

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Fyziologie živočichů

Studijní obor: N-FYZZNE



Bc. Jana Dittrichová

Studium sluchových funkcí u myši s chybějícími proteiny KCTD12

Study of auditory function in mice lacking KCTD12 protein

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Rostislav Tureček, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 8. 2024

Podpis:

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu RNDr. Rostislavu Turečkovi, Ph.D., za pomoc s prací, odborné rady, milý přístup a možnost podílet se na práci v jeho laboratoři. Velké poděkování patří také Bc. Štěpánce Suchánkové za pomoc se zaučením behaviorálních a elektrofyziologických metod, s měřením a následným vyhodnocováním dat. V poslední řadě bych pak ráda poděkovala Aničce za pomoc s finální korekturou práce, Filipovi za praktické rady a společnost během psaní, Josefovi za emoční podporu a všem ostatním přátelům, kteří mi během psaní práce byli nablízku.

Abstrakt

Proteiny KCTD12 jsou pomocné podjednotky inhibičních GABA_B receptorů, regulující jejich povrchovou expresi a kinetiku signalizace. Předchozí nálezy naznačily, že KCTD12 by mohl představovat gen vnímavosti k indukci poruch, jako je například tinnitus, ale jeho funkce ve sluchovém systému nebyla objasněna. Předkládaná diplomová práce se zaměřuje na studium významu proteinu KCTD12 pro sluchové funkce savců pomocí myši s genetickou ablací KCTD12. Vliv delece KCTD12 na kochleární funkci a aktivitu neuronů sluchové dráhy myši jsme posuzovali pomocí kombinace akustických, elektrofyziologických a behaviorálních metod. Prováděli jsme měření otoakustických emisí, evokovaných kmenových potenciálů, úlekové reakce a její modulace zvukovými prepulsy a získané parametry jsme srovnávali u kontrolních myši WT a myši KCTD12^{-/-}. Výsledky ukázaly, že delece KCTD12 u myši vedla k významným změnám v akusticky vyvolaných odezvách kochleárního aparátu a mozkového kmene. Myši KCTD12^{-/-} vykazovaly zvýšené audiometrické prahy, snížené amplitudy a omezený dynamický rozsah DPOAE a ABR. Tyto změny se vyznačovaly nápadnou spektrální závislostí, přičemž největší rozdíly mezi WT a KCTD12^{-/-} skupinami byly pozorovány v oblasti středních a vysokých frekvencí akustické stimulace. Tato zjištění podporují hypotézu, že protein KCTD12 hraje důležitou roli jak v kochleárních homeostatických mechanismech, nezbytných pro správnou funkci OHC, tak v centrální sluchové dráze, kde pomáhá udržovat fyziologickou funkci GABA_B receptorů. V souladu s tímto předpokladem behaviorální testování sluchových funkcí odhalilo, že myši KCTD12^{-/-} vykazují významně zvýšenou amplitudu ASR a sníženou citlivost ASR k inhibici mezerovým prepulzem. Tato pozorování naznačují přítomnost audiologických poruch hyperakuze a tinnitu a podporují představu, že delece KCTD12 vede k oslabení GABA_B inhibice, narušení rovnováhy mezi excitací a inhibicí a hyperaktivitě neuronů sluchového systému. Naše výsledky tak souborně dokládají, že delece KCTD12 vede k sensorineurální ztrátě sluchu a naznačují, že myši KCTD12^{-/-} by mohly sloužit jako zvířecí model pro výzkum mechanismů sluchových poruch.

Klíčová slova: GABA-B receptor, KCTD12, sluch, tinnitus

Abstract

KCTD12 proteins are auxiliary subunits of inhibitory GABA_B receptors, regulating their surface expression and signaling kinetics. Previous findings have suggested that KCTD12 might represent a susceptibility gene for the induction of disorders such as tinnitus, but its function in the auditory system has not been elucidated. The present thesis focuses on studying the importance of the KCTD12 protein for mammalian auditory function using mice with genetic ablation of KCTD12. The effect of deletion on cochlear function and the activity of neurons in the auditory pathway of mice was assessed using a combination of acoustic, electrophysiological and behavioural methods. We measured otoacoustic emissions, evoked brainstem potentials, the startle response and its modulation by various pre-pulses and compared the obtained parameters in control WT and KCTD12^{-/-} mice. The results showed that deletion of KCTD12 in mice led to significant changes in acoustically evoked responses of the cochlear apparatus and brainstem. KCTD12^{-/-} mice exhibited increased audiometric thresholds, reduced amplitudes, and limited dynamic range of DPOAEs and ABRs. These changes were characterized by a striking spectral dependence, with the greatest differences between the WT and KCTD12^{-/-} groups observed in the mid- and high-frequency regions of acoustic stimulation. These findings support the hypothesis that the KCTD12 protein plays an important role in both cochlear homeostatic mechanisms, necessary for proper OHC function, and in the central auditory pathway, where it helps maintain physiological GABA_B receptor function. Consistent with this assumption, behavioral testing of auditory function revealed that KCTD12^{-/-} mice exhibit significantly increased ASR amplitude and reduced ASR sensitivity to inhibition by a gap pre-pulse. These observations suggest the presence of audiological states such as hyperacusis and tinnitus and support the idea that deletion of KCTD12 leads to attenuation of GABAergic inhibition, disruption of the balance between excitation and inhibition, and hyperactivity of neurons in the auditory system. Thus, our results collectively demonstrate that KCTD12 deletion leads to sensorineural hearing loss and suggest that KCTD12^{-/-} mice could serve as an animal model for investigating the mechanisms of hearing loss.

Key words: GABA-B receptor, KCTD12, hearing, tinnitus

Zkratky

A1 – Primární sluchová kůra (Primary auditory cortex)

ABR – Odpovědi mozkového kmene (Auditory brainstem response)

ASR – Akustická startlová odpověď (Acoustic startle response)

BGN – Zvuk v pozadí (Background noise)

cAMP – Cyklický adenosinmonofosfát (Cyclic adenosine monophosphate)

DCN – Dorzální kochleární jádra (Dorsal cochlear nucleus)

DPOAE – Distorzní produkt otoakustických emisí (Distortion product otoacoustic emissions)

GABA – Kyselina γ -aminomáselná (γ -aminobutyric acid)

GDP – Guanosindifosfát (Guanosine diphosphate)

GTP – Guanosintrifosfát (Guanosine triphosphate)

GPIAS – Detekce pauzy v šumu (Gap prepulse inhibition of the acoustic startle)

IC – Spodní kolikulus (Inferior colliculus)

IHC – Vnitřní vláskové buňky (Inner hair cells)

KCTD – Proteiny draslíkového kanálu tetramerizační domény (Potassium channel tetramerization domain)

MGN – Mediální kolínkaté jádro (Medial geniculate nucleus)

NBN – Úzkopásmový šum (Narrowband noise)

OHC – Vnější vláskové buňky (Outer hair cell)

OAE – Otoakustické emise (Otoacoustic emissions)

PKA – Proteinkinázy A (Protein kinase A)

PPI – Prepulsní úleková inhibice (Prepulse inhibition)

SOAE – Spontánní otoakustické emise (Spontaneous otoacoustic emission)

SOC – Komplex olivy superior (Superior olivary complex)

SPL – Hladina intenzity zvuku (Sound pressure level)

TDT – Tucker Davis Technologies

TEOAE – Transientně evokované otoakustické emise (Transient evoked otoacoustic emission)

VCN – Ventrální kochleární jádro (Ventral cochlear nucleus)

VFT – Venus fly-trap doména (Venus fly-trap domain)

VGCC – Napěťově řízený vápníkový kanál (Voltage-gated calcium channel)

