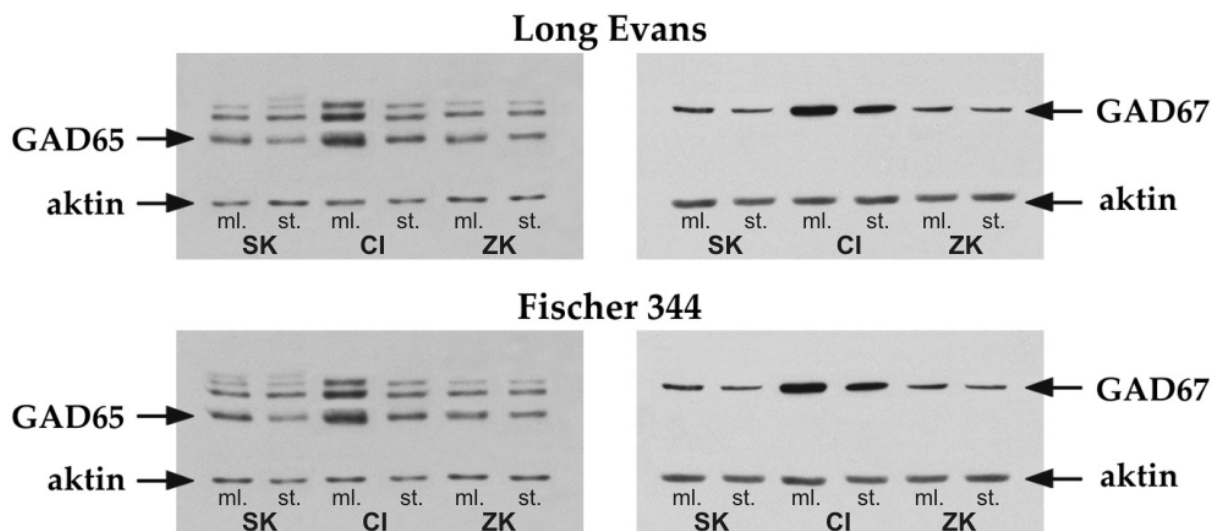
U starých potkanů se snížila optická denzita buněk, ale poněkud méně výrazně než ve sluchové kůře, konkrétně o 12% pro GAD65-ir (nesignifikantní) a o 18% pro GAD67-ir neurony ( $P=0,03$ ). Naproti tomu počet buněk se téměř nesnížil (cca o 5%, nesignifikantní). Stejně jako ve sluchové kůře a v colliculus inferior se nezměnil ani průměrný objem GAD pozitivních buněk (obr. 15 A-D).



Obr. 16 - Výsledky analýzy hladin proteinů GAD65 a GAD67 v CI, SK a ZK u mladých a starých potkanů (6 mladých a 6 starých potkanů kmene Long Evans a 2 mladí a 2 starí potkani kmene Fischer 344). Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata. Chybové úsečky představují S.E.M. (\* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ ). Jednotlivé experimentální skupiny a mozkové struktury byly pro daný protein vždy zastoupeny na jednom filmu (viz obr. 17). Arbitrární jednotky jsme spočítali jako poměr optické denzity detekovaného proteinu a aktinu (v naskenovaných filmech analýzou v softwaru ImageQuant).

Hladiny obou proteinů byly značně sníženy i ve zrakové kůře. Nicméně jejich pokles byl méně výrazný než v obou sluchových strukturách. GAD65 poklesl o 22% (0,041) a GAD67 o 20% ( $P=0,028$ ) (obr. 16). U mladých potkanů byla hladina obou proteinů ve sluchové kůře vyšší než v kůře zrakové (v případě GAD67 signifikantně,  $P < 0,05$ ). U starých

zvířat byla hladina obou proteinů ve sluchové i zrakové kůře přibližně stejná. Pokud provedeme statistickou analýzu velikosti poklesu, pak v colliculus inferior i sluchové kůře klesaly oba proteiny stejnou měrou, zatímco ve zrakové kůře byl rozsah poklesu nejen procentuálně, ale i statisticky menší než ve sluchovém systému ( $P < 0,05$ ).



Obr. 17 – Reprezentativní filmy (1 mladý a 1 starý potkan Long Evans a totéž Fischer 344) s výsledky analýzy western blotu pro GAD65 (levý panel) a GAD67 (pravý panel) vyvolané pomocí metody zesílené chemiluminiscence. Aktin, který sloužil jako interní kontrola, byl detekován na pozici odpovídající molekulové váze 42 kDa. Vzhledem k použití polyklonální protilátky pro GAD65 je na levém panelu přítomné i nespecifické zbarvení (neoznačené horní bledé proužky).

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

#### **4.3.2. Změny v GAD65 a 67 ve stáří u kmene Fischer 344**

V principu měly změny ve stáří u kmene Fischer 344 stejný charakter jako u kmene Long Evans, nicméně malé množství zvířat, které bylo k dispozici, umožnilo jen velmi omezenou statistickou analýzu výsledků. V imunohistochemické části experimentu byly studovány pouze změny v GAD67. Optická denzita GAD67-ir somat poklesla v CCI o 23% ( $P=0,03$ ), v ECI o 10%, ve sluchové kůře o 18% a v zrakové kůře také o 18%. Počet GAD67-ir buněk se snížil v týchž strukturách v uvedeném pořadí o 8%, 12%, 12% a 4% (obr. 15E-F).

Ve western blotu byly sledovány změny v GAD65 i GAD67. V colliculus inferior poklesly hladiny GAD65 o 46% a GAD67 o 44% (obr. 16). Ve sluchové kůře se GAD65 snížil o 34% a GAD67 o 49%. A konečně ve zrakové kůře byly hladiny GAD65 nižší o 19% a GAD67 o 20%. Změny byly tedy zcela obdobné jako u potkanů Long Evans, ale malý počet především starých zvířat, které byly k dispozici ( $n=2$ ), zde nedovolil statistické vyhodnocení.



#### ***4.4. Vliv atorvastatinu na zpomalení narůstajícího poškození sluchu s věkem u dvou kmenů myší***

##### **4.4.1. Sluchové prahy**

Mezi kontrolními myšmi a myšmi, kterým byl podáván atorvastatin, jsme nezjistili žádné signifikantní rozdíly v hodnotách sluchových prahů, a to ani u kmene C57/BL/6J ani u apoE<sup>-/-</sup> myší. Srovnání mezikmenové, tj. mezi C57/BL/6J a apoE<sup>-/-</sup> myšmi, pouze ukázalo o málo horší prahy u kmene apoE<sup>-/-</sup> v odpovědi na klik, nicméně statisticky byl rozdíl nevýznamný. Nebyly nalezeny ani žádné signifikantní rozdíly v latenci vln ABR.

##### **4.4.2. Distorzní produkty otoakustických emisí**

Ve skupině C57/BL/6J myší krmených potravou s příměsí atorvastatinu byly zjištěny vyšší hodnoty amplitud DPOAE ve srovnání s kontrolní skupinou. Tento rozdíl byl signifikantní pro jednotlivé frekvence f<sub>2</sub> v pásmu od 19 kHz do 27 kHz (pro 23 kHz, P<0,01; pro 19 a 27 kHz, P<0,05). I pro všechny ostatní měřené frekvence byly nalezeny větší hodnoty amplitud DPOAE u atorvastatinové skupiny, jak je dobře patrné na obr. 18, rozdíly však již nebyly statisticky signifikantní. Na frekvencích f<sub>2</sub> 4-6 kHz a 38 kHz byla zaznamenána přítomnost DPOAE jen u velmi malého počtu C57 zvířat, a proto byly tyto hodnoty vyřazeny z další analýzy. Naproti tomu testování DPOAE u kmene myší apoE<sup>-/-</sup> žádné rozdíly mezi atorvastatinovou a kontrolní skupinou neukázalo.

##### **4.4.3. Hladiny cholesterolu v krvi**

Biochemická analýza neprokázala u kmene C57BL/6J po podávání atorvastatinu statisticky signifikantní pokles hladin cholesterolu v krvi (2,7 atorvastatinové vs. 3,2 mmol/l kontrolní myší). Zato u apoE-deficientního kmene došlo po podávání atorvastatinu naopak k výraznému zvýšení již tak vysokých hladin cholesterolu o 56% (17,5 atorvastatinové vs. 11,2 mmol/l u kontrolních; P = 0,005).

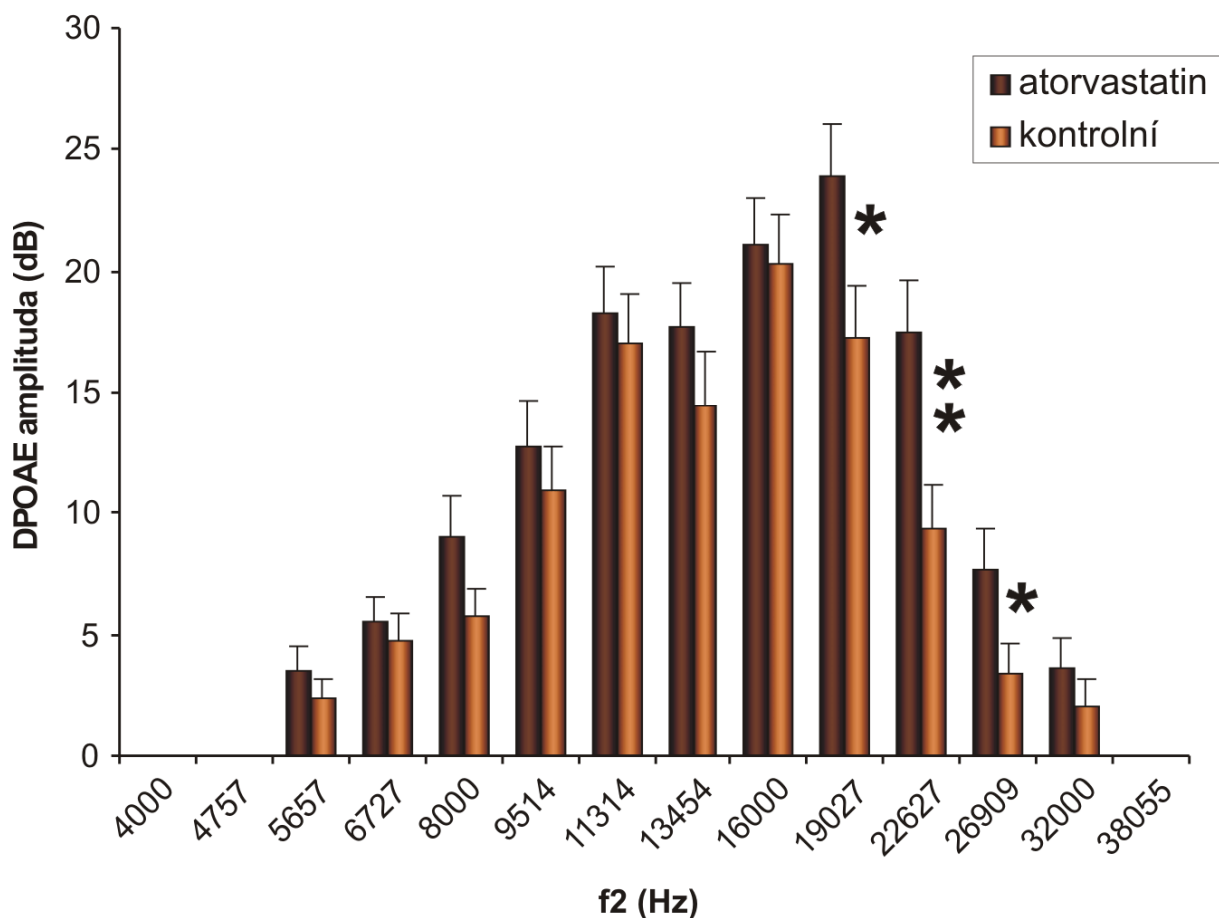
##### **4.4.4. Exprese zánětlivých markerů VCAM-1 a ICAM-1**

Makroskopicky viditelné aterosklerotické poškození či jiné morfologické abnormality jsme na kořeni a oblouku aorty nenalezli ani u jedné testované skupiny myší.

Imunohistochemická analýza ale prokázala změny v expresi faktorů ICAM-1 a VCAM-1 (exprese byla vyjádřena jako procentuální podíl z celkové plochy endotelu). Z obr. 19 je patrné, že podávání atorvastatinu neovlivnilo expresi ICAM-1 u apoE-

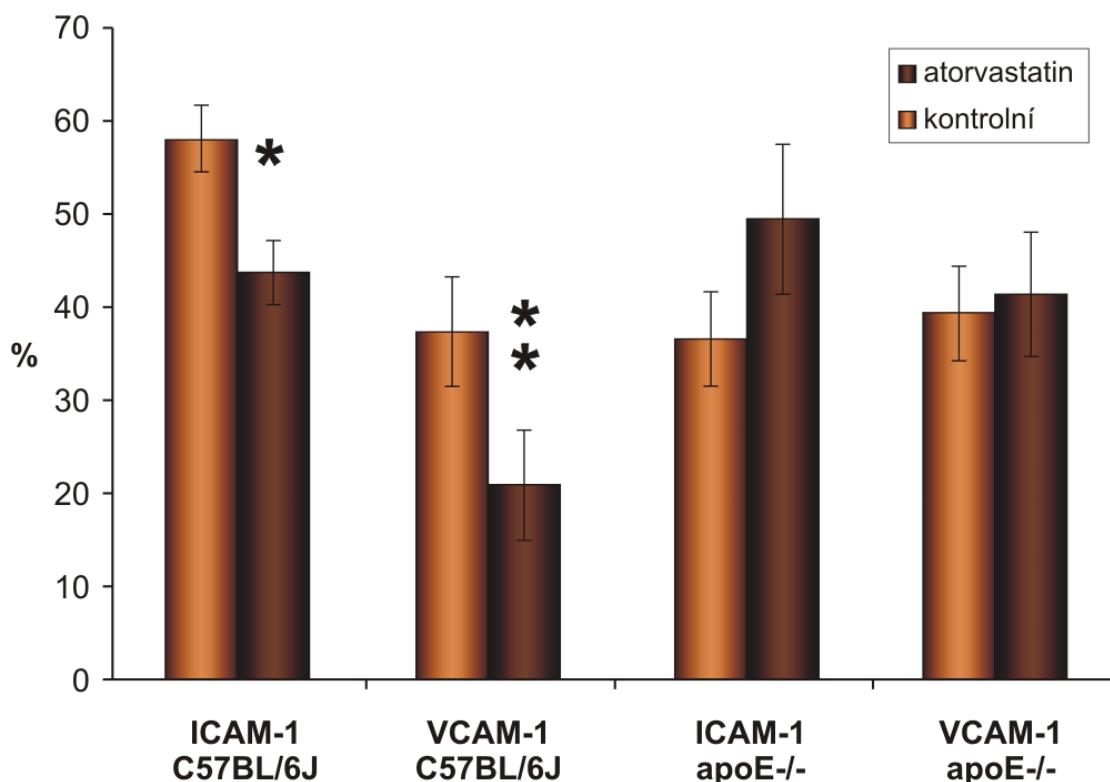
deficientních myši, naopak výsledkem byl nesignifikantní nárůst (37 vs. 49 %), zatímco u myši kmene C57BL/6J byl výrazný pokles v expresi ICAM-1 dobře patrný (58 vs. 44 %,  $P=0,018$ ). Výsledky analýzy pro VCAM-1 jsou podobné. Atorvastatin významně ovlivnil expresi VCAM-1 pouze u kmene C57BL/6J (37 vs. 21 %,  $P=0,005$ ), zatímco u kmene apoE<sup>-/-</sup> myši k žádné změně v expresi nedošlo (39 vs. 41 %).

### Distorzní produkty otoakustických emisí - C57BL/6J Velikost průměrných amplitud



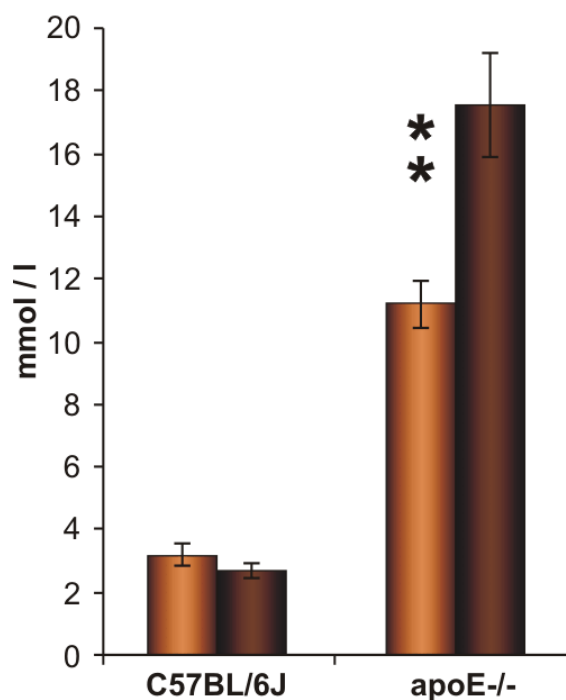
Obr. 18 – Průměrné velikosti amplitudy DPOAE u kmene C57BL/6J pro každou měřenou frekvenci  $f_2$  u myši krmených dietou s atorvastatinem (tmavohnědé sloupečky) a kontrolních myši (světlehnědé sloupečky) (\* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ ).

### Aktivita markerů zánětlivého endothelia



Obr. 19 – Procentuální podíl aktivovaných endotheliálních buněk cévní stěny pro markery ICAM-1 a VCAM-1 u kontrolních myší (světlehnědé sloupečky) a myší krměných dietou s atorvastatinem (tmavohnědé sloupečky) kmenů C57BL/6J a apoE-/- (\* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ )

### Hladiny cholesterolu v krvi



Obr. 20 – Hladiny cholesterolu v krvi u kontrolních myší (světlehnědé sloupečky) a myší krměných dietou s atorvastatinem (tmavohnědé sloupečky) u kmenů C57BL/6J a apoE-/- (\* -  $P < 0,05$ , \*\* -  $P < 0,01$ )

## 5. DISKUZE

### 5.1. *Presbyakuze – histochemické změny ve sluchové dráze a farmakologické ovlivnění sensorineurální formy*

Naše práce potvrdila, že ve stáří dochází v centrálním sluchovém systému ke změnám v imunocytochemických a neurochemických markerech, které postihují určité neuronální populace a ukázala, že tyto změny mohou být odlišné u různých kmenů laboratorního potkana. Celkově výsledky přinášejí nové doklady, že funkce inhibičního systému ve stáří klesá. Zároveň se zdá, že část těchto změn může být obecným rysem stárnoucího mozku, zatímco k některým změnám dochází v návaznosti na pokles ascendentní stimulace z periferního smyslového orgánu (kochley). Současně jsme ukázali, že u periferní, sensorineurální, formy presbyakuze může mít podávání látek zlepšujících krevní průtok i pozitivní účinek na uchování funkce sluchu.

