

**Ovlivnění funkce centrální části sluchového systému
dospělého potkana krátkou hlukovou expozicí v průběhu
raného vývoje.**

Doktorská dizertační práce z oboru neurovědy

Mgr. Jolana Bartošová

Ústav experimentální medicíny AV ČR

Školitel: RNDr. Jiří Popelář, CSc.

Praha 2012

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat mému školiteli, RNDr. Jiřímu Popelářovi, CSc., za pomoc a trpělivé vedení nejen při řešení mé disertační práce, ale po celou dobu doktorského studia. Děkuji také prof. MUDr. Josefu Sykovi DrSc., za konzultace a cenné rady, které mi při psaní dizertační práce poskytl. Upřímné poděkování rovněž patří RNDr. Natalii Rybalko, CSc., Dr. Ing. Zbyňku Burešovi, Dr. Ing. Danielu Šutovi, Ing. Milanu Jílkovi a Janě Janouškové, se kterými jsem spolupracovala na provedení experimentální části této práce, a Janu Setníčkovi, který mi pomohl s grafickou úpravou práce. Můj dík za podporu a práci v příjemném kolektivu patří i všem ostatním spolupracovníkům.

Prohlášení:

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

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

V Praze, 12.09.2012

SEZNAM ZKRATEK

- ABR – sluchové kmenové odpovědi vyvolané zvukovými podněty („auditory brainstem responses“)
- AIF – funkce závislosti amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu (amplitude-intensity function, AIF)
- ASR – úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě („acoustic startle reflex“)
- CF – charakteristická frekvence
- CI – colliculus inferior
- CCI – centrální jádro colliculus inferior
- c-Fos - protein kódovaný FOS genem, jehož míry exprese se využívá jako nepřímé známky neuronální aktivity, neboť c-Fos je hojně exprimován v aktivních neuronech
- dB HL (hearing level) – hladina hlasitosti zvuku (na frekvenci 1kHz odpovídají její hodnoty hodnotám v dB SPL, pro další frekvence je nutno se řídit tvarem křivek stejné hlasitosti)
- dB SPL (sound pressure level)– hladina intenzity zvuku $[dB SPL] = 20 \cdot \log (P/P_0)$, kde P_0 je základní akustický tlak ($2 \cdot 10^{-5}$ Pa).
- DCI – dorzální kůra colliculus inferior
- DPOAE – distorzní produkt otoakustické emise
- ECI – externí kůra colliculus inferior
- FTC – frekvenční prahová křivka („frequency tuning curve“)
- GABA – kyselina gamma-aminomáselná („gamma-aminobutyric acid“)
- MLR – sluchové odpovědi se střední latencí vyvolané akustickým podnětem („middle-latency responses“)
- PPI – prepulzní inhibice („prepulse inhibition“)
- PTS – trvalý posun sluchového prahu („permanent threshold shift“)
- RLF – změny ve velikosti odpovědi neuronu v závislosti na intenzitě zvukového podnětu („rate-level function“)
- S.E.M. – střední chyba průměru („standard error of the mean“)
- TTS – dočasný posun sluchového prahu („temporary threshold shift“)

OBSAH

| | |
|---|----|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 1.1. Funkční anatomie a fyziologie colliculus inferior..... | 2 |
| 1.1.1. Vlastní uspořádání colliculus inferior..... | 2 |
| 1.1.2. Vzestupné, sestupné a výstupní projekce z colliculus inferior..... | 5 |
| 1.1.3. Elektrofyziologie colliculus inferior..... | 8 |
| 1.2. Plastické změny ve sluchovém systému vyvolané působením hluku..... | 10 |
| 1.2.1. Vliv hluku na periferní sluchový systém..... | 10 |
| 1.2.2. Vliv hluku na centrální sluchový systém..... | 11 |
| 1.3. Postnatální vývoj centrálního sluchového systému se zaměřením na colliculus inferior u potkana..... | 13 |
| 2. HYPOTÉZY A CÍLE | 20 |
| 3. MATERIÁL A METODY | 22 |
| 3.1. Testovaná zvířata..... | 22 |
| 3.2. Hluková expozice..... | 22 |
| 3.3. Stanovení sluchového prahu prostřednictvím registrace ABR a DPOAE..... | 23 |
| 3.3.1. Testovaná zvířata..... | 23 |
| 3.3.2. Záznam a vyhodnocování ABR..... | 23 |
| 3.3.3. Záznam a vyhodnocování DPOAE..... | 24 |
| 3.4. Snímání neuronální aktivity v centrálním jádře colliculus inferior..... | 26 |
| 3.4.1. Testovaná zvířata..... | 26 |
| 3.4.2. Chirurgická příprava..... | 26 |
| 3.4.3. Snímání neuronální aktivity v CCI..... | 27 |
| 3.4.4. Záznam a hodnocení frekvenční charakteristiky neuronů v CCI..... | 28 |
| 3.4.5. Záznam a hodnocení intenzitní charakteristiky neuronů v CCI..... | 33 |
| 3.4.6. Histologická kontrola pozice elektrody..... | 35 |
| 3.4.7. Statistické zpracování..... | 35 |
| 3.5. Vyšetření behaviorální reakce na zvukový podnět..... | 36 |
| 3.5.1. Zařízení pro měření ASR a PPI..... | 37 |
| 3.5.2. Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět..... | 38 |
| 3.5.3. Měření prepulzní inhibice úlekové reakce..... | 38 |
| 3.5.4. Statistické zpracování..... | 38 |
| 4. VÝSLEDKY | 39 |
| 4.1. Změny sluchových prahů v průběhu vývoje a po krátké hlukové expozici..... | 39 |
| 4.1.1. ABR audiogramy..... | 39 |
| 4.1.2. Distorzní produkty otoakustických emisí..... | 40 |
| 4.1.3. Excitační prahy neuronů CCI u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku..... | 40 |
| 4.2. Změny ve frekvenční selektivitě neuronů CCI u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku..... | 41 |
| 4.2.1. Frekvenční prahové křivky neuronů CCI..... | 41 |
| 4.2.2. Hodnoty parametru Q30 v závislosti na CF jednotlivých neuronů CCI..... | 42 |
| 4.3. Změny v postranních inhibičních oblastech neuronů CCI u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku..... | 43 |
| 4.3.1. Výskyt a šířka postranních inhibičních oblastí..... | 43 |
| 4.3.2. Poloha nízkofrekvenčních a vysokofrekvenčních postranních inhibičních oblastí..... | 44 |
| 4.3.3. Vliv postranních inhibičních oblastí na frekvenční charakteristiku neuronů CCI..... | 46 |
| 4.4. Změny ve spontánní aktivitě neuronů CCI u potkanů ohlušených v mládí hluku..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.5. Změny v kódování intenzity zvuku u neuronů CCI dospělých potkanů vystavených v mládí hluku..... | 48 |
| 4.5.1. Latence odpovědi neuronů CCI na zvukové podněty | 48 |
| 4.5.2. Změny ve velikosti odpovědi neuronů v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (rate-level function, RLF) | 49 |
| 4.5.2.1. Změny RLF na CF neuronů | 49 |
| 4.5.2.2. Změny RLF na frekvencích 4, 8, a 16 kHz | 51 |
| 4.5.3. Závislost amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu..... | 52 |
| 4.6. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku..... | 52 |
| 4.6.1. Úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě | 52 |
| 4.6.2. Prepulzní inhibice úlekové reakce na neočekávaný zvukový stimul | 54 |
| 5. DISKUZE | 58 |
| 5.1. Vliv hluku na nezralý sluchový systém potkana v průběhu kritické periody vývoje | 58 |
| 5.2. Změny ve frekvenční charakteristice neuronů CCI..... | 59 |
| 5.3. Změny v rozložení dvoutónové inhibice u neuronů CCI | 61 |
| 5.4. Změny ve spontánní aktivitě | 63 |
| 5.5. Vliv hluku na kódování intenzity zvuku | 63 |
| 5.6. Latence odezvy..... | 66 |
| 5.7. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět u potkanů vystavených v mládí hluku | 66 |
| 6. SOUHRN PRÁCE | 69 |
| 7. ZÁVĚRY | 73 |
| 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 74 |
| 9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ | 86 |

1. ÚVOD

Z hlediska funkční neuroanatomie je sluchový systém člověka považován za jeden z nejsložitějších sensorických systémů. Svým spletitým uspořádáním a kombinovaným mechanoelektrickým přenosem zvukové informace předchází i komplikovanost přenosu světelné energie prostřednictvím fotoreceptorů zrakového systému. Centrem sluchového systému je hlemýžď, který obsahuje detektory schopné převádět energii mechanického vlnění zvuku na elektrický signál, a to v časovém rozmezí desítek mikrosekund. Tato extrémně rychlá reakce na zvuk umožňuje orientaci hlavy a těla směrem ke zvukovému podnětu, obzvlášť je-li zdroj zvuku mimo zrakové pole. Přestože člověk je tvor velmi závislý na zrakovém vnímání, odborníci se jednoznačně shodují, že sociální izolace vyplývající ze ztráty sluchu je mnohem horší než ztráta zraku. Vrozená nebo získaná ztráta sluchu významným způsobem ovlivňuje nejen rozvoj lidské řeči, která je nástrojem komunikace, ale také vnímání hudby. Pozorování soudobých primitivních kultur nepřímo potvrzují, že jazyk, hudba a tanec tvořil magickou jednotu, základní aspekty náboženského rituálu, který měl zajistit fyzické a duchovní přežití. Správná funkce sluchového systému je tedy jedním z klíčových elementů lidské sensorické percepce.

Avšak nadbytek zvuků může často působit s příliš velkou intenzitou, která neodpovídá lidské únosnosti a přizpůsobení. Příliš silné či v nevhodnou dobu se vyskytující zvuky, které jsou obtěžující nebo škodlivé, označujeme jako hluk. Stoupající hladina hluku v prostředí, ve kterém žijeme, jednoznačně zvyšuje pozornost soustředěnou na problém sensorineurální ztráty sluchu. Změny ve sluchovém systému po hlukové expozici jsou obvykle prezentovány jako výsledek mechanického poškození kochleárních struktur. Nicméně, změny ve sluchovém ústrojí způsobené akustickým traumatem se jednoznačně dotýkají vyšších oddílů sluchové dráhy, jak demonstrují některé studie zaměřené na mechanismy plastických změn centrálních částí sluchového systému po částečném nebo kompletním poranění vnitřního ucha. Poranění kochleárních struktur může vyvolat nejen funkční, ale i morfologickou přestavbu sluchových jader (Syka a spol., 1994).

Světová zdravotnická organizace odhaduje celosvětový výskyt lidí trpících střední nebo těžkou ztrátou sluchu na 278 milionů, což z ní činí jedno z nejrozšířenějších chronických onemocnění na celém světě. V Evropě je porucha sluchu ve stáří (presbyakuse) nejčastější formou poškození sluchu u osob ve věku nad 60 let; postihuje každého třetího člověka po 65. roce, dále prevalence stoupá s věkem. Mechanismy plastických změn ve sluchovém systému způsobených hlukem, jež se objevují v průběhu stárnutí, jsou

studovány na laboratorních zvířatech pomocí behaviorálních testů, histochemických a imunohistochemických metod, elektrofyziologických měření a záznamů otoakustických emisí.

V předkládané dizertační práci byly změny v centrálním sluchovém systému po hlukové expozici hodnoceny snímáním aktivity neuronů v centrálním sluchovém jádře colliculus inferior. První část úvodu popisuje strukturální vlastnosti sluchového jádra colliculus inferior, jeho inervaci a funkční charakteristiku. Druhá část se zabývá problematikou hluku a jeho účinkem na periferní a centrální sluchový systém. Poslední oddíl se věnuje anatomickému a funkčnímu vývoji centrálního sluchového systému se zaměřením na colliculus inferior.

1.1. Funkční anatomie a fyziologie colliculus inferior

1.1.1. Vlastní uspořádání colliculus inferior

Sluchové informace přenášené systémem sluchové dráhy z Cortiho orgánu vnitřního ucha do sluchové kůry koncového mozku se šíří mnoha různými drahami, obzvláště v mozkovém kmeni, kde početná sluchová jádra tvoří komplikovanou síť ipsilaterálních a kontralaterálních projekcí. Tato sluchová jádra nejsou pouze „přepojovacími stanicemi“ sluchové dráhy, ale centry, kde mohou být na základě integrace vstupů mnoha projekcí a zapojením lokálních nervových spojů znovu analyzovány a kódovány některé časové a prostorové parametry vnímaného zvuku.

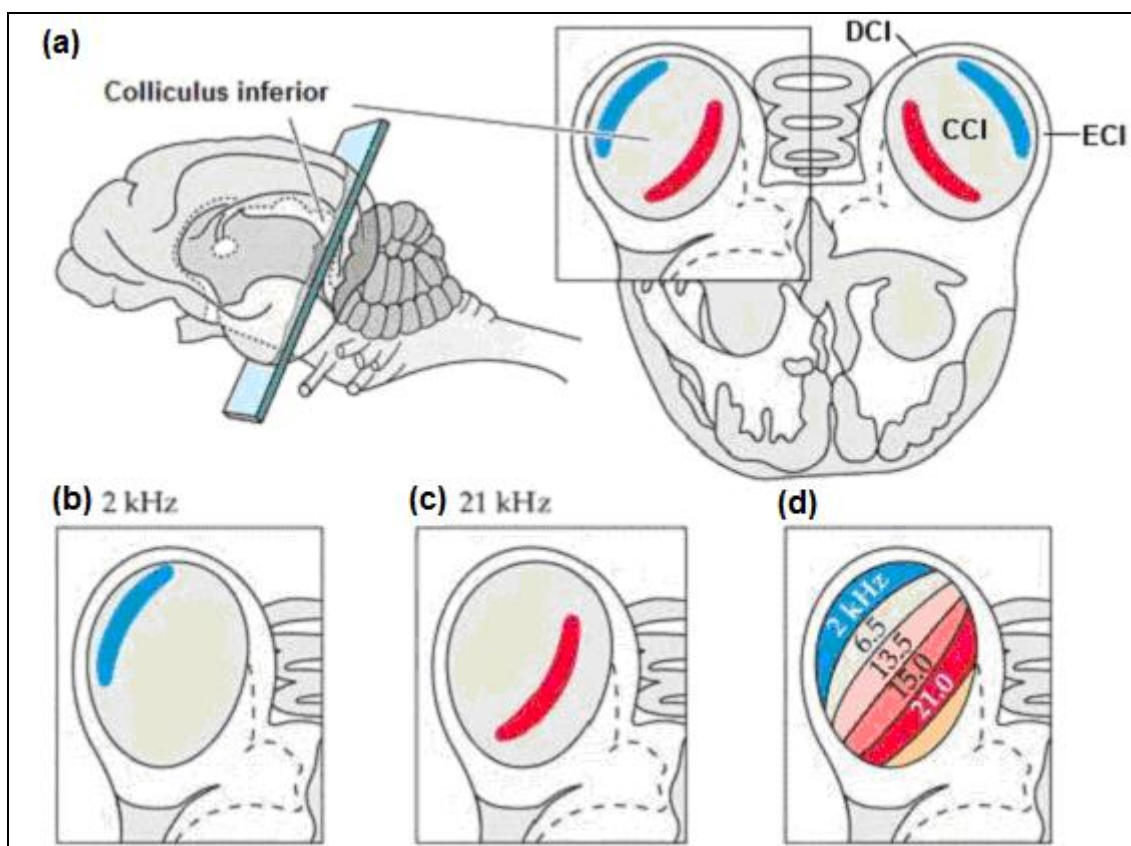
Počet oddílů sluchové dráhy projikujících do středního mozku se v průběhu fylogeneze obratlovců neměnil. Projekce z komplexu kochleárního jádra, olivy superior a laterálního lemnisku jsou přítomné již u obojživelníků (pro přehled viz McCormick, 1992). V případě těchto obratlovců nejsou centrální nervové struktury jako přední mozek a sluchová kůra ještě vyvinuty a analýza zvuku u například vydatně vokalizujících žab se odehrává na úrovni středního mozku a thalamu. Tudiž i z hlediska evolučního je zřejmé, že úloha středního mozku nespočívá pouze v různých způsobech třídění a zpracování spektrálních, temporálních a prostorových vlastností zvuku, ale účastní se také složitějších nervových úkonů, jakými jsou například behaviorální reakce na zvuk.

Colliculus inferior (CI), párové jádro centrálního sluchového systému, bývá označováno jako řídicí sluchové centrum středního mozku, neboť se v něm sbíhají téměř všechny vzestupné i sestupné sluchové dráhy. Velikost CI u kočky je zhruba $5,5 \times 5 \times 3$ mm v dorzoventrálním, v mediolaterálním a v rostrokaudálním směru, u potkana je jádro veliké

3,2 × 2,8 × 2,7 mm. Ramón y Cajal identifikoval na základě Golgiho barvení tři hlavní části CI: centrální jádro (CCI), laterálně a rostrálně uloženou externí kůru (ECI) a dorzální kůru (DCI) (obr. 1). Zastoupení všech tří částí není v rámci různých živočišných druhů podmínkou (Morest a Oliver, 1984; Faye Lund a Osen, 1985).

Počet neuronů v CI potkana se odhaduje na 350 000 neuronů, z toho asi 200 000 je obsaženo v CCI (Kulesza a spol., 2002). Pro představu, celkový počet neuronů v jádrech laterálního lemnisku se uvádí asi 17 500, v corpus geniculatum mediale je to okolo 70 000 neuronů. Organizace neuronů a axonů v CCI je charakteristická pravidelným vrstevnatým uspořádáním. Těla neuronů CCI vysílají dendrity diskovitěho tvaru uložené v podélných vrstvách, které jsou orientovány paralelně s aferentními axony laterálního lemnisku. Malmierca a spol. (1993, 1995) definovali u potkana dva typy neuronů na základě tloušťky, větvení a orientace dendritického stromu a umístění neuronů vzhledem k jednotlivým vrstvám v CCI – „F“ (flat) a „LF“ (low flat) neurony. „F“ neurony mají ve srovnání s „LF“ neurony hustší dendritický strom široký zhruba 50 μm, jsou umístěny paralelně s aferentními vlákny a vytvářejí vrstvy (laminy) asi 40–70 μm široké. „LF“ neurony se svým 100 μm širokým dendritickým stromem jsou součástí interlaminárních vrstev, kterými jsou laminy tvořené „F“ neurony odděleny. Interlaminární části CCI jsou více zřetelné ve ventromediální oblasti, v dorzomediální oblasti jsou pozorovatelné méně.

Cytoarchitektonika CCI sleduje tonotopické uspořádání v hlemýždi, tzv. kochleární tonotopii (kochleotopii) (Clopton a Winfield, 1973; Merzenich a Reid, 1974; Semple a Aitkin, 1979; Huang a Fex, 1986; Ryan a Woolf, 1988). Nejlépe popsanou funkční vlastností CCI je uspořádání neuronů podél dorzoventrální osy jádra, kdy je kochleotopie reprezentována oblastmi, ve kterých jsou obsaženy neurony naladěné převážně na vysoké frekvence (dále jen vysokofrekvenční), orientovanými ventromediálně a oblastmi, ve kterých jsou zastoupeny neurony naladěné především na nízké frekvence (dále jen nízkofrekvenční), orientovanými dorzolaterálně (Merzenich a Reid, 1974) – viz též obr. 1. Trojrozměrná rekonstrukce jednotlivých vrstev CCI podle Schreiner a Langnera (1997), provedená na základě extracelulárního měření neuronů, odhalila v rámci každé vrstvy úzká frekvenční pásma, která vykazovala postupný gradient ($0,09 \pm 0,04$ oktávy mm^{-1}) kolmý na dorzoventrální osu. Vyšší frekvence byly obecně lokalizovány blíže laterálnímu okraji centrálního jádra a nízké frekvence blíže rostromediálnímu okraji. Napříč vrstvami byl pozorován nesouvislý, zhruba desetkrát strmější gradient ($0,09 \pm 0,04$ oktávy mm^{-1}). Předpokládá se, že laminární uspořádání neuronů v CCI by mohlo hrát klíčovou roli při zpracování informace o spektrálních a temporálních parametrech zvuku.



Obr. 1. Schéma tonotopické organizace v colliculus inferior. CCI = centrální jádro colliculus inferior; DCI = dorzální kůra colliculus inferior; ECI = externí kůra colliculus inferior (a). Neurony odpovídající na nízké frekvence jsou lokalizovány v izofrekvenčních vrstvách dorzolaterálně (b), neurony odpovídající na vysoké frekvence jsou uloženy ventromediálně (c). Jednotlivé frekvenční vrstvy v CCI kočky sestavené na podkladě frekvenčně specifického barvení excitovaných neuronů, jejichž aktivita byla vyvolána stimulací zvukovými podněty o frekvencích 2, 6,5, 13,5, 15 a 21 kHz, se rozprostírají v rostro-kaudálním směru (d). (Upraveno podle Heeger D, 2006).

Dorzální kůra zaujímá dorzomediální a kaudální oblasti colliculus inferior. Je tvořena třemi vrstvami nervových buněk, které se liší velikostí a tvarem. Zvláštností neuronů v DCI (i v ECI) je schopnost syntézy oxidu dusnatého, což bylo zjištěno barvením NADPH–diaforázy (nikotinamid adenin dinukleotid fostát), enzymu kolokalizovaného se syntázou oxidu dusnatého (Druga a Syka, 1993). Externí kůra pokrývá CCI laterálně, ventrálně a rostrálně (Faye-Lund a Osen, 1985). Stejně jako v případě dorzální kůry je externí tvořena třemi buněčnými vrstvami, z nichž první je pokračováním nejsvrchnější vrstvy

dorsální kůry. Neurony druhé vrstvy se kumulují do hustých shluků a vytvářejí tzv. neuropil bohatě protkaný myelinem. Třetí vrstva přechází v rostrální kůru a z topografického hlediska náleží ke svazkům nervových komisurálních vláken.

1.1.2. Vzestupné, sestupné a výstupní projekce z colliculus inferior

Téměř všechna jádra nižších oddílů sluchové dráhy, vyjma kontralaterálního ventrálního jádra laterálního lemnisku, vysílají oboustranné vzestupné projekce do CCI, což znamená, že prakticky všechny předzpracované sluchové informace z mozkového kmene jsou shromažďovány v CCI. Převážná většina sluchových vláken laterálního lemnisku končí v CCI a jen některá jej míjí a směřují do corpus geniculatum mediale (pro přehled viz Kudo, 1981; Calford a Aitkin, 1983; Henkel, 1983). Hlavní tok akustických informací přichází do CCI z kontralaterální strany, a to ze všech oddílů kochleárního jádra (anteroventrální, posteroventrální a dorzální kochleární jádro), z laterální olivy superior a z intermediálních a dorzálních jader laterálního lemnisku. Hlavní ipsilaterální projekce přicházejí do CCI z jader laterálního lemnisku a z mediální a laterální olivy superior. Zatímco neurony v CCI jsou silně ovlivňovány aktivitou nižších sluchových center, aktivita v DCI je regulována převážně z vyšších oddílů sluchové dráhy cestou eferentního systému sluchových drah. Neurony lokalizované na hranici mezi CCI a DCI jsou ovlivňovány kombinací signálů přicházejících vzestupnými i sestupnými sluchovými dráhami, ale i z komisurálních nervových spojů, které vzájemně propojují odpovídající frekvenční pásma jednotlivých vrstev obou jader colliculus inferior, a z lokálních interneuronálních spojů (Saldaña a Merchán, 1992). Jednotlivé projekční oblasti vzestupných sluchových drah v DCI nejsou známy. Zajímavá je vzestupná inervace ECI, která kromě aferentace ze sluchového systému prostřednictvím CCI a laterálního lemnisku zahrnuje bilaterální somatosenzorické projekce z jader zadních provazců míšních, nucleus gracilis a nucleus cuneatus, a ze spinálního jádra trojklaného nervu (Coleman a Clerici, 1987).

Téměř všechny projekce ze sluchových jader mozkového kmene jsou tonotopicky organizované a většina z těchto aferentních drah má vlákna rozdělená do hustých pásem, která odpovídají tonotopicky uspořádaným izofrekvenčním vrstvám v CI; výjimkou jsou rozptýlené projekce ventrálního jádra laterálního lemnisku. Například projekce z ventrálního oddílu kochleárního jádra se soustřeďují do centra CCI, aferentace z posteroventrálního kochleárního jádra končí převážně v kaudoventrální části CCI a vlákna z mediální olivy superior se koncentrují v dorzální a laterální části CCI. Projekce z laterální olivy superior směřují především do dorzální oblasti CCI a dorzální jádro LL projikuje do kontralaterálního CCI,

a to přednostně do dorzální a centrální oblasti. Způsob, jakým dochází k třídění vláken přicházejících ze sluchových okřsků mozkového kmene se zdá být klíčovým pro pochopení funkčních vlastností CCI (pro přehled viz Kuwada a spol., 1997).

Hlavní sestupné dráhy do CI zahrnují tonotopicky organizované ipsilaterální a kontralaterální kortiko-kolikulární projekce z V. vrstvy sluchové kůry, které končí v DCI a ECI. Projekce z primární sluchové kůry potkana končí v DCI, projekce ze sekundárních sluchových oblastí směřují do DCI a ECI (pro přehled viz Games a Winer, 1988; Druga and Syka, 1984; Druga a spol., 1997; Saldaña a spol., 1996). Předpokládalo se, že kortiko-kolikulární vlákna vycházejí výlučně z V. vrstvy sluchové kůry (Kelly a Wong, 1981). Poslední studie však prostřednictvím retrográdního značení potvrdily přítomnost těchto vláken i v VI. vrstvě (potkan: Doucet a spol., 2003; křeček: Bajo a Moore, 2005; morče: Coomes a spol. 2005; Schofield, 2009). Z dosavadních výsledků vyplývá, že charakter těchto kortikokolikulárních synapsí je glutamatergní (morče: Feliciano a Potashner, 1995). Nicméně, elektrická stimulace sluchové kůry u kočky navodila nejen excitační efekt, ale vyvolala řadu dalších inhibičních a komplexních interakcí u neuronů CI (Mitani a spol., 1983). Sluchová kůra pravděpodobně moduluje zpracování zvuku v CI aktivací inhibičních interneuronů a ovlivňuje tak frekvenční selektivitu, kódování intenzity zvuku a binaurální interakce neuronů v CI.

Colliculus inferior dostává také fylogeneticky starší thalamické descendentní projekce. Kortiko-thalamická vlákna z V. vrstvy (s širokými synaptickými zakončeními) inervují corpus geniculatum mediale, colliculus inferior i kochleární jádro (Hefti a Smith, 2000). Kortiko-thalamická vlákna s malými synaptickými zakončeními jsou pravděpodobně excitačními projekcemi pyramidových buněk VI. vrstvy (Bartlett a spol., 2000). Zhang a Suga (1997) popsali excitační efekt kortikothalamických vláken pyramidových buněk VI. vrstvy na neurony v corpus geniculatum mediale a v colliculus inferior naladěné na stejnou frekvenci (rozdíl ne větší než 0,2 kHz) a inhibiční vliv na neurony reagující na jinou frekvenci (rozdíl větší než 0,2 kHz). Z dalších výsledků vyplývá, že inaktivací sluchové kůry muscimolem se snížila aktivita podkorových neuronů v corpus geniculatum mediale a v CI (Zhang a Suga, 1997; He, 1997). Popelář a spol. (2003) registrovali v průběhu farmakologické inaktivace sluchové kůry aktivitu neuronů v CI a zaznamenali nárůst nervové aktivity u 40 % neuronů CI a pokles u 44 % neuronů, přičemž pokles nervové aktivity byl příznačný pro nízkofrekvenční neurony, zatímco aktivita vysokofrekvenčních neuronů po inaktivaci sluchové kůry stoupla. Podobné výsledky prezentovali Nwabueze-Ogbo a spol. (2002) u neuronů CI po funkčním vyřazení sluchové kůry tetrodotoxinem: vzestup nervové aktivity u 48 % neuronů, pokles

u 32 % neuronů, 20 % nervových odpovědí beze změny. Různé projevy inaktivace sluchové kůry na úrovni CI lze chápat jako výsledný efekt modulačního účinku sluchové kůry na vzájemné interakce excitačních, inhibičních a facilitačních nervových okruhů centrálního sluchového systému. Některé studie zastávají názor přímých projekcí sluchové kůry do centrálního jádra CI (např. u morčete: Feliciano a Potashner, 1995; u potkana: Saldaña a spol., 1996). Přestože nebyly prokázány přímé korové projekce do CCI u všech živočišných druhů, inervace CCI je zajištěna prostřednictvím obsáhlých korových projekcí do DCI a ECI (Jen a spol., 2001). Vliv sluchové kůry na neurony CCI je také umožněn prostřednictvím korových projekcí do sluchových jader mozkového kmene, které pak zpětně ovlivňují aktivitu aferentních vláken vstupujících do CI (Schofield a Coomes, 2005, Peterson a Schofield, 2007). Dorzální i externí kůra colliculus inferior dostává aferentace i z nesluchového struktur, např. z colliculus superior (Coleman a Clerici, 1987), substantia nigra a periakvaduktální šedi (Syka a Straschill, 1970). Bylo elektrofyziologicky doloženo, že neurony ECI skutečně reagují i na somatosenzorické podněty (kočka : Aitkin, 1978, 1981).

Hlavní výstupní dráhou axonů z CCI je tzv. brachium CI, které obsahuje asi desetinásobný počet vláken než je jich přítomno ve sluchovém nervu. Zakončuje se v předposledním oddílu sluchové dráhy, v corpus geniculatum mediale. DCI a ECI vysílají také multisenzorické projekce do mnohých nesluchového struktur, např. do colliculus superior, retikulární formace a periakvaduktální šedi ve středním mozku cortex (Syka and Straschill, 1970; Syka and Radil-Weiss, 1971).

Sestupná vlákna z CI směřují do sluchových jader mozkového kmene a cestou ECI do motorických jader v oblasti mostomozečkového koutu (Faye-Lund, 1986; Syka a spol., 1988). Zda jsou cílem těchto descendentních projekcí i jádra laterálního lemnisku není známo (Faye-Lund, 1986; Caicedo a Herbert, 1993; Vetter a spol., 1993). Terminální zakončení kolikulo-olivárních vláken ve ventrálním jádře trapézového tělesa se překrývají s aferenty mediálního olivo-kochleárního svazku. Je předmětem zájmu, zda kolikulo-olivární vlákna vytvářejí synapse s neurony mediálního olivo-kochleárního svazku. Podobně jako v případě elektrické stimulace mediálního olivo-kochleárního svazku, stimulací CI bylo dosaženo prodloužení latence a zmenšení amplitudy odpovědi sluchového nervu a snížení dočasného posunu sluchového prahu způsobeného expozicí hluku o vysoké intenzitě (Rajan, 1990).

Nervová vlákna, která zajišťují inervaci mezi jednotlivými oddíly CI, jsou označována jako vnitřní spoje. Vlákna, která příčně spojují obě jádra CI a odpovídají za jejich vzájemnou komunikaci, se nazývají komisurální. Oba typy nervových vláken představují kolaterály

axonů projikujících buď do thalamu nebo do nižších kmenových struktur, anebo výběžky interneuronů, jejichž buněčná těla leží uvnitř CI (Oliver a spol., 1991). Tato nervová vlákna vytvářejí „pláty“ souběžné s izofrekvenčními laminami a rozpínají se do dorzální a externí oblasti CI (Malmierca a spol., 2003). Výsledky experimentálních studií ukazují, že většina těchto vnitřních projekcí je excitačních. Obarvená nervová vlákna rozpínající se přes středovou osu do druhostranného CI odráží zrcadlově inervaci izofrekvenčních vrstev v kontralaterálním CI (Coleman a Clerici, 1987). CCI dostává bilaterální vstupy z DCI a ipsilaterální z ECI. DCI a ECI na stejné straně jsou také vzájemně propojeny (Coleman a Clerici, 1987, Malmierca a spol., 2003). Dosavadní výsledky ukazují, že komisurální vlákna jsou převážně glutamatergní a asi 25 % je GABAergních (Saint-Marie, 1996, Malmierca a spol., 2003). Komisurální vlákna působí na neurony kontralaterálního CI jak excitačně, tak inhibičně, a mohou ovlivňovat temporální, binaurální a frekvenční vlastnosti neuronálních odpovědí (Malmierca a spol., 2003).

1.1.3. Elektrofyziologie colliculus inferior

S ohledem na složitou organizaci vstupního a výstupního inervačního systému nelze na úrovni CI očekávat jednoduchost ani v kódování nervových vzruchů. Charakter neuronálních odpovědí na zvuk je určován pomocí standardně vyhodnocovaných parametrů. Patří k nim práh odpovědi, což je nejnižší intenzita čistého tónu, která vyvolá odpověď. Frekvence tónu, při níž je práh odpovědi nejnižší, se nazývá charakteristická frekvence (characteristic frequency, CF). Činitel jakosti Q_{30} udává šířku excitační oblasti neuronu 30 dB nad prahem a vyjadřuje frekvenční selektivitu neuronu. Většina neuronů v CCI se vyznačuje vysokou úrovní frekvenční selektivity. Při zpracování frekvenční charakteristiky zvukových podnětů hraje pravděpodobně významnou roli precizní tonotopické uspořádání centrálního jádra CI (Syka a spol., 1981). Dále se u neuronů popisuje frekvenční prahová křivka, která ohraničuje excitační oblast neuronu (frequency tuning curve, FTC). U některých neuronů jsou po stranách excitačních oblastí přítomny postranní inhibiční oblasti, které zeslabují odpověď neuronu mimo jeho frekvenční účinnost, a podílejí se tak na frekvenčním naladění neuronu. Velikost odpovědi neuronu v závislosti na intenzitě zvuku vyjadřuje funkce RLF (rate-level function) a určuje se nejčastěji na CF neuronu. Průběh RLF se u jednotlivých neuronů CCI liší: některé RLF jsou monotónní a se zvyšující se intenzitou zvuku neustále rostou (tzn. že stoupá počet akčních potenciálů v odpovědi). Častěji však dochází při určité intenzitě zvuku k nasycení nebo-li saturaci, kdy RLF dosáhne maximální velikosti a s narůstající intenzitou podnětu se dále nemění. Některé RLF vykazují dokonce nemonotónní průběh,

kdy po dosažení maximální intenzity začnou naopak klesat. V CCI významně stoupá podíl neuronů s nemonotónním průběhem odezvy (Rose a spol., 1963; Ehret a Merzenich, 1988; Aitkin, 1991). Výraznou převahu nemonotónních RLF (až 94 %) v CCI potvrdili Ehret a Merzenich (1988), když stimulovali neurony v CCI kočky čistými tóny. Nemonotónní funkce RLF mají určité nadprahové maximum, které se pohybuje mezi 3–80 dB, to znamená, že velká většina neuronů CCI není vyladěná pouze na určité frekvence, ale i na určitou intenzitu zvuku.