WT – Wild type

Obsah

1 ÚVOD.....	1
TEORETICKÁ ČÁST	3
2 SLUCHOVÝ SYSTÉM SAVCŮ.....	3
2.1 VNITŘNÍ UCHO.....	3
2.2 SLUCHOVÁ DRÁHA	4
3 PATOLOGICKÉ STAVY SLUCHOVÉ DRÁHY.....	7
3.1 ZTRÁTA SLUCHU.....	7
3.1.1 Presbyakuze.....	8
3.2 TINNITUS	8
3.3 HYPERAKUZE.....	9
4 GABA_B RECEPTORY	10
4.1 STRUKTURNÍ A FUNKČNÍ VLASTNOSTI GABA _B RECEPTORU.....	10
4.2 KCTD PROTEINY	12
5 ZPŮSOBY TESTOVÁNÍ SLUCHOVÉ FUNKCE U MYŠÍ	13
5.1 ÚLEKOVÁ REAKCE.....	13
5.2 OTOAKUSTICKÉ EMISE.....	14
5.3 ODEZVA SLUCHOVÉHO KMENE	15
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
6 METODY A MATERIÁL.....	17
6.1 MATERIÁL	17
6.1.1 Zvířata	17
6.1.2 Anestezie	17
6.2 METODY	17
6.2.1 Testování sluchové funkce	17
6.2.2 Zpracování dat.....	21
7 CÍLE PRÁCE.....	22

8	VÝSLEDKY	23
8.1	VLIV DELECE KCTD12 NA KOCHLEÁRNÍ PARAMETRY	23
8.1.1	Zvýšené prahy DPOAE u KCTD12-/- myši.....	23
8.1.2	Snížené intenzity DPOAE u KCTD12-/- myši.....	24
8.1.3	Srovnání I/O funkcí DPOAE u KCTD12-/- myši	25
8.2	VLIV DELECE KCTD12 NA EVOKOVANÉ POTENCIÁLY MOZKOVÉHO KMENE MYŠI.....	26
8.2.1	Zvýšené prahy ABR u KCTD12-/-.....	26
8.2.2	Snížené amplitudy ABR u KCTD12-/- myši.....	27
8.3	VLIV DELECE KCTD12 NA BEHAVIORÁLNÍ FENOTYP MYŠÍ.....	29
8.3.1	KCTD12-/- myši vykazují zvýšenou amplitudu ASR.	29
8.3.2	Srovnání prepulsní inhibice ASR u WT a KCTD12-/- myši.....	31
8.3.3	Inhibice ASR mezerovým prepulsem.....	32
9	DISKUZE.....	35
9.1	POZNATKY O VLIUVU KCTD12 PŘI POUŽITÍ DPOAE	35
9.2	ZÁVĚRY Z ELEKTROFYZIOLOGICKÉHO MĚŘENÍ	36
9.3	BEHAVIORÁLNÍ POKUSY	37
10	ZÁVĚR.....	39
11	LITERATURA	40

1 Úvod

Sluch je pro člověka jedním z nejdůležitějších smyslů, umožňující dorozumívání a komunikaci se svým okolím. Jeho poruchy patří k nejčastějším smyslovým postižením a podle odhadu Světové zdravotnické organizace jimi trpí asi 20 % světové populace (GBD 2019 Hearing Loss Collaborators 2021). Ztráta sluchu významně snižuje kvalitu života lidí tím, že zpožďuje vývoj řeči a čtení, vede k emočním potížím a depresím a je rizikovým faktorem pro zhoršení kognitivních funkcí a rozvoje demencí, včetně Alzheimerovy choroby. Důsledky, které z toho vyplývají, představují značnou socioekonomickou zátěž a podrobné pochopení příčin ztráty sluchu je zásadním krokem k návrhu preventivních opatření a nových terapeutických přístupů (Livingston et al. 2020).

Patofyziologie ztráty sluchu je poměrně složitá a zahrnuje vliv získaných faktorů i dědičných predispozic. Dosud bylo identifikováno přibližně 130 genů, jejichž mutace jsou spojeny s různými formami ztráty sluchu. Tyto geny kódují především proteiny, které hrají důležité strukturní a funkční role ve vnitřním uchu a sluchové dráze (Amariutei et al. 2023). Překvapivě málo je však známo o souvislosti mezi modifikacemi genů kódujících proteiny inhibičního systému γ -aminomáselné kyseliny (GABA, z anglického γ -aminobutyric acid) a patologickými změnami sluchové funkce. Komponenty GABAergní inhibice, jako jsou endogenní mediátory a jejich syntetizující enzymy, transportní molekuly a receptory, jsou ve sluchovém systému široce rozšířeny a plní důležité funkce při zpracování zvukových podnětů. Předchozí výzkum v této oblasti také zjistil, že patologické stavy sluchového systému jsou doprovázeny výrazným útlumem GABAergní inhibice (Tureček et al. 2023). Předpokládá se, že tyto změny jsou sekundárně způsobeny homeostatickými procesy, které zvyšují centrální zisk, aby kompenzovaly útlum kochleárního výstupu po periferním poškození. Výsledná nerovnováha mezi excitací a inhibicí však vede k hyperaktivitě neuronů a sluchovým poruchám jako tinnitus, hyperakuze nebo zhoršené porozumění řeči. Je proto možné očekávat, že případná dysregulace genů kódujících inhibiční proteiny by mohla vést ke stejným poruchám (Liu et al. 2021). Tato představa je podporována zjištěními, že patogenní varianty genů kódujících podjednotky GABA receptorů se podílejí na řadě neurologických a vývojových onemocnění, například epilepsie a autismu (Minere et al. 2024).

Předkládaná práce obsahuje výsledky studia sluchové funkce u myši s genetickou ablací modulační podjednotky GABA_B receptorů, proteinu KCTD12 (KCTD12^{-/-}). Porovnáním fenotypů myši KCTD12^{-/-} a kontrolních myši C57 se stejným genetickým pozadím (WT, Wild type) jsme se pokusili prokázat příčinnou souvislost mezi útlumem GABAergní inhibice vyvolaným experimentálním zásahem do exprese jejích složek a rozvojem ztráty sluchu. Sluchové funkce jsme studovali pomocí akustických, elektrofyziologických a behaviorálních testů u anestetizovaných i bdělých myši. Metodické přístupy jsme zvolili tak, abychom byli schopni detekovat funkční změny v periferní a centrální části sluchového systému. Věříme, že naše výsledky pomohou objasnit patofyziologickou úlohu podjednotek inhibičních GABA_B receptorů ve sluchové dráze savců.