Výzkum změn markerů na korové a podkorové úrovni se zaměřil především na populace GABAergních interneuronů. Ty lze klasifikovat podle různých cytoarchitektonických hledisek, exprese jednotlivých proteinů, či typů odpovědi na podnět. Především je ale tvoří neurony tzv. lokálních okruhů, tj. neurony neprojikující do vzdálenějších oblastí mozku (pro přehled viz Markram a spol., 2004). Tato definice není úplně přesná, neboť byly již prokázány i GABAergní neurony projikující do vzdálených regionů (Tomioaka a spol., 2005; Higo a spol., 2007). Hodnotili jsme jednak změny týkající se celého GABAergního systému ve sluchové kůře a vybraných podkorových centrech, jednak změny populací neuronů exprimujících NO (pomocí markeru NADPH-diaforázy) a parvalbumin. NADPH-diaforáza pozitivní neurony významně kolokalizují s GABA (Yan a spol., 1996; Huh a spol., 1998, Jinno a spol., 1999); to se týká tzv. I. typu těchto neuronů (větší, intenzivně barvené buňky), typ II. s GABA kolokalizuje jen v menší míře, patří k němu slaběji se barvící buňky s menšími somaty. V mozkové kůře hlodavců se vyskytuje prakticky pouze typ I., typ II NADPH-d pozitivních buněk převažuje v kůře primátů (Yan a Garey, 1997; Judas a spol., 1999). Parvalbumin je exprimován prakticky výhradně jen v GABAergních neuronech, a to u hlodavců i primátů (Kosaka a spol., 1987; Condé a spol., 1994; Freund a Buzsáki, 1996; Kawaguchi a Kubota, 1998). Zároveň je známo, že NADPH-diaforáza příliš nekolokalizuje s parvalbuminem, parvalbumin exprimující neurony mají ale četné synaptické kontakty na NADPH-d pozitivních neuronech (Dun a spol., 1994; Morello a spol., 1997). Jedná se tedy o dvě různé populace neuronů.

Dosavadní nálezy změn NADPH-d pozitivních neuronů ve stárnoucím mozku nejsou jednoznačné. V souladu s našimi výsledky převažují nálezy poklesu jejich množství ve stáří a někteří autoři uvádějí v souladu s naší prací i přestavbu dendritického větvení těchto neuronů (Lolova a spol., 2000; Necchi a spol., 2002; Sánchez-Zuriaga a spol., 2007). Změny v expresi NOS v dané oblasti jsou dávány buď do souvislosti se zhoršením funkce, např. čichového či sluchového systému, nebo jsou interpretovány jako obecně související se stárnutím mozku (Reuss a spol., 2000; Kirkwood a Kowald, 1997; McCann a spol., 1998; Necchi a spol., 2002). Na základě námi nalezeného poklesu počtu NADPH-d pozitivních neuronů v kůře o 15%, ale nelze vyvozovat jednoznačné funkční důsledky. Významné ovšem nejsou jen samotné změny počtu buněk, ale i souvislosti námi pozorované přestavby dendritického větvení, které mohou představovat kompenzační mechanismy související se stárnutím, např. se zmenšením extracelulárního prostoru a změnou poměrů pro přenos a difuzi látek v mozku ve stáří (Syková E., 2001). Skutečnost, že pozorovaná celková délka dendritického větvení připadajícího na jeden NADPH-d neuron se mezi mladými a starými zvířaty významně nezměnila, by mohla svědčit pro hypotézu kompenzační přestavby. Vzhledem k nejednoznačnosti dosavadních nálezů exprese NADPH-d neuronů v mozku ve stáří lze uvažovat i o tom, že tyto změny v expresi NOS nemusejí mít vždy jednotnou podobu a konkrétní charakter změny může souviset s různým průběhem stárnutí mozku. O změnách v NOS/NADPH-d systému se uvažuje i ve vztahu s některými lidskými onemocněními centrálního nervového systému jako je schizofrenie či Parkinsonova nemoc, jednoznačný průkaz ale zatím chybí (Mollace a spol., 1995; Blum-Degen, 1999). Vzhledem k tomu, že naše práce s NADPH-diaforázou byla zaměřena na sluchovou kůru starých potkanů kmene Long Evans, kteří mají jen málo zhoršenou sluchovou funkci, pak by v expresi NADPH-d byly očekávatelné spíše jen menší změny, pokud by s tímto zhoršením sluchu měly souviset.

Naše výsledky ukázaly velmi výrazný úbytek PV-ir neuronů ve sluchové kůře u starých potkanů kmene Fischer 344, kteří trpí výrazným poškozením sluchu ve stáří (Popelář a spol., 2003, 2006; Buckiová a spol., 2007). U starých potkanů Long Evans byla naopak PV-imunoreaktivita v SK zachovaná a v colliculus inferior jsme dokonce našli vyšší počet PV-ir buněk než u mladých jedinců. Otázka významu PV-ir neuronů se v posledních letech dostala do popředí v souvislosti s řadou prací zabývajících se úlohou PV-ir buněk v inhibičních sítích generujících gamma oscilace, zvláště v neokortexu a hipokampu (Bragin a spol., 1995; Buzsáki a Draguhn, 2004). Gamma oscilace (30-100 Hz) představují referenční signál pro časové kódování, spojování jednotlivých prvků zpracovávané informace

do uceleného konceptu vnímání a též pro ukládání do paměti (pro přehled viz – Bartos a spol., 2007). U lidí dochází k poškození PV-ir subpopulace GABAergních neuronů u řady neurologických či neuropsychiatrických onemocnění (Lewis a spol., 2005; Woo a Lu, 2006). Paralelní studie byly provedeny na laboratorních zvířatech, kde např. u LPA1-deficientní myši, sloužící jako zvířecí model schizofrenie, byl nalezen pokles PV a GABA imunoreaktivity v entorhinální kůře spolu s naměřeným výrazným úbytkem gamma oscilací ve stejné oblasti (Cunningham a spol., 2006). Snížení počtu PV-ir neuronů bylo pozorováno také v prefrontální kůře methylazoxymethanolového potkaního modelu schizofrenie (Penschuck a spol., 2006). Ani v jedné z těchto studií nebyly zjištěny změny v počtu kalbindinovým či kalretininovým neuronů.

U starých potkanů kmene Fischer 344 byl pokles PV a GABA imunoreaktivity nalezen také v hipokampu (Shetty a Turner, 1998; Shi a spol. 2004). Přitom je známo, že právě stará zvířata tohoto kmene trpí velkými kognitivními deficity, které se týkají především prostorového učení, úlekového podmiňování a rozlišování pachů (Oler a Markus, 1998; Harker a Whishav, 2002; Villarreal a spol., 2004; La Sarge a spol., 2007). Je ale třeba připomenout, že v mnoha behaviorálních testech byla pro úlekové podmiňování použita zvuková stimulace. Vzhledem k současnému silnému poškození sluchu u těchto zvířat by tak výsledky některých behaviorálních experimentů mohly být tímto faktem ovlivněny. Přesto se ale nabízí hypotéza o souvislosti mezi zhoršením kognitivních funkcí a snížením parvalbuminové exprese v hipokampu. Pokud budeme stejně interpretovat naše pozorování, nabízí se souvislost mezi specifickým poklesem počtu PV-ir neuronů ve sluchové kůře u starých potkanů kmene Fischer 344 a výrazným snížením funkce sluchu u těchto zvířat. Zda je pokles PV-ir neuronů pouze následkem útlumu aferentní aktivity, či naopak může sám dále přispívat ke zhoršení sluchové funkce (která je zde primárně dána periferní patologií) je otázkou pro další výzkum. Nálezy poklesu počtu PV-ir neuronů v dalších několika oblastech kůry (zrakové, retrosplenální), které jsme též pozorovali, mohou naznačovat celkově rychlejší degeneraci centrálního nervového systému jedinců kmene Fischer 344, protože tento kmen se vyznačuje v mnoha ohledech patologickým průběhem stárnutí (viz kapitola 1.3.1.).

Změny v populaci PV-ir neuronů u starých potkanů v našem experimentu jsou tedy kmenově specifické a mohou do jisté míry souviset s mírou zachování funkce sluchu. V této souvislosti se nabízela otázka, zda obdobně kmenově specifické jsou i změny GABAergního systému jako celku, protože PV-ir neurony jsou jeho součástí (Kosaka a spol., 1987; Freund a Buzsáki, 1996; Kawaguchi a Kubota, 1998). Kromě toho např. v hipokampu měly GABA-ir i PV-ir neurony podle některých autorů obdobnou tendenci k úbytku ve stáří (Shetty a Turner,

1998; Shi a spol. 2004). Naše nálezy změn v hladinách GAD 65 a 67 ve sluchovém systému jsou ale v tomto ohledu od změn v imunoreaktivitě parvalbuminu odlišné. Konkrétně, ve všech sledovaných strukturách (CI, SK, ZK) a u obou sledovaných kmenů (Long Evans a Fischer 344) jevíly oba izoenzymy shodně ve stáří pokles, a dokonce i míra tohoto poklesu byla obdobná. Rozdílný průběh změn v produkci parvalbuminu a GABA (GAD) spojených se stárnutím byl ale již u potkanů opakovaně zjištěn např. v septu, sensorimotorické kůře, a i v hipokampu (Krzywkowski a spol., 1995; Vela a spol., 2003; Potier a spol., 2006; Shi a spol., 2006).

Změny v imunoreaktivitě GAD65 a GAD67 v naší studii tedy nebyly kmenově specifické, což je v souladu i s nálezy od Ling a spol. (2005), kteří podobnou metodikou prokázali porovnatelný pokles v hladině GAD 67 ve sluchové kůře starých potkanů kmene Fischer 344/Brown Norway. Lze tedy říci, že s věkem spjaté změny v množství GAD v CI a ve sluchové kůře jsou podobné bez ohledu na použitý kmen potkana. Porovnáme-li naše výsledky dosažené u dvou kmenů laboratorního potkana se situací u myši, kde kmeny CBA/CaJ a C57/BL/6J mají sluchové deficity ve stáří obdobné jako Long Evans a Fischer 344 (ačkoliv u kmene C57 je ztráta sluchu sensorineurálního původu – Parham, 1997, Spongr a spol., 1997), můžeme konstatovat, že významné zhoršení funkce inhibičního systému ve sluchové dráze bylo elektrofyzilogicky prokázáno pro oba myší kmeny (Walton a spol., 1998, 2002; Felix a Portfors, 2007). Je tedy možno navrhnout hypotézu, že úbytek GAD (a GABA) v colliculus inferior a sluchové kůře ve stáří není primárně závislý na periferní deaferentaci, ale je spíše centrálního původu. Tyto změny ve vyšších etážích sluchové dráhy mohou přispívat ke zhoršenému zpracování parametrů klíčových pro porozumění komplexním zvukům, spíše než souviset s např. posunem sluchových prahů (které u kmene Long Evans výrazně posunuty nejsou). Tato data tak zároveň podporují závěr, že pokles hladin a funkce GABA ve stáří má souvislost se zhoršením celkové funkce sluchu včetně lidské presbyakuze.

Naše analýza změn histochemických markerů ve stáří ve sluchové dráze prokazuje tedy částečně centrální původ těchto změn, ale i jejich částečnou souvislost se zachovanou funkcí periférie (především u parvalbuminu) a tedy i zachovanou aferentní stimulací. Farmakologické působení, které by zpomalovalo nástup patologických změn ve vnitřním uchu, by tak mohlo mít kromě vlastního udržení lepší funkce sluchu (menší posun sluchových prahů, atd.) následně i vliv na některé navazující změny ve sluchové dráze. Protože jedním z významných faktorů ovlivňujících přežití a funkci sensorických orgánů je zajištění dostatečného přísunu kyslíku a živin cévním řečištěm, podávání látek

zpomalujících rozvoj patologických procesů v cévách (např. aterosklerózy) by mohlo mít pozitivní vliv na udržení sluchových funkcí.

Ukázali jsme, že takovou pozitivní roli u kmene myší C57BL/6J, standardního zvířecího modelu senzorineurální presbyakuze, může sehrát účinná látka atorvastatin, která je v humánní medicíně běžně používána v léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Davignon, 2001). U kmene myší C57 je popsána významná a rychle progredující ztráta vnějších vláskových buněk již od třetího měsíce věku (Henry, 1984; Parham, 1997; a viz kapitola 1.3.1.). Prokázali jsme, že po 8-týdenní každodenní aplikaci atorvastatinu byl tento patologický proces zpomalen. Myši krmené atorvastatinem měly signifikantně větší zachované amplitudy distorzních produktů otoakustických emisí (DPOAE), především v oblasti vyšších frekvencí. Zhoršení DPOAE je přitom standardně užíváno jako citlivý a raný indikátor úbytku funkce vnějších vláskových buněk, které předchází dalším funkčním změnám (Lichtenhan a spol., 2005; Davis a spol., 2005). Zmenšení plochy ateroskleroticky změněné cévní výstelky v aortě zároveň prokázalo přímý účinek atorvastatinu na zánětlivý proces v cévách u těchto zvířat. Nezměněné hladiny cholesterolu v krvi po osmi týdnech jeho užívání navíc naznačují, že pozitivní efekt statinů v tomto případě nesouvisel s jejich vlivem na snížení hladin cholesterolu v krvi, což je v souladu se závěry předchozích autorů (Farmer 2000; Arnaud a spol., 2005; Gonyeau 2005).

## ***5.2. Změny NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře starých potkanů kmene Long Evans***

V naší práci jsme u velmi starých potkanů kmene Long Evans našli snížení absolutního počtu NADPH-diaforáza pozitivních neuronů v korových oblastech Te1 a Te3 o 15 %. Plošná hustota pozitivních neuronů na mm<sup>2</sup> byla ale zvýšená následkem současného výrazného ztenčení sluchové kůry, které bylo v menší či větší míře přítomné u všech starých zvířat v tomto pokuse. Kvantitativní analýza dále prokázala nárůst počtu dendritických segmentů a bifurkací. Průměrná délka jednotlivých dendritických segmentů ve stáří sice klesla, takže celková délka viditelného dendritického větvení připadajícího na jeden neuron zůstala prakticky stejná jako u mladých zvířat.

Studie mapující NADPH-diaforáza pozitivní neurony v různých oblastech mozku vesměs ukázaly změny v jejich počtu nebo změny jejich morfologie ve stáří, ale charakter těchto změn není jednotný. V našem přehledu se omezíme jen na nálezy u hlodavců, kde jsou v kůře přítomny pouze NADPH-d exprimující neurony typu I (kolokalizují výrazně s GABA). Huh a spol. (1997a) nezjistili žádné významné rozdíly v počtu NADPH-diaforáza pozitivních



neuronů. V práci zaměřené na kolokalizaci neuropeptidu Y a NADPH-d neuronů u 24 měsíců starých potkanů byl nalezen úbytek pouze NADPH-d neuronů neexprimujících neuropeptid Y (Huh a spol., 1997b, 1998). Naproti tomu jiní autoři (Yamada a spol., 1996; Cha a spol., 1998; Necchi a spol., 2002) zjistili, že u velmi starých potkanů (24-30 měsíců) se v somatosenzorické, motorické a sluchové kůře počet NADPH-d/NOS neuronů obecně výrazně snížil, a to až na polovinu ve srovnání s mladými zvířaty. Naše vlastní výsledky ukazují, že ve zrakové kůře byl pokles menší než ve sluchové kůře, a to pouze o 6%. Sánchez-Zuriaga a spol. (2007) našli ve sluchové kůře potkanů kmene Wistar starých 30 měsíců snížení počtu NADPH-d pozitivních neuronů dobře srovnatelné s naší prací, a dále i podobný pokles počtu NADPH-d pozitivních neuronů v colliculus inferior. Je třeba poznamenat, že některé rozdíly mezi výsledky jednotlivých autorů mohou být způsobeny užitím různých kmenů potkanů (Sprague-Dawley – Huh a spol., 1997a,b; Cha a spol., 1998; Fischer 344 - Huh a spol., 1998; Wistar - Yamada a spol., 1996; Necchi a spol., 2002; Lolova a spol., 2000) a také různým stářím pokusných zvířat (24-36 měsíců). Výsledky a metodiky hodnocení jsou natolik různorodé, že možnou kmenovou specifitu těchto změn nelze ani jasně potvrdit ani ji vyloučit.

Celkový počet NADPH-d pozitivních neuronů ve sluchové kůře u starých zvířat klesl o 15% (respektive 13%, při kvantitativním hodnocení jiným postupem, viz kapitola 4.1.3), ale hustota NADPH-d pozitivních neuronů na milimetr čtvereční naopak stoupla o cca 60% v důsledku výrazného ztenčení mozkové kůry. Námi nalezené ztenčení mozkové kůry v tomto experimentu nelze přímo připsat důsledkům zmenšení extracelulárního prostoru v mozkové kůře, ke kterému ve stáří dochází, protože v průběhu standardního histologického zpracování mozku dochází k praktickému vymizení jakéhokoliv pozorovatelného extracelulárního prostoru (Syková a Nicholson, 2008). Podobně významné ztenčení mozkové kůry bylo ale pozorováno, např. u lidí s onemocněními mozku jako je demence či roztroušená skleróza (Sailer a spol., 2003; Im a spol., 2008). U potkanů bylo ale takové výrazné ztenčení dosud zjištěno především v případě kombinovaných následků diabetu a ischemie (Kondo a spol., 2001; Freret a spol., 2006). Kondo a spol. (2001) vyvolali u mladých potkanů přechodnou ischemickou příhodu mozku (okluzí karotid) a později byla u původně diabetických zvířat zjištěna redukce temporální kůry až k 40% původní hodnoty, tedy podobně jako v našem experimentu. U původně nediabetických zvířat byla korová atrofie výrazně menší. Vzhledem k mimořádnému věku potkanů v našem pokusu (36 měsíců), lze u takto starých zvířat předpokládat cerebrovaskulární změny vedoucí k lokální ischemii a postupující korové atrofii, jak bylo již dříve popsáno v literatuře (Shimada, 1999). Diabetes jsme u potkanů v našem

experimentu neprokazovali. V dalších pokusech s jen o něco mladšími zvířaty (27-35 měsíců – změny v imunoreaktivitě PV a GAD) jsme už takové signifikantní ztenčení mozkové kůry nezaznamenali.