Dalším určujícím parametrem nervové odpovědi je latence. V čase 6–20 ms po začátku zvukového stimulu dosáhne podráždění colliculus inferior (Syka a spol., 1981). Latence odpovědi závisí na typu zvukového stimulu, na intenzitě a jeho lokalizaci v prostoru. Obecně platí, že latence odpovědi klesá se vzrůstající intenzitou zvukového stimulu (Moller, 1975). Nicméně variabilita latencí odpovědí kolikulárních neuronů je značná, například Syka a spol. (2000) naměřili v ECI a DCI u morčete minimální latence neuronů 6 ms, maximální až 70 ms. Langner a Shreiner (1988) popsali u neuronů CCI kočky minimální latence odpovědi 4 ms, maximální delší než 50 ms. Velký rozptyl latencí odpovědi lze z části vysvětlit počtem neuronů v rámci různých drah vedoucích od sluchového nervu k CI.

Maximální hodnota spontánní aktivity u neuronů CI registrovaná u bdělých zvířat může dosáhnout až 95 akčních potenciálů za sekundu, přičemž více než 70 % neuronů generuje více než 4 akční potenciály za sekundu (Bock a spol., 1972; Ryan a Miller, 1978). U anestetizovaných zvířat se uvádí nižší úroveň spontánní aktivity (u 60 % neuronů méně než 4 akční potenciály za sekundu) (Willet a Urban, 1978; Li a spol., 1998). Syka a spol. (2000) naměřili u anestetizovaných morčat dvakrát vyšší úroveň spontánní aktivity v CCI v porovnání s DCI a ECI; podobný rozdíl ve velikosti spontánní aktivity v CCI a ECI pozorovali Ryan a Miller (1978) u opice. Vlákna sluchového nervu s nízkými sluchovými prahy měla vyšší úroveň spontánní aktivity (Lieberman, 1978). Podobně i neurony v CCI měly nižší hodnoty sluchových prahů v porovnání s neuronálními prahy v DCI a ECI. Statisticky významná souvislost mezi hodnotami sluchových prahů a velikostí spontánní aktivity v CI však potvrzena nebyla (Syka a spol., 2000).

V CI se vyskytují dva hlavní typy odpovědi neuronů na zvukový podnět, kterým je buď čistý tón nebo šum: fáziké odpovědi, kdy je aktivita neuronů vymezena začátkem zvukového stimulu, a tonické odpovědi, které se vyznačují zvýšenou aktivitou neuronů v průběhu celé délky zvukového stimulu (Moore a Irvine, 1980, Syka a spol., 2000). V CI se ve srovnání s nižšími oddíly sluchové dráhy vyskytuje vyšší procento neuronů reagujících fáziky pouze na začátek zvukového podnětu. Například u kočky se uvádí až 50 % neuronů

reagujících na začátek stimulu, u morčete 20,7 % (Syka a spol, 1981; Syka a spol; 2000). Časový průběh odpovědi neuronů na zvukový stimul je charakterizován tzv. poststimulačním časovým histogramem (post-stimulus time histogram, PSTH).

1.2. Plastické změny ve sluchovém systému vyvolané působením hluku

Sluchový systém moderního člověka je vystaven stále rostoucí nadměrné akustické stimulaci. Každý zvuk, který vyvolává nepříjemný nebo rušivý vjem, nebo který má škodlivý účinek, je označován jako hluk. Hluk je tedy definován z hlediska subjektivního vnímání, nikoliv objektivně, např. na základě akustického tlaku (Syka a spol., 1981). Expozice hluku vede k degenerativním změnám smyslových receptorů ve vnitřním uchu, které postihují nejprve vnější vláskové buňky. S přetrvávajícím účinkem hluku nebo se zvyšováním intenzity následuje poškození vnitřních vláskových buněk. Změny ve vnitřním uchu po expozici hluku lze přirovnat ke změnám, které nastávají po provedení mechanické léze, po podání ototoxických léků nebo k degenerativním změnám charakterizujícím proces stárnutí. Úbytek či ztráta funkce periferních receptorů po hlukové expozici vyvolává plastické změny na úrovni centrálního sluchového systému, které se mnohdy projevují zvýšenou mírou spontánní aktivity nervových vláken (Saunders a spol., 1972; Bock a Saunders, 1977; Popelář a spol., 1987; Salvi a spol., 1990; Syka a spol., 1994). Objasnění mechanismů patologických změn, ke kterým v průběhu a po expozici hluku ve sluchovém systému dochází, by mohlo nabídnout nové možnosti v jejich prevenci a léčbě.

1.2.1. Vliv hluku na periferní sluchový systém

Obvyklou charakteristikou změn ve sluchovém systému způsobených hlukovou expozicí je posun sluchového prahu. Posun sluchového prahu je v závislosti na intenzitě, frekvenčním spektru a jeho trvání buď přechodný (temporary threshold shift, TTS) nebo trvalý (permanent threshold shift, PTS). Zatímco primárním důvodem vzniku trvalého posunu sluchového prahu je ztráta vnějších a vnitřních vláskových buněk v blanitém labyrintu vnitřního ucha, mechanismy vzniku dočasného posunu sluchového prahu jsou ještě stále předmětem zkoumání, která nabízí několik hypotéz. Mechanika dráždění vláskových buněk spočívá v ohnutí jejich stereocilií směrem k bazálnímu tělísku a k otevření nespecifických mechanicky řízených iontových kanálů. Hluk může způsobovat změny mechanických vlastností stereocilií a následně pak i vodivosti vláskových buněk. Několik studií poukázalo na změny ve stereociliích vláskových buněk po intenzivní zvukové stimulaci (Miller a spol., 1985; Saunders a spol., 1986a).

Rozvoj několika nových metod pro měření mikromechanických a elektrických parametrů odpovědí vláskových buněk na akustické podněty umožnil bližší výzkum základních mechanismů TTS. Důležitým předpokladem pro správnou funkci stereocilií je jejich optimální tuhost. Nadměrná hluková zátěž vede ke snížení tuhosti stereocilií u všech vláskových buněk, zejména pak u první řady vnějších vláskových buněk (Saunders a spol., 1986a, b; Saunders a Flock, 1986). V patologických procesech dočasně zvýšeného prahu hrají potenciální roli i ionty kalcia, jejichž výrazný vzestup po hlukové zátěži byl objeven v cytoplazmě vnějších vláskových buněk. Podobně i zvýšená propustnost endolymfo–perilymfatické bariéry pro draslíkové a sodíkové ionty po expozici hluku by mohla být součástí mechanismů vzniku TTS.

Po hlukové expozici jsou popisovány destruktivní změny na synapsích vnitřních vláskových buněk a neuronů buněk spirálního ganglia. Předpokládanou příčinou je excitotoxický účinek glutamátu na periferních dendritech primárních sluchových neuronů a vnitřních vláskových buňkách. Lokální aplikace agonisty glutamátu AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalon) vedla k podobné destrukci primárních sluchových dendritů, která byla pozorována při hlukové expozici. Naopak použití neuroprotektivního glutamátového antagonisty kynurenátu v poškození dendritů primárních sluchových neuronů zabránilo. Obnovení struktury a funkce vnitřních vláskových buněk a primárních neuronů sluchové dráhy časově odpovídalo návratu sluchových prahů (pro přehled viz Syka, 2002).

1.2.2. Vliv hluku na centrální sluchový systém

Úbytek vláskových buněk v hlemýždi po nadměrné zvukové stimulaci je spojen s degenerací vláken sluchového nervu. Souvztažnost mezi ztrátou vláskových buněk a degenerací axonů byla popsána u neuronů ve ventrálním kochleárním jádře, kdy rozsah poškození v kochleárním jádře odpovídal ztrátě vláskových buněk na periférii. Obdobné dystrofické změny, ale bez projevu kochleotopie, byly popsány i ve ventrálním kochleárním jádře, v colliculus inferior nebo olivě superior (Morest a Bohne, 1983; Kim a spol., 1997). Je možné, že se na degeneraci axonálních vláken v centrálním sluchovém systému po hlukové expozici podílí excitotoxické procesy podobné těm, které probíhají v periferním sluchovém ústrojí (Syka, 2002).

Riziko poškození centrálního sluchového systému hlukem se opět odvíjí od hladiny akustického tlaku, obsahu frekvencí a délce expozice. Charakteristickými ukazateli periferní sensorineurální ztráty sluchu jsou posun prahu, narušené vnímání hlasitosti a zhoršené porozumění řeči. Posuny sluchových prahů (TTS i PTS) lze měřit prostřednictvím kmenových

vyvolaných odpovědí nebo středně latentních odpovědí vyvolaných z mozkové kůry. Posun sluchového prahu se na centrální úrovni projevuje zvýšením prahů frekvenčních prahových křivek neuronů v centrálních sluchových jádrech (Syka a Popelář; 1994; Wang a spol., 1996). Uvádí se, že hluk působí na různých úrovních sluchové dráhy odlišně a rozsah posunu prahů se v jednotlivých oddílech sluchové dráhy liší. Například neurony v colliculus inferior měly po stejné hlukové expozici větší prahový posun v porovnání s neurony v kochleárním jádře (Salvi a spol., 1978; Syka a Popelář, 1982).

Dalším specifickým projevem centrálních změn ve sluchovém systému po hlukové zátěži je zvýšení amplitud středně latentních vyvolaných odpovědí z vyšších oddílů sluchové dráhy (middle latency responses, MLR). To bylo pozorováno ve sluchové kůře a v colliculus inferior u mnoha živočišných druhů (Saunders a spol., 1972; Bock a Saunders, 1977; Popelář a spol., 1987, 2008; Salvi a spol., 1990; Syka a spol., 1994). Na nižší úrovni sluchové dráhy, tj. ve sluchovém nervu nebo kochleárním jádře, nebyly zaznamenány žádné změny ve velikosti amplitud MLR (Syka a spol., 1994; Syka a Rybalko, 2000). Mnoho autorů se domnívá, že zvýšení amplitudy MLR v colliculus inferior a ve sluchové kůře je centrálního původu a odráží změny v rovnováze mezi excitačním a inhibičním systémem sluchové kůry (Willott a Lu, 1982; Saunders a spol., 1972; Popelář a spol., 1987; Salvi a spol., 1990, 1992; Syka a spol., 1994; Syka a Rybalko, 2000; Rybalko a Syka, 2001; Popelář a spol., 2008).

Po ohlušení dochází k omezenému přísunu zvukových podnětů a předpokládá se, že sluchový systém kompenzuje redukci akustického vstupu nadměrnou vzrušivostí. Blokováním aktivity inhibičních GABAergních projekcí stoupá v CCI maximální aktivita neuronů o 42 % a rozšiřují se excitační oblasti odpovědí neuronů (Yang a spol., 1992). Zvýšenou aktivitu neuronů v kochleárním jádře a v colliculus inferior po nadměrné hlukové zátěži a jejich změny ve frekvenčním naladění pozorovali Boettcher a Salvi (1993) a Wang a spol. (1996). Pokles inhibice ve sluchovém systému po hlukové zátěži byl sledován i na molekulární úrovni, kdy se po 2–30 dnech po expozici hluku snížila v CI hladina prekurzoru GABA, glutamátdekarboxylázy (Abott a spol., 1999; Milbrandt a spol., 2000).

Působením hluku se dále mění míra spontánní aktivity neuronů centrálního sluchového systému (Kiang a spol., 1976; Salvi a spol., 1978). U neuronů v kochleárním jádře makaka byl pozorován nárůst spontánní aktivity po krátce trvající expozici tónů o středně vysoké intenzitě (Lonsbury-Martin a Martin, 1981). Také v primární sluchové kůře kočky byly zaznamenány zvýšené hodnoty spontánní aktivity po třicetiminutové expozici tónů o vysoké intenzitě (93–123 dB SPL) (Kimura a Eggermont, 1999). Výsledky některých studií uvádí, že zvýšená aktivita neuronů v centrálním sluchovém systému by mohla hrát významnou roli

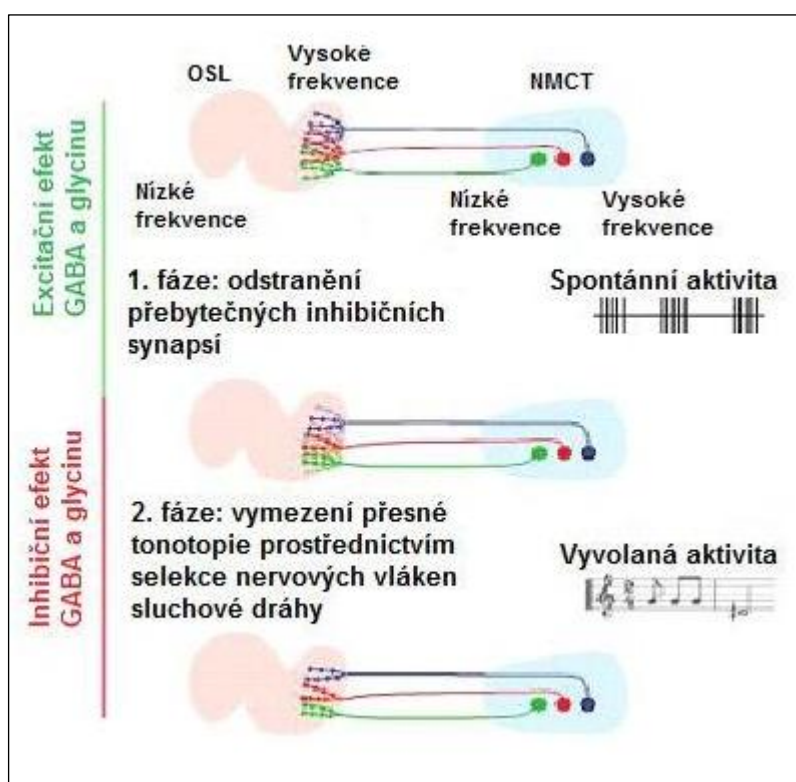
v otázce subjektivního šelestu, tzv. tinnitu (Saunders a spol., 1972; Bock a Saunders, 1977; Popelář a spol., 1987; Salvi a spol., 1990; Syka a spol., 1994; Gerken, 1996; Gerken a spol., 2001; Kaltenbach a spol., 2004; Rybalko a Syka, 2001).

1.3. Postnatální vývoj centrálního sluchového systému se zaměřením na colliculus inferior u potkana

V raných stádiích vývoje probíhají na molekulární a buněčné úrovni časově a prostorově organizované děje, které vytváří základy precizní tonotopické organizace a fyziologických vlastností nervových okruhů sluchové dráhy. Již v roce 1982 potvrdili Hubel a Wiesel ve své průkopnické práci o důsledcích zrakové deprivace na vyvíjející se zrakový systém klíčový význam elektrické aktivity pro správný vývoj nervových spojů v různých částech mozku (Hubel, 1982; Wiesel, 1982). Úlohou elektrické aktivity v počátečním utváření synaptických kontaktů, v dozrávání synapsí a v topografickém uspořádání nervových spojů, se zabývá řada prací (např. Aamodt a Constantine-Paton, 1999; Gabriele a spol., 2000a; Zhang a Poo, 2001; Kandler, 2004; Kandler a Gillespie, 2005). V průběhu embryonálního vývoje či rané fáze postnatálního vývoje, kdy smyslové orgány ještě nejsou aktivovány vnějšími senzorickými podněty, se jedná o spontánní elektrickou aktivitu, která pravděpodobně reguluje proces zakládání synaptických spojů a nervových okruhů (Gabriele a spol., 2000a; Kandler, 2004; Kandler a Gillespie, 2005). Úloha spontánní aktivity v průběhu vývoje centrálního nervového systému byla sledována např. v mozkové kůře, thalamu, hipokampu, v locus coeruleus, retině a páteřní míše vyvíjejícího se mozku (Zhang a Poo, 2001). V nezralém sluchovém systému je spontánní elektrická aktivita generována podpůrnými buňkami v hlemýždi prostřednictvím spontánního uvolňování adenosintrifosfátu. Adenosintrifosfát navozuje depolarizaci vnitřních vláskových buněk, což vede k uvolňování glutamátu a ke vzniku výbojů akčních potenciálů na primárních sluchových neuronech, a to ještě před začátkem slyšení (Tritsch, 2007). V této časné fázi vývoje dochází k eliminaci nadbytečných synaptických spojů a k posílení aktivních synapsí. Redukce synaptických spojů v časné fázi postnatálního vývoje se zdá být organizačním principem zakládání topografie v mnoha senzorických systémech.

Kandler (2004) - viz obr. 2 a 3 - popisuje v rámci utváření tonotopie inhibiční dráhy mediálního jádra corpus trapezoideum a laterálního jádra olivy superior tři zásadní kroky, které probíhají v různé časové posloupnosti pod vlivem rozdílné nervové aktivity. V nejranější fázi vývoje inervují axony mediálního jádra corpus trapezoideum tonotopicky odpovídající oblasti v laterálním jádře olivy superior pomocí chemických ukazatelů.

Výsledkem jsou již topograficky organizované, ale široké aferentní projekce do olivy superior. Ty se postupně zužují prostřednictvím deaktivace většiny synaptických spojů. Obsáhlá funkční reorganizace je s největší pravděpodobností řízena spontánní aktivitou a svůj vliv uplatňuje zřejmě i GABA a glycin, jejichž účinek je před začátkem slyšení excitační. Druhá fáze je vymezena začátkem slyšení. Sluchový systém je stimulován zvukovými podněty z vnějšího prostředí, dochází k odstraňování nadbytečných synapsí a zpřesňování topografie nervových spojů. V tomto období vývoje se efekt GABA a glycinu mění ve výhradně inhibiční.

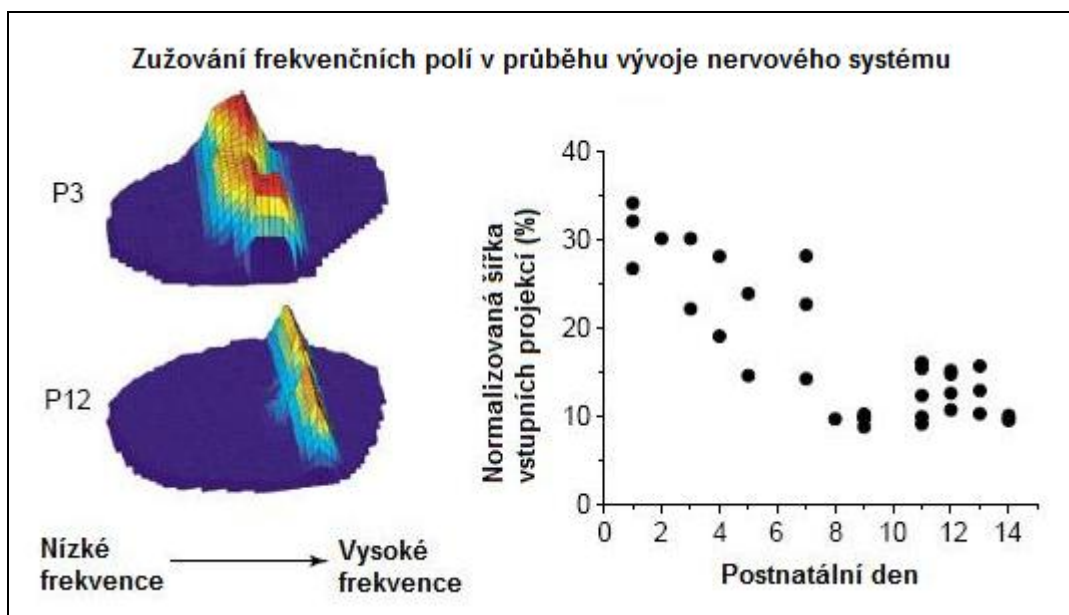


Obr. 2. Modelové znázornění zakládání tonotopie inhibiční dráhy mezi mediálním jádrem corpus trapezoideum a jádrem olivy superior. Jednotlivé axony mediálního jádra corpus trapezoideum zpočátku funkčně inervují „tonotopicky“ široké oblasti v laterálním jádře olivy superior a jednotlivé neurony v laterálním jádře olivy superior dostávají projekce z širokých oblastí mediálního jádra corpus trapezoideum.

V průběhu prvního postnatálního týdne je účinek GABA a glycinu excitační, a synapse v tonotopicky „nesprávných“ oblastech jsou deaktivovány. Tento proces je pravděpodobně závislý na spontánní aktivitě generované podpůrnými buňkami v hlemýždi. Po začátku slyšení jsou již funkčně vymezené tonotopické oblasti definovány i strukturálně redukcí nadbytečných synapsí. V tomto období je účinek GABA a glycinu již hyperpolarizační. (Upraveno podle Kandler, 2004).

Období postnatálního vývoje, v jehož průběhu dochází k finálním změnám ve struktuře a funkci sluchového systému, je definováno jako kritická perioda vývoje. V průběhu kritické periody se mění parametry odpovědi neuronů centrálního sluchového

systému: zkracuje se latence odpovědi a zužují se frekvenční prahové křivky, zvětšuje se dynamický rozsah a velikost maximální odpovědi a stoupá počet monotónních neuronů. Toto senzitivní období charakterizované zvýšenou úrovní plastických dějů je dnes již popsáno u všech hlavních sensorických systémů. Délka kritické periody se v rámci různých sensorických systémů liší. Zatímco kritická perioda vývoje pro somatosenzorickou kůru potkana trvá jen několik dní a končí pátým postnatálním dnem, nejvyšší úroveň nervové plasticity ve zrakovém systému byla u potkana detekována ve třetím až pátém postnatálním týdnu. Rozmezí kritické periody pro sluchový systém potkana se uvádí od začátku slyšení po čtvrtý až šestý postnatální týden (Mourek a spol., 1967; Lenoir a spol., 1979; Syka a Rybalko, 2000; Zhang a spol., 2002; Chang a Merzenich, 2003; Chang a spol., 2005; Zhou a Merzenich, 2007; Luján a spol., 2008).



Obr. 3. Mapa funkčních projekcí směřujících z mediálního jádra corpus trapezoideum do laterálního jádra olivy superior u potkana ve třetím (P3) a dvanáctém (P12) postnatálním dni. V obou případech jsou mapy orientovány kolmo na budoucí tonotopickou osu mediálního jádra corpus trapezoideum, což vypovídá o přítomnosti základní topografické organizace již v raném stádiu vývoje. Po začátku slyšení dochází k oboustrannému zužování vstupních projekcí podél tonotopické osy. Graf ilustruje největší šířku vstupních projekcí podél tonotopické mapy normalizovanou vůči šířce mediálního jádra corpus trapezoideum (Upraveno podle Kandler, 2004).

Například Insanally a spol. (2009), kteří uvádí časové rozmezí kritické periody pro vývoj primární sluchové kůry u potkana mezi 8. a 39. postnatálním dnem, rozdělují toto období do několika časových segmentů. Jednotlivé úseky kritické periody jsou pak charakterizovány dozríváním různých parametrů odpovědi neuronů sluchové kůry (charakteristická frekvence, šířka excitační oblasti odpovědi neuronu, preference pro určité druhy zvukových podnětů). Na druhou stranu jsou však popisovány i velmi krátká údobí kritické periody, například de Villers-Sidani a spol. (2007) popisují kritickou periodu mezi 11.–13. postnatálním dnem.

Potkani, podobně jako myši, fretky, křečci a kočky, patří k altriciální skupině savců. Jejich mláďata se rodí neosrstěná, s nevyvinutou schopností termoregulace, a zcela závislá na rodičích. Oční štěrby a vnější zvukovod mají uzavřené epiteliální zátkou. Kolem desátého postnatálního dne (P10) dochází k otevření zvukovodu. První kmenové vyvolané odpovědi (ABR) lze registrovat v rozmezí P10 až P12 (Iwasa a Potsic, 1982; Blatchley a spol., 1987; Geal-Dor a spol., 1993); vyznačují se však malými amplitudami s delšími latencemi, sníženým počtem pozitivních a negativních vln v odpovědi, a k jejich vyvolání je třeba vysoké intenzity zvuku. V průběhu následujících dvou týdnů postupuje funkční vývoj sluchové dráhy rychle kupředu a koncem prvního postnatálního měsíce (P24–36) dosahují amplitudy ABR dospělých hodnot (Iwasa a Potsic, 1982; Blatchley a spol., 1987).

Vývoj funkčních parametrů neuronů CCI sledovali Shneron a Willot (1978, 1979) u myši v průběhu kritické periody P12–17. Pro vyvolání odpovědi neuronů CCI u jedinců ve věku P12–14 bylo nutné použít zvukové stimuly o nízké frekvenci a intenzitě vyšší než 75 dB SPL. Dvanáctý postnatální den reagovaly neurony CCI pouze na stimulaci šumem, odpovědi na čisté tóny nebylo možné vyvolat ani podnětem o intenzitě 90 dB SPL. V porovnání s dospělým sluchovým systémem měly odpovědi neuronů CCI registrované u mláďat velmi nízkou nebo žádnou spontánní aktivitu, omezený dynamický rozsah a odpovídaly většinou jen na začátek zvukového stimulu. Frekvenční prahové křivky odpovědi neuronů CCI byly široké a měly vysoké sluchové prahy. V průběhu následujících tří až pěti dnů se jednotlivé parametry odpovědi neuronů CCI rychle měnily: míra spontánní aktivity neuronů dosáhla úrovně registrované u dospělých zvířat, odpovědi byly spíše tonické, šířky frekvenčních prahových křivek se zmenšily a prahy odpovědi neuronů se snížily. Výskyt postranních inhibičních oblastí u neuronů CCI registrovali Willott a Shneron (1978) u myši ve věku P15–P17. Podobný trend ve vývoji frekvenčních a intenzitních parametrů odpovědi neuronů CCI, který se vyznačuje poklesem sluchových prahů, zužováním frekvenčních

prahových křivek, zvětšováním dynamického rozsahu odpovědí a převahou tonické aktivity neuronů, byl popsán i u dalších altriciálních živočišných druhů (kočka: Aitkin a Moore, 1975; Pujol, 1972; netopýr: Brown a spol., 1978). Některé funkční změny neuronů CCI v průběhu vývoje se odehrávají v důsledku dozrávání periferní části sluchového systému. Cortiho orgán u myši je desátý postnatální den vyvinutý, jeho inervace však pokračuje až do 14. postnatálního dne (Kikuchi a Hilding, 1965). Amplituda vyvolaných odpovědí sluchového nervu na zvukové podněty se po dvanáctém postnatálním dni také ještě mění (Alford a Ruben, 1963). Předpokládá se, že pokles sluchových prahů v průběhu kritické periody je odrazem dozrávání kochley (Harris a Dallos, 1984; Arjmand a spol., 1988). Naproti tomu proces zužování frekvenčních prahových křivek v průběhu vývoje, který je spojován s výskytem postranních inhibičních oblastí, se přisuzuje dozrávání thalamo–kortikálních a intrakortikálních excitačních a inhibičních okruhů centrálního nervového systému (Zhang a spol., 2003; Metherate a spol., 2005; Razak a Fuzessery, 2007). Ani zkracování latencí odpovědí neuronů centrálního sluchového systému v průběhu kritické periody není jednoduše odrazem dozrávání periferní části, neboť latence odpovědí periferního sluchového nervu se po dvanáctém postnatálním dni již nemění. Ke zlepšení převodní rychlosti nervového signálu v centrálních oddílech sluchové dráhy dochází i v důsledku masivního procesu myelinizace v centrální nervové soustavě, který vydatně pokračuje i po 14. postnatálním dni (Uzman a Rumley, 1958).

Studie zabývající se vývojem tonotopických map ve sluchových jádrech centrálního systému uvádí změny ve frekvenční organizaci neuronů v průběhu vývoje (Lippe a Rubel, 1983, 1985; Lippe, 1987; Brugge a spol., 1978; Wolf a Ryan, 1985; Walsh a McGee, 1987; Blatchley a spol., 1987; Ryan a Woolf, 1988; Sanes a spol., 1989). Některé práce zaměřené na změny v neuronální aktivitě CCI v průběhu vývoje popisují rychlejší dozrávání nízkofrekvenčních oblastí (kočka: Aitkin a Moore, 1975; Moore a Irvine, 1979; Walsh a McGee, 1987; myš: Sanes a Constantine-Paton, 1985a, b; Romand a Ehret, 1990; Pierson a Snyder-Keller, 1994). Například Moore a Irvine (1979) sledovali vývoj frekvenčních prahových křivek neuronů CCI u koček v průběhu prvních osmi postnatálních týdnů a zjistili, že zatímco FTC nízkofrekvenčních neuronů byly P25 srovnatelné s FTC neuronů dospělých zvířat, FTC vysokofrekvenčních neuronů dozrávaly až po P30. Podobný výsledek uveřejnili Pierson a Snyder-Keller (1994), když potvrdili rychlejší dozrávání nízkofrekvenčních oblastí v CCI u potkana prostřednictvím imunohistochemického barvení protilátkou proti c-Fos. C-Fos je protein kódovaný FOS genem, jehož míry exprese se využívá jako nepřímé známky neuronální aktivity, neboť c-Fos je hojně exprimován v aktivních neuronech. Nízkofrekvenční

oblasti v CCI byly již dvanáctý postnatální den tonotopicky organizované na rozdíl od ventrálních vysokofrekvenčních oblastí, které si zachovaly nezralý charakter až do P24. V rozporu s těmito údaji jsou výsledky práce Friauf (1992), který mapoval vývoj tonotopické organizace v centrálních jádrech sluchové dráhy včetně CCI též prostřednictvím imunohistochemického barvení protilátkou proti c-Fos. Výsledky jeho studie nepotvrdily rychlejší vývoj nízkofrekvenčních oblastí CCI a neprokázaly žádné změny v tonotopii CCI po čtrnáctém postnatálním dni.

Vysoká úroveň plastických dějů v průběhu kritické periody umožňuje adaptaci sluchového systému na požadavky vnějšího prostředí a činí jej bezpodmínečně závislým na optimálním přívodu zvukových podnětů. Jakýkoliv zásah vedoucí k omezení nebo přerušení zvukové stimulace je pro vývoj funkčních parametrů sluchu nebezpečný (Sanes a Takacs, 1993; Zhang a spol., 2001; Chang a Merzenich, 2003; Nakahara a spol., 2004; McClure a spol., 2005; Franklin a spol., 2006; de Villers-Sidani a spol., 2007; pro přehled viz Syka, 2002). Působením určitých zvukových podnětů v daném období kritické periody lze ovlivnit vývoj konkrétních funkčních parametrů neuronů primární sluchové kůry (Insanally a spol., 2009). Například expozice potkanů 10.–17. postnatální den frekvenčně modulovaným tónům vedla ke zvýšenému zastoupení vysokých frekvencí v oblasti primární sluchové kůry. Působení frekvenčně modulovaných tónů v časovém rozmezí P17–P24 způsobilo rozšíření excitačních oblastí neuronálních odpovědí. A konečně efekt téže expozice v intervalu P25–P40 se u neuronů projevil zvýšenou citlivostí na určité zvukové stimuly. Změny v tonotopii primární sluchové kůry potkanů vystavených v průběhu kritické periody jednotvárnému zvukovému prostředí popisují práce Zhang a spol., 2001; Zhang a spol., 2002; Chang a Merzenich, 2003; Nakahara a spol., 2004; Bao a spol., 2004.

Převážná většina experimentů zabývajících se projevy postnatální plasticity byla provedena na modelu primární sluchové kůry (A1) (Rybalko a Syka, 2001; Zhang a spol., 2001, 2002; Bao a spol., 2004; de Villers-Sidani a spol., 2007; Zhou a Merzenich, 2009; Zhou a spol., 2011; Insanally a spol., 2009). V rámci studia podkorové plasticity bylo nejčastěji dokumentovanou cílovou oblastí CCI. Například u potkanů, kteří byli v průběhu postnatálního vývoje dlouhodobě vystaveni expozici frekvenčně modulovanému tónu, byl v CCI prokázán zvýšený počet neuronů reagujících nejlépe na daný zvukový stimul (Clopton a Winfield, 1976; Poon a spol., 1990). Neurony CCI u myši vystavených působení širokopásmového šumu v období kritické periody (P8–P24) měly široké frekvenční prahové křivky (Sanes a Constantine-Paton, 1983). Zajímavé je, že i velmi krátká expozice (8 minut) intenzivnímu hluku v průběhu kritické periody způsobila u neuronů v CCI trvalé změny v tonotopické

organizaci (Pierson a Snyder-Keller, 1994). Ve vysokofrekvenčních oblastech CCI dospělých potkanů byla imunohistochemicky detekována široce rozptýlená topografická pásma nervových projekcí, která svým uspořádáním připomínala nezralý sluchový systém.

2. HYPOTÉZY A CÍLE

Cíle této práce vycházely z následujících hypotéz:

1. Předchozí studie ukázaly, že dlouhodobá sluchová deprivace v průběhu kritické periody může vést k trvalému poškození sluchu. Efekt krátkodobé hlukové expozice byl doložen v CCI pouze imunohistochemicky. Naše hypotéza předpokládá, že i krátkodobá expozice intenzivnímu hluku během kritické periody vývoje může způsobit nejen trvalé morfologické změny, ale i funkční změny v aktivitě neuronů CCI.
2. Vzhledem k postupnému dozrávání jednotlivých tonotopických oblastí CCI se domníváme, že hluková expozice zvolená v určitém úseku kritické periody může vyvolat větší změny ve vysokofrekvenční oblasti CCI než v oblasti nízkofrekvenční.
3. Předpokládáme, že případné změny v aktivitě neuronů CCI u dospělých potkanů vystavených hluku v období kritické periody vývoje se projeví i změněnými behaviorálními reakcemi na zvukové podněty.