Teoretická část

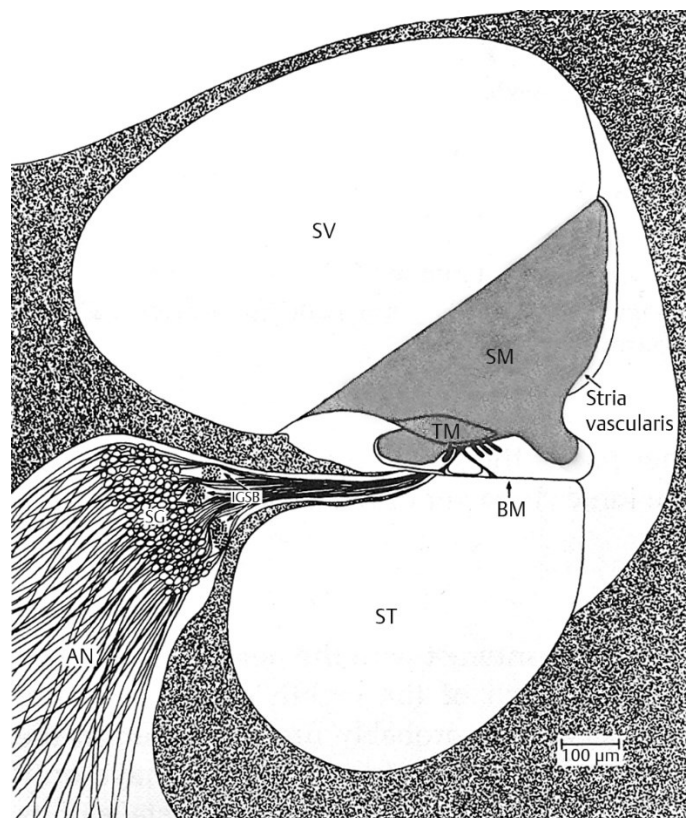
2 Sluchový systém savců

Sluch je jedním z nejdůležitějších, základních smyslů umožňující vnímání okolních zvuků. Pro člověka je zásadní jak pro komunikaci a porozumění řeči, tak pro řadu kulturních aspektů jako je například vnímání hudby. Sluchový systém zajišťuje detekci a zpracování zvukových podmětů přicházejících z externího prostředí. Periferní část sluchového systému obsahuje vnější, střední a vnitřní ucho. Ta slouží k primárnímu zachycení akustických stimulů, jejich převedení na elektrické signály a odeslání těchto signálů do centrální sluchové dráhy. Centrální sluchová dráha pak představuje komplexní nervovou síť, která přenáší a zpracovává sensorické signály z Cortiho orgánu vnitřního ucha do sluchové kůry (Gelfand a Calandruccio 2023, s. 32–40).

2.1 Vnitřní ucho

Klíčovou součástí vnitřního ucha je Cortiho orgán, který hraje zásadní roli v převodu mechanické energie zvukových vln na nervové stimuly (Russell 1987). Tyto impulzy přenášejí informace od sensorických buněk, dále po sluchové dráze až do sluchové kůry. Součástí Cortiho orgánu jsou vnitřní vláskové buňky (IHC, Inner hair cells), reagující na mechanické podráždění a uvolňující excitační neurotransmitter glutamát na zakončení primárních aferentních neuronů spirálního ganglia. Společně s IHC se v Cortiho orgánu nachází tři řady vnějších vláskových buněk (OHC, Outer hair cells), které fungují jako zesilovače akustických signálů. Oba typy sensorických buněk dostávají aferentní a eferentní inervace (Nadol 1988).

Primární aferentní neurony jsou tvořeny bipolárními buňkami spirálního ganglia, které svými dendrity interagují s IHC, zatímco jejich axony dávají vzniku osmému sluchově-rovnovážnému hlavovému nervu. Převážná část sluchového nervu přijímá signály od IHC, které stojí za hlavním zpracováním sluchových podmětů, zatímco menší část pak pochází od OHC (Nadol 1988).



Obrázek 1-Průřez kochleárním aparátem: (SV – scala vestibuli, SM – scala media, ST – scala tympani, TM – tektorální membrána, BM – bazilární membrána, IGSB – intragangliový spirální svazek složený převážně z eferentů, SG – spirální ganglion; AN – sluchový nerv) (Klang et al. 1986; Gelfand a Calandruccio 2023)

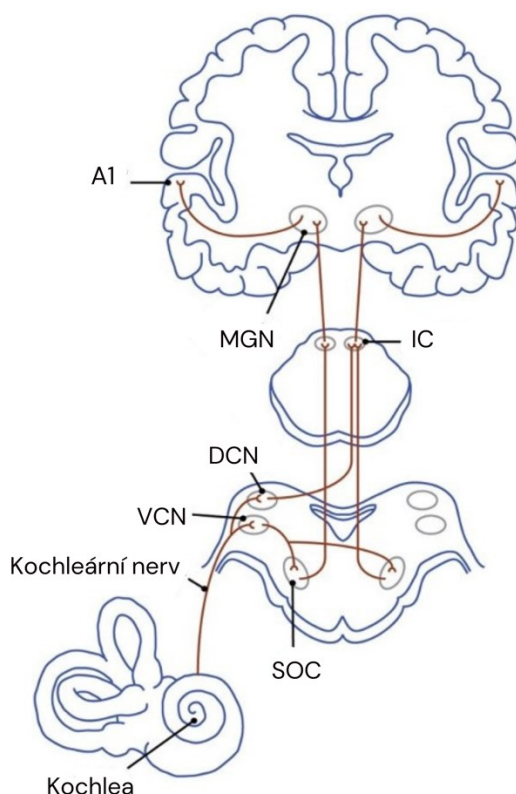
2.2 Sluchová dráha

Sluchová dráha je složitý neuronální systém zodpovídající za přenos a interpretaci zvukových informací z externího prostředí. Skládá se ze systému bilaterálních jader (neuronálních shluků), která jsou propojena vzestupnými a sestupnými projekčními vlákny a rozprostírají se v mozkovém kmeni, středním mozku, thalamu a mozkové kůře (Lee 2013).

Kochleární jádro je prvním procesním místem centrální sluchové dráhy. Morfologicky se rozděluje na dvě části, na dorzální kochleární jádro (DCN, Dorsal cochlear nucleus) a ventrální kochleární jádro (VCN, Ventral cochlear nucleus). Každé z nich obsahuje řadu projekčních neuronů, které vysílají axony do různých částí mozku, a několik typů interneuronů, které formují komplexní vnitřní obvody. Kromě výstupních drah obsahuje kochleární jádro také řadu vstupů pro vzestupné a sestupné dráhy ze sluchových i nesluchových oblastí. Hraje významnou roli v reprezentaci frekvencí, při lokalizaci zdrojů zvuku, filtraci nežádoucích zvuků či v časovém kódování (Shore 2005).

VCN obsahuje neurony, které vysílají axonální projekce do komplexu olivy superior (SOC, Superior olivary complex). To je skupina vzájemně propojených jader mozkového kmene, zpracovávající nezbytné informace pro lokalizaci zvuku v prostoru. Představují první binaurální místo sluchové dráhy, které přijímá binaurální informace z kochleárních jader obou hlemýžďů (Schofield a Coomes 2006; Kelly a Sally 1993). Významnou funkcí SOC je také tvorba regulačních signálů, posílaných cholinergními a GABA/glycinergními dráhami do středního mozku nebo zpět do kochleárního jádra a kochleárního aparátu. Eferentní vlákna vystupující z SOC tak umožňují zpětnou kontrolu kochleární aktivity skrze tzv. olivokochleární svazky vláken (Rapin a Gravel 2003).

Vzestupné projekce neuronů z jader mozkového kmene směřují do středního mozku do oblasti spodního kolikulu (IC, Inferior colliculus). Tato část spojuje oblast zadního a předního mozku a je tvořena tonotopicky uspořádaným centrálním jádrem obklopeným laterální, dorzální a rostrální kůrou. Centrální jádro IC integruje vzestupné sluchové informace a vytváří de novo kódovací vlastnosti, zatímco korové oblasti IC integrují multimodální informace a detekují nové vlastnosti zvukových stimulů (Caicedo a Herbert 1993). Informace zpracované v IC jsou následně přeposílány projekčními neurony do zevní části talamu, konkrétně do corpus geniculatum mediale (MGN, Medial geniculate nucleus), odkud jsou směřovány do finální části dráhy, a to do sluchové kůry (Calford a Aitkin 1983).



Obrázek 2-Sluchová dráha: Zobrazení 4 nejdůležitějších částí sluchové dráhy, vedoucí od kochleárního aparátu až do A1, skrz kochleární nerv, VCN, DCN, IC, MGN. Převzato a upraveno z (Butler a Lomber 2013).