Mimo uvedené změny počtu NADPH-d pozitivních neuronů se také změnila morfologie neuronů. Průměrná velikost buněčných těl (2D průřezů somaty) zůstala sice nezměněná, stejně jako ve studiích jiných autorů (Huh a spol., 1997a,b), na druhou stranu významné změny byly pozorovány v perikaryu. Stárnutí provázal nárůst v počtu dendritických segmentů, počtu dendritických bifurkací, a naopak pokles v průměrné délce jednoho segmentu. Znamená to tedy, že došlo k remodelaci neuronálního stromu. Tyto změny u starých zvířat mohou představovat kompenzační mechanismy související např. se zmenšením extracelulárního prostoru a změnou poměrů pro přenos a difuzi látek v mozku ve stáří (Syková, 2001; Syková a Nicholson, 2008), se změnami v poměrech trofických faktorů, případně i přímo s poklesem absolutního počtu NADPH-d neuronů. Mohlo by se jednat i o přímý důsledek ztenčení mozkové kůry, a tedy by šlo až o projev velmi pozdního stáří pokusných zvířat. Zda byla remodelaci neuronálního stromu specifická pro NADPH-d pozitivní neurony, či zda se týkala i jiných populací neuronů (tj. většiny neuronů), jsme u těchto zvířat nezjišťovali, stejně tak jsme nezjišťovali ani změny glie.

Zdá se ale, že remodelace dendritického větvení se týká NADPH-d pozitivních neuronů v různých částech mozku starých potkanů, např. v periakvadukální šedi, parietální a temporální kůře a v hipokampu (Cha a spol., 1998; Lolova a spol., 2000). Poněkud odlišné výsledky remodelace ve srovnání s našimi uvedli Cha a spol. (1998). Nalezli úbytek pozitivních neuronů ve sluchové kůře, ale popisují snížení počtu a průměrné délky dendritických segmentů připadajících na jeden neuron; jejich údaje ale nebyly doloženy kvantitativní analýzou.

Podobné změny, týkající se remodelace dendritického větvení neuronů obecně, byly pozorovány i jako důsledek některých experimentálních zásahů. Charakter některých změn byl závislý na věku pokusných zvířat. Např. poškození nucleus basalis magnocellularis, které je zdrojem hlavní cholinergní projekce do neokortexu potkana, mělo za následek přestavbu dendritického větvení, ztráty neuronů, a dokonce i částečné ztenčení frontálního neokortexu u starých, ne ale u mladých potkanů (Wellman a Sengelaub, 1995; Harmon a Wellman, 2003; Works a spol., 2004). Změny ve stavbě dendritického větvení a morfologie somat byly pozorovány i v normálně stárnoucím mozku, a to nejen u interneuronů, ale i u stárnoucích korových pyramidových buněk (Vaughan, 1977; Peinado a spol., 1993, 1997; Grill a Riddle, 2002). U pyramidových neuronů V. vrstvy ve sluchové kůře starého potkana došlo k úbytku

primárních dendritů, množství dendritických bifurkací však změněno nebylo (Vaughan a spol., 1977). Morfometrická analýza dendritů pyramidových neuronů II. a III. vrstvy v cingulární kůře prokázala pokles průměrné délky dendritických segmentů, zatímco v V. korové vrstvě cingulární kůry byly, na rozdíl od sluchové kůry, změny v dendritickém větvení minimální (Grill a Riddle, 2002).

### **5.3. Změny v imunoreaktivitě parvalbuminu v *colliculus inferior*, CGM a sluchové kůře u starých potkanů dvou kmenů**

Naše výsledky ukazují významné změny v imunoreaktivitě parvalbuminu ve stárnoucí sluchové dráze, které zahrnují: změny počtu PV-ir buněk, změny jejich optické denzity a změny objemu PV-ir somat. V souhrnu lze říci, že počet PV-ir neuronů vzrostl s věkem v CCI u kmene Long Evans, zatímco u kmene Fischer 344 došlo k výraznému úbytku PV-ir neuronů ve sluchové kůře. Některé části sluchové kůry starých zvířat Fischer 344 byly prakticky bez parvalbuminové imunoreaktivity. Velmi sporadický výskyt slabě denzních PV-ir neuronů v CGM u všech pokusných zvířat bez rozdílu věku je v souladu s nálezy předchozích autorů (Celio, 1990; Covenas a spol., 1991).

Obecně je početní redukce PV-ir neuronů ve sluchové kůře (v CI se počet signifikantně nesnížil) starých potkanů kmene Fischer 344 v souladu s převažující tendencí k poklesu počtu těchto neuronů ve stáří v různých částech mozku, tak jak byly pozorovány jinými autory např. v cingulární kůře, hipokampu a čichovém bulbu (Krzywkowsky a spol., 1995; Shetty a Turner, 1998; Hwang a spol., 2003). Plošné vymizení PV-ir neuronů v korových polích nicméně dosud popsáno nebylo. Naproti tomu u starých zvířat kmene Long Evans jsme ve sluchové kůře zjistili jen nesignifikantní pokles počtu PV-ir neuronů a v *colliculus inferior* jsme naopak našli jejich početní nárůst. Co takový nárůst může znamenat pro funkci CI u starých zvířat kmene Long Evans, není známo. Podobný nárůst počtu PV-ir neuronů ve stáří ale také není ojedinělý, byl popsán např. v kochleárních jádrech u starých myší kmene CBA/CaJ, který má rovněž dobře zachovanou funkci sluchu až do vysokého věku (Idrizbegovic a spol., 2001). Autoři se přiklánějí k názoru, že jde o expresi v neuronech původně neprodukujících vápník vážící proteiny a jde tedy o expresi de-novo vzniklou až v průběhu stárnutí. Zvýšená produkce vápník vážících proteinů by mohla představovat odpověď na zvyšující se potřebu pufrovací kapacity pro udržení vnitrobuněčné homeostázy kalcia. Zhroucení kalciové homeostázy může hrát jednu z klíčových rolí v buněčném stárnutí a ztrátě funkce a přežití neuronů (Verkhatsky a Toescu, 1998; Toescu a spol., 2004).

U starých zvířat kmene Long Evans jsme navíc našli v colliculus inferior i zvýšenou optickou denzitu PV-ir neuronů (ve sluchové kůře jen nesignifikantně). Zvýšení optické denzity může odrážet buď zvýšenou produkci sledovaného produktu anebo nahuštění produktu v důsledku svrážení buňky (Krzywkowski a spol., 1995). Změny průměrného objemu PV-ir neuronů byly ale u kmene Long Evans malé, takže výsledky spíše hovoří ve prospěch celkově zvýšené produkce proteinu. V colliculus inferior potkanů kmene Fischer 344 tomu ale bylo jinak a PV-ir neurony starých zvířat tohoto kmene měly výrazně nižší průměrný objem somat ve srovnání s neurony mladých zvířat. Optická denzita somat přitom zůstala nezměněná. Takový nálezn by naopak svědčil pro snížené množství parvalbuminu v somatech. Zmenšení objemu somat (v důsledku přestavby cytoskeletu, apod.) může být také rys, který se se stárnutím objevuje častěji. Konkrétně u PV-ir buněk byl již popsán např v mediálním septu u starých Sprague-Dawley potkanů (Krzywkovsky a spol., 1995). Co se týče celkového objemu CI, zde nebyla pozorována žádná změna ani u jednoho kmene, což je v souladu se staršími pracemi u potkana (Casparly a spol., 1995) a myši (Willott a spol., 1994).

Jak bylo poznamenáno v úvodu (kapitola 1.3.1), oba použité kmeny potkanů se v mnoha ohledech liší, včetně různého průběhu stárnutí. Mnohem rychlejší a výraznější poškození sluchu ve srovnání s kmenem Long Evans má u kmene Fischer 344 za následek značný posun sluchového prahu, pokles v amplitudě evokovaných kmenových odpovědí, zeslabení distorzních produktů otoakustických emisí a pokles v poddajnosti středouší ve stáří (Popelář a spol., 2003, 2006). Zajímavá analogie k našim výsledkům existuje u myši, pokud srovnáváme kmen CBA/CaJ a kmeny C57/BL/6J a BALB/c. CBA/CaJ je kmen s dobře zachovaným sluchem do vysokého věku, naopak C57 a BALB jsou kmeny s rychlou a výraznou ztrátou sluchu (v tomto případě sensorineurálního původu). V kochleárním jádře našli Idrizbegovic a spol. (2001, 2004, 2006) u myši všech kmenů procentuální nárůst PV-ir neuronů s věkem při srovnání s celkovou populací neuronů (barvení podle Nissla). Absolutně se ale počet PV-ir neuronů zvýšil pouze u kmene CBA/CaJ a ne u C57/BL6J a BALB/c, tedy ne u kmenů s těžkou sensorineurální ztrátou sluchu. Podobné výsledky autoři obdrželi i pro kalbindin. Kromě dokladu kmenově specifických změn jde opět i o argument ve prospěch možnosti de-novo exprese v neuronech původně daný protein neexprimujících. V jiné studii s C57 a CBA kmeny byly sledovány změny ve stáří na úrovni CI (Zettel a spol., 1997). U starých zvířat byl nalezen obdobný pokles kalbindinu v CI u obou kmenů, zatímco k nárůstu množství kalretininu v CI došlo pouze v případě kmene CBA a u C57 byla jeho exprese nezměněná. Navíc se prokázalo, že tato zvýšená produkce kalretininu je opravdu

závislá na zachovaném sluchu do stáří, protože u CBA myši uměle intenzivně ohlušených v raném věku k tomuto nárůstu nedošlo (Zettel a spol., 2001). Zajímavou otázkou je, zda udržení a dokonce zvýšení parvalbuminové imunoreaktivity u starých potkanů Long Evans je také závislé na zachovalé aktivaci z periferie.

Podstatný úbytek PV-ir neuronů ve sluchové kůře kmene Fischer 344 nemůže být prostým důsledkem neselektivního zániku neuronů, protože v řezech barvených podle Nissla jsme nepozorovali žádný významnější celkový úbytek neuronů. I tento výsledek je v souladu s předchozími pracemi, kde žádný celkový úbytek neuronů v mozkové kůře či CI nalezen nebyl, ačkoliv byly popsány morfologické a synaptické změny (Helfert a spol., 1999; Poe a spol., 2001; Merrill a spol., 2001). Při použití imunoreakce na kalbindin a kalretinin jsme žádné srovnatelné výpadky imunoreaktivity v mozkové kůře neobjevili (nepublikovaná data), což podporuje názor, že jde přednostně o selektivní ztrátu PV-ir neuronů anebo o ztrátu produkce parvalbuminu v původně parvalbumin exprimujících neuronech.

Pozorovaný pokles počtu PV-ir buněk ve zrakové kůře podobný změnám ve sluchové kůře, včetně místních plošných výpadků, by mohl být také dán do souvislosti se ztrátou aferentní stimulace. Sensorický deficit u kmene Fischer 344 ve stáří totiž zahrnuje také deficit zraku, který je poškozen především díky degeneraci sítnice a rohovky (Di Loreto a spol., 1994). Také v našem pokuse jevila většina starých potkanů známky zakalené rohovky. Na druhé straně však obdobné nálezy snížení exprese parvalbuminu v nesenzorických částech mozku starých potkanů Fischer 344 (jako např. v retrosplenální kůře a v hipokampu) svědčí i pro možnou souvislost s celkovým průběhem stárnutí u tohoto kmene.

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

Naše výsledky prokazují výrazné změny GAD65 a GAD67 imunoreaktivity ve stáří v *colliculus inferior* a ve sluchové kůře potkana, které zahrnují: úbytek GAD65 a 67-ir neuronů, pokles optické denzity zbývajících GAD65 a 67-ir neuronů a celkový pokles hladin GAD65 a GAD67 proteinů. Získaná data ukazují na poměrně uniformní charakter změn. Za prvé, u obou GAD izoforem byly prokázány obdobné změny, za druhé v obou strukturách sluchové dráhy, CI a sluchové kůře, měly změny velmi podobný charakter, a konečně, nálezy byly velmi obdobné u obou testovaných kmenů (Long Evans a Fischer 344). Souhrnně lze tedy říct, že ve stáří exprese a zastoupení GAD u potkana klesá podobně na podkorové i korové úrovni a tyto změny srovnatelně zasahují GAD65 i GAD67.

Nález celkového poklesu hladin GAD65 a GAD67 proteinů ve stáří dobře souhlasí s dříve publikovanými výsledky, které se týkají poklesu hladin GABA a GAD ve vyšších etážích sluchového systému. Předchozí autoři popsali snížení počtu GABA-ir neuronů v CCI starých potkanů, navíc doprovázeného poklesem v enzymatické aktivitě GAD a v intenzitě uvolňování GABA ze synaptických zakončení (Casparly a spol., 1990; Raza a spol., 1994, Gutierrez a spol., 1994; Casparly a spol., 1995). V CI změny v optické denzitě GABA nebo GAD-ir neuronů doposud popsány nebyly, ale snížení optické denzity porovnatelné s našimi nálezy je známo ze sluchové kůry starých Fischer 344/Brown Norway F1 hybridů v případě GAD67 (Ling a spol., 2005). Jak bylo analogicky diskutováno u změn v denzitě parvalbuminu, pokles optické denzity může odrážet jednak sníženou produkci sledovaného produktu anebo sníženou hustotu produktu v buňce v důsledku zvětšení buněčného těla (Krzywkowski a spol., 1995). Protože žádné významné změny objemu těl neuronů jsme v tomto experimentu nenalezli (stejně jako je nezmiňuje ani Ling a spol., 1995), nálezy spíše naznačují sníženou expresi GAD proteinů v buňkách. Což je v dobrém souladu s naším průkazem celkově snížených hladin GAD proteinů pomocí western blotu.

Snížení počtu GAD-ir neuronů (GAD 65 i 67), které jsme pozorovali v colliculus inferior i sluchové kůře, nelze ani zde přisoudit nescifickému zániku, vzhledem k tomu, že v řezech barvených podle Nissla jsme nenalezli u mladých a starých zvířat žádný významný rozdíl v celkovém počtu neuronů (Helfert a spol., 1999; Poe a spol., 2001; Merrill a spol., 2001; Stanley a Shetty, 2004). Vezmeme-li v úvahu sníženou optickou denzitu GAD-ir neuronů ve stáří, pak se zdá, že hlavní příčinou námi pozorovaného úbytku imunoreaktivních buněk je pokles exprese obou sledovaných GAD izoforem v některých buňkách pod práh detekovatelný použitou imunohistochemickou metodou. Charakter popisovaných změn v imunoreaktivitě GAD65 a 67 v mozkové kůře byl rovnoměrný ve všech korových vrstvách, žádné specifické změny pro některou korovou vrstvu jsme nenalezli, což je též v souladu s výsledky předchozích autorů (Ling a spol., 2005).

Zajímavým nálezem z našeho experimentu je zarážející rozdíl v celkovém množství GAD mezi colliculus inferior a sluchovou kůrou, který jsme detekovali pomocí metody western blot. Téměř trojnásobná hladina GAD65 a GAD67 v CI ve srovnání se zrakovou a sluchovou kůrou je ale v souladu s předchozími nálezy, které dokládají podobný poměr ve western blotem zjištěných hladinách GAD mezi středním mozkem a thalamem na jedné straně a neokortexem na straně druhé (Sheikh a spol., 1999). Z imunohistochemické analýzy žádné významné rozdíly mezi CI a kůrou nevyplývaly. Použitá imunohistochemická analýza však není dostatečně citlivá, aby mohla dobře posuzovat imunoreaktivitu dendritického

větvení a hodnotit GAD-ir punkta, která obsahují významný podíl celkového množství GAD. Funkční význam vyššího množství GAD v CI není jasný. Z elektrofyziologických studií nicméně vyplývá velmi významná role inhibice v colliculus inferior a v CI je popsáno také velké zastoupení GABA-ir zakončení (Gerken, 1996; Pollak a spol., 2002; Frisina 2001; Merchan a spol., 2005).

Úbytek GAD imunoreaktivity a hladin proteinů jsme zjistili také ve zrakové kůře, která sloužila v této práci jako kontrolní sensorická korová oblast. I tyto naše nálezy jsou v souladu s pracemi jiných autorů, např. s Hua a spol. (2008), kteří našli snížený počet GABA-ir buněk ve zrakové kůře starých koček (a celkový počet neuronů barvených podle Nissla byl přitom nezměněn). Podobně byla potvrzena snížená funkce GABAergního systému ve zrakové kůře u starých opic (Schmolesky a spol., 2000; Leventhal a spol., 2003). V naší práci jsme pomocí metody western blot zároveň zjistili, že pokles GAD ve zrakové kůře je ve srovnání s kůrou sluchovou a CI relativně menší, což může signalizovat odlišný průběh stárnutí GABAergního systému v různých částech mozku, a to konkrétně i v jednotlivých sensorických korových oblastech. Pokles hladin GAD v souvislosti se stárnutím byl prokázán také v hipokampu (Stanley a Shetty, 2004; Shi a spol., 2004; Ling a spol., 2005), naproti tomu nebyl nalezen v septu, v sensorimotorické a parietální kůře (Krzywkowski a spol., 1995; Poe a spol., 2001; Ling a spol., 2005; Shi a spol., 2006). Stárnutí centrálního nervového systému patrně nevede k homogennímu poklesu hladin a funkce GABA (GAD) ve všech regionech mozku. Nicméně hypotéza, že heterogenní snížení hladin GABA je průvodním rysem stárnutí centrálního nervového systému, je v poslední době podpořena např. i nálezy pomocí magnetické rezonanční spektroskopie u člověka (Grachev a spol., 2001).