Cíle:

1. Zjistit, zda krátká expozice potkaních mláďat intenzivnímu hluku během kritické periody vývoje (širokopásmový šum o intenzitě 125 dB SPL po dobu 8 minut, 14. postnatální den) způsobí poškození vláskových buněk v hlemýždi a dočasné nebo trvalé zvýšení sluchových prahů. Fyziologický stav vnějších vláskových buněk bude ověřován měřením distorzních produktů otoakustických emisí, sluchový práh potkanů bude sledován na základě měření zvukem vyvolaných kmenových odpovědí.
2. Zjistit, zda krátká expozice potkaních mláďat intenzivnímu hluku během kritické periody vývoje způsobí trvalé změny v aktivitě neuronů CCI. Ve věku 2–3 měsíců bude u potkanů ohlušených v mládí registrován extracelulární záznam odpovědí jednotlivých neuronů v CCI na zvukové podněty a výsledky budou porovnány s obdobnými údaji zjištěnými u skupiny kontrolních potkanů. Budou měřeny šířky excitačních polí odpovědí neuronů CCI a parametry postranních inhibičních oblastí.

3. Ověřit, zda potenciální změny v nervové aktivitě v CCI budou frekvenčně specifické.

4. Otestovat, zda případné změny v neuronové aktivitě v CCI u dospělých potkanů ohlušených v mládí se projeví i při zpracování zvukové informace na behaviorální úrovni. Reakce ohlušených a kontrolních potkanů na zvukové podněty budou testovány behaviorální metodou měření reflexní úlekové reakce na intenzivní akustický podnět. Pro vyšetření nadprahové citlivosti sluchového systému bude použita metoda prepulzní inhibice úlekové reakce.

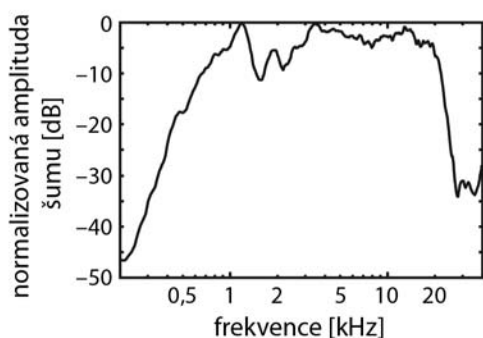
3. MATERIÁL A METODY

3.1. Testovaná zvířata

Všechna zvířata zařazená do experimentů uvedených v této práci pocházela z chovného zařízení Fyziologického ústavu AV ČR. Jednalo se o celkem 35 potkaních samic kmene Long-Evans. Ve věku deseti postnatálních dnů byla mláďata i s matkami umístěna do příručního zvěřince, kde byla chována za standardních podmínek: 12/12 hodin cyklus světlo/tma; přístup k potravě a tekutinám ad libidum. Hmotnost čtrnáctidenních mláďat se pohybovala mezi 29–32 g, hmotnost dospělých potkanů v rozmezí 250–350 g. 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 deklarácí.

3.2. Hluková expozice

Mláďata potkanů byla vystavena 14. postnatální den hlukové expozici širokopásmovým šumem o intenzitě 125 dB SPL po dobu 8 minut. Zvířata byla exponována hlukem ve speciálním boxu v bdělém stavu. Během hlukové expozice byla zvířata uzavřena jednotlivě v malé drátěné kleci (vnitřních rozměrů 13 × 6 × 6 cm) a umístěna v bezdozvukovém boxu (vnitřních rozměrů 24 × 24 × 34 cm) vybaveném reproduktorem (B&C Speakers DE700) ve vzdálenosti 20 cm od přední stěny drátěné klece. Širokopásmový šum byl generován generátorem bílého šumu RFT 03 004 a zesílen pomocí zesilovače zhotoveného na zakázku. Zvukové pole ve čtyřech bodech uvnitř boxu bylo změřeno pomocí mikrofону B&K 4939, předzesilovače ZC0020 a zvukoměru B&K 2231. Měření ukázalo, že se hodnoty akustického tlaku v jednotlivých bodech boxu vzájemně nelišily o více



Obr. 4. Frekvenční spektrum širokopásmového šumu.

než $\pm 1,5$ dB SPL. Frekvenční spektrum šumu měřené ve speciálním boxu bylo v rozsahu frekvencí 0,8–20 kHz ploché (± 5 dB SPL) (obr. 4). Z každého vrhu (obvykle 10 mláďat) byla polovina mláďat vystavena šumu a druhá polovina sloužila jako kontrolní skupina. S těmito mláďaty bylo manipulováno stejně jako s experimentální skupinou, nebyla však vystavena intenzivnímu šumu.

3.3. Stanovení sluchového prahu prostřednictvím registrace ABR a DPOAE

3.3.1. Testovaná zvířata

Do elektrofyziologického testování sluchových prahů bylo zařazeno 8 zdravých potkaních mláďat – samic kmene Long-Evans ve věku P14, z nichž 4 byly čtrnáctý postnatální den vystaveny krátké expozici hluku o vysoké intenzitě (8 min, 125 dB SPL). U ohlušených zvířat byly zhruba 1 hodinu po expozici a následně 15. a 33. postnatální den testovány sluchové prahy prostřednictvím kmenových vyvolaných odpovědí (ABR) a výsledné hodnoty byly porovnány s hodnotami sluchových prahů kontrolních potkanů (n = 4). Jako doplňkové metody pro ověření funkce periferního sluchového systému byly u každého zvířete ve stáří zhruba jednoho měsíce zaznamenány distorzní produkty otoakustických emisí (DPOAE).

Záznamy ABR a DPOAE u dospělých potkanů byly snímány v lehkém zklidnění testovaných potkanů sedativem medetomidin hydrochlorid (Domitor) v dávce 0,3 mg/kg (aplikováno intramuskulárně), účinky přetrvávaly po dobu alespoň jedné hodiny. Anestezie byla nezbytná pro zajištění klidu zvířete při měření a pro vyloučení svalových artefaktů. Záznam ABR a DPOAE probíhal ve zvukově izolované a bezdozvukové komoře. Během měření bylo zvíře umístěno na vyhřívané desce s automaticky regulovanou teplotou 38 °C. U těchto potkanů (n = 8), u nichž byly v průběhu kritické periody vývoje několikrát měřeny sluchové prahy, nebyly později vyhodnocovány odpovědi neuronů v CCI, neboť hrozilo nebezpečí, že vývoj nervové soustavy by mohl být negativně ovlivněn anestezií aplikovanou před měřením.

3.3.2. Záznam a vyhodnocování ABR

Kmenové vyvolané odpovědi byly měřeny diferenciální metodou jehličkovými elektrodami umístěnými pod kůži na temeni hlavy (aktivní elektroda v oblasti vertexu) a na obou stranách na šíji (referenční a zemnicí elektrody). Zvuková stimulace byla generována a zpracování signálu z elektrod bylo prováděno zařízením TDT (SystemIII, Tucker Davis Technologies, Florida, USA) a programem SigGen. Registrované vyvolané odpovědi byly impedančně upraveny předzesilovačem RA4LI, zesíleny desetkrát zesilovačem TDT RA16PA a zavedeny optickými kabely do procesoru TDT Pentusa, kde byly dále zesíleny, filtrovány v rozmezí 300 Hz – 3 kHz a digitalizovány vzorkovací frekvencí 25 kHz.

Zvukové podněty, kterými byly krátké tóny o trvání 3 ms s náběžnou a sestupnou hranou 1 ms, byly prezentovány s opakovací frekvencí 10 Hz ve volném poli z reproduktorové soustavy umístěné 70 cm před hlavou zvířete. Reproduktorová soustava obsahovala dva reproduktory (hlubokotónový reproduktor Jamo a vysokotónový reproduktor SEAS T25CF 002), jejichž frekvenční charakteristika byla velmi plochá (odchyšky nepřesahovaly ± 5 dB) v rozmezí frekvencí 200 Hz až 30 kHz a hodnoty akustického tlaku byly nižší o 10 dB v rozmezí frekvencí 30–50 kHz. Odpovědi ABR byly registrovány na frekvencích 4, 8, 16, 20 a 32 kHz a měřeny v časovém okně 20 ms po stimulaci.

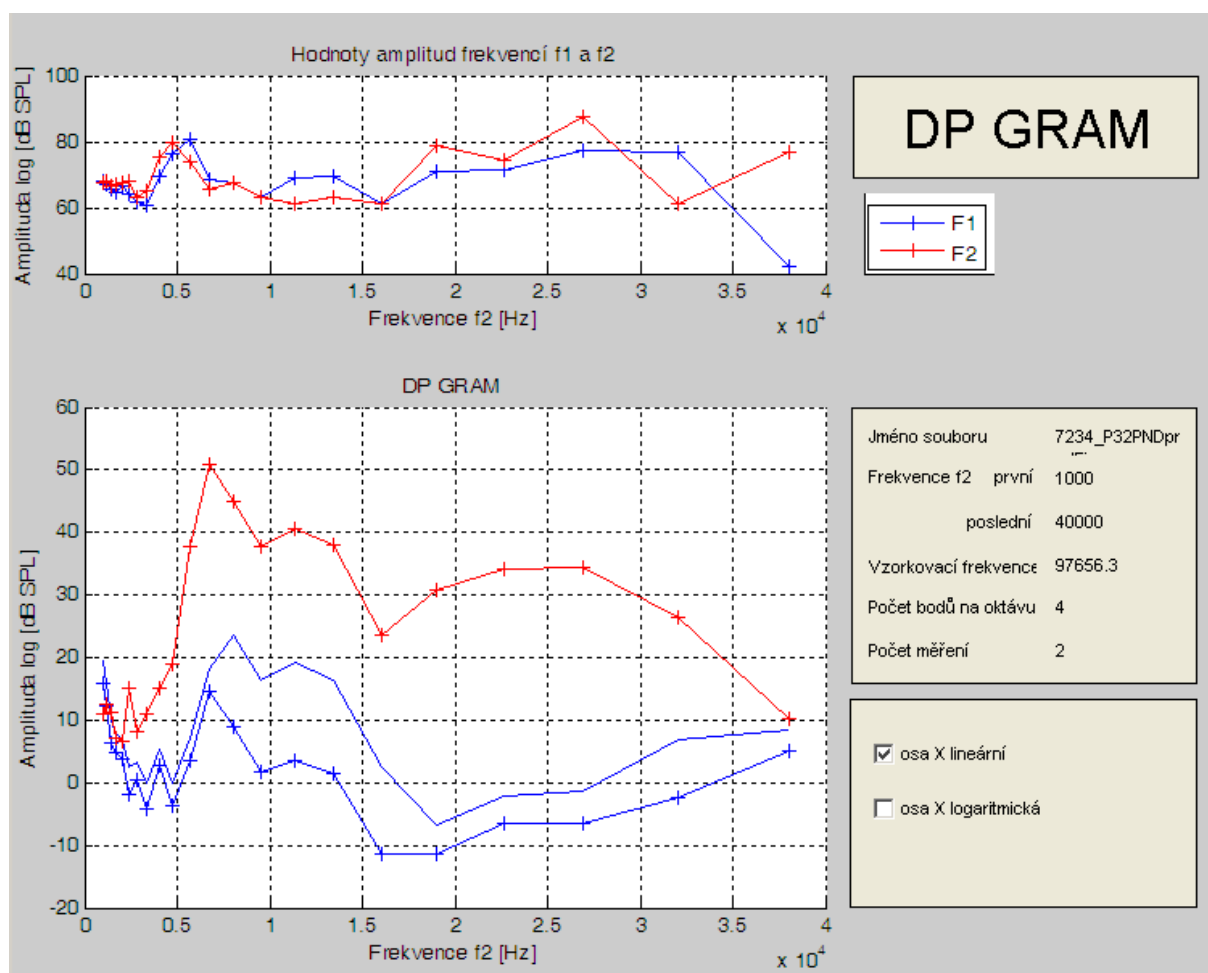
V průběhu stimulace jednotlivými tóny byla intenzita tónového podnětu snižována po krocích 5–10 dB atenuátorem TDT AP4 v rozmezí 0–100 dB a byl sledován výskyt dominantních vrcholů ABR v očekávaném časovém okně signálu (tj. 2–10 ms). Při postupném snižování intenzity podnětů klesala i amplituda vrcholů ABR až odpověď zanikla v šumu. Nejnižší intenzita podnětů, při níž ještě bylo možno detekovat vrcholy ABR, byla stanovena jako práh odpovědi na dané frekvenci. Na intenzitách podnětu blízko prahu odpovědi byl záznam ABR opakován dvakrát až třikrát pro bezpečné určení prahu odpovědi. Tímto způsobem byly u každého zvířete určeny prahy odpovědi na jednotlivých frekvencích a spojnice jednotlivých bodů určovala sluchový práh zvířete. Každý záznam na jednotlivé frekvenci a intenzitě byl získán zprůměrněním odpovědí na 300 opakování podnětů.

Pro frekvenci 8 kHz, na které je úroveň citlivosti sluchu potkana nejvyšší, tedy i posun sluchového prahu bývá na této frekvenci nejvýraznější, byly stanoveny průměrné závislosti amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu zhruba tři týdny po hlukové expozici ve skupině ohlušených a kontrolních zvířat. Hodnocena byla amplituda mezi vrcholy pozitivní komponenty dominantní třetí vlny, s latencí okolo 6 ms a negativní komponenty s latencí zhruba 7 ms. Bylo provedeno srovnání závislostí amplitud ABR na intenzitě zvukového podnětu mezi experimentálními skupinami zvířat (amplitude-intensity function, AIF).

3.3.3. Záznam a vyhodnocování DPOAE

Objektivní metodou hodnotící fyziologický stav vnějších vláskových buněk je snímání distorzních produktů otoakustických emisí. Jedná se o slabé zvuky (o 40–50 dB nižší než je intenzita stimulu), které jsou aktivně generovány vnějšími vláskovými buňkami v hlemýždi jako odpověď na zvukovou stimulaci. DPOAE byly registrovány pomocí sondy systému Etymotic (Etymotic research, Elk Grove Village, USA). Sonda obsahovala citlivý miniaturní mikrofon a byly k ní připojeny 10 cm dlouhými plastovými trubičkami dva

piezoelektrické stimulatory vlastní výroby. Sonda byla upevněna ve vnější části zvukovodu prostřednictvím plastového adaptéru. Akustickými stimuly byly dva tóny f_1 a f_2 ($f_2/f_1 = 1,21$), o intenzitách $L_1 = L_2 = 65$ dB SPL, trvání 1 s, generované procesorem TDT RP2 vzorkovací frekvencí 100 kHz a prezentované současně do zvukovodu. Signál z mikrofonu sondy byl zesílen nízkošumovým zesilovačem (ER-10B+, zisk 40 dB) a analyzován procesorem TDT RP2 vzorkovací frekvencí 100 kHz. Měření bylo provedeno ve frekvenčním rozsahu 1–38 kHz s krokem po $1/4$ oktávy, měření na každé frekvenci bylo třikrát opakováno.



Obr. 5. Ilustrační příklad originálního záznamu DP-gramu sestrojeného ve vyhodnocovacím programu v programovém prostředí MATLAB. Horní obrázek ukazuje hodnoty amplitud frekvencí primárních tónových stimulů f_1 (modře) a f_2 (červeně), na dolním obrázku je DP-gram z pravého ucha kontrolního potkana; červeně jsou označeny hodnoty DPOAE, modře (s křížky) průměrný šum pozadí, modře (bez křížků) první směrodatná odchylka šumu pozadí.

Protože otoakustické emise jsou velmi slabé zvuky, bylo pomocí vlastního programu vytvořeného v programovém prostředí MATLAB (MathWorks) v každém záznamu vyhodnoceno frekvenční spektrum, ve kterém byla změřena amplituda signálu na frekvenci $2f_1-f_2$ (DPOAE) a amplituda okolního šumu pozadí. Tyto hodnoty byly přepočteny na jednotky dB SPL podle předchozí provedené kalibrace v umělém uchu, jehož parametry odpovídaly vnějšímu zvukovodu potkana. Hodnoty DPOAE a šumu získané na jednotlivých frekvencích v každém ze tří měření byly zprůměrněny a vyneseny do grafu ve formě tzv. DP-gramů (funkce závislosti velikosti DPOAE na měnící se frekvenci f_2 stimulu). Výsledné rozlišení DP-gramu bylo čtyři body na oktávu ve frekvenčním rozmezí 1–40 kHz (f_2 tón), viz obr. 5. DPOAE, jejichž amplituda byla nižší než hodnota první směrodatné odchylky šumu, byly považovány za neměřitelné. DPOAE byly registrovány u každého zvířete postupně v obou uších.

3.4. Snímání neuronální aktivity v centrálním jádře colliculus inferior

3.4.1. Testovaná zvířata

Ve skupině potkanů kmene Long-Evans, vystavené 14. postnatální den intenzivnímu hluku (8 min, 125 dB SPL), byla v dospělosti ve věku 3–6 měsíců provedeno snímání neuronální aktivity v centrálním jádře colliculus inferior ($n = 6$). Naměřené a zpracované záznamy byly porovnány s výsledky kontrolní skupiny potkanů ($n = 7$).

3.4.2. Chirurgická příprava

Potkani byli uvedeni do celkové anestezie směsí ketamin (Narkamon 5%; Spofa) a xylazin (Sedazine 2%; Fort Dodge) v poměru 3:1, která byla aplikována intramuskulárně v dávce 0,1 ml/100g tělesné hmotnosti, což odpovídá dávce 38 mg/kg ketaminu a 5 mg/kg xylazinu. Abychom omezili bronchiální sekreci a zamezili případné dušnosti zvířete, aplikovali jsme intramuskulárně atropin (v dávce 0,02 mg/kg). Po odstranění měkkých tkání na lebce potkana a identifikaci bodu bregma a lambda, byly vrtáčkem vyvrtány dva drobné otvory ve frontální kosti pro dva nerezové ocelové šroubky, jimiž byl připevněn držák hlavy k lebce zvířete. Následně byla pomocí dentální vrtačky bilaterálně odstraněna část okcipitální kosti (7–10 mm v anteroposteriorním směru od pilovitého lambdového švu a zhruba 10 mm ve směru mediolaterálním). Po odstranění dury mater byly pod zadními okraji parietálních kostí viditelné obě struktury colliculi inferiores. Po operačním výkonu bylo zvíře přeneseno na vyhřívanou ploténku s automaticky regulovanou teplotou (38°C), hlava zvířete byla

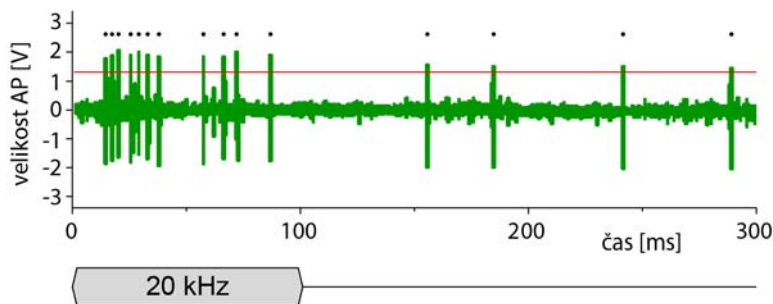
upevněna prostřednictvím držáku do stereotaxického rámu a zafixována v poloze příhodné pro přístup mikroelektrody k jádru CI. V průběhu operace a snímání nervové aktivity v CCI bylo zvíře udržováno v celkové anestezii pravidelným přidáváním dávky ketamin:xylazin v časových intervalech zhruba po 1–2 hodinách, v závislosti na kontrole reflexů (pozitivní pupilární reflex nebo reflexy na stisknutí tlapky nebo ocásku). Ve stejných časových intervalech byl přidáván atropin; povrch mozku byl manuálně omýván fyziologickým roztokem. Měření probíhalo ve zvukově izolované a bezdozvukové komoře.

3.4.3. Snímání neuronální aktivity v CCI

Pro extracelulární snímání nervové aktivity v CCI byla použita šestnáctikanálová mikroelektrodová sonda Neuronexus Technologies (Ann Arbor, MI, USA) tvořená úzkým nosičem z polyimidu (délka 5 mm), na jehož povrchu ústilo 16 platinových mikroelektrod (vzdálenost mezi jednotlivými mikroelektrodami byla 50 μm). Mikroelektrodová sonda byla připojena k elektronickému manipulátoru, který jí umožňoval pohyb ve třech ortogonálních osách. Signál byl zesílen 10 000-krát, filtrován v rozmezí 300 Hz – 10 kHz a dále zpracován zařízením TDT System III, RX5-2 Pentusa Base Station.

Záznam z každé mikroelektrody na sondě obsahoval soubor akčních potenciálů několika neuronů nacházejících se v blízkosti elektrody. V ideálním případě při vhodné impedanci elektrody (3–7 $\text{M}\Omega$) obsahoval signál akční potenciály s velkou amplitudou a dostatečným odstupem od šumu pozadí, u nichž se dalo předpokládat, že jsou generovány pouze jedním neuronem. Ve většině případů signál obsahoval akční potenciály s různou amplitudou, které byly generované více neurony. Akční potenciály byly identifikovány na základě velikosti amplitudy a oddělovány od šumu již v průběhu měření v programu BrainWare (Jan Schnup's BrainWare V8.1 for TDT). Obr. 6 ukazuje záznam neuronální aktivity registrovaný v CCI na jedné mikroelektrodě sondy vyvolaný krátkým tónovým podnětem o trvání 100 ms.

Výhodou používání šestnáctikanálové mikroelektrodové sondy bylo množství naměřených dat, neboť jedním měřením bylo možné získat současně 16 neuronálních záznamů z různých míst v CCI. Na druhé straně, vzdálenost mezi sousedními mikroelektrodami na sondě byla pouhých 50 μm , a v případě registrace neuronu s velkou amplitudou byla jeho aktivita snímána sousedními mikroelektrodami.



Obr. 6. Záznam nervové aktivity registrovaný v CCI na jedné mikroelektrodě sondy vyvolaný krátkým tónovým podnětem o frekvenci 20 kHz a trvání 100 ms. Největší amplitudy

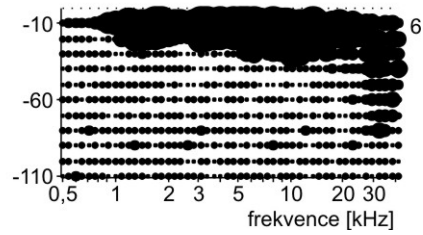
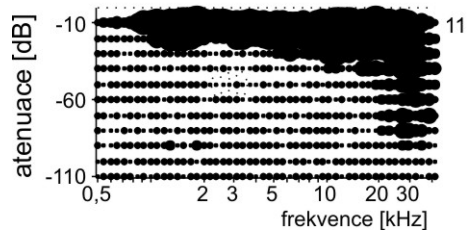
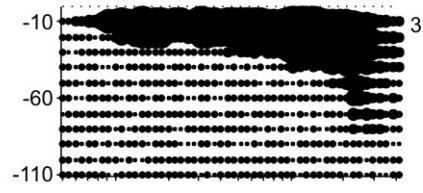
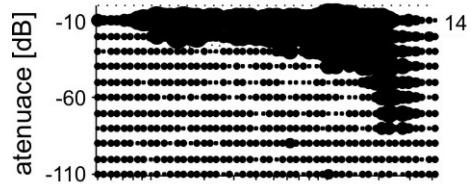
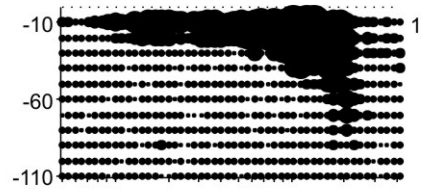
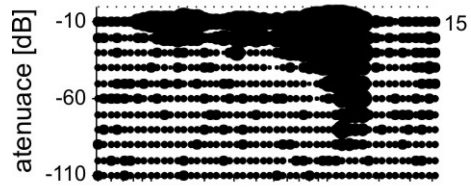
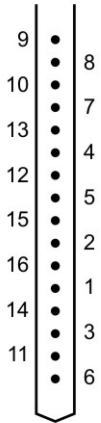
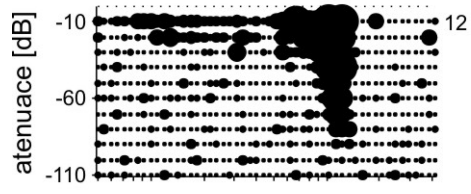
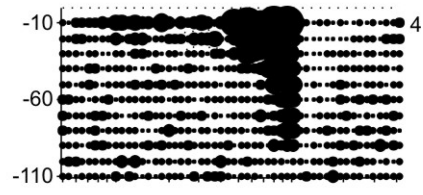
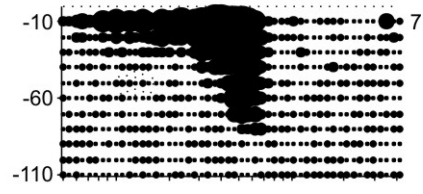
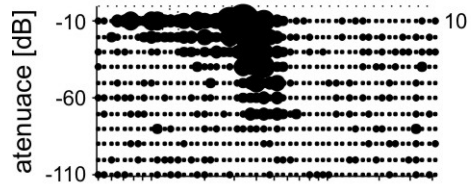
akčních potenciálů byly na základě velikosti oddělovány od šumu již v průběhu měření v programu BrainWare. Úroveň prahování akčních potenciálů od šumu je na záznamu znázorněna červenou linkou.

Tříděním akčních potenciálů podle velikosti a tvaru prvního pozitivního a negativního vrcholu jsme získali sérii akčních potenciálů odpovídajících okamžikům aktivity jednotlivých neuronů. Cílem bylo získat co nejvíce kvalitních záznamů samostatných nervových jednotek, tzv. „single unit“. Následná analýza byla provedena pomocí softwaru BrainWare.

Stimulace akustickými podněty ve volném poli byla generována zařízením TDT III System (RP 2.1 Enhanced Real-Time Processor) a řízena softwarem BrainWare. Zvukové podněty byly prezentovány ve volném poli pomocí dvou reproduktorů (hlubokotónový reproduktor Jamo a vysokotónový reproduktor SEAS T25CF 002) umístěných 70 cm před hlavou stimulovaného zvířete. Zvukové zařízení bylo kalibrováno pomocí mikrofону B&K 4939, předzesilovače ZC0020 a zvukoměru B&K 2231.

3.4.4. Záznam a hodnocení frekvenční charakteristiky neuronů v CCI

Informaci o frekvenční charakteristice jednotlivých neuronů jsme získali frekvenčně–intenzitním mapováním excitačních a postranních inhibičních oblastí odpovědi neuronů prostřednictvím zvukové stimulace. Zvukovými podněty byly krátké tóny o trvání 100 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms, o různé frekvenci (s krokem po $\frac{1}{8}$ oktávy) a intenzitě (s krokem 5 dB), předkládané v nahodilém pořadí. Pro zprůměrnění odpovědi bylo každé měření opakováno třikrát. Výsledkem tónové stimulace byla dvourozměrná matice bodů, každý bod znázorňoval velikost odpovědi neuronu v závislosti na dané frekvenci a intenzitě zvukového stimulu, tzv. frekvenčně–intenzitní oblast odpovědi neuronu. Velikost odpovědi byla vyjádřena počtem akčních potenciálů vyvolaných zvukovým stimulem v časovém okně 10–110 ms po začátku stimulu.

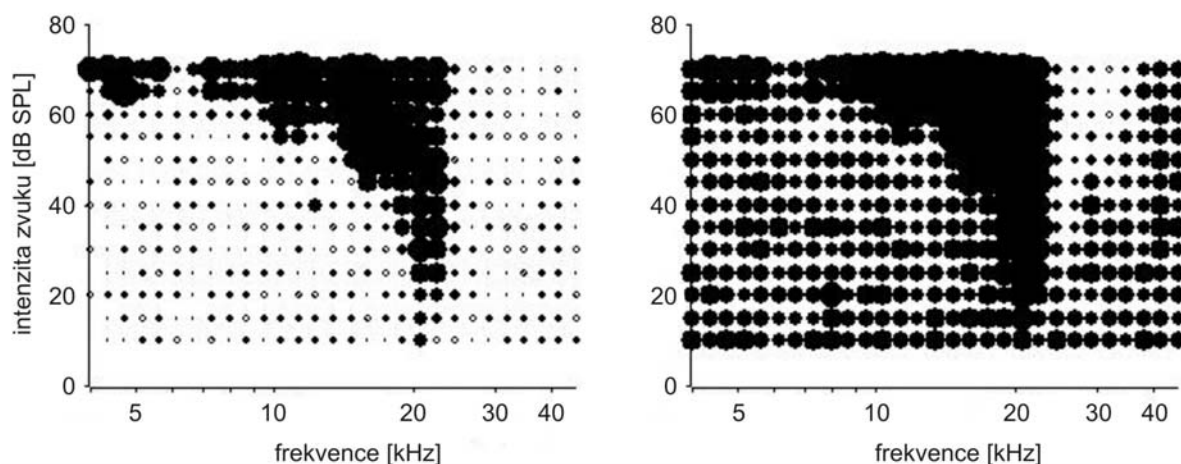


Obr. 7. Záznam frekvenčně–intenzitních oblastí odpovědi neuronů na všech šestnácti mikroelektrodách sondy získaný jedním měřením. Uprostřed je schéma nosiče sondy s šestnácti mikroelektrodami uspořádanými ve vertikální ose pod sebou; čísla mikroelektrod korespondují s čísly jednotlivých frekvenčně–intenzitních oblastí odpovědi neuronů, které byly příslušnou mikroelektrodou registrovány. Z obrázku je patrné, že se frekvenční charakteristika jednotlivých neuronů měnila podle tonotopické osy CCI v závislosti na poloze sondy: odpovědi neuronů registrované mikroelektrodami umístěnými blíže spodního okraje nosiče sondy, tzn. v hlubších vrstvách CCI, byly obecně vysokofrekvenční, záznamy prezentované na horních mikroelektrodách byly většinou nízkofrekvenční (např. mikroelektroda č. 10, 8, 9).

Míra spontánní aktivity neuronu byla získána z téhož záznamu frekvenčně–intenzitní oblasti odpovědi, z části, kde byl neuron stimulován zvukovými podněty spadajícími mimo jeho frekvenční účinnost. Záznam získaný jedním měřením ze všech šestnácti mikroelektrod uspořádaných na sondě ve vertikální rovině odrážel tonotopickou organizaci neuronů typickou pro CCI. Charakteristická frekvence neuronů snímaných jednotlivými mikroelektrodami se měnila podél tonotopické osy CCI, viz obr. 7. Ten ilustruje 16 záznamů frekvenčně–intenzitních oblastí odpovědi neuronů registrovaných jednotlivými mikroelektrodami v různé hloubce CCI.

U některých odpovědi neuronů byly po stranách excitačních oblastí zřetelné postranní inhibiční oblasti, které se projevovaly útlumem spontánní aktivity. Na obr. 7 jsou nevýrazné postranní inhibiční oblasti na nízkofrekvenční i vysokofrekvenční straně excitační oblasti přítomny např. u neuronu snímaného mikroelektrodou č. 13. U neuronů bez spontánní aktivity jsme přítomnost postranních inhibičních oblastí odpovědi neuronů vyšetřovali prostřednictvím dvoutónové stimulace. Dvoutónovou stimulaci tvořil pár tónových podnětů, z nichž frekvence prvního tónu byla shodná s CF sledovaného neuronu, a intenzita tónu byla o 10 dB vyšší než byla hodnota intenzity prahové odpovědi neuronu na jeho CF. Druhý tón o variabilní frekvenci a intenzitě byl stejný jako v případě základního mapování excitačních oblastí odpovědi neuronů. Výsledným záznamem dvoutónové stimulace byla opět dvourozměrná matice bodů odpovídajících velikosti odpovědi v příslušné frekvenčně–intenzitní oblasti. Na obr. 8A je uveden příklad excitační oblasti jednoho neuronu, na obr. 8B je záznam odpovědi téhož neuronu vyvolaný dvoutónovou stimulací, tj. čistým tónem o charakteristické frekvenci neuronu (20 kHz) a intenzitě 10 dB nad prahem (25 dB SPL), předkládaným současně se souborem krátkých tónů variabilní frekvence a intenzity. Tvar

excitační oblasti odpovědi neuronu byl stejný při jednotónové i dvoutónové stimulaci; při dvoutónové stimulaci byla po straně excitační oblasti zřetelná postranní inhibiční oblast. Postranní inhibiční oblast vyvolaná nižšími frekvencemi než CF neuronu, byla označena jako nízkofrekvenční inhibiční oblast. V opačném případě se jednalo o vysokofrekvenční postranní inhibiční oblast.



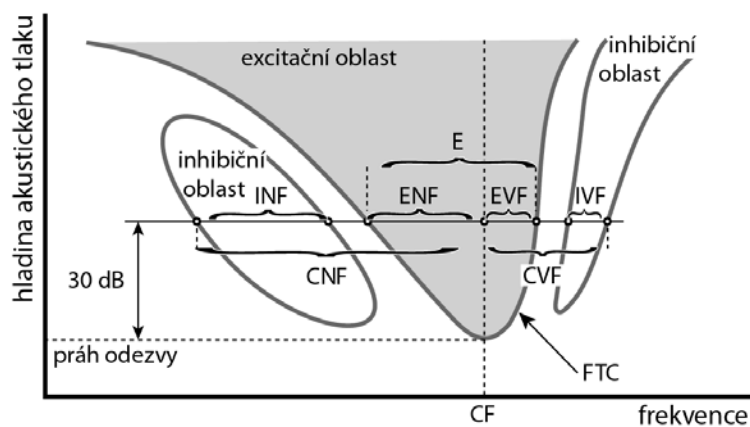
Obr. 8A. Příklad excitační oblasti odpovědi neuronu vyvolané stimulací krátkými tóny o variabilní frekvenci a intenzitě. Každý bod frekvenčně-intenzitní oblasti odpovědi znázorňuje velikost odpovědi neuronu, tzn. množství akčních potenciálů, vyvolaných tónem o příslušné frekvenci a intenzitě. Excitační oblast odpovědi neuronu je charakteristického tvaru písmene „V“; charakteristická frekvence neuronu je 20 kHz a práh odpovědi se nachází na úrovni 10 dB SPL.

Obr. 8B. Příklad postranní inhibiční oblasti odpovědi neuronu vyvolané dvoutónovou stimulací. Jde o záznam odpovědi stejného neuronu uvedeného na Obr. 8A. Současná stimulace čistým tónem o charakteristické frekvenci neuronu (20 kHz; intenzita 10 dB nad prahem neuronu, tj. 20 dB SPL) a souborem krátkých tónů variabilní frekvence a intenzity ukázala přítomnost vysokofrekvenční postranní inhibiční oblasti.