Sluchová kůra člověka je situována v temporální oblasti mozkové kůry, odpovídající Brodmanovým oblastem 41 (Herschlův závit) a 42. Sluchová kůra je součástí neokortexu, je příjemcem signálu z aferentních drah a zodpovídá za finální úpravu a zpracování zvuků. Její morfologie je mapována do řady oblastí, které se u každého živočišného druhu trochu odlišují. U člověka se sluchová kůra rozděluje na primární sluchovou kůru (A1, Primary auditory cortex) a řadu sekundární oblastí. A1 se nachází v horním spánkovém laloku a přijímá vstupy z MGN. V A1 oblasti je tonotopie rozdělena do izofrekvenčních pruhů, které ve své přední části zpracovávají frekvence nízké a v zadní části frekvence vysoké. V asociačních oblastech sluchové kůry pak není pravidelnost tonotopie tak zřetelná (Kandel et al. 2021).

3 Patologické stavy sluchové dráhy

3.1 Ztráta sluchu

Ztráta sluchu představuje jeden z nejzávažnějších patologických stavů sluchového systému. Ovlivňuje jedince všech věkových skupin, od novorozenců až po seniory, přičemž u dětí může výrazně ovlivnit rozvoj řeči a u dospělých má za následek psychické, sociální ale i pracovní problémy (Punch et al. 2019). Příčiny ztráty sluchu jsou multifaktoriální a zahrnují modifikace a patologie v různých částech periferního a centrálního sluchového systému. Mezi časté příčiny patří enviromentální faktory, jako je expozice hluku, infekce vnitřního ucha, působení otoakustických látek nebo genetické faktory (Chai et al. 2022).

Akustické trauma, které může být akutní nebo chronické, je jedním z nejběžnějších stavů vedoucí k poškození sluchu. Hluk může sluch okamžitě poškodit buď prostřednictvím intenzivního akustického stimulu, který překračuje meze pružnosti periferního sluchového mechanismu, nebo dlouhodobou expozicí hlasitému zvuku, což může vést k poškození sluchu způsobené excitotoxicitou (Wada et al. 2017). Infekce mohou představovat jednu z dalších příčin úplné či částečné ztráty sluchu. Řada virových infekcí může poškodit struktury vnitřního ucha nebo vyvolat zánětlivé reakce, které mohou vyústit v poškození sluchu. Tyto infekce mohou navíc zvýšit citlivost a náchylnost k bakteriálním či plísňovým infekcím, což nadále zvyšuje riziko ztráty sluchu (Cohen et al. 2014; Veltri et al. 1981). Některé virové infekce zase mohou způsobit pouze akutní ztrátu sluchu, která se může obnovit spontánně (Chand et al. 1993).

Expozice ototoxickým látkám, které negativně ovlivňují sluchový a vestibulární systém, je další významnou příčinou vedoucí ke ztrátě sluchu. V mnoha zemích je sledování a dávkování těchto látek přísně regulováno, což snižuje potenciální problém ototoxicity. Problém naopak vzniká v rozvojových zemích, kde se ototoxické látky často předepisují bez odpovídajícího dávkování, hlídání rizikových skupin populace a ve špatných formách (Arslan et al. 1999). Z genetického hlediska je pak identifikována řada genů související se sluchem. Jedním z těchto genů je již identifikovaný protein prestin, který je exprimován na OHC a podílí se na změnách délky vláskových buněk (Zheng et al. 2000). Mutace v tomto genu jsou zodpovědné za sluchové poruchy (Liu 2003). Mezi další geny pravděpodobně související se sluchem se řadí například i gen KCTD12 na který se tato práce zaměřuje (Tureček et al. 2023).

Ztráta sluchu se projevuje posunutím sluchového prahu do vyšších hodnot, což způsobuje částečnou nebo úplnou nedoslýchavost, často doprovázenou tinnitem nebo poruchou stability. Zpočátku se ztráta sluchu může jevit jako latentní a pacient si přítomnost poruchy nemusí uvědomovat. Výraznější porucha sluchu se často projeví až v nepříznivých akustických podmínkách. V pokročilejších stádiích může dojít k praktické hluchotě, kdy pacient sice zaznamenává hlas z okolí, ale nerozumí řeči, a v nejzávažnějších případech k úplné hluchotě, kdy pacient neslyší zvuk žádný (Syka et al. 1981).

Problémy se sluchovým aparátem vyvolávají v centrálním sluchovém systému řadu změn, včetně tonotopické reorganizace a zvýšené síťové hyperaktivity, a to jak v rámci sluchového systému, tak mimo něj. Tyto změny, které jsou poškozením sluchu vyvolány, mohou vést k dalším symptomatickým projevům, jako je tinnitus či hyperakuzie, nicméně není to vždy nutnou podmínkou (Zeng 2020).

3.1.1 Presbyakuze

Presbyakuze je obecný termín pro ztrátu sluchu spojenou se stářím. Jedná se o multifaktoriální proces, který se projevuje různou závažností v závislosti na řadě enviromentálních a genetických faktorů. Neléčená forma presbyakuze postupem času ovlivňuje jedince v řadě sociálních aspektů. Lidé trpící touto formou se často potýkají s problémy v komunikaci, projevuje se u nich sociální izolace často doprovázená depresivními stavy, což může podpořit například rozvoj demence (Ciorba et al. 2012).

3.2 Tinnitus

Tinnitus je symptom charakterizovaný percepcí zvuků bez přítomnosti externího zdroje, a to buď v jednom nebo obou uších, či vně hlavy. Slyšitelné zvuky se mohou projevovat jako zvonění, pískání, bzučení nebo šumění, a mohou se lišit vnímanou frekvencí a intenzitou. Existují dva typy tinnitu: akutní, který obvykle odezní do několika hodin a chronický, který přetrvává dlouhodobě. V posledních letech stále narůstá incidence tinnitu, přičemž postižena je nejen starší část populace, ale čím dál více i mladší osoby. Tinnitus zároveň velmi zásadně snižuje kvalitu života postižených, což je umocněno absencí účinné léčby. Existuje pouze pár způsobů na zmírnění příznaků nebo na zlepšení psychické pohody (Bhatt et al. 2023).

Mechanismy tinnitu jsou stále zkoumány, ale doposud nebyly jednoznačně pochopeny. Jedná se o komplexní syndrom, který má řadu příčin vzniku, včetně akustického traumatu, vysokého krevního tlaku, problémů s krční páteří, psychických problémů a dlouhotrvajícího

stresu, anebo jiného onemocnění. Často je tinnitus iniciován poškozením periferní části sluchového systému, což vede k senzoryneurální sluchové ztrátě a následně k maladaptivní plasticitě v centrální části sluchové dráhy. Maladaptivní změny zahrnují zvýšenou excitabilitu a hyperaktivitu nervových buněk na různých úrovních sluchového systému, jako je DCN, IC, MGN nebo sluchová kůra. Je předpokládáno, že neuronální hyperaktivita vzniká jako důsledek narušení glycinergní a GABAergní inhibice (Henry et al. 2014).

3.3 Hyperakuze

Hyperakuze, jež se často vyskytuje společně s tinnitem, je porucha charakterizována zvýšenou citlivostí na běžné zvuky v okolním prostředí. Pro osoby trpící touto poruchou se zvuky každodenního života stávají nadměrně rušivými, nepříjemnými nebo dokonce bolestivými. Hyperakuze může vést k rozvoji řady dalších symptomů, jako je zvýšená bolest hlavy, únava, úzkost, deprese či potíže s koncentrací. Podobným stavem je fonofobie, neboli episodická nesnášenlivost zvuků, která se může objevovat krátkodobě například u migrén, nicméně s postupem času odezní (Paulin et al. 2016).