Snížení inhibice zprostředkované GABA v centrální sluchové dráze má pravděpodobně funkční následky. Pokles inhibice vede k rozšíření excitačních oblastí, úbytku úzce laděných receptivních polí, čili neuronů s úzkými prahovými křivkami, a nárůstu počtu komplexních receptivních polí, jak bylo popsáno v elektrofyziologických pracích z CI a sluchové kůry (Palombi a Caspari 1996a,b,c; Walton a spol., 2002; Turner a spol., 2005a,b). Autoři zmiňují, že tyto změny by mohly vést k propouštění většího množství šumu do celého centrálního sluchového systému, což by mohlo mít za následek mimo jiné zhoršené rozlišení časových parametrů komplexních zvuků včetně lidské řeči (Fitzgibbons a Gordon-Salant, 1994; Grose a spol., 2006; Gordon-Salant a spol., 2007). Leventhal a spol. (2003) v primární zrakové kůře starých opic prokázali, že aplikace GABA či jejího agonisty muscimolu může lokálně příznivě ovlivnit funkci inhibice a zlepšit orientační a směrovou citlivost receptivních polí neuronů, která se dočasně přiblížila hodnotám typickým pro mladé jedince. Mimo výše

uvedené dochází ve stáří ve sluchovém systému i ke zhoršování dalších měřitelných parametrů, které mohou s funkcí inhibičního systému souviset; stoupá např. práh pro detekce mezery v šumu (tj. mezera musí být delší, aby byla rozpoznána) a zhoršuje se rozlišování změn délky trvání těchto mezer v šumu (Snell, 1997; Rybalko a spol., 2008).

### **5.5. Vliv atorvastatinu na narůstající poškození sluchu s věkem u kmenů myši C57BL/6J a apoE-/-**

Senzorineurální presbyakuzi představuje zhoršení funkce sluchu v souvislosti se stárnutím, které je spojeno především se ztrátou vnějších a vnitřních vláskových buněk, a projevuje se ztrátou sluchu především ve vysokých frekvencích. Myši kmene C57BL/6J zde slouží jako standardní zvířecí model, u kterého dochází k významné ztrátě vnějších vláskových buněk již od 3 měsíců věku (Henry, 1984; Parham, 1997; Spongr a spol., 1997; viz též kapitola 1.3.1.). Vzhledem k tomu, že snížené krevní zásobení kochley v důsledku poškození mikrocirkulace ve vyšším věku detailně popsán např. u pískomilů (Gratton a Schulte, 1995, Seidman a spol., 1999) bylo prokázáno právě i u myši kmene C57 (Brown a spol., 1995), bylo možné předpokládat, že podávání účinných látek, které by dokázaly poškození cévní mikrocirkulace omezit, může způsobit zlepšené prokrvení vnitřního ucha a tím i ovlivnit funkci sluchu u tohoto kmene.

Výsledky našeho experimentu zřetelně ukazují, že atorvastatin je schopen pozitivně ovlivnit zhoršování sluchu C57BL/6J myši, což bylo prokázáno především na základě měření amplitud DPOAE. Na druhé straně jsme ukázali, že podávání atorvastatinu nijak neovlivnilo amplitudy DPOAE u apoE-/- myši. Fakt, že kladný účinek atorvastatinu na vnitřní ucho C57BL/6J myši je možné dát do souvislosti s vlivem atorvastatinu na průchodnost cév, byl podpořen nálezy snížené exprese ICAM-1 a VCAM-1 ve stěně aorty u těchto zvířat. Doposud žádné srovnatelné spojení mezi funkcí sluchu a působením statinů na endotheliální zánět přitom publikováno nebylo. Ve zrakovém systému byl ale kladný účinek statinů (post-ischémické reperfuční změny) již pozorován (Honjo a spol. 2002). Dávkování statinů zeslabilo v sítnici akumulaci leukocytů, snížilo expresi P-selektinu a ICAM-1 a sníželo počet apoptotických buněk. V jiné studii byla u pacientů se stařeckou makulární degenerací zjištěna po léčbě statiny redukováná neovaskularizace v cévnatce (Wilson a spol., 2004). Udržení dostatečného krevního zásobení by mohlo mít přímý vliv na přežití vláskových buněk nebo působit na jejich funkci nepřímo přes udržení funkce stria vascularis (Melichar a Syka, 1987).



Naše práce se soustředila na rané změny sluchové funkce předcházející detekovatelné posuny sluchových prahů, které byly u kmene myši C57BL/6J zaznamenány u zvířat starších než 3 měsíce (Spongr a spol., 1997), tedy na farmakologické preventivní působení, předcházející vlastní degradaci sluchové funkce. Naše pozorování, že se sluchové prahy mezi zvířaty, kterým atorvastatin podáván byl, a mezi kontrolními zvířaty nijak nelišily, není proto překvapující, neboť posun sluchového prahu je u tohoto kmene ve věku 2-4 měsíce velmi malý a nachází se v rámci variability měření pomocí ABR. Měření DPOAE je v tomto ohledu mnohem citlivější indikátor počátku patologických změn kochley. Je známo, že DPOAE mohou odhalit skrytou kochleární patologii (především poškození či ztrátu vnějších vláskových buněk) již v době, kdy jsou sluchové prahy stále ještě v normě (Lichtenhan a spol., 2005; Davis a spol., 2005). U lidí i zvířat byl navíc popsán převažující obecný pokles DPOAE s věkem (Parham, 1997; Kon a spol., 2000; Guimaraes a spol., 2004), u myši je charakteristický právě pro kmeny s progredující ztrátou sluchu (Jimenez a spol., 1999).

Ve srovnání s kontrolními C57BL/6J zvířaty byly větší amplitudy DPOAE u myši krmených peletami s atorvastatinem zjištěny v celém frekvenčním pásmu. V rozsahu frekvencí  $f_2$  mezi 19 – 27 kHz byl však tento rozdíl signifikantní i pro jednotlivé frekvence, a to i s použitím přísnějších statistických kritérií (Bonfferoniho korelační test), která brala v potaz vzájemnou velikost amplitud na sousedních frekvencích, aby byl zcela eliminován efekt případného arteficiálního naměření velké amplitudy na jedné či dvou měřených frekvencích. Pravděpodobnost nalezení jednoznačné signifikance na určité frekvenci byla tak sice snížena, přesto byla pro frekvenci 23 kHz významnost rozdílu na hladině  $P < 0,01$ . Nález signifikantních změn právě v oblasti vyšších frekvencí je navíc v dobrém souladu s faktem, že zánik vnějších vláskových buněk začíná u myši C57 v oblasti kochleární baze a ztráta sluchu se projevuje nejvíce v oblasti vysokých frekvencí (Parham, 1997; Spongr a spol., 1997).

Hodnocení hladin ICAM-1 a VCAM-1 v cévním endothelu patří mezi prognostické faktory určování rizik ischemických příhod u cévních zánětlivých procesů a zároveň jde i o indikátory hodnocení efektu léčby (Sukhova a spol., 2002; Silvestro a spol., 2005). Nálezy statisticky významně nižších hladin ICAM-1 a VCAM-1 v kořeni a oblouku aorty u atorvastatinem krmených myši proto dokazují pozitivní efekt atorvastatinu na rozvoj zánětlivého procesu v cévách těchto zvířat. Zároveň podávání atorvastatinu u těchto myši nijak neovlivnilo celkové hladiny cholesterolu v krvi, což je ale v souladu s předchozími nálezy, že statiny nemají žádný účinek na hladiny cholesterolu u normolipidemických divokých typů myši (Choudhury a spol. 2004). Podobně tomu bylo i u dalších

experimentálních zvířat s normolipidemií, např. opic (Sukhova a spol. 2002). Z toho lze vyvodit, že k účinkům atorvastatinu na expresi VCAM-1 a ICAM-1 nedochází prostřednictvím snížení hladiny lipidů v krvi a stejný závěr pak platí i pro zpomalené poškození vnějších vláskových buněk. Tento závěr je v souladu s poznatkem, že inhibice syntézy HMG-CoA nepůsobí jen nižší syntézu cholesterolu, ale např. též isoprenoidů, látek podílejících se na aktivaci monocytů, sekreci zánětlivých cytokinů a proliferaci hladkého svalstva v zánětlivém cévním endotheliu (Choudhury a spol., 2004; Liao, 2005). Co se týče sluchu, alternativně by mohl ale být zvážen i přímý efekt atorvastatinu na metabolismus cholesterolu v laterální stěně vnějších vláskových buněk (Forge, 1991; Nguyen a Brownell, 1998; Rajagopalan a spol., 2007). Pak by nebyl efekt atorvastatinu na sluch zapříčiněn ani změnou hladiny cholesterolu v krvi a dokonce ani prostřednictvím účinku na cévní výstelku. Taková hypotéza by ale musela být v budoucnu experimentálně ověřena.

Naproti tomu u kmene myši apoE<sup>-/-</sup>, který představuje zvířecí model aterogenní hypercholesterolemie podobný lidské hyperlipoproteinemii typu III (Reddick a spol., 1994), nemělo podávání atorvastatinu na velikost amplitud DPOAE ani na expresi ICAM-1 a VCAM-1 v aortě žádný vliv. U apoE<sup>-/-</sup> myši byl přitom také zaznamenán vzájemný vztah mezi hypercholesterolemií a ztrátou sluchu (Guo a spol., 2005). Nicméně již z prací předchozích autorů je známo, že podávání statinů u tohoto kmene nemá vliv na zánětlivou aktivitu cévního endothelia (Bea a spol., 2002). Navíc u apoE-deficientních myši v našem experimentu hladiny cholesterolu v krvi po podávání atorvastatinu dokonce ještě vzrostly, tento paradoxní jev je ale pro hypercholesterolemické myši také již znám (Wang a spol., 2002; Choudhury a spol. 2004). Autoři argumentují tím, že působení statinů u apoE<sup>-/-</sup> kmene blokuje alternativní cesty clearance cholesterolu, které jsou v nepřítomnosti apoE proteinu činné. Statiny patrně tímto způsobem ještě dále zvyšují vysokou hladinu cholesterolu u tohoto kmene. V důsledku toho pak zesílená hypercholesterolemie pravděpodobně maskuje možný pozitivní efekt statinů na cévní endothel. V kontextu těchto nálezů není nulový efekt atorvastatinu na sluchovou funkci u apoE<sup>-/-</sup> myši nijak překvapující.

Závěrem lze říci, že výsledky našich experimentů ukazují, že atorvastatin zpomaluje zhoršování sluchu u C57BL/6J myši, které je doprovázeno postupným zmenšováním amplitud DPOAE v důsledku zhoršování funkce vnějších vláskových buněk. Zároveň můžeme uvést, že pozitivní účinek atorvastatinu na cévní stěnu byl pravděpodobně nezávislý na jeho schopnosti snižovat hladinu cholesterolu v krvi.

## 6. SOUHRN PRÁCE

V naší práci jsme objasnili některé změny v histochemických markerech systému inhibičních GABAergních neuronů ve vyšších etážích sluchové dráhy, které by mohly mít spojitost s centrální komponentou presbyakuze, především se zhoršeným zpracováním komplexních zvuků ve stáří. Uvedené nálezy přinášejí nové doklady pro představu, že funkce inhibičního systému s narůstajícím věkem klesá, a že změny, které s tímto poklesem souvisejí, jsou částečně následkem snížené aferentní stimulace z patologicky narušené periferie (kochley), ale z části mají zřejmě svůj primárně centrální původ. Posoudit tuto otázku v naší práci nám umožnilo zařazení zástupců dvou kmenů potkana s velmi rozdílným průběhem zachovalosti sluchové funkce s věkem, tj. kmenů Long Evans a Fischer 344 (Popelář a spol., 2003, 2006). Součástí našeho přístupu k problematice presbyakuze byla také práce, v níž jsme se pokusili pozitivně ovlivnit zhoršování sluchové funkce pokusných zvířat perorální aplikací léku, který by mohl zlepšit cévní zásobení kochley – atorvastatinu.

### **Změny v pozitivitě NADPH-diaforázy**

Neurony exprimující NOS/NADPH-diaforázu patří v mozkové kůře hlodavců převážně mezi GABAergní inhibiční neurony. U velmi starých potkanů Long Evans jsme zjistili pokles jejich počtu ve sluchové kůře o 15% ( $P < 0,05$ ), zároveň jsme ovšem našli výraznou redukci tloušťky sluchové kůry o cca 45% ( $P < 0,001$ ), takže NADPH-d pozitivní neurony se nacházely podstatně blíže u sebe, než tomu bylo u mladých zvířat. K podobným změnám došlo i ve zrakové kůře. Nález tak výrazného ztenčení mozkové kůry se podobal např. důsledkům kombinovaného vlivu ischemie a diabetu (Kondo a spol., 2001), je ale třeba vzít v úvahu i mimořádné stáří zvířat v tomto pokuse (více než 36 měsíců). V pokusech s PV a GAD jsme u málo mladších zvířat (27-35 měsíců) již významné ztenčení mozkové kůry nenalezli. U starých potkanů se také zvýšil počet dendritických segmentů i bifurkací připadajících průměrně na jeden pozitivní neuron, zatímco průměrná délka jednoho dendritického segmentu se naopak zkrátila. Celková délka viditelných dendritů jednoho neuronu zůstala přibližně stejná jako u mladých zvířat. Tento nález naznačuje přestavbu neuronálního stromu ve stáří popsanou i jinými autory (Cha a spol., 1998; Lolova a spol., 2000), která by mohla souviset se změnami mezibuněčného prostoru a parametrů přenosu látek ve stárnoucím mozku. Poklesy počtu a přestavba NADPH-d pozitivních neuronů by mohly být příspěvkem či průvodním jevem změny funkce sluchovém systému ve stáří.

### **Změny v imunoreaktivitě parvalbuminu (PV)**

GABAergní populace parvalbumin exprimujících inhibičních neuronů hraje, zvláště v neokortexu a hipokampu, klíčovou úlohu při tvorbě tzv. gamma oscilací (Bartos a spol.,

2007) a pokles počtu či funkce těchto interneuronů byl popsán u např. schizofrenie a epilepsie (Woo a Lu, 2006).

V CCI u kmene Long Evans jsme našli zvýšení počtu a optické denzity parvalbuminových neuronů (u obojího nárůst o cca 20%). Ve sluchové kůře byly změny celkově nepříliš výrazné. U kmene Fischer 344 byla v centrálním jádře CI přítomna spíše tendence ke snížení počtu parvalbumin exprimujících buněk a signifikantně se zmenšil objem jejich somat (o cca 20%,  $P < 0,05$ ). Ve sluchové kůře starých potkanů kmene Fischer ale byly evidentní výrazné ohniskové úbytky parvalbumin-pozitivních buněk (celkově o 30%,  $P < 0,05$ ; objem a optická denzita zbylých PV-ir neuronů se významně neměnily). Tyto místní úbytky imunoreaktivity parvalbuminu se vyskytovaly obvykle ve všech korových vrstvách současně a někdy zahrnovaly i rozsáhlé části sluchové kůry v dané hemisféře. Ve zbylých částech sluchové kůry se počet pozitivních buněk příliš neměnil. V řezech barvených podle Nissla přitom žádné nespecifické úbytky celkového počtu neuronů nebyly patrné. Pokles exprese parvalbuminu je možné u tohoto kmene dát do souvislosti se ztrátou sluchu ve stáří (Popelář, 2006), ale vzhledem k tomu, že podobné úbytky v imunoreaktivitě parvalbuminu jsme pozorovali i ve zrakové kůře a pokles počtu PV-ir neuronů byl u starých potkanů kmene Fischer 344 popsán např. i v hipokampu (Shetty and Turner, 1998), je třeba zvážit též souvislost s celkově patologickým průběhem stárnutí kmene Fischer 344 spojeným s úpadkem senzorických i kognitivních funkcí. Naopak u starých potkanů Long Evans by relativně zachovalá funkce sluchu mohla mít vliv i na zachování funkční sítě parvalbuminových interneuronů ve sluchové dráze.

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

Protože centrální komponenta presbyakuze je dávana do souvislosti s celkovým úbytkem funkce inhibičního systému (Walton a spol., 2002; Turner, 2005a,b), sledovali jsme pomocí GAD, klíčového enzymu pro syntézu GABA, změny GABAergního systému v colliculus inferior a sluchové kůře. Dosud publikované práce na toto téma vesměs testovaly kmeny, které se ve stáří vyznačují velkou ztrátou sluchu periferního původu (Caspary a spol., 2008). Následkem čehož byla dosud preferována hypotéza, že útlum GABAergní inhibice ve sluchové dráze primárně souvisí se ztrátou aferentní stimulace. Proto jsme se rozhodli testovat tyto změny především u kmene Long Evans, který se vyznačuje jen mírnou ztrátou sluchu ve stáří, a ověřit mezikmenové rozdíly na menším vzorku potkanů Fischer 344.

Naše výsledky prokázaly v colliculus inferior a ve sluchové kůře starých potkanů výrazný a uniformní úbytek GAD65 a GAD67 zahrnující: snížení počtu GAD65 a GAD67 imunoreaktivních neuronů (o 5-15%), snížení intenzity jejich imunoreakce (o 15-25%,

$P < 0,05$ ), a pokles celkových hladin obou proteinů (o 40-50%,  $P < 0,01$ ) prokázaný pomocí western blotu. 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. Skutečnost, že změny v imunoreaktivitě parvalbuminu se u testovaných kmenů odlišovaly, dále ukazuje, že i když parvalbumin exprimující neurony tvoří významnou subpopulaci GABAergních neuronů, mohou být změny obou markerů ve stáří různé (Krzywkowski a spol., 1995; Shi a spol., 2006).