Celá frekvenčně-intenzitní oblast odpovědi neuronu byla následně vyhlazena použitím kubického interpolačního nástroje v programovém prostředí MATLAB. Tento způsob zprůměrnění odpovědi nám umožnil překonat omezení daná původně nízkým rozlišením frekvenčně-intenzitní mapy. Vyhlazená frekvenčně-intenzitní funkce nám sloužila jako výchozí informační zdroj k získání následujících parametrů pro hodnocení frekvenční selektivity neuronů (viz obr. 9, který ilustruje schéma frekvenčně-intenzitní oblasti odpovědi

neuronu včetně excitačních a postranních inhibičních oblastí, frekvenční prahové křivky a ostatních hodnocených parametrů):

- práh odpovědi – nejnižší intenzita čistého tónu, která vyvolá odpověď neuronu, uvádí se v dB SPL;
- charakteristická frekvence (CF) – frekvence tónu, na kterou je neuron nejcitlivější (má na ní nejnižší práh odpovědi), uvádí se v Hz nebo kHz;
- frekvenční prahová křivka (FTC) – souvislá křivka, která ohraničuje excitační oblast odpovědi neuronu;
- šířka excitační oblasti – měřená 30 dB nad prahem na CF neuronu prostřednictvím parametru Q_{30} (standardní míra pro stanovení šířky excitační oblasti neuronu definovaná jako CF dělená šířkou excitační oblasti 30 dB nad prahem; čím vyšší je hodnota parametru Q_{30} , tím užší je odpověď neuronu);
- šířka inhibiční oblasti – měřená 30 dB nad prahem v oktávách.



Obr. 9. Schématické znázornění frekvenčně-intenzitní oblasti odpovědi neuronu. Šedou je označena excitační oblast odpovědi neuronu, po stranách excitační oblasti jsou znázorněny postranní inhibiční oblasti.

Ve schématu jsou vyznačeny hodnocené parametry: práh odpovědi neuronu (práh odezvy), charakteristická frekvence (CF), šířka excitační oblasti (E), šířka excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence nižší než CF (ENF) a šířka excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence vyšší než CF (EVF), šířka nízkofrekvenční (INF) a vysokofrekvenční postranní inhibiční oblasti (IVF), šířka excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence nižší než CF včetně nízkofrekvenční postranní inhibiční oblasti (CNF) a šířka excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence vyšší než CF včetně vysokofrekvenční postranní inhibiční oblasti (CVF), frekvenční prahová křivka (FTC).

Odpověď neuronu byla hodnocena jako excitační, pokud její velikost překročila hodnotu prahové odezvy, definovanou jako: $R_{exc} = R_{ref} + 0,2(R_{max} - R_{ref})$, přičemž R_{max} je označení

pro maximální velikost excitační odpovědi a R_{ref} označuje referenční hodnotu. V případě jednotónové stimulace byla jako referenční hodnota stanovena úroveň spontánní aktivity neuronu. V případě dvoutónové stimulace byla za referenční hodnotu uvažována velikost odpovědi vyvolaná prvním nadprahovým tónem. Odpověď byla stanovena jako inhibiční, pokud její velikost byla o 20 % menší než referenční hodnota. Parametry pro hodnocení frekvenční selektivity neuronů byly analyzovány ve třech nepřekrývajících se frekvenčních pásmech podle CF neuronů: (I, 1–8 kHz; II, 8–16 kHz; >16 kHz).

3.4.5. Záznam a hodnocení intenzitní charakteristiky neuronů v CCI

Výchozím materiálem pro sestrojení funkce velikosti odpovědi neuronu v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (rate-level function, RLF) byla vyhlazená frekvenčně–intenzitní funkce jednotlivých neuronů popsaná v předchozí stati. RLF byla získána jako průřez této funkce na dané konstantní frekvenci. Díky obecnému frekvenčně–intenzitnímu záznamu neuronální odpovědi bylo možné vyhodnocovat RLF nejen na CF neuronu, ale i na jiných libovolných frekvencích v rozmezí měřeného frekvenčního spektra (500 Hz – 40 kHz).

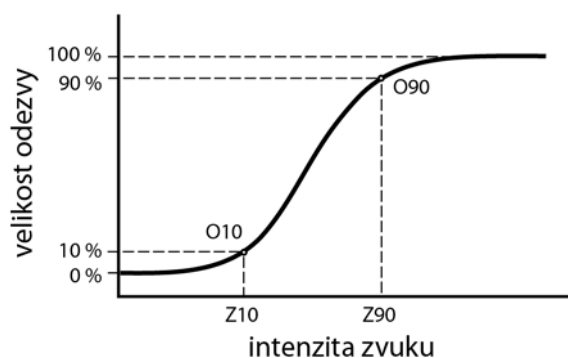
Celkový rozsah amplitudy RLF byl vyjádřen pomocí procentuální škály, kde 0 % odpovídalo úrovni spontánní aktivity a 100 % maximální velikosti odpovědi. Na každé RLF byly definovány dva body:

O10 – bod nárůstu odpovědi, tj. bod, ve kterém amplituda odpovědi dosahovala 10 % celkového rozsahu RLF;

O90 – bod, ve kterém odpověď přecházela do oblasti saturace, tj. kdy velikost odpovědi dosahovala 90 % celkového rozsahu RLF (viz Obr. 10, který ilustruje schéma RLF s hodnocenými parametry).

Na každé RLF jsme dále vyhodnocovali následující parametry:

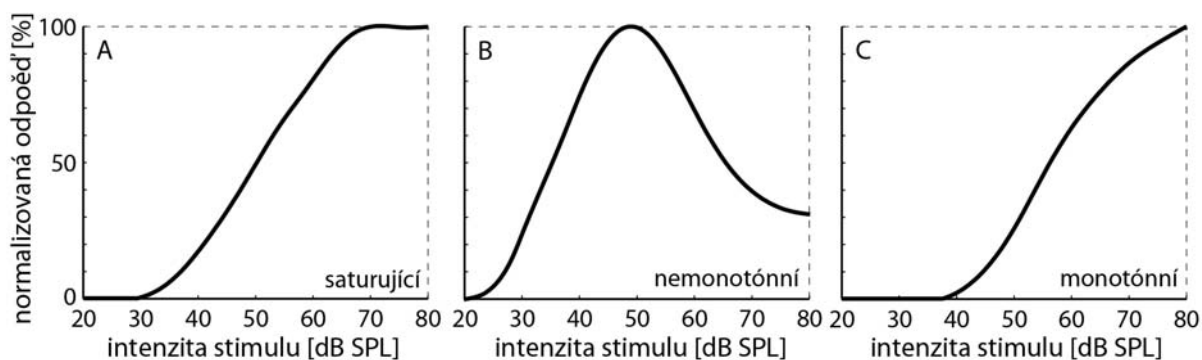
- procento saturovaných, nemonotónních a monotónních RLF;
- práh odpovědi (pouze pro RLF na CF neuronů);
- intenzitu zvukového stimulu (S10) korespondující s bodem O10 (pouze pro RLF sestrojené na jiné než CF neuronů);
- intenzitu zvukového stimulu (S90) odpovídající bodu O90;
- dynamický rozsah RLF (na CF: $DR = Z90 - \text{práh}$; mimo CF: $DR = Z90 - Z10$);
- relativní počáteční sklon RLF – odvozen z normalizované RLF, vypočítán z úseku prvních 20 dB nad prahem, udává změnu hodnoty v procentech na dB;
- velikost maximální amplitudy.



Obr. 10. Schématické znázornění závislosti velikosti odpovědi neuronu na intenzitě zvukového stimulu (rate-level function, RLF). Průběh RLF je definován dvěma body relativní stupnice odezvy: 0 % (minimální amplituda odezvy, tzn. úroveň spontánní aktivity) a 100 % (maximální amplituda

odezvy); amplituda odezvy v bodě O10 a O90 odpovídá úrovni 10 a 90 % na stupnici a intenzitě zvuku v bodě Z10 a Z90.

RLF byla zařazena do skupiny saturujících, pokud se její průběh v úseku posledních deseti dB, tzn. na nejvyšších intenzitách zvukového stimulu, neměnil ($\pm 10\%$). RLF byla vyhodnocena jako nemonotónní v případě, že úroveň velikosti amplitudy RLF vyvolaná nejvyšší intenzitou zvukového stimulu byla nižší než maximální velikost amplitudy o víc než 20 %. Ostatní RLF byly definovány jako monotónní. Příklady třech typů RLF, které představují odpovědi třech různých neuronů, jsou zobrazeny na obr. 11A–C.



Obr. 11A–C. Typické příklady třech typů RLF sestavené z vyhlazených frekvenčně–intenzitních funkcí třech různých neuronů. (A) Jako saturující byla označena RLF, jejíž průběh se v úseku posledních 10 dB neměnil ($\pm 10\%$). (B) RLF byla stanovena jako nemonotónní v případě, že úroveň velikosti amplitudy RLF vyvolaná nejvyšší intenzitou zvukového stimulu byla nižší než maximální velikost amplitudy o víc než 20 %. Ostatní RLF byly označeny jako ryze monotónní (C).

V případě RLF měřených mimo oblast charakteristické frekvence neuronu, vzhledem k jejich vysokým excitačním prahům, nebyl dostupný dynamický rozsah dostatečný pro spolehlivé určení typu RLF, proto jsme se omezili pouze na určení dynamického rozsahu u nemonotónních RLF. RLF byly rozdělené do tří skupin podle charakteristické frekvence neuronů (I: 1–8 kHz, II: 8–16 kHz; III: > 16 kHz) a pro každou skupinu byla sestrojena průměrná relativní RLF. K tomu jsme použili obdobné metody jako Cai a spol. (2008). Před způměrněním byly jednotlivé hodnoty RLF normalizovány (jejich maximální hodnota byla stanovena jako 1 a minimální hodnotou byl práh odpovědi).

3.4.6. Histologická kontrola pozice elektrody

Na závěr každého měření neuronální aktivity bylo místo posledního vpichu elektrody v CCI označeno malou lézí způsobenou průchodem elektrického proudu skrze nejhlubší mikroelektrodu šestnáctikanálové sondy. V průběhu každého měření byla elektroda přemístěna třikrát až pětkrát v mediolaterálním směru CI, vzdálenost jednotlivých vpichů byla zhruba 500 μm , což umožnilo registrovat aktivitu neuronů v různých tonotopických oblastech. 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 mozky vyňaty a postfixovány po dobu několika dní při teplotě 4 °C. Na zmrazovacím mikrotomu byly nakrájeny frontální řezy ze zájmových oblastí o tloušťce 40 μm . Pro pomocnou orientaci při určování hranic jednotlivých oblastí colliculus inferior byly volné řezy barveny podle Nissla. Řezy byly inkubovány 20 minut v roztoku krezylóvé violeti (0,2 g krezylóvé violeti + 100 ml 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. Histologické vzorky byly prohlíženy pod světelným mikroskopem a byla provedena rekonstrukce jednotlivých pozic mikroelektrodové sondy v CI. Pouze neurony, které byly snímány v oblasti v centrální části CI, byly zařazeny do analýzy.

3.4.7. Statistické zpracování

Abychom posoudili statistickou významnost rozdílů průměrných hodnot dvou datových souborů (např. šířek excitačních a postranních inhibičních oblastí u kontrolních a experimentálních potkanů), použili jsme v případě shodného rozptylu dat nepárový t–test, v opačném případě různých rozptylů jsme použili Welchův test. Při testování rozdílů dvou

rozptylů nám posloužil F–test. Pro testování hypotézy, zda–li přítomnost postranních inhibičních polí souvisí s užšími FTC, jsme použili metodu logistické regrese.

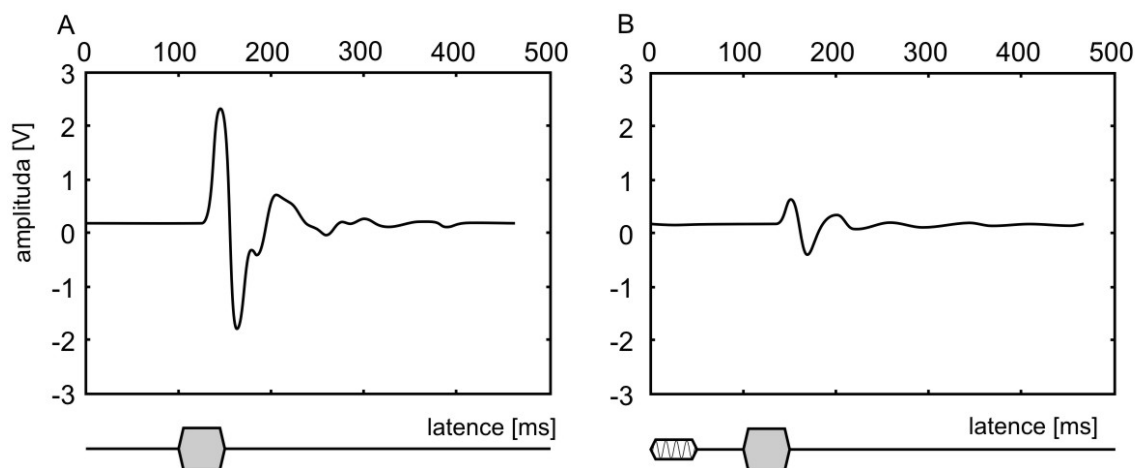
K porovnání procentuálního zastoupení neuronů disponujících určitými vlastnostmi (např. saturující RLF) byl použit Fisherův exaktní dvoustranný test. Podobnost rozložení neuronálních prahů byla testována pomocí Kolmogorova–Smirnova testu. Statistická analýza byla provedena pomocí programu Prisma 5 (GraphPad Software, Inc.) a Matlab 7 (The MathWorks, Inc.).

3.5. Vyšetření behaviorální reakce na zvukový podnět

Do behaviorální části experimentů bylo zavzato 7 potkanů, kteří byli 14. postnatální den vystaveni krátké expozici hluku (8 min, 125 dB SPL), a 7 kontrolních potkanů. Ve věku 3–5 měsíců probíhalo každodenní testování potkanů metodou měření velikosti úlekové reakce na zvukový podnět (acoustic startle reflex, ASR) a prepulzní inhibice úlekové reakce na zvukový podnět (prepulse inhibition, PPI).

ASR je přechodná motorická reakce na neočekávaný intenzivní sensorický podnět. Jedná se o primitivní behaviorální projev společný všem savcům, na jehož vzniku se podílí nervové okruhy zahrnující posteroventrální oddíl kochleárního jádra, jedno či více jader laterálního lemnisku, kaudální jádro retikulární formace, spinální interneurony a spinální motoneurony. Tato relativně jednoduchá reakce může být kvantitativně ovlivněna řadou faktorů, např. mezidruhovými rozdíly, denními rytmy, habituací, senzibilizací nebo prepulzní inhibicí, jejichž působením se její velikost zvětšuje nebo zmenšuje (pro přehled viz Koch a Schnitzler, 1997; Rybalko a spol., 2011). Měření ASR je široce využívaným modelem pro studium plastických dějů účastnících se zpracování senzomotorické informace a hojně se používá společně s prepulzní inhibicí při vyšetřování sluchové funkce.

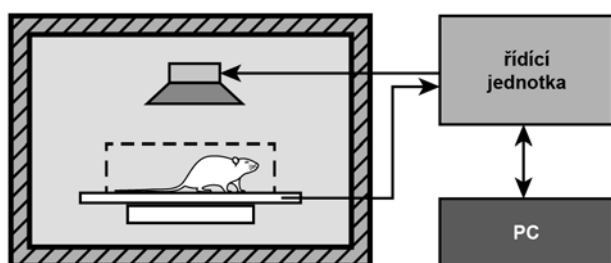
Prepulzní inhibice nebo–li potlačení úlekové reakce je způsobeno akustickým stimulem vloženým před samotný úlekový signál, který samotnou odpověď na úlekový signál zeslabuje (viz obr. 12A a B). Tento způsob potlačení standardního zpracování příchozí informace ukazuje základní princip nervových mechanismů pro kontrolu a regulaci chování, nezbytný pro organizační hierarchii nervových procesů. Nervové mechanismy odpovědné za prepulzní inhibici nejsou ještě zcela známy. Předpokládá se účast kochleárního jádra, colliculus superior, colliculus inferior a pedunkulopontinního jádra (pro přehled viz Koch a Schnitzler, 1997; Rybalko a spol., 2011).



Obr. 12A. Amplituda úlekové reakce (ASR) vyvolaná testovacím impulzem širokopásmového šumu o intenzitě 110 dB SPL. (B) Prepulzní inhibice ASR vyvolaná prepulzním tónem o intenzitě 60 dB.

3.5.1. Zařízení pro měření ASR a PPI

Behaviorální testování probíhalo ve zvukově izolované komoře (Coulbourn Habitest, model E10-21) ve zvukotěsné místnosti. V průběhu testování byl potkan umístěn do malé drátěné klece (160 × 58 × 90 mm), jejíž podlážka byla citlivá na pohyb. Motorický reflex zvířete byl snímán a převáděn pomocí piezoelektrického akcelerometru. Zesílený napěťový signál byl dále zpracován v zařízení TDT system III (RP 2.1 Enhanced Real-Time Processor) a v námi vytvořeném vyhodnocovacím programu v programovém prostředí MATLAB, viz obr. 13. Velikost úlekové reakce byla vyhodnocována v časovém rozmezí 100 ms od spuštění úlekového stimulu. Velikost amplitudy ASR byla určena maximální výchylkou střídavého napětí v časovém okně odpovědi. Úlekovými stimuly byly krátké tóny nebo krátké



Obr. 13. Ilustrační schéma testovacího zařízení pro ASR

impulzy hluku. Prepulzními stimuly byly krátké tóny generované v obou případech systémem TDT a vyvolané reproduktorem (SEAS, 29 AF/W) umístěným uvnitř komory. Nahrávání dat bylo řízeno námi vyrobeným programem v prostředí MATLAB. Zařízení bylo zkalibrováno ve frekvenčním rozmezí 1–32 kHz pomocí mikrofonu B&K 4939, připojenému k předzesilovači ZC0020 a zvukoměru B&K 2231.

3.5.2. Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět

Úleková reakce byla vyvolána zvukovými stimuly, kterými byly krátké tóny o frekvenci 2, 4, 8, a 16 kHz a širokopásmový šum o frekvenci 1,5–45 kHz (délka stimulů 50 ms s náběžnou a sestupnou hranou 5 ms). V každé testovací sérii byly měřeny reakce potkana na šest úlekových stimulů o různé intenzitě (70, 80, 90, 100, 110 a 120 dB SPL) a úroveň aktivity bez stimulu. Stimuly byly předkládány v nahodilém pořadí, přičemž každý stimul byl uveden desetkrát. Aby u zvířat nedocházelo vlivem častého opakování signálů k habituaci, byly mezi jednotlivými stimuly intervaly o trvání v průměru 15–40 s.

Pro každý typ stimulu byla vypočítána průměrná amplituda ASR; největší a nejmenší hodnota amplitudy ASR byla ze zprůměrnování vyloučena. Nejmenší intenzita testovacího stimulu, která vyvolala úlekovou reakci alespoň u 50 % případů z celkové prezentace stimulu, byla označena jako prahová hodnota ASR .

3.5.3. Měření prepulzní inhibice úlekové reakce

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

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

3.5.4. Statistické zpracování

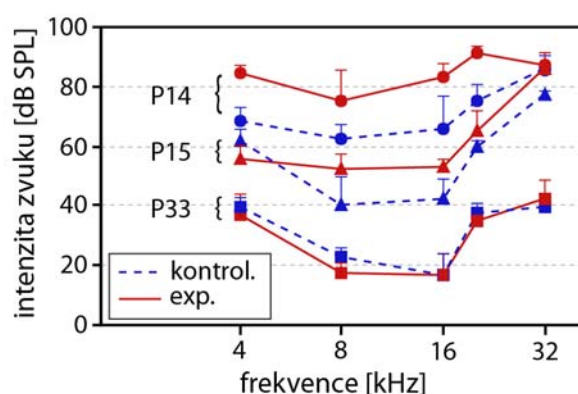
K ověření statistické významnosti rozdílů mezi průměrnými hodnotami ASR na různé typy stimulů mezi skupinami ohlušených a kontrolních potkanů byla použita analýza variance (analysis of variance, ANOVA) s následným Student–Newman–Keuls post hoc testem. Stejným způsobem byly testovány rozdíly mezi průměrnými hodnotami ASR na jednotlivých stimulech a účinnost prepulzní inhibice ASR v experimentálních skupinách. Rozdíly ve sklonech funkce PPI byly analyzovány pomocí t–testu

4. VÝSLEDKY

4.1. Změny sluchových prahů v průběhu vývoje a po krátké hlukové expozici

4.1.1. ABR audiogramy

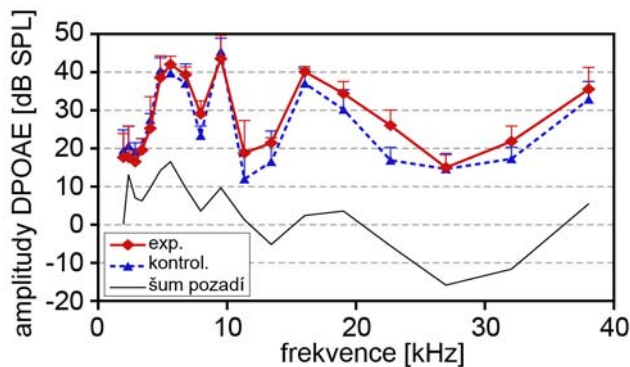
Účinek krátké expozice potkaních mláďat intenzivnímu hluku během kritické periody vývoje (širokopásmový šum o intenzitě 125 dB SPL po dobu 8 minut, 14. postnatální den) byl vyšetřován prostřednictvím registrace ABR. Prahy ABR byly měřeny ve skupině ohlušených potkanů ($n = 4$) 14. postnatální den jednu hodinu po expozici, 15. a 33. postnatální den a porovnány se sluchovými prahy kontrolních potkanů ($n = 4$). Průměrné ABR audiogramy ohlušených a kontrolních potkanů jsou ilustrovány na obr. 14. Průměrné sluchové prahy čtrnáctidenních potkanů se pohybovaly v rozmezí 62 dB SPL na 8 kHz až 88 dB SPL na 32 kHz. Hodnoty sluchových prahů čtrnáctidenních potkanů byly oproti sluchovým prahům dospělých jedinců zvýšené v průměru o 30 dB SPL na nízkých frekvencích a o 50 dB SPL na vysokých frekvencích. Pouhých 8 minut intenzivního hluku (125 dB SPL) způsobilo u potkaních mláďat posun sluchového prahu o 10 až 20 dB SPL ve frekvenčním rozsahu 1–20 kHz, měřený jednu hodinu po expozici. Následující dva týdny byly sluchové prahy ohlušených potkanů zvýšené oproti prahům kontrolních zvířat, s nejméně výrazným vzestupem na 8 a 16 kHz. Tři týdny po hlukové expozici se dočasně zvýšené sluchové prahy obnovily a byly srovnatelné se sluchovými prahy kontrolních potkanů.



Obr. 14. Průměrné ABR audiogramy registrované u ohlušených a kontrolních potkanů 14. postnatální den jednu hodinu po expozici, 15. a 33. postnatální den (P14, P15 a P33). Červeně jsou vyznačeny hodnoty ohlušených (exp.), modře kontrolních (kontrol.) zvířat; chybové úsečky představují S.E.M.

4.1.2. Distorzní produkty otoakustických emisí

U ohlušených a kontrolních potkanů byl 33. postnatální den zaznamenán typický tvar DP–gramů, pro který byla charakteristická přítomnost DPOAE v celé oblasti frekvenčního rozsahu 0,5–38 kHz (obr. 15). U ohlušených potkanů přesáhly hodnoty DPOAE šum pozadí v podobném rozsahu jako u kontrolních zvířat ($P>0,05$). Snímáním DPOAE u ohlušených zvířat v celé šíři měřeného frekvenčního pásma jsme se ujistili, že funkce vnějších vláskových buněk vnitřního ucha nebyla krátkou hlukovou expozicí trvale narušena. Toto zjištění podpořilo úsudek získaný na základě měření ABR, že krátká hluková zátěž nezpůsobila trvalé poškození orgánů vnitřního ucha, a příčinou dočasného posunu sluchových prahů by mohly být reverzibilní metabolické změny v periferním sluchovém systému.

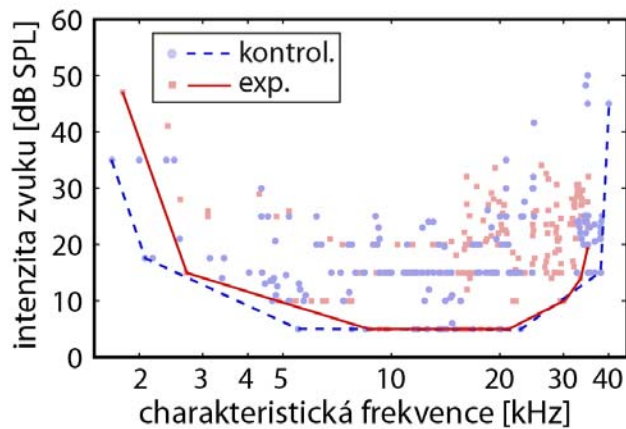


Obr. 15. Průměrné hodnoty DPOAE u ohlušených a kontrolních potkanů. Červeně jsou vyznačeny hodnoty ohlušených (exp.), modře kontrolních (kontrol.) zvířat; černě je vyznačena hladina šumu pozadí; chybové úsečky představují S.E.M.

4.1.3. Excitační prahy neuronů CCI u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku

U dospělých potkanů, kteří byli v mládí vystaveni hlukové zátěži, byl ve věku 2–3 měsíců registrován extracelulární záznam odpovědi jednotlivých neuronů CCI na zvukové podněty ($n = 197$) a výsledky byly porovnány s údaji zjištěnými ve skupině kontrolních potkanů ($n = 184$). Charakteristická frekvence každého neuronu byla určena na základě frekvenčně-intenzitního mapování CCI. Prahy odpovědi neuronů v závislosti na CF u ohlušených potkanů byly porovnány s prahy odpovědi neuronů kontrolních potkanů. Zjistili jsme, že raná expozice hluku neměla vliv na rozložení prahů jednotlivých neuronů v CCI a u ohlušených potkanů bylo rozložení prahů odpovědi srovnatelné s kontrolní skupinou ($P = 0,91$, Kolmogorovův-Smirnovův test). Hodnoty prahů odpovědi jednotlivých neuronů v závislosti na CF u kontrolních (modré symboly) a ohlušených (červené symboly) potkanů jsou znázorněny na obr. 16. Zjištění, že se ani nejnižší hodnoty prahů odpovědi neuronů CCI mezi experimentálními skupinami nelišily, bylo v souladu s výsledky ABR

audiogramů, které neukázaly žádné rozdíly ve sluchových prazích ohlušených a kontrolních potkanů.



Obr. 16. Prahy odpovědí jednotlivých neuronů v CCI. Rozložení prahů odpovědí u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku (červené symboly, exp.) a u kontrolních potkanů (modré symboly, kontrol.). Křivky spojující minimální hodnoty prahů

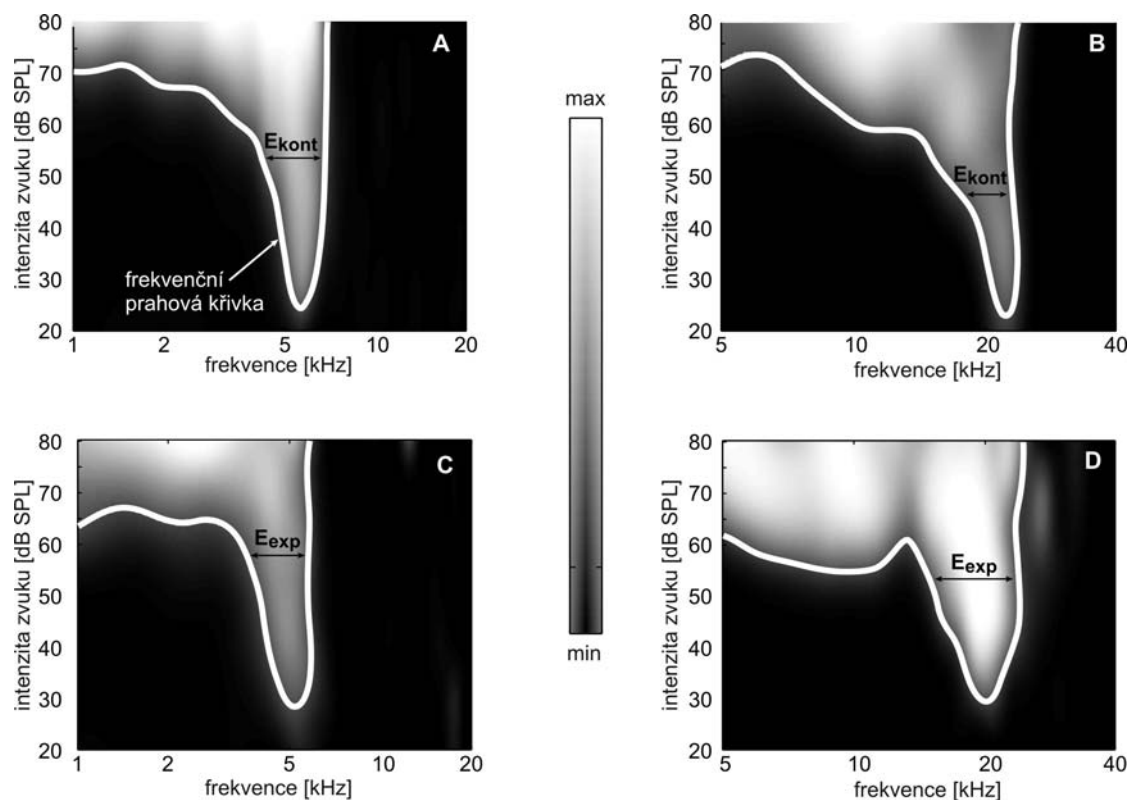
odpovědi neuronů CCI (tj. prahy nejcitlivějších neuronů) téměř reprezentují sluchové prahy dospělých potkanů (plná křivka, ohlušení potkani; přerušovaná křivka, kontrolní potkani).

4.2. Změny ve frekvenční selektivitě neuronů CCI u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku

4.2.1. Frekvenční prahové křivky neuronů CCI

Frekvenční prahová křivka jednotlivých neuronů v CCI byla získána z vyhlazené, frekvenčně–intenzitní funkce neuronu. Na obr. 17 jsou uvedeny typické příklady frekvenčních prahových křivek, které ohraničují excitační oblasti odpovědi neuronů CCI vyvolaných u kontrolního (A a B) a ohlušeného (C a D) potkana. Velikost odpovědi neuronu je znázorněna pomocí barevné škály od modré (minimální počet akčních potenciálů) po červenou (maximální počet akčních potenciálů); excitační oblast odpovědi je ohraničena bílou čarou, která označuje frekvenční prahovou křivku. Odstíny modré mimo excitační oblast neuronu zobrazují velikost spontánní aktivity neuronu. Abychom zjistili, zda jsou případné rozdíly FTC mezi neurony ohlušených a kontrolních potkanů frekvenčně specifické, rozdělili jsme neurony podle CF na nízkofrekvenční ($CF < 8$ kHz) a vysokofrekvenční ($CF > 8$ kHz). Když jsme mezi neurony ohlušených a kontrolních potkanů porovnali šířky frekvenčních prahových křivek s CF menší než 8 kHz, nelišily se. Frekvenční prahové křivky vysokofrekvenčních neuronů byly u ohlušených potkanů (D) statisticky významně širší v porovnání s kontrolními potkany (B) ($P < 0,001$). Šířka frekvenční prahové křivky souvisí

se schopností frekvenční selektivity neuronu; čím užší FTC, tím lepší schopnost frekvenční selektivity neuronu.



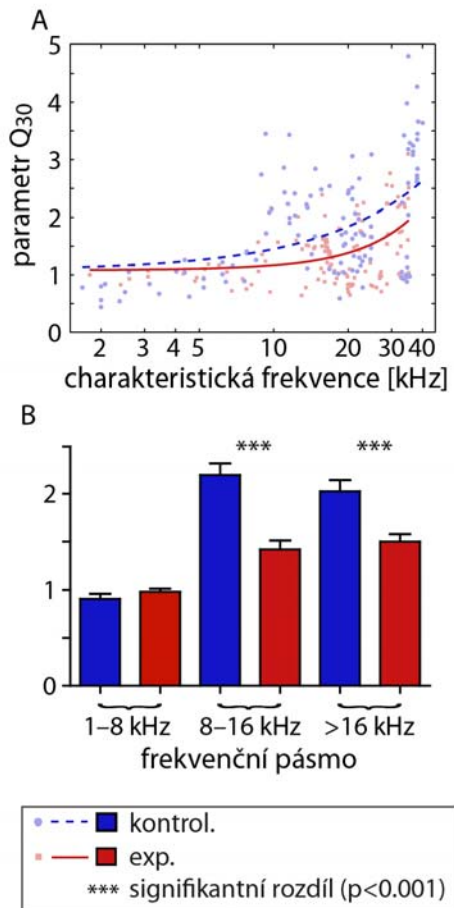
Obr. 17. Typické příklady frekvenčních prahových křivek registrované u jednotlivých neuronů CCI u kontrolního (A a B) a ohlušeného (C a D) potkana. Excitační oblast odpovědi je ohraničena bílou čarou, která označuje frekvenční prahovou křivku. Velikost odpovědi neuronu je znázorněna prostřednictvím odstínů šedé; bílá a černá symbolizují maximální a minimální velikost odpovědi neuronu na zvukový podnět.

4.2.2. Hodnoty parametru Q_{30} v závislosti na CF jednotlivých neuronů CCI

Úroveň frekvenční selektivity každého neuronu byla vyjádřena prostřednictvím parametru Q_{30} . Závislost parametrů Q_{30} na CF jednotlivých neuronů u kontrolních (modrý symbol) a ohlušených potkanů (červený symbol) je znázorněna na obr. 18A, spolu s křivkou kvadratické polynomicke regrese (plná křivka, ohlušení potkani; přerušovaná křivka, kontrolní potkani).