Některé studie rozdělují hyperakuzi do několika hlavních kategorií na základě typů symptomů, které pacienti uvádějí. Tyto kategorie zahrnují hlasitostní hyperakuzi, bolestivou hyperakuzi a hyperakuzi vyvolávající strach a obtěžování. Hlasitostní hyperakuze je velmi běžná u lidí se senzoryneurální ztrátou sluchu. U bolestivé hyperakuze se prahová hodnota bolesti pohybuje zhruba kolem 140 dB SPL při 2 kHz, přičemž tito pacienti mohou cítit bolest doprovázenou nepříjemným tlakem v uchu a pálením ucha či jeho okolí. Emocionální reakce, jako jsou strach a obtěžování, jsou typické pro poslední jmenované typy hyperakuze a odrážejí emocionální reakce s ní spojené. Strach ze zvuku může být vrozený, naučený anebo kombinací obojího (Salvi et al. 2022).

Mechanismy vzniku hyperakuze nejsou dosud plně pochopeny, podobně jako u tinnitu. Neurální mechanismy této poruchy jsou složité a komplexní. Patofyziologie hypersenzitivity ke zvuku je popsána u mnoha stavů jako je postižení středního ucha nebo například lícního nervu (Anari et al. 1999). Jedna z převládajících teorií předpokládá, že hyperakuze je důsledkem zvýšeného zisku v centrálním nervovém systému, což je forma homeostatické plasticity kompenzující snížený výstup nervových signálů z kochleární části sluchového systému (Auerbach et al. 2014). Výzkum na zvířatech, u kterých byla hyperakuze vyvolána akustickým traumatem a ototoxicitou, odhalil pozorovatelné změny na různých úrovních

centrálního sluchového systému. Změny zahrnovaly zvýšenou neuronální synchronizaci, zvýšenou spontánní excitabilitu v DCN, IC a rozšíření a reorganizace kortikálních oblastí odpovědi (Mulders a Robertson 2009; Weisz et al. 2007).

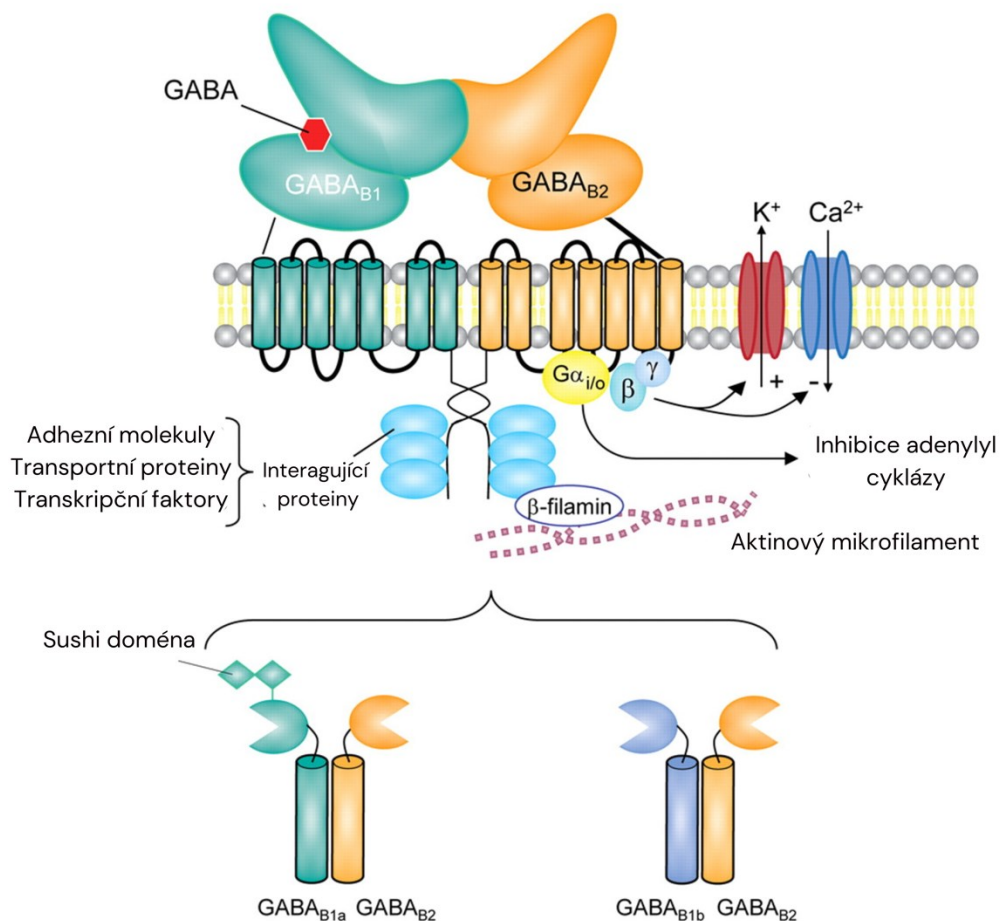
4 GABA_B receptory

GABA_B receptory jsou s G-proteiny spřažené receptory pro GABA, jednoho z hlavních inhibičních neurotransmiterů nervového systému savců. GABA_B receptory jsou důležité regulátory neuronální excitability. Vyznačují se širokým rozšířením ve sluchovém systému, kde se podílí na procesech nezbytných pro správnou funkci sluchu. Jedná se například o regulaci spontánní aktivity neuronů sluchové dráhy, modulaci kochleárního zesilovače, binaurální a časové zpracování informací, prediktivní kódování a regulaci oscilatorní aktivity neuronů sluchové kůry (Ngodup et al. 2024; Maison et al. 2009; Wedemeyer et al. 2013; Magnusson et al. 2008; Ayala a Malmierca 2018; Oswald et al. 2009). Vzhledem k významu receptorů se předpokládá, že závažné narušení jejich exprese nebo distribuce ve sluchové dráze povede k hyperaktivitě neuronálních okruhů a k poruchám sluchu. Tato teze zatím nebyla plně prokázána, ale některé předchozí výsledky by mohly podpořit platnost této hypotézy. Patří k nim nálezy snížené hustoty GABA_B receptorů ve sluchovém systému stárnoucích potkanů s příznaky presbyakuze a identifikace izoformy proteinu KCTD12, modulační podjednotky receptoru, jako modifikátoru rizika chronického tinnitu (de Villers-Sidani et al. 2010; Milbrandt et al. 1994; Sand et al. 2012). Objasnění patofyziologické úlohy dysfunkce GABA_B receptoru by naznačilo, že jeho podjednotky mohou představovat nový terapeutický cíl pro léčbu sensorineurální ztráty sluchu. Tato představa je podporována také tím, že strukturálně-funkční vlastnosti receptoru jsou poměrně dobře známé a existuje řada farmakologických nástrojů, které umožňují cílit na jeho aktivitu v lidském nervovém systému.

4.1 Strukturální a funkční vlastnosti GABA_B receptoru

GABA_B receptory jsou komplexní heterodimerní struktury složené z podjednotek GABA_{B1} a GABA_{B2} klíčové pro jejich funkci. Podjednotky tohoto receptoru jsou složeny z tří hlavních domén: první částí je extracelulární N-terminální doména, známá jako venus fly-trap (VFT) doména. Tato specifická doména je zodpovědná za navázání neurotransmiterů GABA, což je klíčovým krokem k aktivaci receptoru (Galvez et al. 1999).