#### **Vliv atorvastatinu na progresi poškození sluchu u myší C57BL/6J a apoE<sup>-/-</sup>**

Možnost farmakologického ovlivnění rozvíjející se ztráty sluchu v průběhu stárnutí byla úspěšně testována na kmenech myší C57BL/6J, standardním modelem rychle progredující senzineurální presbyakuze (Parham, 1997), který se vyznačuje významnou ztrátou vnějších vláskových buněk již od 3 měsíců věku, především v oblasti vysokých frekvencí (Spongr, 1997). Vzhledem k tomu, že je třeba vzít do úvahy vliv zhoršujícího se cévního průtoku kochleou (Gratton a Schulte, 1995; Seidman a spol. 1999), testovali jsme působení statinů, léků standardně užívaných v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Citlivým a časným indikátorem zhoršení funkce a poškození vnějších vláskových buněk jsou změny v DPOAE (Davis a spol., 2005), které jsme použili pro vyhodnocení léčebného efektu. U skupiny myší na atorvastatinové dietě jsme našli větší amplitudy DPOAE než u kontrolních zvířat, v pásmu vysokých frekvencí byl pak tento rozdíl statisticky významný (pro 23 kHz,  $P < 0,01$ ; pro 19 a 27 kHz,  $P < 0,05$ ). Snížená exprese markerů zánětlivého endothelu v aortě, vyšetřená imunohistochemicky, potvrdila u těchto zvířat pozitivní vliv atorvastatinu na cévní výstelku. Současné zjištění nezměněných hladin cholesterolu v krvi ukázalo, že pozitivní efekt atorvastatinu není primárně zprostředkovaný snížením hladin lipidů v krvi (Gonyeau, 2005). Naopak u kmene apoE<sup>-/-</sup> myší nemělo podávání atorvastatinu žádný pozitivní účinek ani na funkci sluchu ani na cévní stěnu, což je v souladu s předpoklady, že u apoE deficientního kmene zvířat podávání statinů především dále zvyšuje již přítomnou hypercholesterolemii, která pak jiné pozitivní působení statinů maskuje (Choudhury a spol. 2004).

Výsledky našeho experimentu celkově ukazují, že atorvastatin může zpomalovat poškození funkce vnějších vláskových buněk u myší C57BL/6J, a tedy, že statiny mohou mít pozitivní účinek na uchování funkce sluchu, přinejmenším v případě senzineurální formy presbyakuze.

## 7. ZÁVĚRY

### I. NADPH – diaforáza

- Ve stáří se absolutní počet NADPH-diaforáza pozitivních neuronů ve sluchové kůře snížil (15%), jejich distribuce se nijak nezměnila.
- Došlo k přestavbě dendritického větvení - zkrácení jednotlivých dendritických segmentů, naopak počet segmentů a počet bifurkací připadajících na jeden neuron se zvýšil.
- Nalezli jsme výrazné ztenčení sluchové kůry u starých zvířat; v jeho důsledku se počet NADPH-d pozitivních neuronů na mm<sup>2</sup> ve sluchové kůře významně zvýšil.

### II. PARVALBUMIN

- U kmene Long Evans počet parvalbuminových neuronů narostl v CI, ve sluchové kůře se neměnil. U kmene Fischer 344 se počet pozitivních buněk ve sluchové kůře výrazně snížil, tento úbytek měl navíc ohniskový charakter.
- Optická denzita parvalbuminu v somatech neuronů vzrostla pouze u kmene Long Evans v CI, objem somat se naopak měnil jen v CI u kmene Fischer 344 (zmenšení o 20%).
- V CGM bylo množství parvalbuminových buněk minimální a beze změn u starých zvířat.
- Námi prokázané změny ve stáří byly specifické v závislosti na použitém kmeni potkana.

### III. GLUTAMÁTDEKARBOXYLÁZA

- Počet GAD65 i GAD67 pozitivních neuronů poklesl ve stáří u obou kmenů v CI, SK a méně výrazně i v ZK.
- Optická denzita GAD 65 a 67 imunoreaktivních somat ve stáří klesla v CI, SK i méně významně v ZK, objem somat a morfologie neuronů se neměnily.
- Hladiny GAD65 a 67 detekované pomocí western blotu významně poklesly ve všech sledovaných strukturách, přičemž v CI a SK byl pokles výraznější (50%) než v ZK (20%).
- Změny nebyly kmenově specifické, naopak měly velmi podobný charakter u obou kmenů.

### IV. ATORVASTATIN – farmakologické ovlivnění

- 8-týdenní podávání atorvastatinu zpomalilo zhoršování funkce sluchu u kmene myši C57/BL/6J, což bylo prokázáno nálezem větších hodnot amplitud DPOAE než u kontrol.
- Tyto nálezy korelovaly s nálezem snížené exprese zánětlivých endotheliálních markerů v aortě, hladina cholesterolu v krvi ale nebyla podáváním atorvastatinu ovlivněna.
- U kmene apoE<sup>-/-</sup> naopak podávání atorvastatinu k žádným pozitivním efektům nevedlo.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Adams JC (1979). Ascending projections to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 183:519-538.
- Adams JC, Schulte BA (1997). Histopathologic observations of the aging gerbil cochlea. *Hear Res* 104:101-111.
- Aitkin LM, Dunlop CW (1969). Inhibition in the medial geniculate body of the cat. *Exp Brain Res* 7:68-83.
- Akyol O, Zoroglu SS, Armutcu F, Sahin S, Gurel A (2004). Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. *In Vivo* 18:377-90.
- Andersen RA, Roth GL, Aitkin LM, Merzenich MM (1980). The topographic organization of corticocollicular projections from physiologically identified loci in the AI, AII, and anterior auditory cortical fields of the cat. *J Comp Neurol* 191:479-494.
- Andersen BB, Gundersen HJG (1999). Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections. *J Microsc* 196:69-73.
- Arnaud C, Braunersreuther VF, Mach F (2005). Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc Med* 15:202-6.
- Ashmore J (2008). Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88:173-210.
- Aschoff A, Ostwald J (1987). Different origins of cochlear efferents in some bat species, rats and guinea pigs. *J Comp Neurol* 264:56-72.
- Au WWL (1993). *The sonar of dolphins*. Springer Verlag, New York.
- Baimbridge, KG, Celio, MR, Rogers, JH (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 15:303-8.
- Bajo VM, Merchan MA, Lopez 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.
- Barone P, Kennedy H (2000). Non-uniformity of neocortex: areal heterogeneity of NADPH-diaphorase reactive neurons in adult macaque monkeys. *Cereb Cortex* 10:160-74.
- Bartos M, Vida I, Jonas P (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci* 8:45-56.
- Bea E, Blessing F, Bennett B, Levitz M, Wallace EP, Rosenfeld ME (2002). Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 22:1832-1837.
- Beaulieu C (1993). Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res* 609:284-92.
- Beitel RE, Kaas JH (1993). Effects of bilateral and unilateral ablation of auditory cortex in cats on the unconditioned head orienting response to acoustic stimuli. *J Neurophysiol* 70:351-69.
- Bennett CL, Davis RT, Miller JM (1983). Demonstration of presbycusis across repeated measures in a nonhuman primate species. *Behav Neurosci* 97:602-7.
- Berlin CI, Hood LJ, Wen H, Szabo P, Cecola RP, Rigby P, Jackson DF (1993). Contralateral suppression of non-linear click-evoked otoacoustic emissions. *Hear Res* 71:1-11.
- Berlin CI (1998). *Otoacoustic Emissions: Basic Science and Clinical Application*. Singular Publishing Group, San Diego - London.
- Bidmon HJ, Wu J, Godecke A, Schleicher A, Mayer B, Zilles K (1997). Nitric oxide synthase-expressing neurons are area-specifically distributed within the cerebral cortex of the rat. *Neuroscience* 81:321-30.
- Blum-Degen D, Heinemann T, Lan J, Pedersen V, Leblhuber F, Paulus W, Rieder P, Gerlach M (1999). Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during ageing. *Brain Res* 834:128-35.

- Boettcher FA, Mills JH, Norton LB (1993). Age-related changes in auditory evoked potentials of gerbils. I. Response amplitudes. *Hear Res* 71:137-145.
- Boettcher FA, Mills JH, Dubno JR, Schmidt RA (1995). Masking of auditory brainstem response in young and aged Mongolian gerbils. *Hear Res* 89:1-13.
- Bohne BA, Gruner MM, Harding GW (1990). Morphological correlates of aging in the chinchilla cochlea. *Hear Res* 48:79-92.
- Bragin A, Jando G, Nadasdy Z, Hetke J, Wise K, Buzsáki G (1995). Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15:47-60.
- Braun M (1994). Tuned hair cells for hearing, but tuned basilar membrane for overload protection: evidence from dolphins, bats, and desert rodents. *Hear Res* 78:98-114.
- Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7:615-24.
- Bredt DS (2003). Nitric oxide signalling specificity – the heart of the problem. *J Cell Sci* 116:9-15.
- Brown JN, Miller JM, Nuttall AL (1995). Age-related changes in cochlear vascular conductance in mice. *Hear Res* 86:189-94.
- 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* 182:220-31.
- Buckiová D, Popelar J, Syka J (2006). Collagen changes in the cochlea of aged Fischer 344 rats. *Exp Gerontol* 41:296-302.
- Buckiová D, Popelar J, Syka J (2007). Aging cochleas in the F344 rat: morphological and functional changes. *Exp Gerontol* 42:629-38.
- Buzsáki G, Draguhn A (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926-1929.
- Buzsáki G, Kaila K, Raichle M (2007). Inhibition and brain work. *Neuron* 56:771-83.
- Calford MB, Aitkin LM (1983). Ascending projections to the medial geniculate body of the cat evidence for multiple parallel auditory pathways through thalamus. *J Neurosci* 3:2365-2380.
- Caspary DM, Raza A, Lawhorn Armour, BA, Pippin J, Arneric 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.
- Caspary, DM, Milbrandt, JC, Helfert, RH (1995). Central auditory aging: GABA changes in the inferior colliculus. *Exp Gerontol* 30: 349-60.
- Caspary DM., Holder TM, Hughes LF, Milbrandt JC, McKernan RM, Naritoku DK (1999). Age-related changes in GABAA receptor subunit composition and function in rat auditory system. *Neuroscience* 93: 307-312.
- Caspary DM, Ling LL, Hughes LF (2002a). Age-related changes in the subunit makeup of the GABAA receptor in rat primary auditory corte: GABAA receptors in cellular and network excitability: Orlando, FL. Poster B12.
- Caspary DM, Palombi PS, Hughes LF (2002b). GABAergic inputs shape responses to amplitude modulated stimuli in the inferior colliculus. *Hear Res* 168:163-173.
- Caspary, DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF (2008). Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol* 211:1781-91.
- Celio MR (1986). Parvalbumin in most gamma-aminobutyric acid containing neurons of the rat cerebral cortex. *Science* 231:995-7.
- Celio MR (1990). Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475.



- Coleman GL, Barthold SW, Osbaldistan GW, Foster SJ, Jonas AM (1977). Pathological changes during aging in barrier-reared Fischer 344 male rats. *J Gerontol* 32:258-278.
- Condé F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA (1994). Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J Comp Neurol* 341:95-116.
- Covenas R, De Leon M, Alonso JR, Arevalo R, Lara J, Aijon J (1991). Distribution of parvalbumin-immunoreactivity in the rat thalamus using a monoclonal antibody. *Arch. Ital Biol* 129:199-210.
- Cruikshank SJ, Killackey HP, Metherate R (2001). Parvalbumin and calbindin are differentially distributed within primary and secondary subregions of the mouse auditory forebrain. *Neuroscience* 105:553-69.
- Cunningham MO, Hunt J, Middleton S, LeBeau FE, Gillies MJ, Davies CH, Maycox PR, Whittington MA, Racca C (2006). Region-specific reduction in entorhinal gamma oscillations and parvalbumin-immunoreactive neurons in animal models of psychiatric illness. *J. Neurosci* 26:2767-76.
- Dannhof BJ, Bruns V (1993). The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear Res* 66:8-22.
- Dallos P, Zheng J, Cheatham MA (2006). Prestin and the cochlear amplifier. *J Physiol* 576:37-42.
- Dallos P, Wu X, Cheatham MA, Gao J, Zheng J, Anderson CT, Jia S, Wang X, Cheng WH, Sengupta S, He DZ, Zuo J (2008). Prestin-based outer hair cell motility is necessary for mammalian cochlear amplification. *Neuron* 58:333-9.
- Davignon J (2001). Advances in lipid-lowering therapy in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 498: 49-58.
- Davis B, Qiu W, Hamernik RP (2005). Sensitivity of distortion product otoacoustic emissions in noise-exposed chinchillas. *J Am Acad Audiol* 16:69-78.
- Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7797-801.
- Dawson VL, Dawson TM (1995). Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system. *Adv Pharmacol* 4:323-42.
- De Felipe J, Jones EG (1992). High-Resolution light and electron microscopic immunocytochemistry of colocalized GABA and calbindin D-28k in somata and double bouquet cell axons of monkey somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 4:46-60.
- De Felipe J, Fariñas I (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.
- De Felipe J (1993). Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3:273-289.
- 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: 459-65.
- De la Mothe LA, Blumell S, Kajikawa Y, Hackett TA (2006). Cortical connections of the auditory cortex in marmoset monkeys: core and medial belt regions. *J Comp Neurol* 496:27-71.
- 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.

- Derin A, Agirdir B, Derin N, Dinç O, Güney K, Ozcaglar H, Kiliñarslan S (2004). The effects of L-carnitine on presbycusis in the rat model. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 29:238-41.
- Di Loreto Jr, 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* 647:181-91.
- Diamond JT, Jones EG, Powel TPS (1969). The projection of the auditory cortex upon the diencephalon and brainstem of the cat. *Brain Res* 15:305-340.
- Doron NN, LeDoux JE, Semple MN (2002). Redefining the tonotopic core of rat auditory cortex: Physiological evidence for a posterior field. *J Comp Neurol* 453:345-360.
- Druga R, Syka J (1984). Projections from auditory structures to the superior colliculus in the rat. *Neurosci Lett* 45:247-252.
- Druga R, Syka J (1993). NADPH-diaphorase activity in the central auditory structures of the rat. *Neuroreport* 4:999-1002.
- Druga R, Syka J, Rajkowska G (1997). Projections of auditory cortex onto the inferior colliculus in the rat. *Physiol Res* 16:149-164.
- Druga R, Syka J (2001). Effect of auditory cortex lesions on NADPH-diaphorase staining in the inferior colliculus of rat. *Neuroreport* 12:1555-9.
- Dubno JR, Dirks DD, Morgan DE (1984). Effects of age and mild hearing loss on speech recognition in noise. *J Acoust Soc Am* 76:87-96.
- Dun NJ, Huang R, Dun SL, Förstermann U (1994). Infrequent co-localization of nitric oxide synthase and calcium binding proteins immunoreactivity in rat neocortical neurons. *Brain Res* 666:289-94.
- Egberongbe YI, Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Polak JM, Roberts GW (1994). The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* 59:561-78.
- Eggermont JJ (2001). Between sound and perception: reviewing the search for a neural code. *Hear Res* 157:1-42.
- Engineer CT, Perez CA, Chen YH, Carraway RS, Reed AC, Shetake JA, Jakkamsetti V, Chang KQ, Kilgard MP (2008). Cortical activity patterns predict speech discrimination ability. *Nature Neurosci* 11:603-608.
- Erlander MG, Tobin AJ (1991). The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochem Res* 16:215-26.
- Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR (1994). Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci* 14:1834-55.
- Esser KH, Eiermann A (1999). Tonotopic organization and parcellation of auditory cortex in the FM-bat *Carollia perspicillata*. *Eur J Neurosci* 11:3669-82.
- Estrada C, De Felipe J (1998). Nitric oxide-producing neurons in the neocortex: morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature. *Cereb Cortex* 8:193-203.
- Farmer JA (2000). Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep* 2:208-17.
- Faye-Lund H, Osen KK (1985). Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anat Embryol* 171:1-20.
- Feldman SC, Lacopino AM, Christakos S (1990). Vitamin D-dependent calcium binding protein (calbindin-D28k) in the central nervous system: Distribution and functional considerations, In: Smith VL, Dedman JR (Eds), *Stimulus Response Coupling: The Role of Intracellular Calcium Binding Proteins*. CRC Press, Boston, pp. 133-157.

- Feldblum S, Erlander MG, Tobin AJ (1993). Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles. *J. Neurosci Res* 34:689-706.
- Feldblum S, Dumoulin A, Anoaï M, Sandillon F, Privat A (1995). Comparative distribution of GAD65 and GAD67 mRNAs and proteins in the rat spinal cord supports a differential regulation of these two glutamate decarboxylases in vivo. *J Neurosci Res* 42:742-57.
- Feliciano M, Potasher SJ (1995). Evidence for a glutamatergic pathway from the guinea pig auditory cortex to the inferior colliculus. *J Neurochem* 65:1348-1357.
- Felix RA 2nd, Portfors CV (2007). Excitatory, inhibitory and facilitatory frequency response areas in the inferior colliculus of hearing impaired mice. *Hear Res* 228:212-29.
- Fettiplace R, Hackney CM (2006). The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nature Rev Neurosci* 7:19-29.
- Fitzgibbons PJ, Gordon-Salant S (1994). Age effects on measures of auditory duration discrimination. *J Speech Hear Res* 37:662-670.
- Forge A (1991). Structural features of the lateral walls in mammalian cochlear outer hair cells. *Cell Tissue Res* 265:473-83.
- Formisano E, Kim DS, Di Salle F, van de Moortele PF, Ugurbil K, Goebel R (2003). Mirror-Symmetric Tonotopic Maps in Human Primary Auditory Cortex. *Neuron* 40:859-869.
- Foster TC (2007). Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* 6:319-25.
- Franca JG, Volchan E (1995). NADPH diaphorase histochemistry as a marker for barrels in rat somatosensory cortex. *Braz J Med Biol Res* 28:787-90.
- Freret T, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Boulouard M (2006). Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behav Neurosci* 120:1285-98.
- Freund TF, Buzsáki G (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347-470.
- Frisina DR, Frisina RD (1997). Speech recognition in noise and presbycusis: relations to possible neural mechanisms. *Hear Res* 106:95-104.
- Frisina RD (2001). Subcortical neural coding mechanisms for auditory temporal processing. *Hear Res* 158:1-27.
- Frisina ST, Mapes F, Kim S, Frisina DR, Frisina RD (2006). Characterization of hearing loss in aged type II diabetics. *Hear Res* 211:103-13.
- Fukazawa T (1992). Evoked otoacoustic emissions in a nonlinear model of the cochlea. *Hear Res* 59:17-24.
- Fukuda T, Kosaka T, Singer W, Galuske RA (2006). Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network. *J Neurosci* 26:3434-43.
- Fullerton BC, Pandya DN (2007). Architectonic analysis of the auditory-related areas of the superior temporal region in human brain. *J Comp Neurol* 504:470-98.
- Gates GA, Cobb JL, D'Agostino RB, Wolf PA (1993). The relation of hearing in the elderly to the presence of cardiovascular disease and cardiovascular risk factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* Feb 119:156-61.
- Gates GA, Mills JH (2005). Presbycusis. *Lancet* 366:1111-20.
- Geissler DB, Ehret D (2004). Auditory perception vs. recognition: representation of complex communication sounds in the mouse auditory cortical fields. *Eur J Neurosci* 19:1027-1040.
- Gelfand SA (1997). *Essentials of Audiology*. Thieme, New York, pp. 362-363.
- Gerken GM (1996). Central tinnitus and lateral inhibition: an auditory brainstem model. *Hear Res* 97:75-83.