Abychom ověřili statistický význam rozdílných hodnot Q_{30} mezi oběma skupinami, analyzovali jsme hodnoty Q_{30} v závislosti na charakteristické frekvenci ve třech

nepřekrývajících se frekvenčních pásmech (I: 1–8 kHz; II: 8–16 kHz; III: >16 kHz) a vzájemně je porovnali (obr. 18B). V nejnižším frekvenčním pásmu (CF<8 kHz) se hodnoty Q_{30} mezi skupinami nelišily. Ve frekvenčních pásmech II a III měly neurony ohlušených potkanů statisticky významně nižší Q_{30} ve srovnání s kontrolními potkany ($P<0,001$).



Obr. 18A. Hodnoty parametrů Q_{30} v závislosti na charakteristické frekvenci neuronů CCI. Bodový diagram ukazuje závislost Q_{30} na CF u ohlušených (červený symbol, exp.) a kontrolních (modrý symbol, kontrol.) zvířat. Body jsou proloženy křivkou kvadratické polynomicke regrese (plná křivka, ohlušení potkani; přerušovaná křivka, kontrolní potkani).

(B) Průměrné hodnoty Q_{30} u neuronů s CF<8 kHz, 8–16 kHz a nad 16 kHz; červené sloupečky, ohlušení potkani (exp.); modré sloupečky, kontrolní potkani (kontrol.); chybové úsečky představují S.E.M; *** – $P<0,001$.

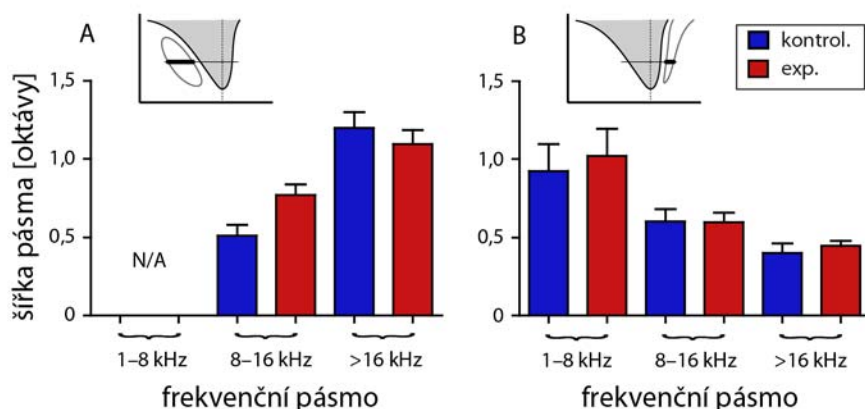
4.3. Změny v postranních inhibičních oblastech neuronů CCI u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku

4.3.1. Výskyt a šířka postranních inhibičních oblastí

Prostřednictvím dvoutónové stimulace jsme u každého neuronu vyšetřili výskyt postranních inhibičních oblastí a porovnali jsme počet neuronů s alespoň jednou postranní inhibiční oblastí (nízkofrekvenční nebo vysokofrekvenční) ve skupině ohlušených a kontrolních potkanů. Zjistili jsme, že ve skupině ohlušených zvířat bylo neuronů s výskytem alespoň jedné postranní inhibiční oblasti statisticky významně méně (59 %) v porovnání s kontrolní skupinou (75 %) ($P<0,001$, chí-kvadrát test). Ve skupině ohlušených

potkanů se vyskytovalo 50 % neuronů s nízkofrekvenční a 58 % s vysokofrekvenční postranní inhibicí. Ve skupině kontrolních potkanů bylo 63 % neuronů, u kterých jsme zjistili nízkofrekvenční postranní inhibiční oblast a 71 % neuronů, u kterých byla přítomna vysokofrekvenční inhibice. Většina neuronů s nízkofrekvenční inhibiční oblastí měla i vysokofrekvenční inhibiční oblast (98 % u ohlušených a 81 % u kontrolních potkanů).

U neuronů CCI s výskytem nízkofrekvenční a/nebo vysokofrekvenční postranní inhibiční oblasti byla měřena šířka inhibiční oblasti 30 dB nad prahem odpovědi neuronu. Jelikož ohlušená zvířata měla významně širší excitační oblasti odpovědi neuronů ve srovnání s kontrolními potkany, domnívali jsme se, že se toto rozšíření projeví i na šířce postranních inhibičních oblastí; předpokládali jsme, že inhibiční oblasti budou ve skupině ohlušených zvířat užší v důsledku rozšíření excitační oblasti. Porovnáním šířek nízkofrekvenčních a vysokofrekvenčních inhibičních oblastí jsme však nezjistili žádné rozdíly mezi skupinou ohlušených a kontrolních potkanů (obr. 19A a B).

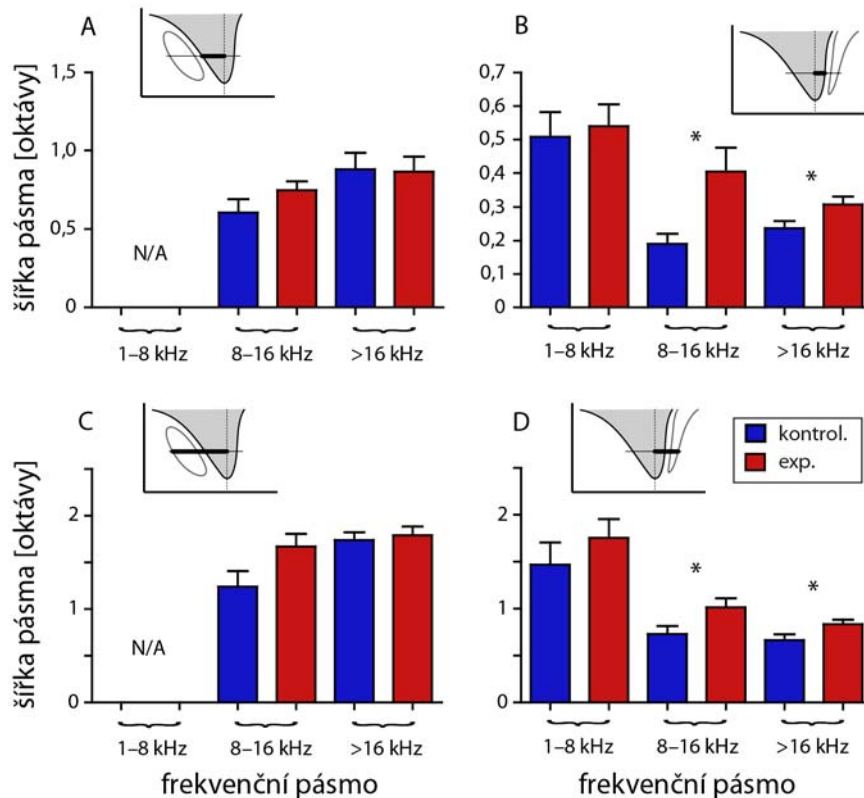


Obr. 19. Šířka nízkofrekvenční (A) a/nebo vysokofrekvenční (B) postranní inhibiční oblasti; červené sloupečky, ohlušení potkani (exp.); modré sloupečky, kontrolní potkani (kontrol.); chybové úsečky představují S.E.M;

4.3.2. Poloha nízkofrekvenčních a vysokofrekvenčních postranních inhibičních oblastí

Jelikož jsme nenalezli žádné změny v šířce postranních inhibičních oblastí neuronů ohlušených zvířat a naše domněnka o zužování postranních inhibičních oblastí v důsledku širších excitačních oblastí se nepotvrdila, provedli jsme podrobnější analýzu odpovědi neuronů s výskytem postranních inhibičních oblastí. U každého neuronu s nízkofrekvenční inhibiční oblastí jsme vyhodnocovali šířku excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence nižší než CF (viz též schéma na obr. 9, parametr ENF) a šířku excitační oblasti odpovědi

neuronu na frekvence nižší než CF včetně nízkofrekvenční postranní inhibiční oblasti (obr. 9, parametr CNF). U neuronů s výskytem vysokofrekvenční inhibiční oblasti jsme hodnotili šířku excitační oblasti odpovědi neuronů na frekvence vyšší než CF (obr. 9, parametr EVF) a šířku excitační oblasti odpovědi neuronů na frekvence vyšší než CF včetně vysokofrekvenční postranní inhibiční oblasti, viz schéma na obr. 9, parametr CVF).



Obr. 20. Parametry definující šířku odpovědi u neuronů CCI s výskytem nízkofrekvenční (A, C) a vysokofrekvenční (B, D) postranní inhibiční oblasti: šířka excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence nižší než CF (A); šířka excitační oblasti odpovědi neuronů na frekvence vyšší než CF (B); šířka excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence nižší než CF včetně nízkofrekvenční inhibiční oblasti (C); šířka excitační oblasti odpovědi neuronů na frekvence vyšší než CF včetně vysokofrekvenční inhibiční oblasti (D); červené sloupečky, ohlušení potkani (exp.); modré sloupečky, kontrolní potkani (kontrol.); chybové úsečky představují S.E.M.; * – $P < 0,05$.

Odpovědi neuronů s nízkofrekvenční postranní inhibiční oblastí se mezi ohlušenými a kontrolními potkany nelišily ani šířkou excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence nižší než CF, ani šířkou excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence nižší než CF včetně nízkofrekvenční inhibiční oblasti (obr. 20A a C) (t-test, $P > 0,05$) v žádném z hodnocených

frekvenčních pásem. Neuronální odpověď na nižší frekvence než byla CF neuronů zůstala u ohlušených potkanů beze změn.

U vysokofrekvenčních neuronů s CF nad 8 kHz, u kterých jsme registrovali vysokofrekvenční postranní inhibiční oblasti (obr. 20B a D), se změnila šířka excitační oblasti odpovědi neuronů na frekvence vyšší než CF (obr. 20B) a u neuronů ohlušených potkanů byla významně větší v porovnání s kontrolními zvířaty ($P < 0,05$ ve frekvenčních pásmech II a III). Také šířka excitační oblasti odpovědi neuronů na frekvence vyšší než CF včetně vysokofrekvenční inhibiční oblasti byla u ohlušených potkanů významně větší ($P < 0,05$ ve frekvenčních pásmech II a III) (obr. 20D). U neuronů s CF nad 8 kHz došlo ke změně polohy vysokofrekvenční inhibiční oblasti. Je možné, že hluková expozice potkanů v průběhu vývoje vedla ke strukturálním změnám nervových projekcí nad CF neuronů, které způsobily změny ve vysokofrekvenční inhibici. Posun nebo oslabení vysokofrekvenčních postranních inhibičních oblastí mohly být příčinou toho, že se excitační oblasti odpovědi neuronů v průběhu kritické periody vývoje nezúžily a zůstaly v porovnání s odpověďmi neuronů kontrolních zvířat široké.

4.3.3. Vliv postranních inhibičních oblastí na frekvenční charakteristiku neuronů CCI

Šířky frekvenčních prahových křivek u neuronů CCI s výskytem nízkofrekvenční a/nebo vysokofrekvenční postranní inhibiční oblasti byly statisticky významně užší v porovnání s FTC neuronů bez postranní inhibice, a to jak u ohlušených tak u kontrolních potkanů ($P < 0,05$ v obou skupinách).

Když jsme porovnali mezi experimentálními skupinami hodnoty parametru Q_{30} pouze u neuronů bez inhibičních oblastí, nelišily se ani v jednom ze tří frekvenčních pásem ($P > 0,05$ pro frekvenční pásmo I, II a III; viz Tabulka 1, levý sloupec). Přítomnost postranní inhibice tedy přispěla ke zúžení excitační oblasti odpovědi neuronu.

Neurony s nízkofrekvenční a/nebo vysokofrekvenční inhibiční oblastí měly srovnatelné parametry Q_{30} pouze v prvním frekvenčním pásmu (I, 1–8 kHz, $P > 0,05$; viz tabulka 1, pravý sloupec). Neurony s CF vyšší než 8 kHz měly ve skupině ohlušených potkanů hodnoty Q_{30} významně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou potkanů (čím nižší Q_{30} , tím širší FTC); u neuronů s vysokofrekvenční postranní inhibicí (II, $P < 0,01$; III, $P < 0,05$) jsme zjistili větší rozdíl ve velikosti parametru Q_{30} ve srovnání s neurony s nízkofrekvenční postranní inhibicí (II, $P < 0,001$; III, $P < 0,01$).

| Frekvenční pásmo | Neurony bez postranní inibiční oblasti | | | Neurony s postranní inibiční oblastí | | |
|------------------|--|-----------|--------|--------------------------------------|-----------|--------|
| | Kontrol. | Ohl. | P | Ohl. | Exp. | P |
| I: 1-8 kHz | N | N | N | 1,09±0,12 | 0,91±0,07 | 0,2784 |
| II: 8-16 kHz | 1,69±0,34 | 1,27±0,17 | 0,2672 | 2,26±0,13 | 1,46±0,13 | 0,0001 |
| III: >16 kHz | 1,58±0,24 | 1,28±0,09 | 0,2562 | 2,14±0,16 | 1,73±0,12 | 0,0461 |

Tabulka 1. Hodnoty parametru Q_{30} u neuronů CCI bez/s postranní inibiční oblastí u kontrolních a ohlušených zvířat. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty (\pm S.E.M.). Statistická významnost rozdílů mezi experimentálními skupinami byla testována nepárovým t -testem, P – hladina významnosti; data byla vyhodnocována ve třech nepřekrývajících se frekvenčních pásmech. N – nedostupná data.

4.4. Změny ve spontánní aktivitě neuronů CCI u potkanů ohlušených v mládí hluku

Míra spontánní aktivity byla vyhodnocována z frekvenčně-intenzitních oblastí odpovědí neuronů při stimulaci zvukovými podněty, které spadaly mimo frekvenční účinnost neuronu. Spontánní aktivita neuronů CCI registrovaná u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku byla celkově nižší než u kontrolních potkanů ($P < 0,01$). Když jsme úroveň spontánní aktivity vyhodnocovali v závislosti na CF neuronů, tedy odděleně ve třech frekvenčních pásmech (I, 1–8 kHz, II, 8–16 kHz, nad 16 kHz), rozdíl byl statisticky významný pouze ve druhém frekvenčním pásmu ($P < 0,001$, viz tabulka 2).

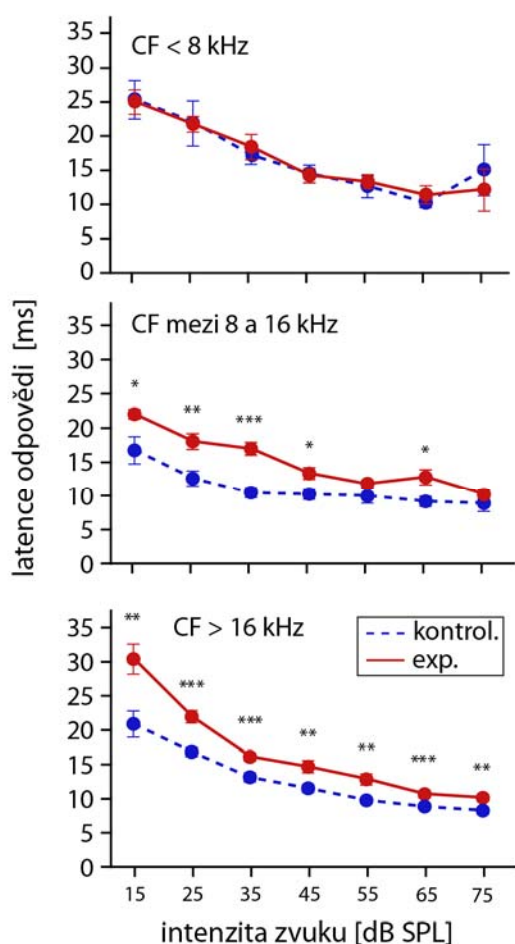
| Frekvenční pásmo | Kontrol. | Exp. | P |
|------------------|---------------------|---------------------|--------|
| I: 1-8 kHz | 0,0838 \pm 0,0575 | 0,1988 \pm 0,0532 | 0,1643 |
| II: 8-16 kHz | 0,8167 \pm 0,1466 | 0,0879 \pm 0,0229 | 0,0001 |
| III: >16 kHz | 0,2579 \pm 0,0574 | 0,1917 \pm 0,0372 | 0,3353 |

Tabulka 2. Spontánní aktivita (počet akčních potenciálů na jeden zvukový podnět o délce 100ms) u neuronů CCI kontrolních a ohlušených potkanů. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty spontánní aktivity neuronů (\pm S.E.M.) rozdělené do tří frekvenčních pásem. Statistická významnost rozdílů mezi experimentálními skupinami byla testována nepárovým t -testem, P – hladina významnosti; data byla vyhodnocována ve třech nepřekrývajících se frekvenčních pásmech.

4.5. Změny v kódování intenzity zvuku u neuronů CCI dospělých potkanů vystavených v mládí hluku

4.5.1. Latence odpovědi neuronů CCI na zvukové podněty

Latence odpovědi neuronů v CCI na zvukové podněty byly měřeny na CF neuronů v rozmezí intenzit 15–75 dB SPL, a na každé intenzitě byly stanoveny průměrné hodnoty latencí odpovědi registrovaných u kontrolních a ohlušených potkanů (obr. 21). Výsledné hodnoty byly porovnány mezi experimentálními skupinami odděleně ve třech frekvenčních pásmech. V prvním pásmu (I, CF < 8 kHz) nebyly nalezeny žádné rozdíly v latencích nervových odpovědí mezi experimentálními skupinami zvířat (nepárový t-test; $P > 0,4$



pro všechny intenzity zvukového podnětu). Ve druhém frekvenčním pásmu (II, 8–16 kHz) byly latence odpovědi neuronů CCI u potkanů vystavených v mládí hluku významně delší než u kontrolních potkanů (nepárový t-test; $P < 0,05$), a to na všech úrovních intenzity zvukového podnětu s výjimkou 55 a 75 dB SPL. Podobně ve třetím frekvenčním pásmu (CF nad 16 kHz) byly latence odpovědi neuronů statisticky významně delší u ohlušených potkanů na všech intenzitách zvukového podnětu (nepárový t-test; $P < 0,01$).

Obr. 21. Latence odpovědi neuronů CCI na zvukové podněty. Průměrné hodnoty latencí odpovědi registrovaných na CF neuronů byly stanoveny v rozmezí

*intenzit zvukových podnětů 15–75 dB SPL; plná křivka, ohlušení potkani (exp.); přerušovaná křivka, kontrolní potkani (kontrol.); chybové úsečky představují S.E.M.; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$).*

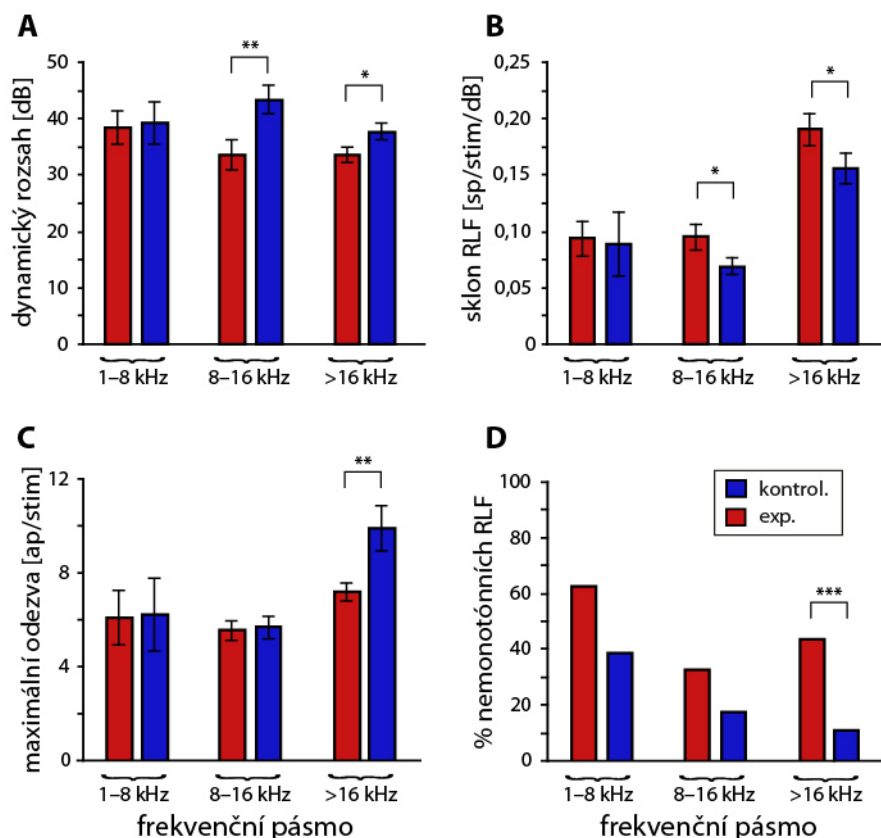
4.5.2. Změny ve velikosti odpovědi neuronů v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (rate-level function, RLF)

Schopnost kódování intenzity zvukového podnětu u neuronů CCI byla hodnocena prostřednictvím funkce popisující velikost nervové odpovědi v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (rate-level function, RLF). Funkce RLF byly měřeny na charakteristické frekvenci neuronů, a dále na frekvencích 4, 8 a 16 kHz. Parametry jednotlivých funkcí RLF (dynamický rozsah, počáteční sklon, úroveň saturace, procento monotónních a nemonotónních RLF, viz obr. 10) byly analyzovány ve třech frekvenčních pásmech.

4.5.2.1. Změny RLF na CF neuronů

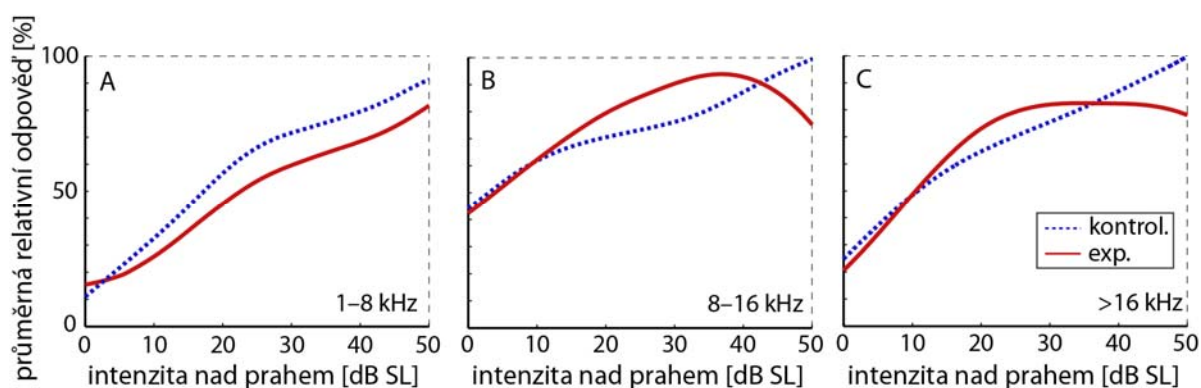
V populaci nízkofrekvenčních neuronů (I; 1–8 kHz) se průběh funkce RLF nelišil mezi experimentálními skupinami v žádném z hodnocených parametrů (obr. 22). Neurony ohlušených zvířat s CF ve středním frekvenčním pásmu (II: 8–16 kHz) měly významné rozdíly ve většině parametrů RLF ve srovnání s kontrolními zvířaty. RLF ohlušených potkanů měly užší dynamický rozsah (obr. 22A; nepárový t-test, $P = 0,01$), větší počáteční sklon (obr. 22B; nepárový t-test, $P < 0,01$) a dosahovaly saturace na nižších intenzitách stimulu (nepárový t-test, $P < 0,05$). To se odrazilo v menším počtu monotónních neuronů (Fisherův exaktní test, $P < 0,05$). Všechny změny parametrů RLF pozorované ve druhém frekvenčním pásmu byly přítomné i u neuronů s CF nad 16 kHz (III, CF > 16 kHz): RLF ohlušených zvířat měly užší dynamický rozsah (obr. 22A, nepárový t-test, $P < 0,05$), větší počáteční sklon (obr. 22B; nepárový t-test, $P < 0,001$), dosahovaly saturace na nižších intenzitách stimulu (nepárový t-test, $P < 0,01$), a procento monotónních neuronů bylo u ohlušených potkanů nižší (Fisherův exaktní test, $P < 0,001$). Pozorovali jsme i další změny: neurony ohlušených potkanů měly významně nižší maximální velikost odpovědi ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat (obr. 22C; nepárový t-test, $P < 0,01$) a procento nemonotónních neuronů bylo významně vyšší ve skupině ohlušených potkanů (obr. 22D; Fisherův exaktní test, $P < 0,001$).

Statisticky významné rozdíly v parametrech RLF vysokofrekvenčních neuronů u ohlušených zvířat se projevily také na průběhu průměrných relativních funkcí RLF, které byly sestrojeny pro jednotlivá frekvenční pásma v rozmezí intenzit 0–50 dB nad prahem ve skupině ohlušených a kontrolních potkanů (obr. 23A–C). Před zprůměrněním byly jednotlivé RLF normalizovány pomocí maximálních hodnot a zarovnány podle hodnot sluchových prahů.



Obr. 22. Funkční parametry RLF na CF neuronů: (A) dynamický rozsah, (B) relativní sklon stanovený 30 dB nad prahem, (C) maximální velikost odezvy, (D) procento nemonotónních RLF. Parametry byly vyhodnocovány ve třech frekvenčních pásmech (I, 1-8 kHz, II, 8-16 kHz, nad 16 kHz). Červené sloupce, ohlušení potkani (exp.); modré sloupce, kontrolní potkani (kontrol.); chybové úsečky představují S.E.M. (A-C: nepárový t-test, D a E: Fisherův exaktní test; * – $P < 0,01$, ** – $P < 0,05$, *** – $P < 0,001$).

Průměrná relativní funkce RLF neuronů v nejnižším frekvenčním pásmu ($CF < 8$ kHz) měla u ohlušených potkanů podobný průběh jako u kontrolních zvířat. Průměrné RLF neuronů s CF nad 8 kHz (frekvenční pásma II a III) se svým průběhem mezi experimentálními skupinami výrazně lišily: průměrné RLF ohlušených zvířat měly větší počáteční sklon, saturovaly dříve a jejich dynamický rozsah byl užší ve srovnání s kontrolními RLF. Ve frekvenčním pásmu II (8–16 kHz) měla průměrná RLF neuronů ohlušených zvířat nemonotónní průběh se zřetelným vrcholem a následným poklesem; ve frekvenčním pásmu III (>16 kHz) dosáhla průměrná RLF neuronů ohlušených potkanů saturace na nízké intenzitě stimulu, čímž obsáhla pouhých 30 dB intenzitního spektra zvuku.



Obr. 23A–C. Průměrné relativní RLF na CF neuronů. Pro jednotlivá frekvenční pásma (I: 1–8 kHz, II: 8–16 kHz, III: >16 kHz) byly zkonstruovány průměrné relativní RLF neuronů ohlušených (červená plná křivka, exp.) a kontrolních zvířat (modrá přerušovaná křivka, kontrol.). Průměrné RLF neuronů ohlušených zvířat s CF nad 8 kHz měly větší počáteční sklon, satureovaly dříve a měly užší dynamický rozsah. Ve druhém frekvenčním pásmu se průměrná RLF neuronů ohlušených zvířat vyznačovala nemonotónním průběhem a po dosažení maxima začala klesat; ve třetím frekvenčním pásmu dosáhla průměrná RLF neuronů ohlušených zvířat velmi brzy saturačního plateau.

4.5.2.2. Změny RLF na frekvencích 4, 8, a 16 kHz

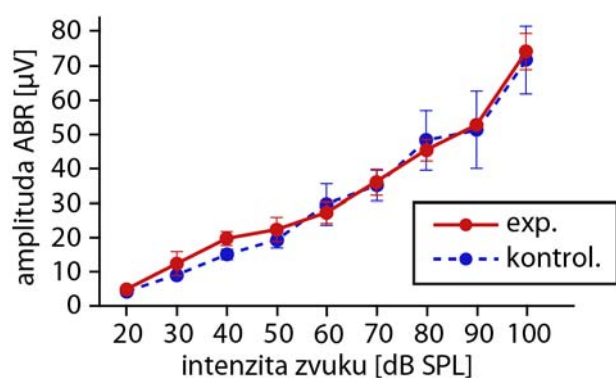
Změny RLF, které jsme pozorovali na charakteristických frekvencích vysokofrekvenčních neuronů (CF>8 kHz), byly vyšetřovány i na frekvencích mimo maximální frekvenční účinnost neuronů: na 4, 8 a 16 kHz. I zde se ve velké většině potvrdily rozdíly zjištěné při hodnocení RLF na CF neuronů: parametry RLF se lišily ve druhém a třetím frekvenčním pásmu (II a III, CF>8 kHz) s výraznějšími rozdíly ve třetím frekvenčním pásmu (CF>16 kHz). RLF neuronů ohlušených potkanů měly užší dynamický rozsah, satureovaly dříve a jejich maximální velikost odpovědi byla redukována v porovnání s kontrolními zvířaty. Podobně jako se mezi ohlušenými a kontrolními zvířaty nelišily odpovědi prahů neuronů na charakteristické frekvenci, byl v obou skupinách srovnatelný i parametr Z10, který označoval úroveň intenzity stimulu, při které amplituda odpovědi začala narůstat a dosáhla 10 % celkové velikosti (viz schéma Obr. 10) ($P>0,2$). To by mohlo znamenat, že ani excitační prahy mimo CF neuronů nebyly postiženy hlukovou expozicí.

Když jsme porovnali RLF s ohledem na frekvenci zvukového podnětu, zjistili jsme, že odezvy neuronů na tóny o frekvenci 4 kHz se mezi exponovanými a kontrolními potkany nelišily ani v jednom z frekvenčních pásem. Ukázalo se, že i vysokofrekvenční neurony,

jejichž reprezentace intenzity byla na charakteristické frekvenci narušena, měly zachovanou schopnost kódování intenzity nízkofrekvenčních stimulů.

4.5.3. Závislost amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu

V rámci registrace ABR jsme využili možnost zhodnotit funkci rozlišování intenzit zvuku i na úrovni periferního sluchového systému a stanovili jsme průměrnou funkci závislosti amplitudy ABR na intenzitě zvukového podnětu (amplitude-intensity function, AIF) u kontrolní a ohlušené skupiny zvířat. AIF jsme hodnotili na frekvenci 8 kHz, neboť posun sluchového prahu byl u ohlušených potkanů nejvýraznější právě na frekvenci 8 a 16 kHz. Zhruba tři týdny po hlukové expozici, kdy byly prahy ABR ohlušených zvířat srovnatelné se sluchovými prahy kontrolních potkanů, jsme porovnali průměrné AIF mezi oběma experimentálními skupinami (obr. 24). Průběh funkce AIF se mezi ohlušenou a kontrolní skupinou zvířat téměř nelišil ($P > 0,1$ na všech intenzitách zvukového podnětu). Tento výsledek podpořil předpoklad neporušené reprezentace intenzity zvuku na periferní úrovni sluchového systému.

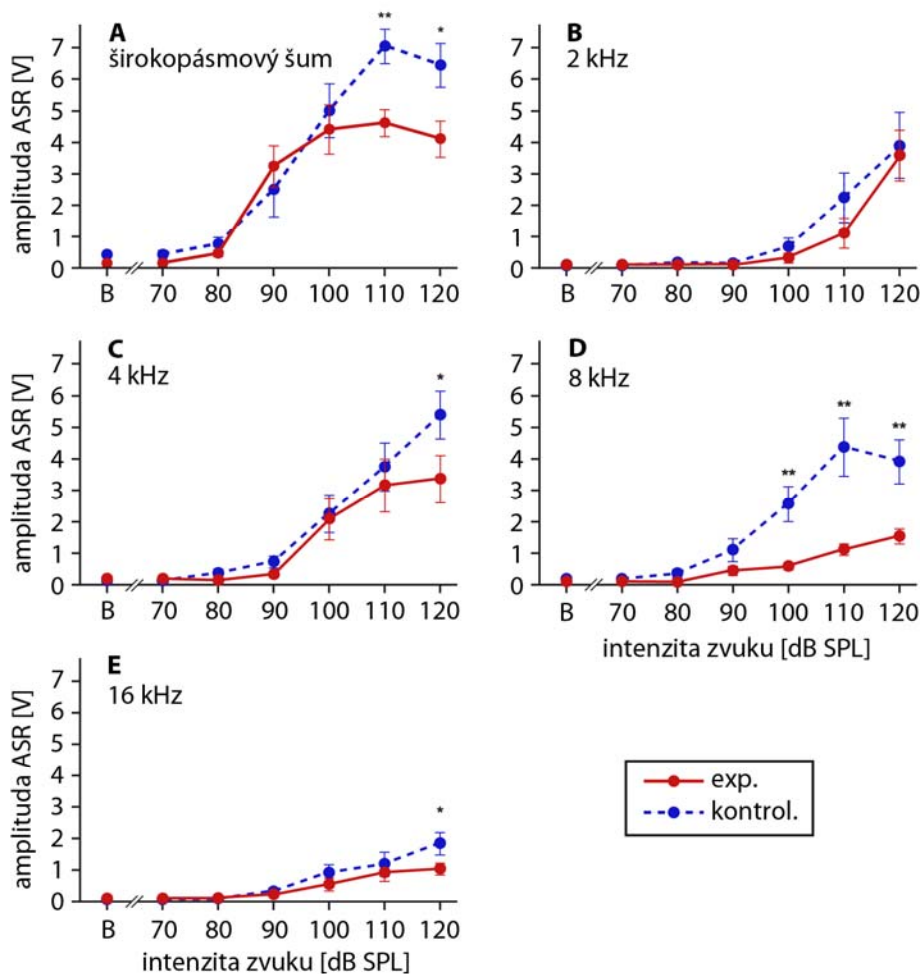


Obr. 24. Velikost amplitudy ABR v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (amplitude-intensity function, AIF). Průměrné funkce AIF na frekvenci 8 kHz registrované tři týdny po hlukové expozici u ohlušené (červená plná křivka, exp.) a kontrolní skupiny zvířat (modrá přerušovaná křivka, kontrol.); chybové úsečky představují S.E.M.