Druhým kompartmentem receptoru je sedm transmembránových domén, které jsou následovány intracelulární C-terminální doménou. Toto složení domén umožňuje heterodimerizaci mezi podjednotkami $GABA_{B1}$ a $GABA_{B2}$. Zatímco podjednotka $GABA_{B1}$ je zodpovědná za přímé navázání agonisty pomocí VFT domény, $GABA_{B2}$ podjednotka ligand neváže přímo, ale je nezbytná pro signalizaci a aktivaci G-proteinu. Zároveň podjednotka $GABA_{B1}$ má dvě odlišné izoformy, $GABA_{B1a}$ a $GABA_{B1b}$, které se liší v N-terminální oblasti, a to přítomností tandemového páru extracelulární domény, nazývané sushi doména. Sushi doména se vyskytuje pouze u izoformy $GABA_{B1a}$ a její vlastnost spočívá v zajištění axonálního transportu této podjednotky (Biermann et al. 2010).



Obrázek 3-Strukturální a funkční vlastnosti GABA_B receptoru. Převzato a přeloženo z (Gomes et al. 2019).

GABA_B receptor po navázání ligandu na $GABA_{B1}$ způsobí konformační změnu nezbytnou pro další molekulární interakce s heterotrimerním G-proteinem umístěným na intracelulární straně plazmatické membrány. Po navázání proteinu k aktivovanému receptoru dojde ke změně jeho konformace, která vede k výměně guanosindifosfátu

(GDP, Guanosine diphosphate) za guanosintrifosfát (GTP, Guanosine triphosphate) na alfa podjednotce (Gai/o) G-proteinu. Navázání způsobí disociaci proteinu na dva hlavní komplexy alfa (α) a beta-gamma ($\beta\gamma$). Tyto podjednotky následně moduluji řadu cílových molekul v cytoplazmě a buněčné membráně, včetně enzymů a iontových kanálů, což spouští řadu signálních reakcí a konformačních změn efektorových proteinů. Podjednotka alfa má za následek inhibici adenylylcyklázy a tím i zapříčinění ovlivnění dráhy cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP, Cyclic adenosine monophosphate) a proteinkinázy A (PKA, Protein kinase A) (Knight a Bowery 1996). $\beta\gamma$ komplex G-proteinu může modulovat funkce iontových kanálů, včetně otevření draslíkových Kir3 kanálů, které způsobují hyperpolarizaci buňky, či inhibici napětově řízených vápníkových kanálů (VGCC, Voltage-gated calcium channel) vedoucí ke snížení neuronální excitability. Aktivace G-proteinu je ukončena hydrolýzou GTP na alfa podjednotce, která následně vytvoří heterotrimer s beta podjednotkou vedoucí k obnovení inaktivní formy G-proteinu (Turecek et al. 2014).

4.2 KCTD proteiny

Rodina cytosolických proteinů, obsahujících tzv. tetramerizační doménu draslíkových kanálů (KCTD), obsahuje několik desítek členů s rozmanitými funkcemi v buněčných procesech. Čtyři zástupci této rodiny, proteiny KCTD 8, 12, 12b a 16 se konstitutivně vážejí na C-terminální doménu podjednotky GABA_{B2} a byly proto nazvány jako pomocné podjednotky GABA_B receptoru (Schwenk et al. 2010). Tyto proteiny obsahují relativně konzervativní N-koncovou doménu T1 a variabilní C-terminální doménu H1. T1 zprostředkovává spojení čtyř molekul KCTD do homomerních a heteromerních komplexů a jejich vazbu na receptor. Celý komplex GABA_B receptoru se vyznačuje zvýšenou povrchovou expresí, afinitou a urychlenou kinetikou G-proteinové signalizace (Ivankova et al. 2013; Turecek et al. 2014). U proteinů KCTD12 a KCTD12b doména H1 vyvolává výraznou desenzitizaci odpovědi GABA_B receptorů, interakcí s $\beta\gamma$ podjednotkami G proteinu. Samotná desenzitizace je regulována fosforylací serinu-892 na GABA_{B2} nebo heteromerizací KCTD12 s KCTD16 (Adelfinger et al. 2014). Kromě toho protein KCTD16 zpomaluje deaktivaci fázi GABA_B-aktivovaných Kir3 proudů, avšak mechanismus tohoto účinku není plně objasněn (Fritzius et al. 2017).

KCTD proteiny se vyznačují vysokou úrovní exprese v nervové soustavě, zejména v hipokampu, mozečku, thalamu a mozkové kůře (Metz et al. 2011). Ve sluchovém systému byly nalezeny proteiny KCTD12 a 16, a to ve vyvíjejícím se kochleárním aparátu, dále v DCN, IC a MGN myši (Resendes et al. 2004; Metz et al. 2011). Význam KCTD pro sluch není

objasněn, ale jejich lokalizace ve fibrocytech Cortiho orgánu naznačuje, že by mohly být zapojeny v recyklaci draslíkových iontů a v udržování endokochleárního potenciálu.

5 Způsoby testování sluchové funkce u myší

Vyšetření sluchu u myších modelů poskytuje důležité informace o mechanismech zpracování zvuků ve sluchovém systému savců, včetně člověka. Mezi základní metodické přístupy se řadí behaviorální testy, jako je akusticky vyvolaná úleková reakce a její modulace zvukovými prepulzemi, a dále audiometrické metody využívající měření otoakustických emisí nebo snímání kmenových potenciálů elektrofyziologickými technikami.

5.1 Úleková reakce

Úleková reakce organismu je jeho rychlá odpověď na nečekaný a intenzivní podnět. Podnět může mít řadu podob, akustický, dotykový, vizuální a další. Daný stimul způsobuje rychlou a impulzivní reakci, která se projevuje převážně stažením svalů, zvýšením srdeční tepové frekvence nebo zavřením očí. Běžným typem reakce je akustická úleková odpověď (ASR, Acoustic startle response), která je vyvolána zvukem jako podnětem k leknutí. Úlekový reflex u myší využívá jednoduchou a rychlou neuronální dráhu, která nevyžaduje účast vyšších nervových center. Tato dráha vykazuje minimální časovou prodlevu a primárně zasahuje jen do oblastí mozku kmene. Přenos elektrických signálů z vláskových buněk začíná u aferentních nervových zakončení v kochleě a pokračuje sluchovým nervem do neuronů kochleárního jádra. Zde dochází k prvnímu zpracování informací, které pokračují dále do retikulárních jader v kaudální oblasti pontu. Tato jádra převádějí signály do motoneuronů, jež inervují svalová vlákna. Aktivace svalových vláken vede ke svalové kontrakci, která umožňuje vlastní ASR (Lee et al. 1996; Gómez-Nieto et al. 2014).

Při behaviorálním testování sluchové funkce bývá často používána technika zkoumající citlivost ASR k předcházejícímu zvukovému stimulu. Jedná se o tzv. prepulsní inhibici ASR (PPI, prepulse inhibition) využívající méně intenzivnější prestimul (prepuls), který předchází vlastní úlekový podnět o řádově desítky ms. Jeho úkolem je inhibovat reakci zvířete na hlavní akustický stimul mechanismy, které probíhají v obvodech středního mozku (Yeomans et al. 2010). Tato metoda umožňuje studium nepodmíněného reflexu, který poskytuje informace o správném fungování nervových center. Prestimul moduluje amplitudu ASR a indikuje schopnost nervové soustavy adaptovat se na silný zvukový podnět v přítomnosti méně

intenzivnějšího podmětu (Hoffman a Searle 1968). Variantou PPI je testování inhibice ASR pauzou v šumu na pozadí (GPIAS, Gap prepulse inhibition of the acoustic startle). Tato technika byla navržena pro detekci přítomnosti tinnitu u laboratorních zvířat (Turner et al. 2006). U normálně slyšících zvířat způsobuje pauza v šumu významnou inhibici ASR. Naopak u zvířat s experimentálně vyvolaným tinnitem je pauza maskována fantomovou percepcí a její schopnost potlačovat ASR je snížena (Turner a Parrish 2008; Turner et al. 2006). Výhodou této behaviorální metody je, že není potřeba dlouhá tréninková příprava, která je nutná u některých behaviorálních testů, kde může mít délku několik dnů či týdnu. Zároveň umožňuje opakované použití s přiměřeným časem odpočinku mezi jednotlivými seancemi.