- Gibson E, Peterson C (1985). Calcium and the aging nervous system. *Neurobiol Aging* 8: 329-343.
- Giraud AL, Garnier S, Mecheyl C, Lina G, Chays A, Chery-Croze S (1997). Auditory efferents involved in speech-in-noise intelligibility. *Neuroreport* 8:1779-1783.
- Gonyeau, MJ (2005). Statins and osteoporosis: a clinical review. *Pharmacotherapy* 25:228-43.
- Goodman DC, Ward JM, Squire RA, Chu KC, Linhart MS (1979). Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 48:237-48.
- 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* 50:1181-93.
- 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
- Gratton MA, Schulte BA (1995). Alterations in microvasculature are associated with atrophy of the stria vascularis in quiet-aged gerbils. *Hear Res* 82:44-52.
- Grill JD, Riddle DR (2002). Age-related and laminar-specific dendritic changes in the medial frontal cortex of the rat. *Brain Res* 937:8-21.
- Grose JH, Hall JW 3rd, Buss E (2006). Temporal processing deficits in the pre-senescent auditory system. *J Acoust Soc Am* 119:2305-15.
- Grothe B, Sanes DH (1994). Synaptic inhibition influences the temporal coding properties of medial superior olivary neurons: An in vitro study. *J Neurosci* 14:1701-1709.
- Guillery RW (1995). Anatomical evidence concerning the role of the thalamus in corticocortical communication: a brief review. *J Anat* 187:583-592.
- Guimaraes P, Zhu X, Cannon T, Kim S, Frisina RD (2004). Sex differences in distortion product otoacoustic emissions as a function of age in CBA mice. *Hear Res* 192:83-9.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B (1988). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-81.
- Guo Y, Zhang C, Du X, Nair U, Yoo TJ (2005). Morphological and functional alterations of the cochlea in apolipoprotein E gene deficient mice. *Hear Res* 208:54-67.
- Gupta A, Wang Y, Markram H (2000). Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287:273-8.
- Gutierrez 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* 14:7469-77.
- Hackett TA, Stepniewska I, Kaas JH (1998a). Thalamocortical connections of the parabelt auditory cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 400:271-86.
- Hackett TA, Stepniewska I, Kaas JH (1998b). Subdivisions of auditory cortex and ipsilateral cortical connections of the parabelt auditory cortex in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 394:475-95.
- Hackett TA, Preuss TM, Kaas JH (2001). Architectonic identification of the core region in auditory cortex of macaques, chimpanzees, and humans. *J Comp Neurol* 441:197-222.
- Hackett TA, De La Mothe LA, Ulbert I, Karmos G, Smiley J, Schroeder CE (2007). Multisensory convergence in auditory cortex, II. Thalamocortical connections of the caudal superior temporal plane. *J Comp Neurol* 502:924-52.
- Harada N, Han DY, Komeda M, Yamashita T (1994). Glutamate-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation in isolated spiral ganglion cells of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol* 114:609-612.

- 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.
- Harris FP (1990). Distortion-product otoacoustic emissions in humans with high frequency sensorineural hearing loss. *J Speech Hear Res* 33:594-600.
- 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* 134:467-77.
- Harmon KM, Wellman CL (2003). Differential effects of cholinergic lesions on dendritic spines in frontal cortex of young adult and aging rats. *Brain Res* 992:60-8.
- Hashikawa T, Leggio MG, Hattori R, Yui Y (1994). Nitric oxide synthase immunoreactivity colocalized with NADPH-diaphorase histochemistry in monkey cerebral cortex. *Brain Res* 641:341-9.
- He J (1997). Modulatory effects of regional cortical activation on the onset responses of the cat medial geniculate neurons. *J Neurophysiol* 77:896-908.
- Hefti BJ, Smith PH (2000). Anatomy, physiology and synaptic responses of layer V cells in rat auditory cortex: characterization and study of inhibition through intracellular GABAA blockade. *J Neurophysiol* 83:2626-2638.
- 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.
- 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* 406:285-98.
- Hellstrom LI, Schmiedt RA (1990). Compound action potential input/output functions in young and quiet-aged gerbils. *Hear Res* 50:163-74.
- Hendrickson AE, Tillakaratne NJ, Mehra RD, Esclapez M, Erickson A, Vician L, Tobin AJ (1994). Differential localization of two glutamic acid decarboxylases (GAD65 and GAD67) in adult monkey visual cortex. *J Comp Neurol* 343:566-81.
- Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J (1987). Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J Neurosci* 7:1503-1519.
- Henry KR, Chole RA (1980). Genotypic differences in behavioral, physiological, and anatomical expressions of age-related hearing loss on the laboratory mouse. *Audiology* 19:369-383.
- Henry KR (1984). Cochlear microphonics and action potentials mature and decline at different rates in the normal and pathologic mouse cochlea. *Dev Psychobiol* 17:493-504.
- Herbert H, Aschoff A, Oswald J (1991). Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat. *J Comp Neurol* 304:103-22.
- Higo S, Udaka N, Tamamaki N. (2007). Long-range GABAergic projection neurons in the cat neocortex. *J Comp Neurol* 503:421-31.
- Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, Kiryu J, Honda Y, Yue BY, Sawamura T (2002). Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 120:1707-13.
- Hood LJ, Berlin CI, Hurley A, Cecola RP, Bell B (1996). Contralateral suppression of transient-evoked otoacoustic emissions in humans. Intensity effects. *Hear Res* 37:29-46.
- Hope BT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2811-4.
- Howard CV, Reed MG (1998). *Unbiased Stereology – Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Springer Verlag, New York.

- 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* 75:119-25.
- Huang CL, Larue DT, Winer JA (1999). GABAergic organization of the cat medial geniculate body. *J Comp Neurol* 415:368-92.
- Huh Y, Kim C, Cho J, Lee W, Kim J, Ahn H (1997a). Differential effects of aging on NADPH-diaphorase and VIP neurons in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 8: 2991-4.
- Huh Y, Kim C, Lee W, Kim J, Ahn H (1997b). Age-related change in the neuropeptide Y and NADPH-diaphorase-positive neurons in the cerebral cortex and striatum of aged rats. *Neurosci Lett* 223:157-60.
- Huh Y, Lee W, Cho J, Ahn H (1998). Regional changes of NADPH-diaphorase and neuropeptide Y neurons in the cerebral cortex of aged Fischer 344 rats. *Neurosci Lett* 247:79-82.
- Hwang IK, Kim DS, Lee HY, Lee JY, Choi GP, Lee DI, Kim JD, Lee YB, Sohn HS, Kang TC, Won MH (2003). Age-related changes of parvalbumin immunoreactive neurons in the rat main olfactory bulb. *Mol Cells* 16:302-6.
- Cha CI, Uhm MR, Shin DH, Chung YH, Baik SH (1998). Immunocytochemical study on the distribution of NOS-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of aged rats. *Neuroreport* 9:2171-4.
- Chernock ML, Larue DT, Winer JA (2004). A periodic network of neurochemical modules in the inferior colliculus. *Hear Res* 188:12-20.
- Choudhury RP, Carrelli AL, Stern JD, Chereshnev I, Soccio R, Elmalem VI, Fallon JT, Fischer EA, Reis ED (2004). Effects of simvastatin on plasma lipoproteins and response to arterial injury in wild-type and apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res* 41:75-83.
- Idrizbegovic E, Canlon B, Bross LS, Willott JF, Bogdanovic N (2001). The total number of neurons and calcium binding protein positive neurons during aging in the cochlear nucleus of CBA/CaJ mice: a quantitative study. *Hear Res* 158:102-15.
- Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Viberg A, Canlon B (2003). Auditory peripheral influences on calcium binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus during aging in the C57BL/6J mouse. *Hear Res* 179:33-42.
- Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Willott JF, Canlon B (2004). Age-related increases in calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of hearing impaired C57BL/6J mice. *Neurobiol Aging* 25:1085-93.
- 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.
- Im K, Lee JM, Seo SW, Yoon U, Kim ST, Kim YH, Kim SI, Na DL (2008). Variations in cortical thickness with dementia severity in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 436:227-31.
- Imaizumi K, Priebe NJ, Crum PA, Bedenbaugh PH, Cheung SW, Schreiner CE (2004). Modular Functional Organization of Cat Anterior Auditory Field. *J Neurophysiol* 92: 444-57.
- Irvine DRF (1986). A review of the structure and function of auditory brainstem processing mechanisms, In: Ottoson D (Ed), *Sensory Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-279.
- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, Raphael Y (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 11:271-6.
- Jimenez AM, Stagner BB, Martin GK, Lonsbury-Martin BL (1999). Age-related loss of distortion product otoacoustic emissions in four mouse strains. *Hear Res* 138:91-105.

- Jinno S, Aika Y, Fukuda T, Kosaka T (1999). Quantitative analysis of neuronal nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the mouse hippocampus with optical disector. *J Comp Neurol* 410:398-412.
- Jinno S, Kosaka T (2002). Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *J Comp Neurol* 449:1-25.
- Johnson KR, Erway LC, Cook SA, Willott JF, Zheng QY (1997). A major gene affecting age-related hearing loss in C57BL/6J mice. *Hear Res* 114:83-92.
- Johnsrude IS, Penhune VB, Zatorre RJ (2000). Functional specificity in the right human auditory cortex for perceiving pitch direction. *Brain* 123:155-163.
- Jones G, Waters DA (2000). Moth hearing in response to bat echolocation calls manipulated independently in time and frequency. *Proc Biol Sci* 267:1627-32.
- Jones EG (2003). Chemically defined parallel pathways in the monkey auditory system. *Ann NY Acad Sci* 999:218-33.
- Judas M, Sestan N, Kostovic I (1999). Nitrinergic neurons in the developing and adult human telencephalon: transient and permanent patterns of expression in comparison to other mammals. *Microsc Res Tech* 45:401-19.
- Kaas JH, Hackett TA (1999). 'What' and 'where' processing in auditory cortex. *Nat Neurosci* 2:1045-7.
- Kaas JH, Hackett TA (2000). Subdivisions of auditory cortex and processing streams in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11793-9.
- 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.
- Keithley EM, Ryan AF, Feldman ML (1992). Cochlear degeneration in aged rats of four strains. *Hear Res* 59:171-178.
- Kelly JB, Whitfield IC (1971). Effects of auditory cortical lesions on discriminations of rising and falling frequency-modulated tones. *J Neurophysiol* 34:802-816.
- Kelly JB, Sally SL (1988). Organization of auditory cortex in the albino rat: binaural response properties. *J Neurophysiol* 59:1756-69.
- Kemp DT (1978). Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 64:1386-91.
- Kemp DT (1979). The evoked cochlear mechanical response and the auditory microstructure - evidence for a new element in cochlear mechanics. *Scand Audiol Suppl* 9:35-47.
- Kemp DT (1986). Otoacoustic emissions, travelling waves and cochlear mechanisms. *Hear Res* 22:95-104.
- Kemp DT (1998). Otoacoustic emissions: distorted echos of the cochlea's travelling wave, In: Berlin CI (Ed), *Otoacoustic Emissions: Basic Science and Clinical Applications*. Singular Press, San Diego, pp. 1-60.
- Kemp DT (2002). Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. *Br Med Bull* 63:223-241.
- Kempainen S, Pitkänen A (2000). Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol* 426:441-67.
- Khachaturian ZS (1989). The role of calcium regulation in brain aging: re-examination of a hypothesis. *Aging* 1:17-34.
- Khvoles R, Freeman S, Sohmer H (1996). Transient evoked otoacoustic emissions can be recorded in the rat. *Hear Res* 97:120-6.
- Kirkwood TBL, Kowald A. (1997). Network theory of aging. *Exp Gerontol* 32:395-399.

- 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.
- Koay G, Heffner HE, Heffner RS (1997). Audiogram of the big brown bat (*Eptesicus fuscus*). *Hear Res* 105:202-10.
- Kon K, Inagaki M, Kaga M (2000). Developmental changes of distortion product and transient evoked otoacoustic emissions in different age groups. *Brain Dev* 22:41-6.
- Kondo F, Asanuma M, Miyazaki I, Kondo Y, Tanaka K, Makino H, Ogawa N (2001). Progressive cortical atrophy after forebrain ischemia in diabetic rats. *Neurosci Res* 39:339-46.
- Kopp-Scheinflug C, Tolnai S, Malmierca MS, Rübsamen R (2008). The medial nucleus of the trapezoid body: comparative physiology. *Neuroscience* 154:160-70.
- 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* 419:119-30.
- Kowall NW, Ferrante RJ, Beal MF, Richardson EP Jr, Sofroniew MV, Cuello AC, Martin JB (1987). Neuropeptide Y, somatostatin, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase in the human striatum: a combined immunocytochemical and enzyme histochemical study. *Neuroscience* 20:817-28.
- Kraus N, Nicol T (2005). Brainstem origins for cortical 'what' and 'where' pathways in the auditory system. *Trends Neurosci* 28:176-81.
- Krenning J, Hughes LF, Caspary DM, Helfert RH (1998). Age-related glycine receptor subunit changes in the cochlear nucleus of Fischer-344 rats. *Laryngoscope* 108:26-31.
- Krishna BS, Semple MN (2000). Auditory temporal processing: responses to sinusoidally amplitude-modulated tones in the inferior colliculus. *J Neurophysiol* 84:255-273.
- 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.
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994). Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Res* 649:159-73.
- Kudo M, Niimi K (1978). Ascending projections of the inferior colliculus onto the medial geniculate body in the cat studied by anterograde and retrograde tracing. *Brain Res* 155:113-117.
- Kudo M, Nakamura Y (1988). Organization of the lateral lemniscal fibers converging onto the inferior colliculus in the cat: an anatomical review, In: Syka J Masterton RB (Eds), *Auditory Pathway: Structure and Function*. Plenum Press, New York, pp. 171-183.
- Kudoh M, Nakayama Y, Hishida R, Shibuki K (2006). Requirement of the auditory association cortex for discrimination of vowel-like sounds in rats. *NeuroReport* 17:1761-1766.
- Kuchiiwa S, Kuchiiwa T, Mori S, Nakagawa S (1994). NADPH diaphorase neurones are evenly distributed throughout cat neocortex irrespective of functional specialization of each region. *Neuroreport* 5:1662-4.
- La Sarge CL, Montgomery KS, Tucker C, Slaton GS, Griffith WH, Setlow B, Bizon JL (2007). Deficits across multiple cognitive domains in a subset of aged Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging* 28:928-36.
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M. (2000). Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31:2442-2449.



- Lauter JL, Herscovitch P, Formby C, Raichle ME (1985). Tonotopic organization in human auditory cortex revealed by positron emission tomography. *Hear Res* 20:199-205.
- Leake PA, Snyder RL (1989). Topographic organization of the central projections of the spiral ganglion in cats. *J Comp Neurol* 281:612-629.
- Leake PA, Snyder RL, Merzenich MM (1992). Topographic organization of the cochlear spiral ganglion demonstrated by restricted lesions of the anteroventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 320:468-478.
- Le T, Keithley EM (2007). Effects of antioxidants on the aging inner ear. *Hear Res* 226:194-202.
- Le Doux 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.
- Lee CC, Winer JA (2008). Connections of cat auditory cortex: I. Thalamocortical system. *J Comp Neurol* 507:1879-900.
- Lehmann C, Herdener M, Esposito F, Hubl D, di Salle F, Scheffler K, Bach DR, Federspiel A, Kretz R, Dierks T, Seifritz E (2006). Differential patterns of multisensory interactions in core and belt areas of human auditory cortex. *Neuroimage* 31:294-300.
- Leuba G, Saini K (1997). Colocalization of parvalbumin, calretinin and calbindin D-28k in human cortical and subcortical visual structures. *J Chem Neuroanat* 13:41-52.
- 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.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312-24.
- Liang L, Lu T, Wang X (2002). Neural representations of sinusoidal amplitude and frequency modulations in the primary auditory cortex of awake primates. *J Neurophysiol* 87:2237-2261.
- Liao JK (2005). Clinical implications for statin pleiotropy. *Curr Opin Lipidol* 16:624-9.
- Lieberman MC, Dodds LW, Pierce S (1990). Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy (published erratum appears in *J Comp Neurol* 1991, 304:341). *J Comp Neurol* 301:443-460.
- Lieberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (2002). Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419:300-4.
- Lichtenhan JT, Chertoff ME, Smittkamp SE, Durham D, Girod DA (2005). Predicting severity of cochlear hair cell damage in adult chickens using DPOAE input-output functions. *Hear Res* 201:109-20.
- Ling LL, Hughes LF, Caspary DM (2005). Age-related loss of the GABA synthetic enzyme glutamic acid decarboxylase in rat primary auditory cortex. *Neuroscience* 132:1103-13.
- Lolova IS, Lolov SR, Itzev DE, Usunoff KG (2000). Age-related changes in the NADPH-diaphorase-positive dendrites in the dorsolateral neuronal column of the periaqueductal gray in rat. *Mech Ageing Dev* 120:77-86.
- Maia CA, Campos CA (2005). Diabetes mellitus as etiological factor of hearing loss. *Braz J Otorhinolaryngol* 71:208-14.
- Malmierca MS, Rees A, Le Beau FEN, Bjaalie JG (1995). Laminar organization of frequency-defined local axons within and between the inferior colliculi of the guinea pig. *J Comp Neurol* 357:124-144.
- Manley GA (2000). Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11736-43.
- 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.