4.6. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku

4.6.1. Úleková reakce na neočekávaný zvukový podnět o vysoké intenzitě

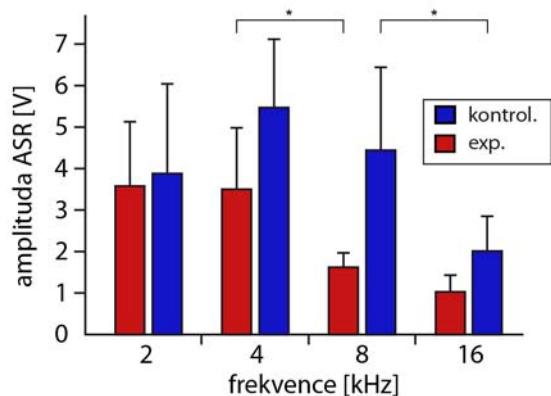
Změny funkčních vlastností neuronů CCI se u dospělých potkanů vystavených v mládí hluku projeví i na behaviorální úrovni. U dospělých potkanů jsme testovali vnímání zvuku prostřednictvím úlekové reakce na zvukový podnět (acoustic startle reflex, ASR). Průměrné amplitudy ASR vyvolané tónovými podněty o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz a bílým šumem ve skupině ohlušených a kontrolních zvířat jsou znázorněny na obr. 25.



Obr. 25. Velikost amplitudy úlekové reakce na neočekávaný zvukový podnět v závislosti na intenzitě zvukového podnětu. Zvukovými podněty byly: širokopásmový šum (A) a krátké tóny o frekvencích 2, 4, 8 a 16 kHz (B, C, D E); „B“ – bez stimulace; chybové úsečky – S.E.M.; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, ANOVA s Newman-Keuls post-hoc testy.

Podobně jako se mezi kontrolní a ohlušenou skupinou nelišily prahy kmenových vyvolaných odpovědí a prahy odpovědí jednotlivých neuronů CCI, ani prahy ASR ohlušených a kontrolních potkanů nebyly výrazně rozdílné: přibližně 100 dB SPL pro frekvenci 2 kHz, 80–90 dB SPL pro 4–16 kHz, a 70 dB SPL pro širokopásmový šum. Velikost amplitud ASR v rámci prahových hodnot byla mezi oběma experimentálními skupinami podobná. Naproti tomu amplitudy ASR vyvolané na vysokých intenzitách zvukových podnětů (110–120 dB SPL) byly u ohlušených potkanů statisticky významně nižší (s výjimkou amplitud ASR vyvolaných tónem o frekvenci 2 kHz, obr. 25).

V obou skupinách experimentálních zvířat byl patrný pokles amplitudy ASR v závislosti na vzrůstající frekvenci stimulu: vysokofrekvenční tóny vyvolaly výrazně menší amplitudu ASR ve srovnání s tóny o nízké frekvenci (obr. 26). U kontrolních potkanů došlo ke statisticky významnému poklesu amplitudy ASR na frekvenci 16 kHz ($P < 0,05$), u ohlušených potkanů byla amplituda ASR významně redukována již na frekvenci 8 kHz ($P < 0,05$) (Obr. 26).

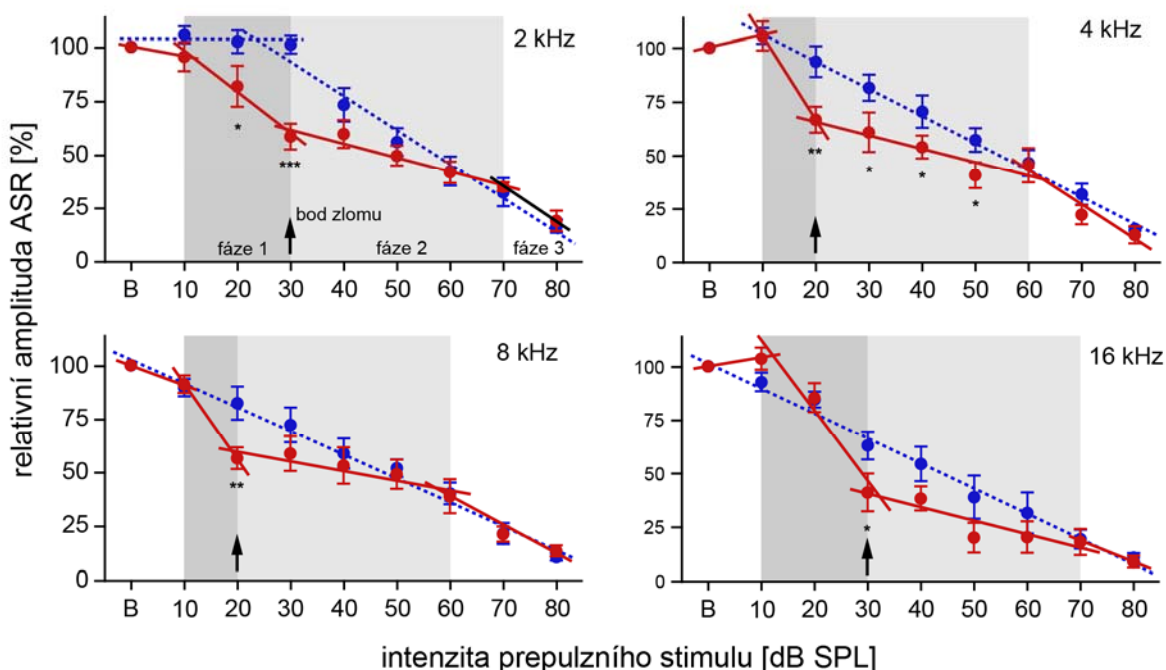


Obr. 26. Průměrná velikost ASR. Průměrné hodnoty ASR vyjádřené ve voltech stanovené na frekvencích 2, 4, 8 a 16 kHz při intenzitě zvukového podnětu 120 dB SPL u ohlušených (červené sloupečky; exp.) a kontrolních (modré sloupečky; kontrol.) zvířat; chybové úsečky představují S.E.M.; * – $P < 0,05$; ANOVA s Newman-Keuls post-hoc testy.

4.6.2. Prepulzní inhibice úlekové reakce na neočekávaný zvukový stimul

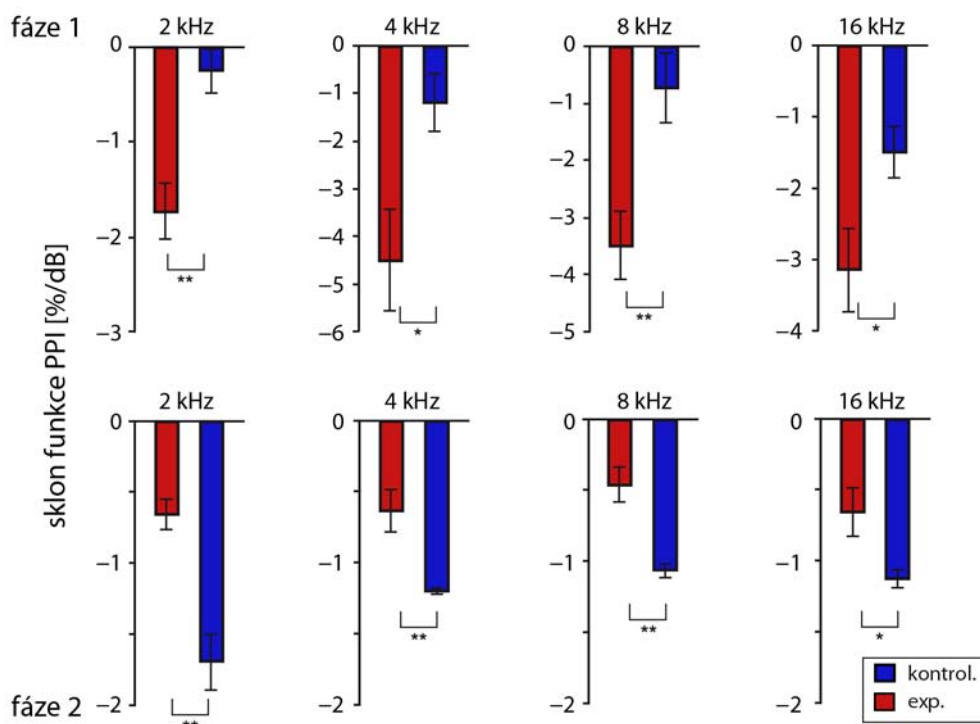
Účinek prepulzní inhibice (PPI) na velikost úlekové reakce (ASR) byl testován pomocí různých intenzit prepulzních tónů o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz. Obr. 27 znázorňuje průměrné relativní amplitudy ASR v závislosti na intenzitě prepulzního stimulu (funkce PPI); amplituda ASR, která není inhibovaná prepulzním stimulem, odpovídá hodnotě 100 % (hodnota označená jako „B“ na ose x). Funkce PPI u ohlušených a kontrolních potkanů mají zřetelně odlišný průběh. U kontrolních potkanů byl průběh funkce PPI charakterizován rovnoměrným poklesem, kterému v případě prepulzního stimulu 2 kHz předcházelo počáteční plateau (důsledek nedostatečného účinku prepulzní inhibice ASR na nízkých frekvencích zvukového podnětu). Průběh funkce PPI se u ohlušených potkanů vyznačoval strmým poklesem amplitudy ASR (tzn. výrazný efekt prepulzní inhibice) na nižších intenzitách prepulzního stimulu (20–30 dB SPL) následovaný fází pomalého poklesu amplitudy ASR (intenzita prepulzního stimulu od 20–30 dB SPL do 60–70 dB SPL), kdy úbytek intenzity prepulzního stimulu vedl pouze k nepatrným rozdílům ve velikosti amplitudy ASR. Statisticky významné rozdíly v průměrných hodnotách amplitud ASR mezi experimentálními skupinami byly detekovány na následujících úrovních intenzit prepulzní inhibice: 20 a 30 dB na 2 a 4 kHz, 20 dB na 8 kHz a 30 dB na 16 kHz.

S ohledem na tvar funkce PPI u ohlušených potkanů jsme její průběh rozdělili do tří intervalů (obr. 27, viz také tabulka 3). První fáze byla vymezená nejnižší intenzitou prepulzního stimulu, při které se velikost amplitudy ASR téměř nelišila od neinhibované čili 100% velikosti amplitudy ASR, a intenzitou tzv. bodu zlomu. Bod zlomu byl stanoven na úrovni prepulzní intenzity stimulu, při které byla amplituda ASR statisticky významně menší než amplituda ASR vyvolaná o 10 dB nižší intenzitou prepulzního stimulu a zároveň statisticky významně větší než amplituda vyvolaná o 10 dB vyšší intenzitou prepulzního stimulu. Funkce PPI v první fázi byla charakterizovaná strmým poklesem amplitudy ASR. Druhá fáze začínala intenzitou bodu zlomu a pokračovala v rozmezí následujících 40 dB intenzit prepulzního stimulu. Průběh funkce PPI ve druhé fázi byl definován pomalým poklesem amplitudy ASR, kdy přírůstek 10 dB prepulzní intenzity ve většině případů nezpůsobil statisticky významný vzestup účinnosti PPI. Třetí fáze měla doznívající charakter a průběh funkce PPI se v této části mezi ohlušenými a kontrolními zvířaty nijak nelišil.



Obr. 27. Účinnost prepulzní inhibice na velikost úlekové reakce vyjádřená křivkou lineární regrese pro skupinu ohlušených (červená plná čára) a kontrolních potkanů (přerušovaná modrá čára); 100% odpovídá velikosti neinhibované amplitudy ASR (ASR bez prepulzního stimulu označená „B“ na ose x).; první a druhá fáze průběhu funkce PPI jsou vymezeny odstíny šedé barvy; chybové úsečky představují S.E.M.; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$, *** – $P < 0,001$, ANOVA s Newman-Keuls post-hoc testy.

V rámci kvantitativní analýzy jsme porovnali tvar funkce PPI mezi kontrolními a ohlušenými zvířaty v první a druhé fázi průběhu, ve kterých byly funkce zřetelně odlišné. V obou fázích jsme zjistili rozdílný sklon funkcí PPI, a to v rámci všech testovaných frekvencí prepulzních stimulů. Sklon funkce PPI v první fázi průběhu byl u ohlušených potkanů statisticky významně větší ve srovnání s kontrolními potkany (obr. 28, horní panel). Ve druhé fázi měla funkce PPI u ohlušených potkanů statisticky významně menší sklon ve srovnání s kontrolními potkany (obr. 28, spodní panel).



Obr. 28. Sklon funkce PPI. Horní panel znázorňuje sklon funkce PPI v první fázi průběhu, spodní panel ve druhé fázi průběhu; červené sloupečky, ohlušení potkani (exp.); modré sloupečky, kontrolní potkani (kontrol.). Rozdíly byly měřeny použitím nepárového *t*-testu v průběhu první fáze, a regresní analýzy ve druhé fázi; chybové úsečky představují S.E.M.; * – $P < 0,05$, ** – $P < 0,01$.

Statistická významnost rozdílů v účinnosti různých intenzit prepulzních stimulů na změnu amplitudy ASR v průběhu druhé fáze PPI u ohlušených a kontrolních zvířat je ukázána v tabulce 3. Z tabulky je patrné, že vzestup prepulzní intenzity o 10 nebo 20 dB nevedl u ohlušených zvířat ani v jednom případě ke statisticky významnému poklesu

amplitudy ASR. Dokonce ani větší přírůstek intenzity prepulzního stimulu (>20 dB) často nezpůsobil žádnou výraznější změnu amplitudy ASR. Například rozdíl v účinnosti prepulzního stimulu (o frekvenci 8 kHz) na potlačení amplitudy ASR se mezi intenzitou prepulzního stimulu 20 a 60 dB SPL statisticky významně nelišil. Naproti tomu v kontrolní skupině byl nárůst intenzity prepulzního stimulu o 10 dB obvykle doprovázen statisticky významným poklesem amplitudy ASR; v případě vzestupu intenzity prepulzního stimulu o 20 dB byl statisticky významný pokles amplitudy přítomen vždy.

| Fáze 2 | | 2 kHz | | | | | 4 kHz | | | | | 8 kHz | | | | | 16 kHz | | | | | | | |
|-----------------------|----|-------|-----|-----|----|---|-------|-----|-----|----|----|-------|----|-----|-----|----|--------|---|----|-----|-----|----|----|---|
| kontrolní potkani | 30 | x | | | | | 20 | x | | | | | 20 | x | | | | | 30 | x | | | | |
| | 40 | *** | x | | | | 30 | ns | x | | | | 30 | ns | x | | | | 40 | ns | x | | | |
| | 50 | *** | ** | x | | | 40 | ** | ** | x | | | 40 | *** | * | x | | | 50 | ** | * | x | | |
| | 60 | *** | *** | * | x | | 50 | *** | ** | ns | x | | 50 | *** | ** | ns | x | | 60 | *** | ** | ns | x | |
| | 70 | *** | *** | *** | ns | x | 60 | *** | *** | ** | ns | x | 60 | *** | *** | ** | * | x | 70 | *** | *** | * | ns | x |
| exponování potkani | 30 | | | | | | 20 | x | | | | | 20 | x | | | | | 30 | x | | | | |
| | 40 | ns | | | | | 30 | ns | x | | | | 30 | ns | x | | | | 40 | ns | x | | | |
| | 50 | ns | ns | | | | 40 | ns | ns | x | | | 40 | ns | ns | x | | | 50 | ns | ns | x | | |
| | 60 | ns | ns | ns | | | 50 | * | ns | ns | x | | 50 | ns | ns | ns | x | | 60 | * | ns | ns | x | |
| | 70 | ** | * | ns | ns | | 60 | ns | ns | ns | ns | x | 60 | ns | ns | ns | ns | x | 70 | ** | ns | ns | ns | x |

Tabulka 3. Analýza rozdílů v účinnosti různých intenzit prepulzních stimulů na změnu amplitudy ASR v průběhu druhé fáze PPI u ohlušených a kontrolních zvířat. Přírůstek intenzity 10 dB; frekvence prepulzních stimulů 2, 4, 8 a 16 kHz; ANOVA s Newman-Keuls post hoc testem.

5. DISKUZE

5.1. Vliv hluku na nezralý sluchový systém potkana v průběhu kritické periody vývoje

Vývoj centrálního sluchového systému v období kritické periody je aktivní děj, který se odvíjí v závislosti na zvukových projevech vnějšího prostředí. Přerušování dodávky akustických stimulů v čase finálního dozrávání sluchové dráhy může narušit průběh zpřesňování reprezentace frekvence a intenzity zvukových podnětů v jednotlivých neuronech sluchové dráhy (Sanes a Constantine-Paton, 1985b; Pierson a Snyder-Keller, 1994; Zhang a spol., 2001; Chang a Merzenich, 2003; Insanally a spol., 2009). Vliv zvukové stimulace na vyvíjející se sluchový systém v průběhu kritické periody je popisován řadou studií. Například anomální změny v tonotopii primární sluchové kůry potkanů vystavených v průběhu kritické periody jednotvárnému zvukovému prostředí, popisují práce Zhang a spol., 2001; Zhang a spol., 2002; Chang a Merzenich, 2003; Nakahara a spol., 2004; Bao a spol., 2004. Podobně je i sluch člověka v průběhu vývoje ovlivňován charakterem zvukových podnětů přicházejících z okolního prostředí; vyvíjející se schopnost kojence rozlišovat fonemickou strukturu rodného jazyka je zjevným projevem tvárnosti sluchového systému přizpůsobit se stávajícímu zvukovému prostředí. Například u dětí s chronickým zánětem středouší byla negativně ovlivněna kvalita binaurálního slyšení (Moore a spol., 1991). Děti vyrůstající s rozštěpem patra a uzavřenou Eustachovou trubicí, které nepodstoupily chirurgický zákrok v raném věku, měly horší jazykové schopnosti a narušenou schopnost čtení (Dorf a Curtin, 1982; Richman a spol., 1988).

Studie, které se zabývají morfologickými nebo funkčními změnami centrálního sluchového systému způsobenými nedostatečnou zvukovou stimulací v průběhu vývoje, využívají dvou hlavních metodických přístupů. V prvním případě jsou zvířata umístěna do prostředí, jehož zvukové pozadí je cíleně upraveno (Sanes a Constantine-Paton, 1985b; Poon a Chen, 1992; Chang a Merzenich, 2003). Druhým způsobem, který umožňuje sledování projevů plasticity, je přímá manipulace sluchového systému, například monoaurální deprivace prostřednictvím unilaterální kochleární ablace (Killackey a Ryugo, 1977; Gabriele a spol., 2000b). Je však otázkou, zda změny v nervové aktivitě centrálního sluchového systému po tak radikální zásahu, jakým je permanentní destrukce periferní části sluchové dráhy ještě před začátkem slyšení, jsou opravdu důsledkem patologického průběhu vývoje nebo důsledkem léze samotné. Ve srovnání s tím nabízí krátká expozice intenzivního hluku provedená v určitém úseku senzitivní periody vcelku účinné řešení, jak navodit trvalé změny v centrálním sluchovém systému bez trvalého poškození periferie. V naší práci jsme přisun

zvukové stimulace v průběhu kritické periody omezili dočasným zvýšením sluchových prahů. K navození dočasného posunu sluchového prahu jsme použili stejný model hlukové expozice, která byla použita ve studii Pierson a Snyder-Keller (1994). Krátká expozice intenzivnímu hluku (8 min, 125 dB SPL) ve 14. postnatálním dni vedla u potkanů k posunu sluchových prahů registrovaných 1 hodinu po expozici o 10–20 dB ve frekvenčním rozsahu 1–20 kHz. V průběhu následujících dvou týdnů zůstaly sluchové prahy dočasně zvýšené ve srovnání s kontrolními zvířaty. Třetí týden po hlukové expozici se sluchové prahy vrátily a jejich hodnoty byly srovnatelné s hodnotami kontrolních zvířat. Protože ani měření distorzních produktů otoakustických emisí třetí týden po hlukové expozici neukázalo žádné změny v aktivitě vnějších vláskových buněk vnitřního ucha, předpokládali jsme, že příčinou dočasného posunu sluchových prahů by mohly být reverzibilní metabolické změny ve sluchovém systému, v rámci kterých se uvažuje například excitotoxicita nebo zvýšená přítomnost iontů vápníku v cytoplazmě vnějších vláskových buněk (pro přehled viz Syka, 2002). Jistěže existuje možnost reziduálních patologických změn v hlemýždi vnitřního ucha a ve sluchovém nervu, které by mohly být způsobeny hlukovou expozicí v průběhu kritické periody. Nicméně registrací DPOAE jsme ukázali normální fyziologický stav vnějších vláskových buněk a měřením ABR sluchových prahů a hodnocením funkce AIF jsme minimalizovali pravděpodobnost změn ve zpracování akustického signálu na úrovni periferního sluchového systému. Tím jsme podpořili předpoklad, že raná expozice hluku nevedla u potkanů k trvalému poškození periferie sluchového systému, ale způsobila změny na centrální úrovni, které přetrvávaly až do dospělého věku potkanů.

5.2. Změny ve frekvenční charakteristice neuronů CCI

Rozsah přenášeného pásma akustických signálů u jednotlivých neuronů ve sluchovém systému lze popsat prostřednictvím šířky excitační oblasti odezvy neuronu, kterou opisuje frekvenční prahová křivka. U potkana jsou základy frekvenční reprezentace v centrálních sluchových jádrech přítomné již před začátkem slyšení (Friauf, 1992). Zralých parametrů však dosahují frekvenční prahové křivky neuronů 1–2 týdny po začátku slyšení; u nezralých jedinců jsou frekvenční prahové křivky širší než u dospělých zvířat (Aitkin a Moore, 1975; Moore a Irvine, 1979; Shneron a Willott, 1979; Chang a spol., 2005).

Předpokládá se, že vývoj tonotopické organizace ve sluchových jádrech centrálního systému neprobíhá najednou v celém frekvenčním rozsahu, ale byl prokázán postupný průběh maturace FTC podél tonotopické osy sluchových struktur. Představy o tom, v jakém směru probíhá vývoj tonotopie sluchové dráhy, se v rámci literárních zdrojů liší. Například Shneron

a Willot (1979) uvedli, že dozrávání frekvenčních prahových křivek neuronů v CCI u myši ve věku P12–P14 probíhá podél tonotopické osy od nízkých po vysoké frekvence. Nízkofrekvenční neurony měli čtrnáctý postnatální den FTC srovnatelné s dospělými jedinci, zatímco vysokofrekvenční FTC byly široké, bez typicky ostrých křivek připomínajících tvar písmene „V“. Podobný trend ve vývoji FTC popsali u různých živočišných druhů v jednotlivých oddílech sluchové dráhy Aitkin a Moore, 1975; Moore a Irvine, 1979; Sanes a Constantine-Paton, 1985a, b; Walsh a McGee, 1987; Romand a Ehret, 1990; Pierson a Snyder-Keller, 1994. Některé studie však zastávají opačný názor a včasnější vývoj předpokládají ve vysokofrekvenčních oblastech než v oblastech nízkofrekvenčních (Altman a Bayer, 1981; Kandler a Friauf, 1993; Gabriele a spol., 2000a). Ať už je trend ve vytváření tonotopické organizace sluchových struktur jakýkoliv, zásah do sluchového systému v určitém období kritické periody pravděpodobně ovlivní pouze jistou část frekvenčního spektra (Pierson a Snyder-Keller, 1994; Constantine-Paton, 1983).

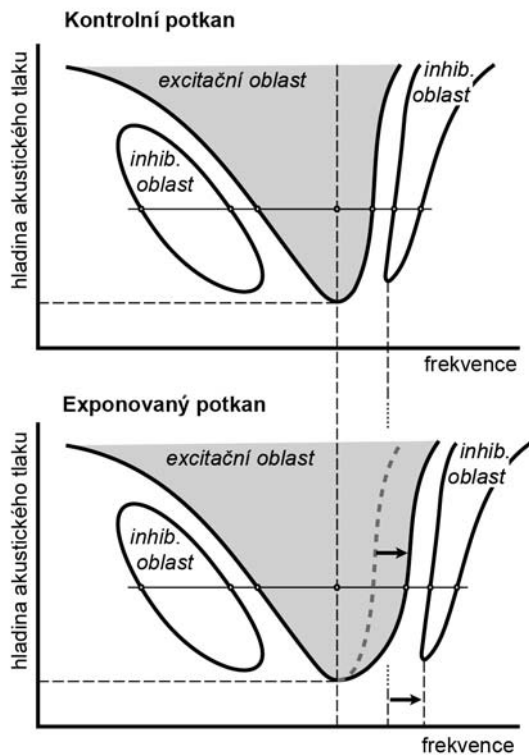
Vlastnosti odpovědi neuronu jsou z velké části určovány poměrem excitačních a inhibičních vstupů. Na počátku vývoje přijímá neuron široké excitační a inhibiční projekce a jeho odezva je tudíž málo specifická. Široký rozsah přenášeného frekvenčního spektra detekovaný u nezralých neuronů částečně odráží široký frekvenční rozsah vstupní akustické informace z nižších úrovní sluchové dráhy (Moore, 1983). Na zužování frekvenčního rozsahu jednotlivých neuronů v průběhu vývoje se pravděpodobně podílí mechanismy centrálního původu, například interneuronální inhibiční spoje (Brown a spol., 1978; Sanes a Constantine-Paton, 1985b). Podle Gabriele a spol. (2000a) jsou základy inhibičních projekcí do colliculus inferior přítomny již v samém začátku postnatálního vývoje, struktura těchto nezralých nervových inhibičních spojů je však difuzní a postrádá finální koncept tonotopicky organizovaných spojů. Teprve v průběhu prvních týdnů postnatálního vývoje se pod vlivem akustické stimulace vyhraňuje topografie inhibičních nervových okruhů a nadbytečné inhibiční synapse jsou funkčně i strukturálně odstraňovány. Konečným výsledkem postnatální eliminace nadbytečných synaptických spojů jsou úzce laděné frekvenčně-intenzitní oblasti odpovědí neuronů vedoucí ke zvýšené frekvenční specializaci neuronu (Kandler, 2004). Chang a spol. (2005) se zabývali změnami inhibičních oblastí neuronů primární sluchové kůry v průběhu postnatálního vývoje. Zjistili, že se zužují podobně jako excitační oblasti odpovědí neuronů a z původně širokých, frekvenčně málo specifických oblastí se stávají úzké, frekvenčně vyhraněné postranní inhibiční oblasti. Průběh finálního dozrávání excitačních a inhibičních spojů sluchového systému je řízený spontánní nebo vyvolanou zvukovou stimulací (Sanes a Takács, 1993; Gabriele a spol., 2000a, b; Zhang et al., 2001). Krátkodobá

expoziční intenzivního hluku, které byli potkani v našem experimentu 14. postnatální den vystaveni, vedla ke změnám nervových odpovědí vysokofrekvenčních neuronů CCI. Neurony s CF nad 8 kHz měly široké frekvenční prahové křivky, které připomínaly FTC nezralých potkanů. Je možné, že dočasné zvýšení sluchových prahů v průběhu senzitivní periody omezilo tok akustických informací do vyvíjejícího se sluchového systému, a narušilo tak fyziologický vývoj inhibičních nervových spojů ve vysokofrekvenčních oblastech CCI. Předpokládáme, že vývoj nízkofrekvenčních oblastí CCI mohl být 14. postnatální den již ukončen, a proto nedošlo k žádným změnám odpovědí nízkofrekvenčních neuronů.

Změny frekvenčních vlastností neuronů v CCI uvedli Sanes a Constantine-Paton (1983) u myši, které byly v rané fázi vývoje opakovaně vystavené signálům širokopásmového šumu: efekt hlukové expozice byl zaznamenán v podobě rozšířených FTC u neuronů s CF mezi 10 a 15 kHz. Zhang (2001) popsal široké FTC u neuronů ve sluchové kůře potkanů vystavených v období kritické periody (P9–P28) expozici širokopásmového šumu. Zajímavá byla zjištění prezentovaná ve studii Chang a Merzenich (2003), kteří sledovali účinek dlouhodobé expozice širokopásmového hluku (70 dB SPL, P7–P50) na vývoj FTC neuronů ve sluchové kůře potkana. Narozdíl od našich výsledků, efekt hlukové expozice, který se projevil rozšířením FTC, nebyl trvalý a dva měsíce po hlukové expozici byly FTC ohlušených potkanů srovnatelné s FTC stejně starých kontrolních zvířat. To mohlo být způsobeno rozdílnou metodikou, například vyšší intenzitou hlukové expozice použitou v našem experimentu (125 dB SPL), nebo odlišnou úrovní plasticity v colliculus inferior a ve sluchové kůře. Podobně jako v našem případě, ani ve většině ostatních prací neměla ohlušená zvířata trvalé změny sluchových prahů. Na základě toho předpokládáme, že fenomén rozšířených FTC nesouvisí s kochleárním poškozením, ale spíše ukazuje na změny centrálních nervových spojů. Je možné, že vlivem snížené stimulace sluchového systému nedošlo k finálnímu zužování aferentních projekcí do CCI a zůstala u nich zachována původní struktura širokých nervových spojů typická pro nezralý sluchový systém.

5.3. Změny v rozložení dvoutónové inhibice u neuronů CCI

V naší práci jsme pozorovali u dospělých potkanů ohlušených v mládí hluku snížené procentuální zastoupení neuronů s výskytem dvoutónové inhibice. Zjistili jsme, že v populaci neuronů bez výskytu postranní inhibiční oblasti se mezi ohlušenými a kontrolními potkany šířky FTC nelišily ani v jednom z vyhodnocovaných frekvenčních pásem (I, 1–8 kHz; II, 8–16 kHz; III, nad 16 kHz). Dále jsme zjistili, že přítomnost postranní inhibice souvisela se šířkou FTC a neurony s postranními inhibičními oblastmi měly významně užší FTC;



Obr. 29. Schématické znázornění excitační a postranních inhibičních oblastí odpovědi neuronu u kontrolního (nahore) a ohlušeného (dole) potkana. Po hlukové expozici došlo k rozšíření excitační oblasti odpovědi neuronu na frekvence vyšší než CF a k posunu vysokofrekvenční inhibiční oblasti.

ustálily mezi P27–P35. Rozdíly ve výskytu postranních inhibičních oblastí nebyly jediným projevem změn v inhibičním systému dospělých potkanů ohlušených v mládí hluku. Odpovědi vysokofrekvenčních neuronů ($CF > 8$ kHz), u kterých jsme registrovali postranní inhibiční oblasti, měly rozšířené excitační oblasti odpovědi neuronů na frekvence vyšší než CF a posunutá postranní inhibiční oblasti směrem k vysokým frekvencím (viz obr. 20B, D a schéma na obr. 29). Nízkofrekvenční části excitačních oblastí zůstaly nezměněny a též poloha nízkofrekvenčních inhibičních oblastí se nijak nezměnila.

přítomnost postranní inhibiční oblasti byla pro šířku FTC stěžejní. Menší výskyt postranních inhibičních oblastí v CCI ohlušených potkanů jsme nepřisuzovali celkové absenci inhibičních vstupů do konkrétních neuronů. Spíše jsme předpokládali, že vlivem snížené akustické stimulace pravděpodobně nedošlo k finální redukci inhibičních synaptických spojů a inhibiční projekce, které zůstaly široce rozprostřené, nevytvořily viditelné postranní inhibiční oblasti. Souvislost mezi šířkou FTC a výskytem postranní inhibice uvedli u neuronů ve sluchové kůře potkana i Chang a spol. (2005). Podobně jako my předpokládali, že excitační oblasti odpovědi neuronů se v průběhu vývoje zužují v důsledku rozšiřování postranních inhibičních oblastí. Zjistili však, že inhibiční oblasti neuronů podstupují stejné změny jako excitační oblasti a v průběhu kritické periody se zužují. Rozdíl byl pouze v délce maturace: zatímco excitační oblasti dosahovaly dospělých hodnot v časovém rozmezí P20–P27, hodnoty šířek inhibičních oblastí se

5.4. Změny ve spontánní aktivitě

Působení krátké expozice hluku v období rané fáze vývoje významně ovlivnilo spontánní aktivitu neuronů ve středním frekvenčním pásmu (II, 8–16 kHz), která byla až desetkrát nižší v porovnání s kontrolní skupinou potkanů. Podle Lippeho (1994) je úroveň spontánní aktivity neuronů v nezralém sluchovém systému velmi nízká a s dozráváním centrálního nervového systému se zvyšuje. Nízká úroveň spontánní aktivity registrovaná u dospělých potkanů v našem experimentu, by mohla být dalším ukazatelem nervové nezralosti, obzvláště pak ve středním frekvenčním pásmu, které bylo hlukem nejvíce postiženo.

5.5. Vliv hluku na kódování intenzity zvuku

Většina prací, která se zabývá problematikou vývojových poruch sluchového systému, je zaměřena zejména na změny ve frekvenčním naladění a v tonotopickém uspořádání sluchových struktur (Sanes a Constantine-Paton, 1985a; Zhang a spol., 2001; Chang a Merzenich, 2003; Chang a spol., 2005; Zhou a spol., 2008). My jsme se zabývali trvalými důsledky rané expozice hluku na reprezentaci intenzity zvuku u neuronů CCI dospělých potkanů. Změny intenzitních parametrů neuronů CCI, které jsme registrovali u dospělých zvířat vystavených v mládí hlukové expozici, byly odlišné, mnohdy až protikladné ve srovnání se změnami, které bývají popisovány v případě akustického traumatu v dospělosti. Ty se vyznačují celkovým nárůstem nervové vzrušivosti, oslabenou inhibicí a sníženým výskytem nemonotónních neuronů (např. Salvi a spol., 2000). My jsme registrovali naopak snížení maximální nervové odezvy a vyšší zastoupení nemonotónních RLF.

Rozdílný efekt hluku v období dospělosti a v průběhu vývoje je však vcelku pochopitelný, neboť vlastnosti sluchového systému jsou tehdy značně odlišné: zatímco akustické trauma v dospělosti působí na plně vyvinutý systém, kdy je úroveň plastických dějů obecně nižší, raná intervence hluku působí na nezralé nervové obvody. Na základě našich výsledků se domníváme, že v důsledku omezené zvukové stimulace v průběhu kritické periody nedošlo k úplnému dokončení vývoje nervových spojů v CCI. RLF, které jsme naměřili u neuronů ohlušených zvířat, měly typické vlastnosti nezralého sluchového systému: saturace na nižších intenzitách stimulu, užší dynamický rozsah a strmější počáteční sklon. Neurony v nezralém sluchovém systému mají menší dynamický rozsah (Woolf a Ryan, 1985; Sanes a Rubel, 1988) a menší velikost nervové odezvy (Moore a Irvine, 1980; Brugge a O'Connor, 1984; Sanes a Rubel, 1988) v porovnání s dospělými jedinci. Sanes a Rubel

(1988) uvedli, že RLF u neuronů v laterálním jádře olivy superior v nezralém sluchovém systému křečka (P13–16) má strmější průběh než je tomu u dospělých zvířat. Poměr hladiny excitace a inhibice je v nezralém nervovém systému jiný než v dospělosti a úroveň inhibice je v rané fázi vývoje vyšší (Kandler, 2004); to by mohlo souviset s užším dynamickým rozsahem a menší velikostí nervové odpovědi pozorované u nezralých jedinců. Podobně jako my se Gao a spol. (2009) zabývali změnami v reprezentaci intenzity zvuku ve sluchovém systému dospělých potkanů ohlušených v průběhu kritické periody hlukové zátěži. Zjištění této skupiny se v mnohém shodovala s našimi výsledky: neurony sluchové kůry dospělých potkanů vykazovaly užší dynamický rozsah, strmějším nárůstem RLF a delší latence odpovědi korových neuronů. Narozdíl od nás zaznamenali zvýšené prahy odpovědi u neuronů ohlušených potkanů, což mohlo být způsobeno rozdílným typem hlukové expozice; potkaní mláďata byla v období mezi 15. a 28. postnatálním dnem vystavena přerušované expozici širokopásmovému šumu o intenzitě 80 dB SPL.