5.2 Otoakustické emise

Měření otoakustických emisí (OAE, Otoacoustic emissions) je neinvazivní metoda hodnotící funkční stav OHC. OAE jsou zvuky kochleárního původu, které je možné zaznamenat mikrofonom vloženým do zevního zvukovodu. Tento typ měření se uplatňuje jak ve výzkumu, tak ve zdravotnictví, a to převážně u diagnostiky sluchu novorozenců. Typů OAE je celá řada, primárně je můžeme rozdělit na spontánní, které vznikají v uchu samovolně a evokované, které před měřením vyžadují akustický podmět (Kemp 1978). Spontánní otoakustické emise (SOAE, Spontaneous otoacoustic emission) jsou úzkopásmové šумы vznikající samovolným pohybem OHC a vycházející z vnitřního ucha bez vnější akustické stimulace. Vyskytují se přirozeně u zdravě slyšících jedinců (Kuroda 2007). Frekvenční rozsah SOAE se pohybuje mezi 500 Hz a 4 500 Hz a malé procento lidí může své SOAE vnímat dokonce jako tinnitus (Penner 1990). Evokované OAE jsou transientní OAE (TEOAE, transient evoked otoacoustic emission), které vznikají jako odezva na stimulaci širokopásmovým zvukovým podmětem nazývaným klik. Odpověď se objevuje se zpožděním několika ms po stimulaci a trvá kolem 20 ms (Hall a Lutman 1999). Zvuk klik putuje podél kochleárního kanálu a zpět k mikrofону, který odpovědi zaznamenává. Doba zpoždění je nejkratší v místech poblíž báze hlemýždě, kde se vyskytují vyšší frekvence a směrem k jeho bázi se zvyšuje (Gelfand a Calandruccio 2023).

Posledním typem evokovaných emisí jsou tzv. distorzní produkty otoakustických emisí (DPOAE, Distortion product otoacoustic emissions). Jejich měření slouží k posouzení fyziologického stavu OHC ve vnitřním uchu savců. DPOAE jsou typem signálu, který vzniká v kochleě generováním OHC. Měří se ve sluchovém kanálu, jako odpověď na dva odlišné zvukové stimuly o různých frekvencích, značených f_1 a f_2 . Odpovědi jsou zvuky, které jsou

matematickou kombinací stimulačních frekvencí a jsou zaznamenávány do výsledného grafu s názvem DP-gram (Stover et al. 1996). Mikrofon, který zaznamenává akustické emise v tomto případě vnímá tři tóny, dva podmětové a jeden vyvolaný. Nejvyšší hodnoty DPOAE se objevují při poměru stimulačních frekvencí f_2/f_1 okolo 1,2 a rozdílu intenzit $f_2 - f_1 \geq 10-15$ dB. Frekvence na které se DPOAE bude pohybovat se rovná dvojnásobku frekvence nižšího tónu minus frekvence vyššího tónu (Marcrum et al. 2016). DPOAE se vyskytují ve všech zdravých uších. Jejich amplitudy klesají s rostoucím věkem, po akustickém traumatu a působení ototoxických látek. Při senzoryneurální ztrátě sluchu, kdy posun sluchových prahů přesahuje 60 dB, nejsou DPOAE často detekovány (Moulin et al. 1994).

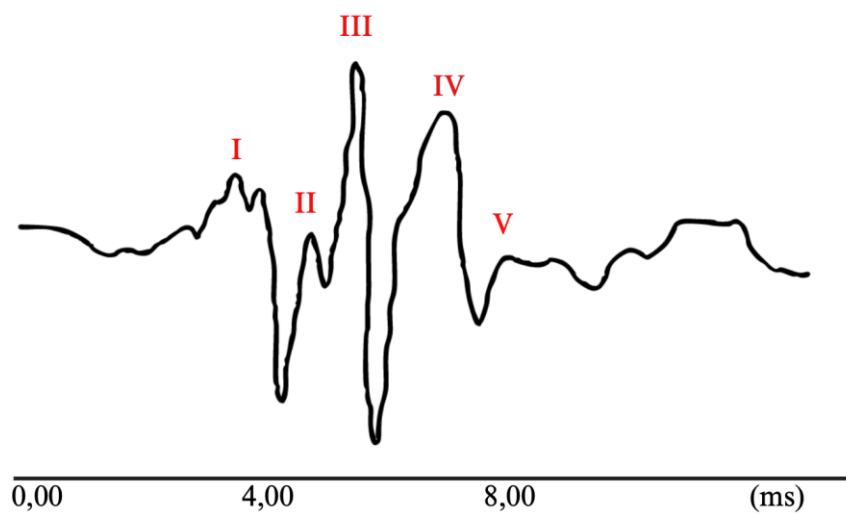
5.3 Odezva sluchového kmene

Odezva sluchového mozkového kmene (ABR, Auditory brainstem responses) vzniká elektrickou aktivitou sluchového nervu a neuronů sluchových jader v mozkovém kmeni a částečně středním mozku. Bývá vyvolána zvukovými stimuly o různé frekvenci a intenzitě. Je to metoda velmi často využívaná v lékařství, ABR jsou měřitelné u všech pacientů s normálním sluchem, včetně novorozenců. Výhodou této metody je že nevyžaduje aktivní účast pacienta. ABR mohou být ovlivněny stárnutím, pohlavím a patologickými stavy sluchové dráhy. S přibývajícím věkem se zvyšuje latence a snižuje se amplituda pozorovaných odpovědí (Gelfand a Calandruccio 2023, s. 314, 316)

Měřením ABR se získávají informace o přenosu a zpracování senzoryckých signálů v začátcích sluchové dráhy. ABR obsahují až 7 pozitivních vln s časovým odstupem kolem 0,8 ms od sebe. V klinických studiích se měření ABR týká vln I až V, které lze poměrně snadno identifikovat, přičemž největší pozornost je věnována vlnám I, III a V. Vlny jsou identifikovány dle jejich absolutních latencí a amplitud (Gelfand a Calandruccio 2023, s. 315–316). Často jsou jednotlivé vlny přisuzovány konkrétním místům sluchové dráhy (Alvarado et al. 2012). Vlny I a II představují komplexní akční potenciály generované sluchovým nervem a buňkami kochleárního jádra. Následné vlny mají pravděpodobně více míst původu a jsou kombinací aktivity několika jader mozkového kmene (Gelfand a Calandruccio 2023, s. 315–316). Vlna III bývá spojována s aktivitou DCN a SOC a vyznačuje se absolutní latencí 3,5 ms. Vlna IV vzniká aktivitou SOC a vzestupných sluchových vláken laterálního lemnisku s absolutní latencí 4,5 ms. Vlna V je odpovědí laterálního lemnisku a IC s latencí 5,5 ms. Vlna I bývá často u myši velmi robustní, naopak u člověka může být poměrně těžko identifikovatelná. Podobně je tomu

u vlny V, která u myši není vždy dobře identifikovatelná, ale u člověka je lehce patrná (Burke et al. 2023).

Další vlny odrážejí evokovanou aktivitu ve vzestupných bodech sluchového středního mozku. Se snižujícím se stimulem je amplituda ABR vln menší a latence naopak větší. Měření se často provádí po 5 až 10 dB SPL a to do té doby, než není patrná žádná odpověď. Poslední bod, kde lze rozeznat odpověď, je určován jako prahová hodnota (Zheng et al. 1999).