- Martin P, Mehta AD, Hudspeth AJ (2000). Negative hair-bundle stiffness betrays a mechanism for mechanical amplification by the hair cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12026-12031.
- Mast TE (1973). Binaural interaction and contralateral inhibition in dorsal cochlear nucleus of chinchilla. *J Neurophysiol* 62:61-70.
- Mayhew TM, Gundersen HJG (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* 188:1-15.
- Mazelová J, Popelar J, Syka J (2003). Auditory function in presbycusis: peripheral vs. central changes. *Exp Gerontol* 38:87-94.
- McCann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rettorri V (1998). The nitric oxide hypothesis of aging. *Exp Gerontol* 33:813-26.
- McFadden SL, Willott JF (1994a). Responses of inferior colliculus neurons in C57BL/6J mice with and without sensorineural hearing loss: effects of changing the azimuthal location of a continuous noise masker on responses to contralateral tones. *Hear Res* 78:132-148.
- McFadden SL, Willott JF (1994b). Responses of inferior colliculus neurons in C57BL/6J mice with and without sensorineural hearing loss: effects of changing the azimuthal location of an unmasked pure-tone stimulus. *Hear Res* 78:115-131.
- Melichar I, Syka J (1987). Electrophysiological measurements of the stria vascularis potentials in vivo. *Hear Res* 25:35-43.
- Merchán M, Aguilar LA, Lopez-Poveda EA, Malmierca MS (2005). The inferior colliculus of the rat: quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine. *Neuroscience* 136:907-25.
- Merrill DA, Chiba AA, Tuszynski MH (2001). Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *J Comp Neurol* 438:445-56.
- Mestas J, Ley K (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 18:228-32
- Micheyl C, Collet L (1996). Involvement of the olivocochlear bundle in the detection of tones in noise. *J Acoust Soc Am* 99: 1604-1610.
- Mikaelian DO (1979). Development and degeneration of hearing in the C57/b16 mouse: relation of electrophysiologic responses from the round window and cochlear nucleus to cochlear anatomy and behavioral responses. *Laryngoscope* 34:1-15.
- 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.
- Milbrandt JC, Albin RL, Turgeon SM, Caspary DM (1996). GABAA receptor binding in the aging rat inferior colliculus. *Neuroscience* 73:449-458.
- Milbrandt JC, Hunter C, Caspary DM (1997). Alterations of GABAA receptor subunit mRNA levels in the aging Fisher 344 rat inferior colliculus neurons. *J Comp Neurol* 379:455-465.
- Mills JH, Boettcher FA, Dubno JR (1997). Interaction of noise-induced permanent threshold shift and age-related threshold shifts. *J Acoust Soc Am* 101:1681-1686.
- Misawa H, Suga N (2001). Multiple combination-sensitive neurons in the auditory cortex of the mustached bat. *Hear Res* 151:15-29.
- Mollace V, Rodino P, Massoud R, Rotiroti D, Nistico G (1995). Age-dependent changes of NO synthase activity in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commn* 215:822-7.
- Moller AR, Janneta PJ (1981). Compound actions potentials recorded intracranially from the auditory nerve in man. *Exp Neurol* 74:862-874.
- Moller AR (2000). *Hearing: Its Physiology and Pathophysiology*. Academic Press, San Diego, pp. 123-296.

- Moore JK (1987). The human auditory brainstem: A comparative view. *Hear Res* 29:33-44.
- Morello M, Reiner A, Sancesario G, Karle EJ, Bernardi G (1997). Ultrastructural study of nitric oxide synthase-containing striatal neurons and their relationship with parvalbumin-containing neurons in rats. *Brain Res* 776:30-9.
- Morest DK, Oliver DL (1984). The neuronal architecture of the inferior colliculus of the cat: defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J Comp Neurol* 222:209-236.
- Nadol JB Jr. (1988). Comparative anatomy of the cochlea and auditory nerve in mammals. *Hear Res* 34:253-66.
- Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M, Gojova A, Solichova D, Zdansky P, Zadak Z (2004). Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherosclerosis. *Pathol Res Pract* 200:219-29.
- Naidu RC, Mountain DC (1998). Measurements of the stiffness map challenge a basic tenet of cochlear theories. *Hear Res* 124:124-131.
- Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 18:842-51.
- Necchi D, Virgili M, Monti B, Contestabile A, Scherini E (2002). Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. *Brain Res* 933:31-41.
- Netter FH (1962). The CIBA collection of medical illustrations, Vol. 1, The Nervous system. CIBA Pharmaceutical Company.
- Nguyen TV, Brownell WE (1998). Contribution of membrane cholesterol to outer hair cell lateral wall stiffness. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 119:14-20.
- Nordang L, Cestreicher E, Arnold W, Anniko M (2000). Glutamate is the afferent neurotransmitter in the human cochlea. *Acta Otolaryngol* 120:359-362.
- 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.
- Oeken I, Müller HD (1995). Distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) in chronic noise-induced hearing loss-recommendations for expert assessment. *Laryngorhinootologie* 74:473-80.
- Ohl FW, Wetzel W, Wagner T, Rech A, Scheich H (1999). Bilateral ablation of auditory cortex in Mongolian gerbil affects discrimination of frequency modulated tones but not of pure tones. *Learn Mem* 6:347-362.
- Ohlemiller KK (2002). Reduction in sharpness of frequency tuning but not endocochlear potential in aging and noise-exposed BALB/cJ mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 3:444-56.
- Ohlemiller KK, Frisina RD (2008). Clinical Characterization of Age-Related Hearing Loss and Its Neural and Molecular Bases, In: Schacht J, Popper A, Fay R (Eds), *Auditory Trauma, Protection and Treatment*. Springer-Verlag, New York, pp.145-194.
- Ojima H (1994). Terminal morphology and distribution of corticothalamic fibers originating from layers 5 and 6 of cat primary auditory cortex. *Cereb Cortex* 4:646-663.
- Oler JA, Markus EJ (1998). Age-related deficits on the radial maze and in fear conditioning: hippocampal processing and consolidation. *Hippocampus* 8:402-15.
- 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.
- Oliver D, Klonker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppertsberg JP, Fakler (2000) Gating of Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26:595-601.

- O'Neill WE, Zettel ML, Whittemore KR, Frisina RD (1997). Calbindin D-28k immunoreactivity in the medial nucleus of the trapezoid body declines with age in C57BL/6, but not CBA/CaJ, mice. *Hear Res* 112:158-66.
- Ostroff JM, McDonald KL, Schneider BA, Alain C (2003). Aging and the processing of sound duration in human auditory cortex. *Hear Res* 181:1-7.
- Ottaviani F, Di Girolamo S, Briglia G, De Rossi G, Di Giuda D, Di Nardo W (1997). Tonotopic organization of human auditory cortex analyzed by SPET. *Audiology* 36:241-248.
- Palombi PS, Caspary DM (1996a). Physiology of the aged Fischer 344 rat inferior colliculus: responses to contralateral monaural stimuli. *J Neurophysiol* 76:3114-3125.
- Palombi PS, Caspary DM (1996b). Responses of young and aged Fischer 344 rat inferior colliculus neurons to binaural tonal stimuli. *Hear Res* 100:59-67.
- 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.
- Parham K (1997). Distortion product otoacoustic emissions in the C57BL/6J mouse model of age-related hearing loss. *Hear Res* 112:216-34.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.
- Peinado MA, Martinez M, Pedrosa JA, Quesada A, Peinado JM (1993). Quantitative morphological changes in neurons and glia in the frontal lobe of the aging rat. *Anat Rec* 237:104-8.
- Peinado MA, Quesada A, Pedrosa JA, Martinez M, Esteban FJ, Del Moral ML, Peinado JM (1997). Light microscopic quantification of morphological changes during aging in neurons and glia of the rat parietal cortex. *Anat Rec* 247:420-5.
- Penschuck S, Flagstad P, Didriksen M, Leist M, Michael-Titus AT (2006). Decrease in parvalbumin-expressing neurons in the hippocampus and increased phencyclidine-induced locomotor activity in the rat methylazoxymethanol (MAM) model of schizophrenia. *Eur J Neurosci* 23:279-84.
- 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* 17:3766-77.
- Peters, A, Sethares C (1991). Organization of pyramidal neurons in area 17 of monkey visual cortex. *J Comp Neurol* 306:1-23
- Poe BH, Linvill, 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* 406:285-98.
- 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.
- Polley DB, Read HL, Storace DA, Merzenich MM (2007). Multiparametric auditory receptive field organization across five cortical fields in the albino rat. *J Neurophysiol* 97:3621-3638.
- Popelář 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* 52:615-28.
- Popelář J, Groh D, Mazelová J, Syka J (2003). Cochlear function in young and adult Fischer 344 rats. *Hear Res* 186:75-84.
- Popelář 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.
- Poremba A, Malloy M, Saunders RC, Carson RE, Herscovitch P, Mishkin M (2004). Species-specific calls evoke asymmetric activity in the monkey's temporal poles. *Nature* 427:448-451.

- 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.
- Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994a). Morphology and spatial distribution of GABAergic neurons in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol* 344:349-82.
- Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994b). Laminar distribution and neuronal targets of GABAergic axon terminals in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol* 344:383-402.
- Prosen CA, Dore DJ, May BJ (2003). The functional age of hearing loss in a mouse model of presbycusis. I. Behavioral assessments. *Hear Res* 183:44-56.
- Puel JL, Rebillard G (1990). Effect of contralateral sound stimulation on the distortion product 2F1-F2: evidence that the medial efferent system is involved. *J Acoust Soc Am* 87:1630-1635.
- Rajagopalan L, Greeson JN, Xia A, Liu H, Sturm A, Raphael RM, Davidson AL, Oghalai JS, Pereira FA, Brownell WE (2007). Tuning of the outer hair cell motor by membrane cholesterol. *J Biol Chem* 282:36659-70.
- Rauschecker JP (1998). Cortical processing of complex sounds. *Curr Opin Neurobiol* 8:516-521.
- 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.
- Reale RA, Imig TJ (1980). Tonotopic organization of auditory cortex in the cat. *J Comp Neurol* 192:265-291.
- Reddick RL, Zhang SH, Maeda N (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb* 14:141-7.
- Ren JQ, Aika Y, Heizmann CW, Kosaka T (1992). Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons. *Exp Brain Res* 92:1-14.
- Reuss S, Schaeffer DF, Laages MH, Riemann R (2000). Evidence for increased nitric oxide production in the auditory brain stem of the aged dwarf hamster (*Phodopus sungorus*): an NADPH-diaphorase histochemical study. *Mech Ageing Dev* 112:125-134.
- Ribaupierre F (1997). Acoustical Information Processing in the Auditory Thalamus and Cerebral Cortex, In: Ehret G, Romand R (Eds), *The Central Auditory System*. Oxford University Press, pp. 348-370.
- Rodrigo J, Springall DR, Uttenthal O, Bentura ML, Abadia-Molina F, Riveros-Moreno V, Martínez-Murillo R, Polak JM, Moncada S (1994). Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:175-221.
- Rogers LJ (2008). Development and function of lateralization in the avian brain. *Brain Res Bull* 76: 235-44.
- Rogers JH, Resibois A (1992). Calretinin and calbindin-D28k in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 51:843-865.
- Rossi G, Solero P, Rolando M, Olina M (1989). Are delayed evoked oto-acoustic emissions (DEOE). solely the outcome of an active intracochlear mechanism? *Scand Audiol* 18:99-104.
- Rouiller EM, Ryugo DK (1988). The central projection of intracellularly labeled auditory nerve fibers: morphometric relationships between structural and physiological properties, In: Syka J, Masterton JB (Eds), *Auditory Pathways: Structure and Function*. Plenum Press, New York, pp.101-106.
- 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* 23:1614-22.

- Rybalko N, Suta D, Pelanova J, Syka J (2008). Age-related deterioration of hearing in rats, 6th FENS, Abstract, vol. 4, 188.22.
- Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schönfeld MA, Busa E, Bodammer N, Heinze HJ, Dale A (2003). Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain* 126:1734-44.
- Saldana E, Merchan MA (1992). Intrinsic and commissural connections of the rat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 319:417-37.
- Saldana E, Feliciano M, Mugnaini E (1996). Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 371:15-40.
- Sancesario G, Morello M, Reiner A, Giacomini P, Massa R, Schoen S, Bernardi G (2000). Nitroergic neurons make synapses on dual-input dendritic spines of neurons in the cerebral cortex and the striatum of the rat: implication for a postsynaptic action of nitric oxide. *Neuroscience* 99:627-42.
- Sánchez-Zuriaga D, Martí-Gutiérrez N, De La Cruz MA, Peris-Sanchis MR (2007). Age-related changes of NADPH-diaphorase-positive neurons in the rat inferior colliculus and auditory cortex. *Microsc Res Tech* 70:1051-9.
- Sass B, Rabstein LS, Madison R, Nims RM, Peters RL, Kelloff GJ (1975). Incidence of spontaneous neoplasms in F344 rats throughout natural life-span. *J Natl Cancer Inst* 54:1449-1456.
- Seidman MD, Quirk WS, Shirwany NA (1999). Mechanisms of alterations in the microcirculation of the cochlea. *Ann NY Acad Sci* 884:226-32.
- Seidman MD (2000). Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* 110:727-38.
- Shaffer LA, Withnell RH, Dhar S, Lilly DJ, Goodman SS, Harmon KM (2003). Sources and mechanisms of DPOAE generation: implications for the prediction of auditory sensitivity. *Ear Hear* 24:367-79.
- 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.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ (1995). Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 333:1301-1307.
- 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* 394:252-69.
- 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: 282-91.
- 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.
- Shimada A (1999). Age-dependent cerebral atrophy and cognitive dysfunction in SAMP10 mice. *Neurobiol Aging* 20:125-36.
- Scharf B, Quigley S, Aoki C, Peachey N, Reeve A (1987). Focused auditory attention and frequency selectivity. *Percept Psychophys* 42:215-223.
- Schmidt S, Redecker C, Bruehl C, Witte OW (2008). Age-related decline of functional inhibition in rat cortex. *Neurobiol Aging* doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.04.006
- Schmiedt RA (1989). Spontaneous rates, thresholds and tuning of auditory-nerve fibers in the gerbil: comparison to cat data. *Hear Res* 42:23-36.

- Schmiedt RA, Mills JH, Boettcher FA (1996). Age-related loss of activity of auditory-nerve fibers. *J Neurophysiol* 76:2799-2803.
- Schmolsky 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.
- Schneider BA, Pichora-Fuller MK, Kowalchuk D, Lamb M (1994). Gap detection and the precedence effect in young and old adults. *J Acoust Soc Am* 95:980-981.
- Schneiderman A, Oliver DL, Henkel CK (1988). Connections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus: An inhibitory parallel pathway in the ascending auditory system? *J Comp Neurol* 276:188-208.
- Schofield BR, Cant NB (1999). Descending auditory pathways: projections from the inferior colliculus contact superior olivary cells that project bilaterally to the cochlear nuclei. *J Comp Neurol* 409:210-223.
- Schreiner CE, Winer JA (2007). Auditory cortex mapmaking: principles, projections, and plasticity. *Neuron* 56:356-65.
- Schuknecht HF, Gacek MR (1993). Cochlear pathology in presbycusis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:1-16.
- Schwartz IR (1992). The superior olivary complex and lateral lemniscal nuclei, In: Webster DP, Popper AN, Fay RR (Eds), *The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy*. Springer-Verlag, New York, pp.117-167.
- Silvestro A, Brevetti G, Schiano V, Scopacasa F, Chiariello M (2005). Adhesion molecules and cardiovascular risk in peripheral arterial disease. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 improves risk stratification. *Thromb Haemost* 93:559-63.
- Simon H, Frisina RD, Walton JP (2004). Age reduces response latency of mouse inferior colliculus neurons to AM sounds. *J Acoust. Soc Am* 116:469-477.
- Simpson GV, Knight RT, Brailowsky S, Prospero-Garcia O, Scabini D (1985). Altered peripheral and brainstem auditory function in aged rats. *Brain Res* 348:28-35.
- Smiley JF, Hackett TA, Ulbert I, Karmas G, Lakatos P, Javitt DC, Schroeder CE (2007). Multisensory convergence in auditory cortex, I. Cortical connections of the caudal superior temporal plane in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 502: 894-923.
- Smith PH, Spirou GA (2002). From the Cochlea to the Cortex and Back, In: Oertel D, Fay RR, Popper AN (Eds), *Integrative Functions in the Mammalian Auditory Pathway*. Springer-Verlag, New York, pp. 6-71.
- Snell KB (1997). Age-related changes in temporal gap detection. *J Acoust Soc Am* 101:2214–2220.
- Soghomonian JJ, Martin DL (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci* 19:500-5.
- Spangler KM, Warr WB (1991). The descending auditory system, In: Alschuler RA, Bobbin RP, Clopton BM, Hoffman DW (Eds), *Neurobiology of hearing: The Central Auditory System*. Raven Press, New York, pp. 27-45.
- Spelman FA, Johnson TJ, et al. (2004). Apparatus and method for treating strial hearing loss. US Patente Office, USA: Advanced Cochlear Systems.
- 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* 101:3546-53.
- 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.* 89:204-16.
- Stiebler I, Neulist R, Fichtel I, Ehret G (1997). The auditory cortex of the house mouse: left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *J Comp Physiol [A]*. 181:559-71.