V našem experimentu jsme naměřené RLF rozdělili do tří skupin: nemonotónní, saturující a striktně monotónní. U ohlušených potkanů jsme zjistili statisticky významně nižší zastoupení ryze monotónních neuronů, což bylo vyváženo zvýšeným počtem neuronů nemonotónních. Zvýšený podíl nemonotónních RLF ve sluchové kůře potkanů vystavených v průběhu kritické periody kontinuální tónové expozici popsal také de Villers-Sidani a spol. (2007). Vycházíme-li z informace, že procento nemonotónních neuronů v centrálním sluchovém systému v průběhu postnatálního vývoje klesá (Bonham a spol., 2004) a nemonotónní průběh RLF je dán součinností excitace a inhibice na různých intenzitách zvuku (Wu a spol., 2006), mohl by zvýšený počet nemonotónních RLF teoreticky svědčit ve prospěch zvýšené úrovně inhibice naznačující nezralost sluchového systému (Wilson a Leon, 1986; Sanes a Rubel, 1988; Sanes, 1993; Thornton a spol., 1999). Nepřímým dokladem zesílené inhibice může být model tzv. odmaskování (Salvi a spol., 2000): jestliže odmaskování excitační oblasti odpovědi neuronu potlačením inhibice vedlo ke změně nemonotónní RLF na monotónní, převrácená změna monotónní RLF v nemonotónní by mohla být vysvětlena obráceně, tj. zvýšenou úrovní inhibice.

Změny v parametrech jednotlivých RLF u ohlušených potkanů se rovněž významně odrazily na rozdílném průběhu průměrných relativních RLF, a to opět pouze v limitovaném frekvenčním spektru nad 8 kHz. Průměrné RLF vysokofrekvenčních neuronů CCI se vyznačovaly větším počátečním sklonem, saturací na nižších intenzitách zvuku nebo nemonotónním průběhem RLF a užším dynamickým rozsahem. Na základě toho jsme předpokládali, že by se pozorované změny RLF mohly odrazit nejen na zhoršeném vnímání

hlasitosti, ale i na celkovém rozsahu vnímání a rozlišování intenzit zvuku. Intenzita zvuku je kódována četností výbojů akčních potenciálů relevantní skupiny neuronů. Aby bylo možné rozpoznat mezi dvěma různými intenzitami zvuku, musí být efekt souhrnných reakcí příslušných skupin neuronů do jisté míry odlišný (Green a Swets, 1966; Colburn a spol., 2003). V ideálním případě by průměrné relativní RLF měly ryze monotónně rostoucí průběh v závislosti na intenzitě zvukového stimulu. S ohledem na výsledný průběh průměrných RLF v našem experimentu by se změny v rozlišování intenzit zvuku daly teoreticky očekávat v úzkém rozsahu nadprahových intenzit, kde byl nárůst RLF rychlejší než u kontrolních zvířat. To se potvrdilo, když jsme průběh průměrné RLF ohlušených zvířat porovnali s průběhem funkce PPI. Rychlý nárůst průměrné funkce PPI v první fázi průběhu, tj. na nižších úrovních prepulzní intenzity (20–30 dB SPL), odpovídal většímu počátečnímu sklonu průměrné RLF v rozmezí nadprahových intenzit zvukových podnětů. Rychlé změny PPI by mohly souviset s tzv. recruitment fenoménem – fenoménem nadprahového vyrovnání hlasitosti, kdy s narůstající intenzitou zvuku velmi rychle vzrůstá hlasitost vjemu a zhoršuje se srozumitelnost. Naopak malé změny v účinnosti prepulzní inhibice ve druhé fázi PPI, tj. do 60–70 dB SPL intenzity prepulzního stimulu, které odpovídaly nemonotónnímu tvaru RLF na vyšších intenzitách zvukového stimulu, poukázaly na zhoršenou schopnost rozlišování intenzit ve středním frekvenčním pásmu.

Prostřednictvím registrace ABR byly vyhodnoceny také velikosti amplitud ABR v závislosti na intenzitě zvukového podnětu (amplitude-intensity function, AIF). Podobný průběh průměrných funkcí AIF mezi experimentálními skupinami podpořil náš předpoklad, že schopnost kódování intenzity zvuku na periferní úrovni sluchového systému nebyla hlukovou expozicí narušena. Přestože intenzita hluku, které byli potkani v průběhu kritické periody vystaveni, byla poměrně vysoká (125 dB SPL), vedla pouze k dočasnému posunu sluchových prahů (o 15–20 dB). Během následujících dvou týdnů došlo k úplné obnově periferní sluchové funkce, což potvrdily nejen ABR audiogramy a výsledné funkce AIF, ale i DP-gramy vypovídající o fyziologickém stavu vnějších vláskových buněk. Proč nedošlo vlivem hlukové expozice o vysoké intenzitě (125 dB SPL) k trvalému poškození periferního sluchového systému si vysvětlujeme tím, že sluchové prahy potkaních mláďat byly čtrnáctý postnatální den ještě výrazně zvýšené v porovnání se sluchovými prahy dospělých jedinců (pohybovaly se v rozmezí od 62 dB SPL na 8 kHz do 88 dB SPL na 40 kHz). Intenzita hlukové expozice tak byla pro nezralý sluchový systém potkaních mláďat na úrovni 40–60 dB nad jejich sluchovými prahy.

5.6. Latence odezvy

U ohlušených potkanů jsme registrovali delší latence nervových odpovědí vysokofrekvenčních neuronů (CF nad 8 kHz). V literatuře se uvádí, že delší latence neuronálních odpovědí jsou ukazatelem nezralého nervového systému a řada prací pojednává o zkracování latencí odpovědí neuronů v průběhu vývoje sluchového systému (Brugge a O'Connor, 1984; Sanes a Rubel, 1988; Ehret a Romand, 1992; Kral a spol., 2005; de Villers-Sidani a spol., 2007). Delší latence odezev u dospělých potkanů ohlušených hluku v průběhu kritické periody popsal také Gao a spol. (2009). Jedná se tedy o další parametr charakterizující nezralost sluchového systému, který u jedinců vystavených hluku v průběhu kritické periody nevymizel, a přetrval až do dospělosti.

5.7. Změny v behaviorální reakci na zvukový podnět u potkanů vystavených v mládí hluku

U dospělých potkanů ohlušených v mládí hluku jsme naměřili menší velikost úlekové reakce na intenzivní zvukový stimul (ASR), a to ve frekvenčním rozsahu 4–16 kHz. Domníváme se, že menší amplitudy ASR by mohly být behaviorálním projevem snížené nervové vzrušivosti, která byla u neuronů v CCI u ohlušených zvířat naměřena. Menší velikost amplitud ASR, snížená úroveň maximální odpovědi neuronů, užší dynamický rozsah RLF a menší počet monotónních neuronů jsou znaky přisuzované projevům nezralého sluchového systému. V souvislosti s nezralým centrálním sluchovým systémem se uvádí zvýšená úroveň inhibice.

Zjištění, že vysokofrekvenční tóny v porovnání s nízkofrekvenčními vyvolaly výrazně nižší amplitudy ASR, odpovídala výsledkům ostatních studií (Carlson a Willott, 1996; Pilz a spol., 1987; Błaszcyk a Tajchert, 1997). Velké amplitudy úlekové reakce vyvolané nízkofrekvenčními signály mohou souviset s významem nízkofrekvenčních podnětů v přirozeném prostředí zvířat (Błaszcyk a Tajchert, 1997). Přestože sluch potkanů je citlivější na vysoké frekvence a komunikace mezi potkany probíhá převážně pomocí ultrazvukových vokalizací, přijímají sluchové podněty v širokém frekvenčním rozsahu a nízké frekvence jsou důležitou složkou vokalizací signalizujících bolestivý vjem (Jourdan a spol., 1995). Je tedy možné, že větší velikost amplitud ASR vyvolaných nízkofrekvenčními podněty souvisí s vyšší pravděpodobností přežití potkanů v jejich přirozeném prostředí. Tento fenomén je částečně zobrazen ve tvaru frekvenčních prahových křivek sluchových neuronů. Například neurony v kochleárním jádře jsou citlivé nejen na charakteristických frekvencích, ale odpovídají také na nízkofrekvenční stimuly o vysoké intenzitě (Evans, 1975).

Pokles amplitud ASR v závislosti na rostoucí frekvenci zvukového podnětu byl zřetelný v obou experimentálních skupinách. V případě kontrolní skupiny potkanů se projevil statisticky významný pokles amplitudy ASR na 16 kHz, ve skupině ohlušených potkanů vykazovaly amplitudy ASR významnou redukcí již na 8 kHz. Obdobné výsledky byly pozorovány u myšího kmene C57BL s geneticky podmíněnou progresivní ztrátou vysokofrekvenčního sluchu (Parham a Willott, 1988). Během prvního roku došlo u myší k poklesu amplitudy ASR ve frekvenčním rozmezí 4–16 kHz bez zřetelných změn sluchových prahů. Autoři to vysvětlovali jako projev snížené vzrušivosti centrálního nervového systému. Jak bylo diskutováno v předešlé kapitole, nezralý sluchový systém se vyznačuje nižší mírou vzrušivosti v porovnání se sluchovým systémem dospělého jedince (Moore a Irvine, 1980; Mysliveček J., 1983; Brugge a O'Connor, 1984). Redukce amplitudy ASR, která se v případě ohlušených potkanů vyskytovala na nižších frekvencích (8 kHz) než u kontrolních zvířat (16 kHz), by mohla být způsobena nezralostí nervových obvodů ve vysokofrekvenčních oblastech centrálního sluchového systému.

Výsledky testování účinku prepulzní inhibice na velikost ASR odhalily u ohlušených potkanů řadu anomálií. Zvyšování intenzity prepulzního stimulu u kontrolních potkanů vedlo obecně k plynulému zvyšování účinnosti PPI. V případě ohlušených potkanů měla funkce PPI zcela odlišný průběh, který se vyznačoval třemi rozdílnými fázemi. V první fázi průběhu funkce PPI, tj. na nižších úrovních prepulzní intenzity (20–30 dB SPL), jsme pozorovali silný účinek prepulzní inhibice na velikost ASR, což mohlo naznačovat přítomnost již zmiňovaného tzv. recruitment fenoménu (fenomén nadprahového vyrovnání hlasitosti). V průběhu dalšího navyšování intenzity prepulzního stimulu (do 60–70 dB SPL, fáze 2) byly změny v účinnosti prepulzní inhibice statisticky nevýznamné a naznačovaly snížené vnímání rozdílů hlasitosti mezi danými zvukovými podněty. Zvýšená účinnost PPI vyvolaná tóny o střední frekvenci a nízké intenzitě byla popsána u potkanů po ototoxické léčbě neomycinem (Young a Fechter, 1983) nebo u myšího kmene C57BL v raném stádiu dospělosti (Carlson a Willott, 1996; Parham a Willott, 1988). Autoři Carlson a Willott (1996) považovali tento fenomén za projev patologicky zesílené reakce sluchového systému na určitý zvukový podnět, jehož význam byl pro zvíře umocněn, a to zřejmě v důsledku plastických změn navozených sluchovou ztrátou (Kaas, 1991; Popelář a spol., 1994; Salvi a spol., 2000).

Předpokládáme, že odchylky funkce PPI pozorované u ohlušených potkanů souvisely se změnami v reprezentaci intenzity zvuku zjištěnými na úrovni jednotlivých neuronů CCI. Přestože nervové okruhy účastníci se mechanismu PPI nejsou ještě zcela známy, předpokládá se účast colliculus inferior, colliculus superior a jiných centrálních sluchových struktur včetně

sluchové kůry (Ison a Hammond, 1971; Swerdlow a spol., 2001; Carlson a Willott; 1996). Lze tedy očekávat, že abnormality pozorované ve funkci PPI odráží především změny na úrovni centrálního sluchového systému. Na základě souvislostí mezi výsledky získanými měřeními jednotlivých neuronů v CCI a behaviorálními metodami se domníváme, že změny v reakcích ohlušených potkanů na zvukové podněty registrované metodami měření ASR a PPI jsou v souvislosti s narušeným zpracováním akustického signálu na úrovni CCI.

6. SOUHRN PRÁCE

V naší práci jsme popsali změny v nervové aktivitě centrálního sluchového systému, které byly způsobeny krátkou expozicí intenzivního hluku v průběhu postnatálního vývoje. Uvedené nálezy upozorňují na skutečnost, že ačkoli hluková intervence nezpůsobila trvalé poškození periferie (kochleý a sluchového nervu), omezení zvukové stimulace v období kritické periody způsobené dočasným zvýšením sluchových prahů zásadně narušilo strukturální vývoj centrálních nervových spojů. Sledování účinku hluku na vyvíjející se sluchový systém nám umožnilo zařazení zástupců potkaního kmene Long-Evans, kteří byli čtrnáctý postnatální den vystaveni krátké expozici intenzivnímu hluku (8 min, 125 dB SPL). Poznatky uveřejněné v této práci jsme získali prostřednictvím elektrofyziologických měření nervové aktivity v CCI, zejména frekvenční charakteristiky a reprezentace intenzity u neuronů CCI a behaviorálními metodami určenými pro vyšetřování reakcí na zvukové podněty.

Změny ve frekvenční diskriminaci u neuronů CCI

Krátká expozice potkaních mláďat intenzivnímu hluku (8 min, 125 dB SPL) čtrnáctý postnatální den způsobila pouze dočasný posun sluchových prahů (10–20 dB v celém frekvenčním sluchovém rozsahu); v průběhu následujících dvou týdnů byly hodnoty sluchových prahů ohlušených potkanů srovnatelné s hodnotami kontrolních potkanů. Nicméně registrace neuronů v CCI dospělých potkanů zasažených hlukovou expozicí v průběhu kritické periody vývoje ukázala trvalé změny v nervové aktivitě, které se projeví především u vysokofrekvenčních neuronů (CF nad 8 kHz) zhoršenou schopností frekvenční diskriminace. Přestože rozložení prahových odezev se mezi experimentálními skupinami nelišilo ($P = 0,91$, Kolmogorovův-Smirnovův test), vysokofrekvenční neurony ohlušených potkanů měly významně širší FTC ve srovnání s kontrolními potkany ($P < 0,001$ pro obě frekvenční pásma II a III). Dále jsme zjistili, že zastoupení postranních inhibičních oblastí bylo u neuronů ohlušených potkanů výrazně nižší (59 %) než u neuronů kontrolních potkanů (75 %) ($P < 0,001$, chí-kvadrát test), a že přítomnost postranních inhibičních oblastí významně korelovala se šířkou FTC; neurony s alespoň jednou postranní inhibiční oblastí měly významně užší FTC v porovnání s neurony bez postranní inhibice, a to v obou experimentálních skupinách ($P < 0,05$). Původní hypotézu, jež by vysvětlovala rozšíření excitačních oblastí neuronálních odezev v důsledku zužování postranních inhibičních oblastí vlivem hlukové expozice jsme nepotvrdili, neboť šířka postranních inhibičních oblastí se mezi

experimentálními skupinami neuronů nelišila. Podrobnější analýzou jsme odhalili změny v umístění vysokofrekvenčních inhibičních oblastí relativně vůči excitační oblasti u neuronů ohlušených potkanů s CF nad 8 kHz: vysokofrekvenční inhibiční oblasti byly posunuty směrem k vysokým frekvencím, což umožnilo rozšíření excitační oblasti odpovědi neuronu. Úroveň spontánní nervové aktivity byla u ohlušených potkanů významně nižší, a to v případě vysokofrekvenčních neuronů s CF 8–16 kHz ($P < 0,001$).

Rozdíly mezi experimentálními skupinami byly v rámci všech hodnocených parametrů nejvýraznější ve frekvenčním pásmu II (8-16 kHz), což zřejmě souviselo s účinkem hlukové expozice, který byl nejintenzivnější právě ve středním frekvenčním pásmu; sluchové prahy ve frekvenčním rozmezí nad 20 kHz byly ovlivněny méně. Dočasné zvýšení sluchových prahů v průběhu kritické periody částečně omezilo přístup zvukové stimulace, která je pro správný vývoj centrálního sluchového systému nezbytná. Předpokládáme, že excitační a především inhibiční aferentní projekce v CCI ohlušených zvířat se vlivem nedostatečné stimulace nespécializovaly a zůstaly široce rozprostřené. Důsledkem byly široké excitační oblasti a menší výskyt jasně definovatelných postranních inhibičních oblastí u odpovědi vysokofrekvenčních neuronů. Vývoj nízkofrekvenčních oblastí v CCI byl již čtrnáctý postnatální den pravděpodobně dokončen, neboť odpovědi nízkofrekvenčních neuronů ohlušených zvířat se v porovnání s kontrolními zvířaty nelišily v žádném z hodnocených parametrů.

Změny v kódování intenzity zvuku u neuronů CCI

Krátké akustické trauma v průběhu postnatálního vývoje trvale ovlivnilo nejen frekvenční charakteristiku neuronů v CCI, ale porušilo také reprezentaci intenzity zvuku v CCI. Účinek hlukové expozice v průběhu vývoje byl výrazně odlišný od účinku hluku v dospělosti. Zatímco hluková zátěž v dospělosti způsobuje nárůst vzrušivosti centrálního sluchového systému, úbytek inhibičního vlivu a pokles počtu nemonotónních neuronů, hluková expozice čtrnáctý postnatální den vedla ke snížení maximální odezvy vysokofrekvenčních neuronů (CF nad 16 kHz) o 30 % ($P < 0,01$) a k téměř čtyřikrát většímu nárůstu nemonotónních RLF ($P < 0,001$). Jednotlivé funkce RLF u neuronů s CF nad 8 kHz měly větší počáteční sklon (II, 8–16 kHz, $P < 0,01$; III, >16kHz, $P < 0,001$), saturovaly dříve a měly užší dynamický rozsah (II, 8–16 kHz, $P < 0,01$; III, >16kHz, $P < 0,05$). Obdobné vlastnosti RLF (strmější průběh, menší dynamický rozsah a menší velikost nervové odezvy) se uvádí u nezralého sluchového systému (Moore a Irvine, 1980; Brugge a O'Connor, 1984; Woolf a Ryan, 1985; Sanes a Rubel, 1988). Je tedy možné, že neurony, které řádně neprošly

závěrečnou fází vývoje, si uchovaly charakter nezralého systému v důsledku nedovyvinuté struktury synapsí. Zvýšení sluchových prahů v průběhu kritické periody vedlo k vývojovým změnám ve vzájemném působení excitace a inhibice, které se u dospělých zvířat projeví změnami v parametrech kódování intenzity zvuku u vysokofrekvenčních neuronů CCI.

Důsledky hlukové expozice v souvislosti s behaviorálními změnami

Vzhledem k tomu, že změny chování mají svůj původ ve změnách nervové aktivity, vyšetřovali jsme souvislosti mezi výsledky elektrofyzilogických měření, podle kterých způsobila krátká expozice hluku v průběhu vývoje trvalé změny v reprezentaci intenzity zvuku u vysokofrekvenčních neuronů v CCI, a testovanými behaviorálními parametry ASR a PPI. Prahové hodnoty amplitud ASR byly pro obě skupiny srovnatelné v rámci všech testovaných frekvencí (2, 4, 8 a 16 kHz). Nadprahové velikosti amplitud ASR byly rovněž srovnatelné mezi experimentálními skupinami, ovšem amplitudy ASR vyvolané maximálními intenzitami (110–120 dB SPL) byly v případě ohlušených zvířat statisticky významně menší (s výjimkou 2 kHz). V obou experimentálních skupinách byla zřetelná tendence poklesu amplitudy ASR se stoupající frekvenci zvukového stimulu. U kontrolní skupiny zvířat byl tento pokles statisticky významný na frekvenci 16 kHz, u skupiny ohlušených zvířat byl přítomen již na frekvenci 8 kHz ($P < 0,05$). Domníváme se, že menší maximální amplitudy ASR u ohlušených zvířat jsou dalším ukazatelem nezralosti centrálního sluchového systému. Podobně i redukované amplitudy ASR na frekvenci 8 kHz přisuzujeme narušenému vývoji centrálního sluchového systému.

Účinnost prepulzní inhibice byla testovaná prostřednictvím prepulzních stimulů o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz. Zatímco průměrná velikost ASR u kontrolních zvířat pozvolna klesala v závislosti na intenzitě zvukového stimulu (funkce PPI), tvar křivky PPI u ohlušených zvířat byl odlišný: prudký pokles amplitudy ASR (tj. zvýšená účinnost prepulzního stimulu) na nízkých prepulzních intenzitách (20–30 dB SPL) byl vystřídán fází velmi pomalého poklesu amplitudy ASR (od 20–30 dB SPL do 60–70 dB SPL), kdy vzestup intenzity prepulzního stimulu vyvolal jen velmi malé změny amplitud ASR. Zvýšená citlivost potkanů na nízké intenzity prepulzního stimulu, kterou vystřídala zhoršená schopnost rozlišování intenzit zvuku v rozsahu středních intenzit, naznačovala u ohlušených zvířat porušené vnímání hlasitosti, které korespondovalo se změnami reprezentace intenzity na úrovni neuronů CCI.

Klinická relevance experimentálních dat

Výsledky naší práce lze teoreticky využít v poznacích lidské neonatální medicíny. Funkční stav sluchového systému čtrnáctidenního potkana odpovídá přibližně úrovni sluchové činnosti novorozence (Johansson et al., 1992; Kisilevsky a spol., 2004). Ze studie vyplývá, že i krátká expozice nezralého jedince intenzivnímu hluku (8 min, 125 dB SPL) může narušit jeho/její frekvenční selektivitu v pozdějším věku bez známky poškození sluchových prahů. Poruchu v rozlišování frekvence by nebylo možné odhalit klasickým audiologickým měřením sluchových prahů, ale s použitím například metody testování prahů pro rozlišení frekvencí („difference limen for frequency“).

7. ZÁVĚRY

1. Sluchové prahy dospělých potkanů, kteří byli v mládí vystaveni krátké expozici intenzivnímu hluku (P14, 8 min, 125 dB SPL) a sluchové prahy kontrolních potkanů se nelišily.
2. Rozdíly ve frekvenční a intenzitní charakteristice odpovědí neuronů CCI byly přítomny pouze u vysokofrekvenčních neuronů s CF nad 8 kHz.
3. Šířka excitačních oblastí odpovědí vysokofrekvenčních neuronů CCI byla u ohlušených potkanů větší než u kontrolních zvířat, což ukázalo na zhoršenou schopnost frekvenční selektivity.
4. Šířka postranních inhibičních oblastí odpovědí neuronů CCI se mezi experimentálními skupinami nelišila, ale došlo k posunu vysokofrekvenčních inhibičních oblastí směrem k vysokým frekvencím.
5. Neurony CCI ohlušených potkanů s CF vyšší než 8 kHz měly:
 - užší dynamický rozsah odpovědi;
 - větší počáteční sklon RLF;
 - menší maximální odpověď (CF nad 16 kHz);
 - větší výskyt nemonotónních RLF (CF nad 16 kHz).
6. Prahy ASR byly mezi skupinou ohlušených a kontrolních potkanů srovnatelné v rámci všech testovaných frekvencí (2, 4, 8 a 16 kHz).
7. Potkani ohlušení v mládí měli menší amplitudy ASR vyvolané maximálními intenzitami zvuku v porovnání s kontrolními potkany (vyjma frekvence 2 kHz).
8. Složitější průběh funkce PPI u ohlušených potkanů ve srovnání s kontrolními potkany ukázal na poruchu ve vnímání hlasitosti.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Aamodt SM, Constantine-Paton M. (1999). The role of neural activity in synaptic development and its implications for adult brain function. *Adv Neurol* 79:133–144.
2. Abbott SD, Hughes LF, Bauer CA, Salvi R, Caspary DM (1999). Detection of glutamate decarboxylase isoforms in rat inferior colliculus following acoustic exposure. *Neuroscience* 93:1375–1381.
3. Aitkin LM, Moore DR (1975). Inferior colliculus. II. Development of tuning characteristics and tonotopic organization in central nucleus of the neonatal cat. *J Neurophysiol* 38:1208–1216.
4. Aitkin LM, Dickhaus H, Schult W, Zimmermann M. (1978). External nucleus of IC, auditory and spinal somatosensory afferents and their interactions. *J Neurophysiol* 41:837–847.
5. Aitkin LM, Kenyon CE, Philpott P (1981). The representation of the auditory and somatosensory systems in the external nucleus of the cat IC. *J Comp Neurol* 196:25–40.
6. Aitkin LM (1991) Rate-level functions of neurons in the inferior colliculus of cats measured with the use of free-field sound stimuli. *J Neurophysiol* 65:383–392.
7. Alford BR, Ruben RJ (1963). Physiological, behavioral and anatomical correlates of the development of hearing in the mouse. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 72:237–47.
8. Alkhatib A, Biebel UW, Smolders JW (2006). Inhibitory and excitatory response areas of neurons in the central nucleus of the inferior colliculus in unanesthetized chinchillas. *Exp Brain Res* 174:124–143.
9. Altman J, Bayer SA (1981). Development of the brain stem in the rat. V. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the midbrain tegmentum. *J Comp Neurol* 198:677-716.
10. Arjmand E, Harris D, Dallos P (1988). Developmental changes in frequency mapping of the gerbil cochlea: comparison of two cochlear locations. *Hear Res* 32:93–96.
11. Bajo VM, Moore DR (2005). Descending projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Comp Neurol* 486:101–16.
12. Bao S, Chang EF, Woods J, Merzenich MM (2004). Temporal plasticity in the primary auditory cortex induced by operant perceptual learning. *Nat Neurosci* 9:974–81.
13. Barsz K, Wilson WW, Walton JP (2007). Reorganization of receptive fields following hearing loss in inferior colliculus neurons. *Neuroscience* 147:532–545.
14. Bartlett EL, Stark JM, Guillery RW, Smith PH (2000). Comparison of the fine structure of cortical and collicular terminals in the rat medial geniculate body. *Neuroscience* 100:811–828.
15. Blatchley BJ, Cooper WA, Coleman JR (1987). Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Brain Res*, 429:75–84.
16. Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L (2004). Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse. *Neuron* 44:905–908.
17. Błaszczuk JW, Tajchert K (1997). Effect of acoustic stimulus characteristics on the startle response in hooded rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 57:315–321.
18. Bock GR, Webster WR, Aitkin LM (1972). Discharge patterns of single units in inferior colliculus of the alert cat. *J Neurophysiol* 35:265–277.
19. Bock GR, Saunders JC (1976). Effects of low and high frequency noise bands in producing a physiologic correlate of loudness recruitment in mice. *Trans Am Acad Ophthal Otol* 82:338–342.

20. Bock GR, Saunders JC (1977). A critical period for acoustic trauma in the hamster and its relation to cochlear development. *Science* 197:396–398.
21. Boettcher FA, Salvi RJ (1993). Functional changes in the ventral cochlear nucleus following acute acoustic overstimulation. *J Acoust Soc Am* 94:2123–2134.
22. Bonham BH, Cheung SW, Godey B, Schreiner CE (2004). Spatial organization of frequency response areas and rate / level functions in the developing AI. *J Neurophysiol* 91:841–854.
23. Brown PE, Grinnell AD, Harrison JB (1978). The development of hearing in the pallid bat, *Antrozous pallidus*. *J Comp Physiol A* 126:169–182.
24. Brugge JF, Javel E, Kitzes LM (1978). Signs of functional maturation of peripheral auditory system in discharge patterns of neurons in anteroventral cochlear nucleus of kitten. *J Neurophysiol* 41:1557–1559.
25. Brugge JF, O'Connor TA (1984). Postnatal functional development of the dorsal and posteroventral cochlear nuclei of the cat. *J Acoust Soc Am* 75: 1548–1562.
26. Bureš Z, Grécová J, Popelár J, Syka J (2010). Noise exposure during early development impairs the processing of sound intensity in adult rats. *Eur J Neurosci* 32:155–164.
27. Cai S, Ma WL, Young ED (2008). Encoding intensity in ventral cochlear nucleus following acoustic trauma: implications for loudness recruitment. *J Assoc Res Otolaryngol* 10:5–22.
28. Caicedo A, Herbert H (1993). Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 328:377–92.
29. 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* 11:2365–2380.
30. Carlson S, Willott JF (1996). The behavioral salience of tones as indicated by prepulse inhibition of the startle response: relationship to hearing loss and central neural plasticity in C57BL/6J mice. *Hear Res* 99:168–175.
31. Clopton BM, Winfield JA (1973). Tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat. *Brain Res* 56:355–358.
32. Clopton BM, Winfield JA (1976). Effect of early exposure to patterned sound on unit activity in rat inferior colliculus. *J Neurophysiol* 39:1081–1089.
33. Colburn HS, Carney LH, Heinz MG (2003). Quantifying the information in auditory-nerve responses for level discrimination. *JARO* 4:294–311.
34. Coleman JR, Clerici WJ (1987). Sources of projections to subdivisions of the IC in the rat. *J Comp Neurol* 262:215–226.
35. Coomes DL, Schofield RM, Schofield BR (2005). Unilateral and bilateral projections from cortical cells to the inferior colliculus in guinea pigs. *Brain Res* 1042:62–72.
36. Dorf DS, Curtin JW (1982). Early cleft palate repair and speech outcome. *Plast Reconstr Surg* 70:74–81.
37. Doucet JR, Ryugo DK (2003). Axonal pathways to the lateral superior olive labeled with biotinylated dextran amine injections in the dorsal cochlear nucleus of rats. *J Comp Neurol* 461:452–465.
38. Druga R, Syka J (1984). Projections from auditory structures to the superior colliculus in the rat. *Neurosci Lett* 45:247–52.
39. Druga R, Syka J (1993). NADPH-diaphorase activity in the central auditory structures of the rat. *Neuroreport* 4:999–1002.
40. Druga R, Syka J, Rajkowska G (1997). Projections of AC onto the IC in the rat. *Physiol Res* 46:215–222.

41. Egorova M, Ehret G, Vartanian I, Esser KH (2001). Frequency response areas of neurons in the mouse inferior colliculus. I. Threshold and tuning characteristics. *Exp Brain Res* 140:145–161.
42. Egorova M, Ehret G (2008). Tonotopy and inhibition in the midbrain inferior colliculus shape spectral resolution of sounds in neural critical bands. *Eur J Neurosci* 28:675–692.
43. Ehret G, Merzenich MM. (1988). Neuronal discharge rate is unsuitable for encoding sound intensity at the inferior-colliculus level. *Hear Res* 35:1–7.
44. Ehret G, Romand, R. (1992) Development of tone response thresholds, latencies and tuning in the mouse inferior colliculus. *Brain Res Dev Brain Res* 67:317–326.
45. Evans EF (1975). Cochlear nerve and cochlear nucleus. In Keidel WD, Neff WD, (Ed.), *Handbook of sensory physiology*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, V/2 pp. 1–108.
46. Faingold CL, Hoffmann WE, Caspary DM (1989). Effects of excitant amino acids on acoustic responses of inferior colliculus neurons. *Hear Res* 40:127–136.
47. Faingold CL, Boersma-Anderson CA, Caspary DM (1991) Involvement of GABA in acoustically-evoked inhibition in inferior colliculus neurons. *Hear Res* 52:201–216
48. Faye-Lund H, Osen KK (1985). Anatomic of the IC in rat. *Anat Embryol* 175:35–52.
49. Faye-Lund H (1986). Projection from the inferior colliculus to the superior olivary complex in the albino rat. *Anat Embryol* 175:35–52.
50. Feliciano M, Potashner SJ (1995). Evidence for a glutamatergic pathway from the guinea pig AC to the IC. *J Neurochem* 65:1348–1357.
51. Franklin SR, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2006). Unilateral cochlear ablation before hearing onset disrupts the maintenance of dorsal nucleus of the lateral lemniscus projection patterns in the rat inferior colliculus. *Neuroscience*, 143:105–115.
52. Friauf E. (1992). Tonotopic order in the adult and developing auditory system of the rat as shown by c-fos immunocytochemistry. *Eur. J. Neurosci* 4:798–812.
53. Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2000a). Development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat: projection from the dorsal nucleus of the lateral lemniscus. *J Comp Neurol* 416:368–382.
54. Gabriele ML, Brunso-Bechtold JK, Henkel CK (2000b) Plasticity in the development of afferent patterns in the inferior colliculus of the rat after unilateral cochlear ablation. *J Neurosci* 20:6939–6949.
55. Games KD, Winer JA (1988). Layer V in rat auditory cortex: projections to the inferior colliculus and contralateral cortex. *Hear Res* 34:1–25.
56. Gao F, Zhang J, Sun X, Chen L (2009). The effect of postnatal exposure to noise on sound level processing by auditory cortex neurons of rats in adulthood. *Physiol Behav* 97:369–373.
57. Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H (1993). Development of hearing in neonatal rats: air
58. and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69:236–242.
59. Gerken GM (1996). Central tinnitus and lateral inhibition: an auditory brainstem model. *Hear Res* 97:75–83.
60. Gerken GM, Hesse PS, Wiorkowski JJ (2001). Auditory evoked responses in control subjects and in patients with problem-tinnitus. *Hear Res* 157:52–64.
61. Grécová J, Bureš Z, Popelář J, Šuta D, Syka J (2009). Brief exposure of juvenile rats to noise impairs the development of the response properties of inferior colliculus neurons. *Eur J Neurosci* 29:1921–1930.

62. Green DM, Swets JA (1966). *Signal Detection Theory and Psychophysics*. John Wiley & Sons, New York.
63. Harris DM, Dallos P (1984). Ontogenetic changes in frequency mapping of a mammalian ear.
64. *Science* 225: 741–743.
65. He J (1997). Modulatory effects of regional cortical activation on the onset responses of the cat medial geniculate neurons. *J Neurophysiol* 77:896–908.
66. Hefti BJ, Smith PH (2000). Anatomy, physiology, and synaptic responses of rat layer V auditory cortical cells and effects of intracellular GABA (A) blockade. *J Neurophysiol* 83:2626–2638.
67. Heger D (2006). Perception Lecture Notes: Auditory Pathways and Sound Localization. Department of Psychology, New York University. Dostupné z: <[http:// www.cns.nyu.edu/~david/courses/perception/lecturenotes/localization/localization.htm](http://www.cns.nyu.edu/~david/courses/perception/lecturenotes/localization/localization.htm)>.
68. Henkel CK (1983). Evidence of sub-collicular auditory projections to the medial geniculate nucleus in the cat: an autoradiographic and horseradish peroxidase study. *Brain Res* 259:21–30.
69. Hosomi H, Hirai H, Okada Y, Amatsu M (1995). Long-term potentiation of neurotransmission in the IC of the rat. *Neurosci Lett* 195:175–178.
70. Huang CM, Fex J (1986). Tonotopic organization in the inferior colliculus of the rat demonstrated with the 2-deoxyglucose method. *Exp Brain Res* 61:506–512.
71. Huang ZJ, Kirkwood A, Pizzorusso T, Porciatti V, Morales B, Bear MF, Maffei L, Tonegawa S (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98:739–755.
72. Hubel DH (1982). Exploration of the primary visual cortex. *Nature* 299:515–524.
73. Chang EF, Merzenich MM (2003). Environmental noise retards auditory cortical development. *Science* 300:498–502.
74. Chang EF, Bao S, Imaizumi K, Schreiner CE, Merzenich MM (2005). Development of spectral and temporal response selectivity in the auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:16460–16465.
75. Insanally MN, Köver H, Kim H, Bao S (2009). Feature-dependent sensitive periods in the development of complex sound representation. *J Neurosci* 29:5456–5462.
76. Ison JR, Hammond GR (1971). Modification of the startle reflex in the rat by changes in the auditory and visual environments. *J Comp Physiol Psychol* 75:435–452.
77. Iwasa H, Potsic WP (1982). Maturational change of early, middle, and late components of the auditory evoked responses in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 90:95–102.
78. Izquierdo MA, Gutierrez-Conde PM, Merchan MA, Malmierca MS (2008). Non-plastic reorganization of frequency coding in the inferior colliculus of the rat following noise-induced hearing loss. *Neuroscience* 154:355–369.
79. Jen PH, Sun X, Chen QC (2001). An electrophysiological study of neural pathways for corticofugally inhibited neurons in the central nucleus of the inferior colliculus of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *Exp Brain Res* 137: 292–302.
80. Jewett DL, Romano MN (1972). Neonatal development of auditory system potentials averaged from the scalp of rat and cat. *Brain Res* 36:101–115.
81. Johansson B, Wedenberg E, Westin B (1992). Fetal heart rate response to acoustic stimulation in relation to fetal development and hearing impairment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 71:610–615.

82. Jourdan D, Ardid D, Chapuy E, Eschali er A, Le Bars D (1995). Audible and ultrasonic vocalization elicited by single electrical nociceptive stimuli to the tail in the rat. *Pain* 63:237–249.
83. Kaas JH (1991). Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals: a review. *Annu Rev Neurosci* 14:137–167.
84. Kaltenbach JA, Zacharek MA, Zhang J, Frederick S (2004). Activity in the dorsal cochlear nucleus of hamsters previously tested for tinnitus following intense tone exposure. *Neurosci Lett* 355:121–125.
85. Kandler K, Friauf E (1993). Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 328:161–184.
86. Kandler, K. (2004). Activity-dependent organization of inhibitory circuits: lessons from the auditory system. *Curr Opin Neurobiol* 14:96–104.
87. Kandler K, Gillespie DC (2005). Developmental refinement of inhibitory sound-localization circuits. *Trends Neurosci* 28:290–296.
88. Kelly JP, Wong D (1981). Laminar connections of the cat's auditory cortex. *Brain Res* 212:1–15.
89. Kemp DT (1998). Otoacoustic emissions: distorted echos of the cochlea's travelling wave. In: *Otoacoustic emissions*. Ed.: Berlin CH.I., PhD, Singulair Publishing Group, Inc.
90. Kiang NY, Liberman MC, Levine RA (1976). Auditory-nerve activity in cats exposed to ototoxic drugs and high-intensity sounds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85:752–768.
91. Kikuchi K, Hilding D (1965). The development of the organ of Corti in the mouse. *Acta Otolaryngol* 60:207–222.
92. Killackey HP, Ryugo DK (1977). Effects of neonatal auditory system damage on the structure of the inferior colliculus of the rat. *Anat Rec* 187:624.
93. Kim J, Morest DK, Bohne BA (1997). Degeneration of axons in the brainstem of the chinchilla after auditory overstimulation. *Hear Res* 103:169–191.
94. Kimura M, Eggermont JJ (1999). Effect of acute pure tone induced hearing loss on response properties in three auditory cortical fields in cat. *Hear Res* 135:146–162.
95. Kisilevsky S, Hains SM, Jacquet AY, Granier-Deferre C, Lecanuet JP (2004). Maturation of fetal responses to music. *Dev Sci* 7:550–559.
96. Kitzes LM, Semple MN (1985). Single-unit responses in the inferior colliculus: effects of neonatal unilateral cochlear ablation. *J Neurophysiol* 53:1483–1500.
97. Koch M, Schnitzler HU (1997). The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res* 89:35–49.
98. Kotak VC, Fujisawa S, Lee FA, Karthikeyan O, Aoki C, Sanes DH (2005). Hearing loss raises excitability in the auditory cortex. *J Neurosci* 25:3908–3918.
99. Kral A, Tillein J, Heid S, Hartmann R, Klinke R (2005). Postnatal cortical development in congenital auditory deprivation. *Cereb Cortex* 15:552–562.
100. Kudo M (1981). Projections of the nuclei of the lateral lemniscus in the cat: an autoradiographic study. *Brain Res* 221: 57–69.
101. Kulesza RJ, Vi nuela A, Salda na E, Berrebi AS (2002). Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. *Hear Res* 168:12–24.
102. Kuwada S, Batra R, Yin TC, Oliver DL, Haberly LB, Stanford TR (1997). Intracellular recordings in response to monaural and binaural stimulation of neurons in the IC. *J Neurosci* 17:7565–7581.
103. Langner G, Schreiner CE (1988) Periodicity coding in the inferior colliculus of the cat. I. Neuronal mechanisms. *J Neurophysiol* 60:1799–1822.

104. Lenoir M, Bock GR, Pujol R (1979). Supra-normal susceptibility to acoustic trauma of the rat pup cochlea. *J Physiol (Paris)* 75:521–524.
105. Li L, Kelly JB (1992). Inhibitory influence of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus on binaural responses in the rat's inferior colliculus. *J Neurosci* 12:4530–4539.
106. Li Y, Evans MS, Faingold CL (1998) In vitro electrophysiology of neurons in subnuclei of rat inferior colliculus. *Hear Res* 121:1–10.
107. Liberman MC (1978) Auditory-nerve response from cats raised in a low-noise chamber. *J Acoust Soc Am* 63:442–455.
108. Lippe W, Rubel EW (1983). Development of the place principle: tonotopic organization. *Science* 219:514–516.
109. Lippe W, Rubel EW (1985). Ontogeny of tonotopic organization of brain stem auditory nuclei in the chicken: implications for development of the place principle. *J Comp Neurol* 237:273–89.
110. Lippe WR (1987). Shift of tonotopic organization in brain stem auditory nuclei of the chicken during late embryonic development. *Hear Res* 25:205–208.
111. Lippe WR (1994). Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J Neuroscience* 14:1486–1495.
112. Lonsbury-Martin BL, Martin GK (1981). Effects of moderately intense sound on auditory sensitivity in rhesus monkeys: behavioral and neural observations. *J Neurophysiol* 46:563–586.
113. Luján R, de Cabo C, Juiz JM (2008). Inhibitory synaptogenesis in the rat anteroventral cochlear nucleus. *Neuroscience* 154:315–328.
114. Malmierca MS, Blackstad TW, Osen KK., Karagülle T, Molowny RL (1993). The central nucleus of the IC in rat, a Golgi and Computer reconstruction study of neuronal and laminar structure. *J Comp Neurol* 333:1–27.
115. Malmierca MS, Seip KL, Osen KK (1995). Morphological classification and identification of neurons in the IC, a multivariate analysis. *Anat Embryol* 191:343–350.
116. Malmierca MS, Hernández O, Falconi A, Lopez-Poveda EA, Merchán M, Rees A. (2003). The commissure of the inferior colliculus shapes frequency response areas in rat: an in vivo study using reversible blockade with microinjection of kynurenic acid. *Exp Brain Res* 153:522–529.
117. Mazelová J (2003). Vliv hluku na sluchový systém a změny sluchu ve stáří. Doktorandská disertační práce z oboru neurovědy. ÚEM AVČR.
118. McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM (2005). Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science* 309:2222–2226.
119. Metherate R, Kaur S, Kawai H, Lazar R, Liang K, Rose HJ (2005). Spectral integration in auditory cortex: mechanisms and modulation. *Hear Res* 206:146–158.
120. McAlpine D, Martin RL, Mossop JE, Moore DR (1997). Response properties of neurons in the inferior colliculus of the monaurally deafened ferret to acoustic stimulation of the intact ear. *J Neurophysiol* 78:767–779.
121. McClure MM, Threlkeld SW, Rosen GD, Holly Fitch R (2005). Auditory processing deficits in unilaterally and bilaterally injured hypoxic-ischemic rats. *Neuroreport* 16:1309–1312.
122. McCormick (1992). Evolution of central auditory pathways in anamniotes. In: Webster DB, Fay RR, Pooper AN (Eds), *The Evolutionary Biology of Hearing*, Springer-Verlag, New York, pp. 323–350.

123. Merzenich MM, Reid MD (1974). Representation of the cochlea within the inferior colliculus of the cat. *Brain Res* 77:397–415.
124. Milbrandt JC, Holder TM, Wilson MC, Salvi RJ, Caspary DM (2000). GAD levels and muscimol binding in rat inferior colliculus following acoustic trauma. *Hear Res* 147:251–60.
125. Miller J, Canon B, Flock A (1985). High intensity noise effect on stereocilia mechanics. *Assoc Res Otolaryngol* 8:50.
126. Mitani A, Shimokouchi M, Nomura S (1983). Effects of stimulation of the primary AC upon colliculogeniculate neurons in the IC of the cat. *Neurosci Lett* 42:185–189.
127. Moller AR (1975). Latency of unit responses in cochlear nucleus determined in two different ways. *J Neurophysiol* 38:812–821.
128. Moore DR, Irvine DRF (1979). The development of some peripheral and central auditory responses in the neonatal cat. *Brain Res* 163:49–59.
129. Moore DR, Irvine DRF (1980). Development of binaural input, response patterns, and discharge rate in single units of the cat inferior colliculus. *Exp Brain Res* 38:103–108.
130. Moore DR (1983). Development of inferior colliculus and binaural audition. In R. Romand (Ed.), *Development of Auditory and Vestibular Systems*, Academic Press, New York, pp. 121–166.
131. Moore DR, Hutchings ME, Meyer SE (1991). Binaural masking level differences in children with a history of otitis media. *Audiology* 30:91–101.
132. Morest DK, Bohne BA (1983). Noise-induced degeneration in the brain and representation of inner and outer hair cells. *Hear Res* 9:145–151.
133. Morest DK, Oliver DL (1984). The neuronal architecture of the IC in the cat, defining the functional anatomy of the auditory midbrain. *J Comp Neurol* 222:237–264.
134. Mourek J, Himwich WA, Mysliveček J, Callison DA (1967). The role of nutrition in the development of evoked cortical responses in rat. *Brain Res* 6:241–251.
135. Mysliveček J (1983). Development of the auditory evoked responses in the auditory cortex in mammals. In R. Romand (Ed.), *Development of Auditory and Vestibular Systems*, Academic Press, New York, pp. 167–207.
136. Nakahara H, Zhang LI, Merzenich MM (2004). Specialization of primary auditory cortex processing by sound exposure in the ‘critical period’. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7170–7174.
137. 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* 51:95–104.
138. Oliver DL, Kuwada S, Yin TC, Haberly LB, Henkel CK (1991). Dendritic and axonal morphology of HRP-injected neurons in the IC of the cat. *J Comp Neurol* 303:75–100.
139. Parham K, Willott JF (1988). Acoustic startle response in young and aging C57BL/6J and CBA/J mice. *Behav Neurosci* 102:881–886.
140. Peterson DC, Schofield BR (2007) Projections from auditory cortex contact ascending pathways that originate in the superior olive and inferior colliculus. *Hear Res* 232:67–77.
141. Pierson M, Snyder-Keller A (1994). Development of frequency-selective domains in inferior colliculus of normal and neonatally noise-exposed rats. *Brain Res* 636:55–67.
142. Pilz PK, Schnitzler HU, Menne D (1987). Acoustic startle threshold of the albino rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 101:67–72.
143. Pollak GD, Park TJ (1993). The effects of GABAergic inhibition on monaural response properties of neurons in the mustache bat's inferior colliculus. *Hear Res* 65:99–117.

144. Poon PW, Chen XY, Hwang JC (1990). Altered sensitivities of auditory neurons in the rat midbrain following early postnatal exposure to patterned sounds. *Brain Res* 524:327–330.
145. Poon PW, Chen X (1992) Postnatal exposure to tones alters the tuning characteristics of inferior collicular neurons in the rat. *Brain Res* 585:391–394.
146. Popelář J, Syka J, Berndt H (1987). Effect of noise on auditory evoked responses in awake guinea pig. *Hear Res* 26:239–247.
147. Popelar J, Erre JP, Aran JM, Cazals Y (1994). Plastic changes in ipsicontralateral differences of auditory cortex and inferior colliculus evoked potentials after injury to one ear in the adult guinea pig. *Hear Res* 72:125–134.
148. 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.
149. Popelar J, Grecova J, Rybalko N, Syka J (2008). Comparison of noise-induced changes of auditory brainstem and middle latency response amplitudes in rats. *Hear Res* 245:82– 91.
150. Pujol R (1972). Development of tone-burst responses along the auditory pathway in the cat. *Acta Otolaryngol* 74:383–91.
151. Rajan R (1990). Electrical stimulation of the IC at low rates protects the cochlea from auditory desensitization. *Brain Res* 506:192–204.
152. Rajan R (1998). Receptor organ damage causes loss of cortical surround inhibition without topographic map plasticity. *Nat Neurosci* 1:138–143.
153. Rajan R (2001). Plasticity of excitation and inhibition in the receptive field of primary auditory cortical neurons after limited receptor organ damage. *Cereb Cortex* 11:171–182.
154. Razak KA, Fuzessery ZM (2007). Development of inhibitory mechanisms underlying selectivity for the rate and direction of frequency-modulated sweeps in the auditory cortex. *J Neurosci* 27:1769–1781.
155. Richman RA, Sheehe PR, McCanty T, Vespasiano M, Post EM, Guzi S, Wright H (1988). Olfactory deficits in boys with cleft palate. *Pediatrics* 82:840–844.
156. Roberts RC, Ribak CE (1987a). An electron microscopic study of GABAergic neurons and terminals in the central nucleus of the inferior colliculus of the rat. *J Neurocytol* 16:333–345.
157. Roberts RC, Ribak CE (1987b). GABAergic neurons and axon terminals in the brainstem auditory nuclei of the gerbil. *J Comp Neurol* 258:267–280.
158. Romand R, Ehret G (1990). Development of tonotopy in the inferior colliculus. I. Electrophysiological mapping in house mice. *Brain Res Dev Brain Res* 54:221–234.
159. Rose JE, Greenwood DD, Goldberg JM, Hind JE (1963). Some discharge characteristics of single neurons in the inferior colliculus of the cat. I. Tonotopical organization, relation of spike-counts to tone intensity, and firing patterns of single elements. *J Neurophysiol* 26:294–320.
160. Ryan A, Miller J (1978). Single unit responses in the inferior colliculus of the awake and performing rhesus monkey. *Exp Brain Res* 32:389–407.
161. Ryan AF, Woolf NK (1988). Development of tonotopic representation in the Mongolian gerbil: a 2-deoxyglucose study. *Brain Res* 469:61–70.
162. Ryan AF, Furlow Z, Woolf NK, Keithley EM (1988). The spatial representation of frequency in the rat dorsal cochlear nucleus and IC. *Hear Res* 36:181–189.
163. Rybalko N, Syka J (2001). Susceptibility to noise exposure during postnatal development in rats. *Hear Res* 155:32–40.

164. Rybalko N, Bureš Z, Burianová J, Popelář J, Grécová J, Syka J (2011). Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. *Physiol Behav* 102:453–458.
165. Saint-Marie RL (1996). Glutamatergic connections of the auditory midbrain, selective uptake and axonal transport of D-[3H]-aspartate. *J Comp Neurol* 373:255–270.
166. Saldaña E, Merchán MA (1992). Intrinsic and commissural connections of the rat IC. *J Comp Neurol* 319:417–437.
167. Saldaña E, Feliciano M, Mugnaini E (1996). Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to IC mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol* 371:15–40.
168. Salvi RJ, Hamernik RP, Henderson D (1978). Discharge patterns in the cochlear nucleus of the chinchilla following noise induced asymptotic threshold shift. *Exp Brain Res* 32:301–320.
169. Salvi RJ, Saunders SS, Gratton MA, Arehole S, Powers N (1990). Enhanced evoked response amplitudes in the inferior colliculus of the chinchilla following acoustic trauma. *Hear Res* 50:245–258.
170. Salvi RJ, Saunders SS, Powers NL, Boettcher FA (1992). Discharge patterns of cochlear ganglion neurons in the chicken. *J Comp Physiol A* 170:227–241.
171. Salvi RJ, Wang J, Ding D (2000). Auditory plasticity and hyperactivity following cochlear damage. *Hear Res* 147:261–274.
172. Sanes DH, Constantine-Paton M (1983). Altered activity patterns during development reduce neural tuning. *Science* 221:1183–1185.
173. Sanes DH, Constantine-Paton M (1985a). The development of stimulus following in the cochlear nerve and inferior colliculus of the mouse. *Brain Res* 354:255–267.
174. Sanes DH, Constantine-Paton M (1985b). The sharpening of frequency tuning curves requires patterned activity during development in the mouse, *Mus musculus*. *J Neurosci* 5:1152–1166.
175. Sanes DH, Rubel EW (1988). The ontogeny of inhibition and excitation in the gerbil lateral superior olive. *J Neurosci* 8:682–700.
176. Sanes DH, Merickel M, Rubel EW (1989). Evidence for an alteration of the tonotopic map in the gerbil cochlea during development. *J Comp Neurol* 279:436–444.
177. Sanes DH. (1993). The development of synaptic function and integration in the central auditory system. *J Neurosci* 13:2627–2637.
178. Sanes DH, Takács C (1993). Activity-dependent refinement of inhibitory connections. *Eur J Neurosci* 5:570–574.
179. Saunders JC, Bock GR, James R, Chen CS (1972). Effects of priming for audiogenic seizure on auditory evoked response in the cochlear nucleus and inferior colliculus of BALB-c mice. *Exp Neurol* 37:388–394.
180. Saunders JC, Dear SP, Flock A (1986a). Growth of threshold shift in hair-cell stereocilia following overstimulation. *Hear Res* 23:245–255.
181. Saunders JC, Dear SP, Flock A (1986b) Changes in stereocilia micromechanics following overstimulation in metabolically blocked hair cells. *Hear Res* 24:217–225.
182. Saunders JC, Flock A (1986) Recovery of threshold shift in hair cell stereocilia following exposure to intense stimulation. *Hear Res* 23: 233–243
183. Semple MN, Aitkin LM (1979). Representation of sound frequency and laterality by units in central nucleus of cat inferior colliculus. *J Neurophysiol* 42:1626–1639.
184. Shepherd RK, Baxi JH, Hardie NA (1999). Response of inferior colliculus neurons to electrical stimulation of the auditory nerve in neonatally deafened cats. *J Neurophysiol* 82:1363–1380.

185. Shnerson A, Willott JF (1979). Development of inferior colliculus response properties in C57BL/6J mouse pups. *Exp. Brain Res*, 37:373–385.
186. Schofield BR, Coomes DL (2005). Projections from auditory cortex contact cells in the cochlear nucleus that project to the inferior colliculus. *Hear Res* 206:3–11.
187. Schofield BR (2009). Projections to the inferior colliculus from layer VI cells of auditory cortex. *Neuroscience* 159:246–258.
188. Schreiner CE, Langner G (1997). Laminar fine structure of frequency organization in auditory midbrain. *Nature* 388:383–386.
189. Sun W, Zhang L, Lu J, Yang G, Laundrie E, Salvi R (2008). Noise exposure-induced enhancement of auditory cortex response and changes in gene expression. *Neuroscience* 156:374–380.
190. Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL (2001). Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat, current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 156:194–215.
191. Syka J, Straschill M (1970). Activation of superior colliculus neurons and motor responses after electrical stimulation of the inferior colliculus. *Exp Neurol* Sep 28:384–392.
192. Syka J, Radil-Weiss T (1971). Electrical stimulation of the tectum in freely moving cats. *Brain Res* 28:567–72.
193. Syka J, Voldřich L, Vrabec F (1981). Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu. Avicenum zdravotnické nakladatelství, Praha, str. 161–262.
194. Syka J, Popelář J (1982). Noise impairment in the guinea pig. I. Changes in electrical evoked activity along the auditory pathway. *Hear Res* 8:263–72.
195. 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.
196. Syka J (1989). Experimental Models of Sensorineural Hearing Loss - Effects of Noise and Ototoxic Drugs on Hearing. In: *Sensory Physiology* 9, str.97–170. Ottoson D (ed), Springer-Verlag.
197. Syka J, Popelář J (1994). Modulation of thresholds to acoustical and electrical stimulation of the intact ear in guinea pig by furosemide and noise. *Hear Res* 75:1–10.
198. Syka J, Rybalko N, Popelář J (1994). Enhancement of the auditory cortex evoked responses in awake guinea pigs after noise exposure. *Hear Res* 78:158–168.
199. Syka J, Rybalko N (2000). Threshold shifts and enhancement of cortical evoked responses after noise exposure in rats. *Hear Res* 139:59–68.
200. Syka J, Popelář J, Kvasnák E, Astl J (2000). Response properties of neurons in the central nucleus and external and dorsal cortices of the inferior colliculus in guinea pig. *Exp Brain Res* 133:254–66.
201. Syka J (2002). Plastic Changes in the Central Auditory System After Hearing Loss, Restoration of Function, and During Learning *Physiol Rev* 82:601–636.
202. Thornton SK, Semple MN, Sanes DH (1999). Conditioned enhancement and suppression in the developing auditory midbrain. *Eur J Neurosci* 11:1414–1420.
203. Tritsch NX, Yi E, Gale JE, Glowatzki E, Bergles DE (2007). The origin of spontaneous activity in the developing auditory system. *Nature* 450:50–55.
204. Uzman LL, Rumley MK (1958). Changes in the composition of the developing mouse brain during early myelination. *J Neurochem* 3:170–184.
205. Vale C, Juiz JM, Moore DR, Sanes DH (2004). Unilateral cochlear ablation produces greater loss of inhibition in the contralateral inferior colliculus. *Eur J Neurosci* 20:2133–2140.

206. Vetter DE, Saldaña E, Mugnaini E (1993). Input from the IC to medial olivocochlear neurons in the rat, a double label study with PHA-L and cholera toxin. *Hear Res* 70:173–186.
207. de Villers-Sidani E, Chang EF, Bao S, Merzenich MM (2007). Critical period window for spectral tuning defined in the primary auditory cortex (A1) in the rat. *J Neurosci* 27:180–189.
208. de Villers-Sidani E, Merzenich MM (2011). Lifelong plasticity in the rat auditory cortex: basic mechanisms and role of sensory experience. *Prog Brain Res* 191:119–131.
209. Walsh EJ, McGee J (1987). Postnatal development of auditory nerve and cochlear nucleus neuronal responses in kittens. *Hear Res* 28:97–116.
210. Wang J, Salvi RJ, Powers N (1996). Plasticity of response properties of inferior colliculus neurons following acute cochlear damage. *J Neurophysiol* 75:171–183.
211. Wang J, Ding D, Salvi RJ (2002). Functional reorganization in chinchilla inferior colliculus associated with chronic and acute cochlear damage. *Hear Res* 168:238–249.
212. Wiesel TN (1982). Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature* 299:583–591.
213. Willott JF, Shnerson A (1978). Rapid development of tuning characteristics of inferior colliculus neurons of mouse pups. *Brain Res* 148:230–233.
214. Willott JF, Urban GP (1978). Response properties of neurons in nuclei of the mouse inferior colliculus. *J Comp Physiol A* 127:175–184.
215. Willot JF, Lu SM (1982). Noise-induced hearing loss can alter neural coding and increase excitability in the central nervous system. *Science* 216:1331–1334.
216. Wilson DA, Leon M (1986). Early appearance of inhibition in the neonatal rat olfactory bulb. *Brain Res* 391:289–292.
217. Woolf NK, Ryan AF (1985). Ontogeny of neural discharge patterns in the ventral cochlear nucleus of the mongolian gerbil. *Brain Res* 349:131–147.
218. Wu GK, Li P, Tao HW, Zhang LI (2006). Nonmonotonic synaptic excitation and imbalanced inhibition underlying cortical intensity tuning. *Neuron* 52:705–715.
219. Xu L, Jen PH (2001). The effect of monaural middle ear destruction on postnatal development of auditory response properties of mouse inferior collicular neurons. *Hear Res* 159:1–13.
220. Yang L, Pollak GD, Resler C (1992) GABAergic circuits sharpen tuning curves and modify response properties in the mustache bat inferior colliculus. *J Neurophysiol* 68:1760–1774.
221. Young JS, Fechter LD (1983). Reflex inhibition procedures for animal audiometry: a technique for assessing ototoxicity. *J Acoust Soc Am* 73:1686–1693.
222. Zhang H, Kelly JB (2001). AMPA and NMDA receptors regulate responses of neurons in the rat's IC. *J Neurophysiol* 86:871–880.
223. Zhang LI, Bao S, Merzenich MM (2001). Persistent and specific influences of early acoustic environments on primary auditory cortex. *Nat Neurosci* 4:1123–1130.
224. Zhang LI, Poo MM (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4:1207–1214.
225. Zhang LI, Bao S, Merzenich MM (2002). Disruption of primary auditory cortex by synchronous auditory inputs during a critical period. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2309–2314.
226. Zhang LI, Tan AY, Schreiner CE, Merzenich MM (2003). Topography and synaptic shaping of direction selectivity in primary auditory cortex. *Nature* 424:201–205.
227. Zhang Y, Suga N (1997). Corticofugal amplification of subcortical responses to single tone stimuli in the mustached bat. *J Neurophysiol* 78:3489–3492.

228. Zhang Y, Wu SH (2000). Long-term potentiation in the IC studied in rat brain slice. *Hear Res* 147:92–103.
229. Zhou X, Merzenich MM. (2007). Intensive training in adults refines A1 representations degraded in an early postnatal critical period. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15935–15940.
230. Zhou X, Nagarajan N, Mossop BJ, Merzenich MM (2008). Influences of unmodulated acoustic inputs on functional maturation and critical-period plasticity of the primary auditory cortex. *Neuroscience* 154:390–396.
231. Zhou X, Merzenich MM (2009). Developmentally degraded cortical temporal processing restored by training. *Nat Neurosci* 12:26–8.
232. Zhou X, Panizzutti R, de Villers-Sidani E, Madeira C, Merzenich MM (2011). Natural restoration of critical period plasticity in the juvenile and adult primary auditory cortex. *J Neurosci* 31:5625–5634.

9. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Publikace v impaktovaných časopisech, které jsou podkladem dizertace a příspěvky jednotlivých spoluautorů:

1. **Grécová J**, Bureš Z, Popelář J, Šuta D, Syka J (2009). Brief exposure of juvenile rats to noise impairs the development of the response properties of inferior colliculus neurons. *Eur J Neurosci* 29:1921–1930.
(IF 3,658)

Příspěvky:

Hluková expozice: Grécová J

Registrace sluchových prahů a otoakustických emisí: Grécová J

Extracelulární snímání neuronů v CCI: Grécová J, Popelář J, Šuta D

Analýza dat: Grécová J., Bureš Z

2. Bureš Z, **Grécová J**, Popelář J, Syka J (2010). Noise exposure during early development impairs the processing of sound intensity in adult rats. *Eur J Neurosci* 32:155–164.
(IF 3,658)

Příspěvky:

Hluková expozice: Grécová J

Registrace sluchových prahů a otoakustických emisí: Grécová J

Extracelulární snímání neuronů v CCI: Grécová J, Popelář J

Analýza dat: Bureš Z, Grécová J

3. Rybalko N, Bureš Z, Burianová J, Popelář J, **Grécová J**, Syka J (2011). Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. *Physiol Behav* 102:453–458.
(IF 2.891)

Příspěvky:

Hluková expozice: Grécová J

Elektrofyzilogický záznam sluchových prahů: Grécová J

Behaviorální testování ASR a PPI: Rybalko N, Burianová J

Analýza dat: Rybalko N, Bureš Z, Grécová J

Ostatní publikace:

1. Popelář J, **Grécová J**, Rybalko N, Syka J (2008). Comparison of noise-induced changes of auditory brainstem and middle latency response amplitudes in rats. *Hear Res* 245: 82–91.
(IF 2,428)

Abstrakta

- Popelar J, Rybalko N, Grecova J, Profant O, Syka J: Neural and behavioral correlates of noise-induced hearing loss in rats. The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics - Audition and Vision, Shanghai, 3.–7.11.2006, Abstract pp. 81–82.
- Rybalko N, Grecova J, Popelar J, Syka J: Relationship between noise-induced hearing loss, enhanced amplitudes of cortical evoked responses and gap detection threshold changes. 43rd Inner Ear Biology Workshop, Montpellier, 17.–20.9.2006, Abstracts p. 161.
- Popelar J, Grecova J, Nikitin NI, Rybalko N, Syka J: Long-term recording of neuronal activity in the rat auditory cortex with chronic multielectrode probes. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Melbourne, 12.–17.7.2007, Abstracts p. 182.
- Grécová J, Popelář J, Syka J: Effect of noise exposure on middle latency response amplitudes in rats. 44th Inner Ear Biology Workshop, London, 16.–19.9.2007, Abstracts p. 146.
- Grécová J, Popelář J, Syka J: Effect of noise exposure on the amplitudes of auditory evoked responses in rats. Sixth Conference of the Czech Neuroscience Society, Prague, 19.–20.11.2007, Abstracts p.66.
- Grécová J, Popelar J, Suta D, Syka J: Adult rats demonstrate worse frequency selectivity of inferior colliculus neurons after juvenile noise exposure. 6th Forum of European Neuroscience, Geneva, 12.–16.7.2008, FENS Abstr., vol.4, 087.7, 2008.
- Popelar J, Grecova J, Nikitin NI, Rybalko N, Syka J. Recording of neuronal activity in the rat auditory cortex with chronic multielectrode probe. 6th Forum of European Neuroscience, Geneva, 12.–16.7.2008, FENS Abstr., vol.4, 188.20, 2008.
- Grecova J, Bures Z, Popelar J, Suta D, Syka J: Deterioration of the frequency selectivity of inferior colliculus neurons in the rat after juvenile noise exposure; Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, 15.–19.11.2008.
- Bures Z, Grecova J, Popelar J, Suta D, Syka J: Influence of brief noise exposure in juvenile rats on the development of the tuning properties of inferior colliculus neurons; 45th Inner Ear Biology Workshop 2008, Ferrara, 21.–24.9.2008 (Abstr. p.89).
- Grecova J, Bureš Z, Rybalko N, Popelář J, Syka J: Noise exposure in juvenile rats impairs the processing of sound stimulus intensity in inferior colliculus neurons in adults. Program No. 258.16/V21 2009 Neuroscience Meeting Planner. Chicago, IL: Society for Neuroscience, 2009. Online.
- Grécová J, Bureš Z, Popelář J, Šuta D, Syka J: Adult rats demonstrate an impaired representation of sound intensity in the inferior colliculus neurons after juvenile noise exposure. Joint Conference of the Czech and Slovak Neuroscience Societies, Prague, 1.–4.11.2009, Abstract p.79.
- Popelář J, Bureš Z, Grecova J, Suta D, Syka J: Influence of brief noise exposure in juvenile rats on the response properties of inferior colliculus neurons in adult animals. 46th Workshop on Inner Ear Biology, Utrecht, the Netherlands, 12.–15.9.2009, Abstract p.112.
- Grécová J, Bureš Z, Popelář J, Šuta D, Syka J: The effect of postnatal brief noise exposure on sound level processing in inferior processing neurons of adult rats. 9th International Congress of the Polish Neuroscience Society, First FENS Featured Regional Meeting, Warsaw, 9.–12.9.2009, abstract TIV-2.
- Grécová J, Bureš Z, Chumak T, Popelář J, Syka J: Effect of the environment on the immature rat auditory system affected by noise during the developmental period. 47th Workshop on Inner Ear Biology Prague, 29.8.–1.9.2010, Abstracts p.139.

- Grecova J, Popelar J, Chumak T, Bures Z, Syka J: Effect of early postnatal noise exposure on the responses of inferior colliculus neurons to acoustical stimuli. 7th Forum of European Neuroscience, July 3.–7.2010, Amsterdam.
- Rybalko N, Burianová J, Bures Z, Grecova J, Syka J: Exposure to Noise in Early Ontogeny Affects the Auditory Startle Reflex in Adulthood in the Rat. Abstracts of the 33rd Annual Midwinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Anaheim, USA, 6.-10.2. 2010, Abstract No. 863, p. 296.
- Bureš Z, Grécová J, Chumak T, Popelář J, Syka J: The effect of acoustic stimulation during the sensitive period of development on the response properties of inferior colliculus neurons in the rat. Abstract of the Thirty-Fourth Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Baltimore, Maryland, USA, 19.–23.2.2011, Abstract No. 446, p. 149.