- Strouse A, Ashmead DH, Ohde RN, Grantham DW (1998). Temporal processing in the aging auditory system. *J Acoust Soc Am* 104:2385-2399.
- Stumpner A, von Helversen D (2001). Evolution and function of auditory systems in insects. *Naturwissenschaften* 88:159-70.
- Suga N (1989). Principles of auditory information-processing derived from neuroethology. *J Exp Biol* 146:277-86.
- Suga N (2006). Basic acoustic patterns and neural mechanisms shared by humans and animals for auditory perception, In: Greenberg S, Ainsworth WA (Eds), *Listening to Speech: An Auditory Perspective*. Lawrence Erlbaum Associates, New York, pp. 159-181.
- Sukhova GK, Williams JK, Libby P (2002). Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1452-8.
- Swanson LW (1998). *Brain maps: Structure of the Rat Brain*. Elsevier, Amsterdam.
- Sweet RA, Dorph-Petersen KA, Lewis DA (2005). Mapping auditory core, lateral belt, and parabelt cortices in the human superior temporal gyrus. *J Comp Neurol* 491:270-89.
- Syka J, Straschill M (1970). Activation of superior colliculus neurons and motor responses after electrical stimulation of the inferior colliculus. *Exp Neurol* 28: 384-92.
- Syka J, Radil-Weiss T (1971). Electrical stimulation of the tectum in freely moving cats. *Brain Res* 28: 567-72.
- Syka J, Druga R, Kalinová (1980). Tonotopic organization of the auditory pathway in the rat. *Proceed. 28 Int. Congr. Physiol. Sciences, Budapest, No. 3, pp. 726.*
- Syka J, Voldřich L, Vrabc F (1981). *Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu*. Avicenum zdravotnické nakladatelství, Praha.
- Syka J, Popelář J, Druga R, Vlková A (1988). Descending central auditory pathway - structure and function, In: Syka J, Masterton B (Eds), *Auditory Pathway: Structure and function*. Plenum Press, New York, pp. 279-292.
- Syka J, Rybalko N, Brozek G, Jilek M (1996). Auditory frequency and intensity discrimination in pigmented rats. *Hear Res* 100:107-13.
- Syka J (2002). Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. *Physiol Rev* 82:601-36.
- Syková E (2001). Glial diffusion barriers during aging and pathological states. *Prog Brain Res* 132:339-63.
- Syková E, Nicholson C (2008). Diffusion in brain extracellular space. *Physiol Rev* 88:1277-340.
- Tadros SF, D'Souza M, Zhu X, Frisina RD (2008). Apoptosis-related genes change their expression with age and hearing loss in the mouse cochlea. *Apoptosis* 13:1303-21.
- Talavage, TM., Sereno, MI, Melcher, JR, Ledden, PJ, Rosen, BR, D'Ále, AM (2004). Tonotopic Organization in Human Auditory Cortex Revealed by Progressions of Frequency Sensitivity. *J Neurophysiol* 91:1282-1296.
- Tardif E, Chiry O, Probst A, Magistretti PJ, Clarke S (2003). Patterns of calcium-binding proteins in human inferior colliculus: identification of subdivisions and evidence for putative parallel systems. *Neuroscience* 116:1111-21.
- Thompson AM, Schofield BR (2000). Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51:330-354.
- Tian B, Reser D, Durham A, Kustov A, Rauschecker JP (2001). Functional specialization in rhesus monkey auditory cortex. *Science* 292: 290-3.
- Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW (2004). Ca<sup>2+</sup> regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci* 27:614-20.
- Tokunaga A, Sugita S, Otani K (1984). Auditory and non-auditory subcortical afferents to the inferior colliculus in the rat. *J Hirnforsch* 25:461-72.



- Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y, Obata K, Kaneko T, Tamamaki N (2005). Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. *Eur J Neurosci* 21:1587-600.
- Tremblay KL, Piskosz M, Souza P (2002). Aging alters the neural representation of speech cues. *Neuroreport* 13:1865-1870.
- Tremblay KL, Piskosz M, Souza P (2003). Effects of age and age-related hearing loss on the neural representation of speech cues. *Clin Neurophysiol* 114:1332-1343.
- Tsuchitani C (1977). Functional organization of lateral cell groups of cat superior olivary complex. *J Neurophysiol* 40:296-318.
- Tsuchitani C (1982). Discharge patterns of cat lateral superior olivary units to ipsilateral toneburst stimuli. *J Neurophysiol* 47:479-500.
- Tsuji J, Liberman MC (1997). Intracellular labelling of auditory nerve fibers in guinea pig: central and peripheral projections. *J Comp Neurol* 381:188-202.
- Turner JG, Hughes LF, Caspary DM (2005a). Effects of aging on receptive fields in rat primary auditory cortex layer V neurons. *J Neurophysiol* 94:2738-2747.
- Turner JG, Hughes LF, Caspary DM (2005b). Divergent response properties of layer-V neurons in rat primary auditory cortex. *Hear Res* 202:129-140.
- Valtschanoff JG, Weinberg RJ, Khazaria VN, Schmidt HH, Nakane M, Rustioni A (1993). Neurons in rat cerebral cortex that synthesize nitric oxide: NADPH diaphorase histochemistry, NOS immunocytochemistry, and colocalization with GABA. *Neurosci Lett* 157:157-61.
- Varghese GI, Zhu X, Frisina RD (2005). Age-related declines in distortion product otoacoustic emissions utilizing pure tone contralateral stimulation in CBA/CAJ mice. *Hear Res* 209:60-7.
- Vaughan DW (1977). Age-related deterioration of pyramidal cell basal dendrites in rat auditory cortex. *J Comp Neurol* 171:501-15.
- Vela J, Gutierrez A, Vitorica J, Ruano D (2003). Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J Neurochem* 85:368-77.
- Verkhatsky A, Toescu EC, (1998). Calcium and neuronal ageing. *Trends Neurosci* 21:2-7.
- Veselovský Z (2005). *Etologie - Biologie chování zvířat*. Academia, Praha, pp. 91-98.
- Villa A, Podini P, Panzeri MC, Racchetti G, Meldolesi J (1994). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> binding proteins during rat brain ageing: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum. *Eur J Neurosci* 6:1491-9.
- Villares MC, Carbajo RJ, Calvo DJ, Pello FME, Blanco PP, Risueño TM (2005). Lipid profile and hearing-loss aged-related. *Nutr Hosp* 20:52-7.
- Villarreal JS, Dykes JR, Barea-Rodriguez EJ (2004). Fischer 344 rats display age-related memory deficits in trace fear conditioning. *Behav Neurosci* 118:1166-75.
- Vincent SR, Kimura H (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46:755-84.
- Wallace MN, Rutkowski RG, Palmer AR (2000a). Identification and localisation of auditory areas in guinea pig cortex. *Exp Brain Res* 132:445-456.
- Wallace MN, Rutkowski RG, Palmer AR (2000b). Interconnections of auditory areas in the guinea pig neocortex. *Exp Brain Res* 143:106-19.
- Walton JP, Frisina RD, Ison JE, O'Neill WE (1997). Neural correlates of behavioral gap detection in the inferior colliculus of the young CBA mouse. *J Comp Physiol [A]* 181:161-176.
- 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.
- Walton JP, Simon H, Frisina RD (2002). Age-related alterations in the neural coding of envelope periodicities. *J Neurophysiol* 88:565-78.

- Wang YX, Martin-McNulty B, Huw LY, da Cunha V, Post J, Hinchman J, Vergona R, Sullivan ME, Dole W, Kauser K (2002). Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the presence of apolipoprotein E. *Atherosclerosis* 162:23-31.
- Warr WB (1992). Organization of the olivocochlear efferent systems in mammals, In: Webster DB, Popper AN, Fay RR (Eds), *The auditory mammalian pathway: Neuroanatomy*. Springer-Verlag, New York, pp. 410-448.
- Weedman DL, Ryugo DK (1996). Projections from auditory cortex to the cochlear nucleus in rats: synapses on granule cell dendrites. *J Comp Neurol* 371:311-324.
- Wei J, Wu JY (2008). Post-translational Regulation of L: -Glutamic Acid Decarboxylase in the Brain. *Neurochem Res* 33:1459-65.
- Weibel ER (1979). *Stereological Methods: Practical Methods for Biological Morphometry*, Vol 1. Academic Press, New York.
- Wellman CL, Sengelaub DR (1995). Alterations in dendritic morphology of frontal cortical neurons after basal forebrain lesions in adult and aged rats. *Brain Res* 669:48-58.
- 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.* 231:482-97.
- Wetzel W, Ohl FW, Wagner T, Scheich H (1998). Right auditory cortex lesion in Mongolian gerbils impairs discrimination of rising and falling frequency-modulated tones. *Neurosci. Lett* 252:115-118.
- Wever EG, McCormick JG, Palin J, Ridgway SH (1971). The cochlea of the dolphin, *Tursiops truncatus*: hair cells and ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2908-12.
- Wild JM. Functional anatomy of neural pathways contributing to the control of song production in birds (1997). *Eur J Morphol.* 35:303-25.
- Willott JF (1984). Changes in frequency representation in the auditory system of mice with age-related hearing impairment. *Brain Res* 309:159-162.
- Willott JF (1986). Effects of aging, hearing loss, and anatomical location on thresholds of inferior colliculus neurons in C57BL/6 and CBA mice. *J Neurophysiol* 56:391-408.
- Willott JF, Parham K, Hunter KP (1988a). Response properties of inferior colliculus neurons in young and very old CBA/J mice. *Hear Res* 37:1-14.
- Willott JF, Parham K, Hunter KP (1988b). Response properties of inferior colliculus neurons in middle-aged C57 mice with presbycusis. *Hear Res* 37:15-28.
- Willott JF, Parham K, Hunter KP (1991). Comparison of the auditory sensitivity of neurons in the cochlear nucleus and inferior colliculus neurons of young and aging C57BL/6J and CBA/J mice. *Hear Res* 53:78-94.
- Willott JF, Aitkin LM, McFadden LS (1993). Plasticity of auditory cortex associated with sensorineural hearing loss in adult C57BL/6J mice. *J Comp Neurol* 329:402-411.
- Willott JF, Bross LS, Mc Fadden SL (1994). Morphology of the inferior colliculus in C57BL/6J and CBA/J mice across the life span. *Neurobiol Aging* 15:175-183.
- Willott JF (1996). Anatomic and physiologic aging: a behavioral neuroscience perspective. *J Am Acad Audiol* 7:141-51.
- Willott JF, Milbrandt JC, Bross LS, Caspary DM (1997). Glycine immunoreactivity and receptor binding in the cochlear nucleus of C57BL/6J and CBA/CaJ mice: effects of cochlear impairment and aging. *J Comp Neurol.* 385:405-14.
- Willott JF, Hnath Chisolm T, Lister JJ (2001). Modulation of presbycusis: current status and future directions. *Audiol Neurootol* 6:231-49.
- Wilson HL, Schwartz DM, Bhatt HR, McCulloch CE, Duncan JL (2004). Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 137:615-24.

- Winer JA, Morest DK (1983a). The neuronal architecture of the dorsal division of the medial geniculate body of the cat a study with the rapid Golgi method. *J Comp Neurol* 22:11-30.
- Winer JA, Morest DK (1983b). The medial division of the medial geniculate body of the cat: implications for thalamic organization. *J Neurosci* 3: 2629-2651.
- Winer JA (1984). The human medial geniculate body. *Hear Res* 15:225-47.
- Winer JA, Larue DT (1996). Evolution of GABAergic circuitry in the mammalian medial geniculate body. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3083-7.
- Winer JA, Larue DT, Diehl JJ, Hefti BJ (1998). Auditory cortical projections to the cat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 400:147-174.
- Winer JA, Kelly JB, Larue DT (1999). Neural architecture of the rat medial geniculate body. *Hear Res* 130:19-41.
- Winer JA, Prieto JJ (2001). Layer V in cat primary auditory cortex (AI): cellular architecture and identification of projection neurons. *J Comp Neurol* 434:379-412.
- Winer JA, Chernock ML, Larue DT, Cheung SW (2002). Descending projections to the inferior colliculus from the posterior thalamus and the auditory cortex in rat, cat, and monkey. *Hear Res* 168:181-95.
- Winer JA, Lee CC (2007). The distributed auditory cortex. *Hear Res* 229:3-13.
- Woo NH, Lu B (2006). Regulation of cortical interneurons by neurotrophins: from development to cognitive disorders. *Neuroscientist* 12:43-56.
- Works SJ, Wilson RE, Wellman CL (2004). Age-dependent effect of cholinergic lesion on dendritic morphology in rat frontal cortex. *Neurobiol Aging* 25:963-74.
- Xiao YM, Diao YC, So KF (1996). A morphological study of neurons expressing NADPH diaphorase activity in the visual cortex of the golden hamster. *Brain Behav Evol* 48:221-30.
- Yamada K, Noda Y, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T (1996). Reduction in the number of NADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. *Neurosci Res* 24:393-402.
- Yamada K, Nabeshima T. (1998). Changes in NMDA receptor/nitric oxide signaling pathway in the brain with aging. *Microsc Res Tech* 43:68-74.
- Yan XX, Jen LS, Garey LJ (1996). NADPH-diaphorase-positive neurons in primate cerebral cortex colocalize with GABA and calcium-binding proteins. *Cereb Cortex* 6:524-9.
- Yan XX, Garey LJ (1997). Morphological diversity of nitric oxide synthesising neurons in mammalian cerebral cortex. *J Hirnforsch* 38:165-72.
- Young ED, Davis, KA (2002). Circuitry and function of the dorsal cochlear nucleus, In: Oertel D, Fay RR, Popper AN (Eds), *Integrative Functions in the Mammalian Auditory Pathway*. Springer-Verlag, New York, 2002, pp. 160-206.
- Zatorre RJ, Belin P (2001). Spectral and temporal processing in human auditory cortex. *Cereb Cortex* 11:946-953.
- 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.
- Zettel ML, O'Neill WE, Trang TT, Frisina RD (2001). Early bilateral deafening prevents calretinin up-regulation in the dorsal cortex of the inferior colliculus of aged CBA/CaJ mice. *Hear Res* 158:131-8.
- Zhang Y, Suga N (1997). Corticofugal amplification of subcortical responses to single tone stimuli in the mustached bat. *J Neurophysiol* 78:3489-3492.
- Zhang Y, Suga N (2005). Corticofugal feedback for collicular plasticity evoked by electric stimulation of the inferior colliculus. *J Neurophysiol* 94:2676-82.
- Zilles K (1985). *The Cortex of the Rat, A Stereotaxic Atlas*. Springer-Verlag, Berlin.

## 9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

### Publikace v impaktovaných časopisech

- Ouda L, Nwabueze-Ogbo FC, Druga R, Syka J (2003). NADPH-diaphorase-positive neurons in the auditory cortex of young and old rats. *Neuroreport* 14:363-6.  
IF = 2,163
- Syka J, Ouda L, Nachtigal P, Solichová D, Semecký V (2007). Atorvastatin slows down the deterioration of inner ear function with age in mice. *Neurosci Lett* 411:112-6.  
IF = 2,085
- Ouda L, Druga R, Syka J (2008). Changes in parvalbumin immunoreactivity with aging in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* 43:782-9.  
IF = 2,879
- Burianova J, Ouda L, Profant O, Syka J (2008). Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* doi:10.1016/j.exger.2008.09.012  
IF = 2,879

### Abstrakta

- Druga R, Ouda L, Syka J. Distribution of GABAergic neurons in the auditory cortex and in subcortical auditory structures. Abstracts of the 78th Physiological days of the Slovak and Czech Physiological Societies, Piešťany 5. – 8.2. 2002, Abstract No. 31, *Physiol. Res* 51, 8P, 2002.
- Druga R, Nwabueze-Ogbo FC, Ouda L, Syka J. NADPH-diaphorase – positive neurons in the auditory cortex of young and very old rats. 3th Forum of European Neuroscience, Paris, 13.-17.7.2002, FENS Abstracts, pp. 277, 2002.
- Popelář J, Ouda L, Syka J. Změny středně latentních vyvolaných odpovědí a aktivit jednotlivých neuronů u morčat po ohlušení. 42.otologický den, konference České společnosti otorhinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Praha 5.12.2002.
- Ouda L, Druga R, Syka J. Distribution of parvalbumin and calbindin immunoreactivity within primary and associative areas of the rat auditory cortex. Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, Prague 10. – 15.7.2003, IBRO Abstracts, pp. 188, 2003.
- Druga R., Ouda L., Syka J. Distribution of glutamate decarboxylase immunoreactivity within primary and associative areas of the rat auditory cortex. Plasticity of the Central Auditory System and Processing of Complex Acoustic Signals, Prague 7. -10.7.2003, Abstracts, pp. 49, 2003.
- Ouda L, Rybalko N, Syka J. Vliv hluku na sluchový systém potkana po aplikaci některých farmak. 43. otologický a kofochirurgický den, konference pořádaná ORL klinikou LF UP a FNO. České společnosti otorhinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Olomouc 4.12. 2003.
- Druga R, Ouda L, Syka J. Changes in glutamate decarboxylase immunoreactivity in the rat auditory cortex following noise exposure. 4th forum of European neuroscience, Lisbon, 10. – 14.7. 2004, FENS Abstr., vol.2, A157.11, 2004.
- Ouda L., Rybalko N, Syka J. The role of GABA in noise-induced changes of auditory system function in the rat. 4th Forum of European Neuroscience, Lisbon, 10.–14.7. 2004, FENS Abstr., vol.2, A226.5, 2004.

- Rybalko N, Ouda L, Syka J. The influence of physostigmine and scopolamine on noise-induced changes of hearing function in rats. 4th forum of European neuroscience, Lisbon, 10. – 14.7. 2004, FENS Abstr., vol.2, A226.12, 2004.
- Ouda L, Syka J. Changes in the distribution of calcium binding proteins during aging in the auditory cortex of two rat strains. Joint meeting of ENI-NET and the Czech neuroscience society, Prague 19. – 21.11.2005, Abstracts, pp. 110, 2005.
- Ouda L, Druga R, Syka J. Differences in calretinin immunostaining in the central auditory structures of the rat and guinea pig. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, 8.-12.7.2006, FENS Abstracts., vol.3, A038.16, 2006.
- Ouda L, Druga R, Syka J. Age-related changes in parvalbumin and calretinin immunoreactivity in the central auditory system of two rat strains. 21st Biennial Meeting of the International-Society-for-Neurochemistry/38th Annual Meeting of the American-Society-for-Neurochemistry, Cancun, Mexico, 19-24.4. 2007, Journal of Neurochemistry 102:227, 2007.
- Burianová J, Ouda L, Profant O, Syka J. Comparison of GAD levels in the inferior colliculus and auditory cortex of two rat strains during aging. 44th Inner Ear Biology Workshop, London, 16.-19.9.2007, Abstracts, pp. 151, 2007.
- Ouda L, Druga R, Syka J. Aging influences parvalbumin expression in the central auditory system of two rat strains. Sixth Conference of the Czech Neuroscience Society, Prague, 19.-20.11.2007, Abstracts, pp. 62, 2007.
- Burianová J, Ouda L, Profant O, Syka J. Changes in GAD levels in the central auditory system of two rat strains with aging. Sixth Conference of the Czech Neuroscience Society, Prague, 19.-20.11.2007, Abstracts, pp.61, 2007.
- Porter BA, Floody OR, Ouda L, Skillern C, Sharma T, Kilgard MP. Unimpaired Speech Discrimination in Rats Following Bilateral Auditory Cortex Lesions. Society For Neuroscience, San Diego, 3.-7.11.2007, Abstract No. 174.17, 2007.
- Burianová J, Ouda L, Profant O, Syka J. Effect of aging on GAD levels in the central auditory system of the rat. 6th Forum of European Neuroscience, Geneva, 12.-16.7.2008, FENS Abstracts vol.4, 188.6, 2008.