Obrázek 4-Ukázka měření ABR se zvýrazněnými vlnami I až V. Vlastní zdroj pomocí Canva.com.

Experimentální část

6 Metody a materiál

6.1 Materiál

6.1.1 Zvířata

Pro experimentální část práce byly použity myši obou pohlaví, a to kmene C57Bl6j/Rj (Janvier labs, Francie) a jejich geneticky modifikované varianty postrádající protein KCTD12 (University of Basel, Švýcarsko). Myši byly umístěny v klecích po 2 až 5 zvířatech ve standardních laboratorních podmínkách, 12 hodin světlo/tma cyklus, okolní teplota 23 stupňů celsia a stálý přístup k vodě a pití. Stáří myši u obou skupin se pohybovalo, zhruba ve stejném věku, kolem 2-3 měsíců, kdy byly již zcela vyvinuté sluchové schopnosti těchto zvířat. Všechny experimenty byly provedeny v souladu s principy péče o laboratorní zvířata a v souladu s předpisy etické komise Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

6.1.2 Anestezie

U zvířat byla subkutánně podána anestezie ketamine/xylazine (dle váhy zvířete), poté přibližně poloviční dávka na její udržení. Anestezie byl roztok 35 mg/kg ketaminu (Calypsol 50 mg/ml), 6 mg/kg xylazinu (Xylapan 20 mg/ml) a fyziologického roztoku (NaCl 0,9 %). Podávána byla pouze u měření audiometrie.

6.2 Metody

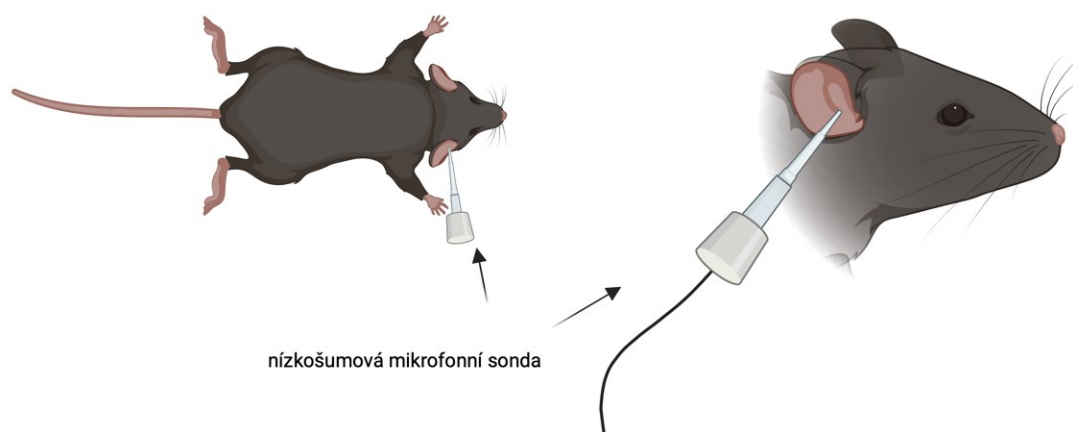
6.2.1 Testování sluchové funkce

Sluchové funkce u myši byly studovány pomocí záznamu ASR, ABR a DPOAE.

6.2.1.1 DPOAE

Při testování do uší anestetizovaných myši byly zvuky přenášeny pomocí piezoelektrických reproduktorů s uzavřeným polem připojených k sondě. Otoakustické emise byly zaznamenávány ze zvukovodu pomocí nízkošumové mikrofonní sondy (Etymotic ER-10B+, Etymotic research, IL, USA). Ke generování zvukových podnětů a záznamu emisí byl použit TDT System III Real-Time Processor RP 2.1 (vzorkovací frekvence 100 kHz). Pro určení amplitudy DPOAE byl měřen kubický součin zkreslení $2f_1-f_2$ v odezvě na dva primární tóny f_1 a f_2 (poměr frekvencí $f_2/f_1 = 1,21$ a poměr hladin $L_1/L_2 = 70/65$ dB SPL), přičemž f_2

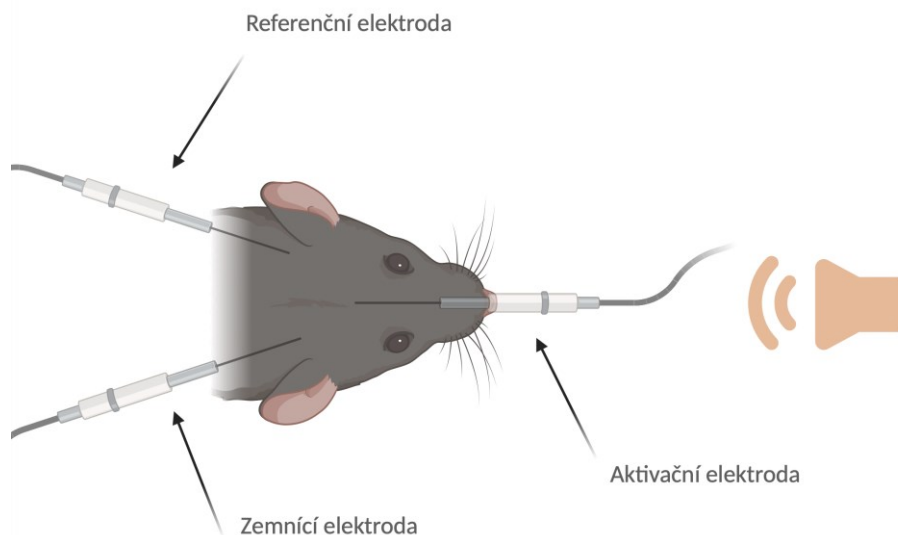
se pohybovala v rozmezí 4 až 40 kHz. Pro určení prahů otoakustických emisí hrál každý reproduktor jeden ze dvou primárních tónů (f_1 a f_2) a pohyboval se v krocích po 5 dB od 70 do 20 dB SPL (pro f_2). V již výše zmíněném frekvenčním rozsahu (4 – 40kHz) byly změřeny 3 body na oktávu. DPOAE prahy byly definovány jako nejnižší úroveň intenzity potřebné k produkci emise ≥ 5 dB SPL. Pokud žádná úroveň intenzity zvuku nevygenerovala emisi splňující toto kritérium, předpokládalo se, že prahová hodnota je 70 dB SPL. Zaznamenaná data byla analyzována pomocí softwaru MATLAB.



Obrázek 5-Ilustrace měření DPOAE. Vlastní zdroj pomocí BioRender.com.

6.2.1.2 ABR

Na uspání myši byla nejdříve subkutánně podána bezpečná a krátkodobá anestezie (roztok ketamine/xylazin) dle váhy zvířete. Následně byla myš umístěna do odhlučněné komory na vyhřívanou podložku o teplotě 38 stupňů celsia, aby byla udržena teplota těla a orientována hlavou směrem k reproduktoru. Byly monitorovány základní reflexy, respirační a dechová frekvence. Měřící elektroda byla umístěna pod kůži zvířete na temeni hlavy a další elektrody referenční a zemní na levý a pravý mastoid.



Obrázek 6-Ilustrace měření ABR. Vlastní zdroj pomocí BioRender.com.

Sluchové odpovědi mozkového kmene (ABR) byly získány z myši uvedených do anestézie. Během záznamu byly myši umístěny na vyhřívané podložce ve zvukotěsné anechoické místnosti. TDT System 3 Real-Time Processor RP 2.1 (Tucker Davis Technologies, FL, USA) byl použit ke generování zvukových podnětů, které byly přenášeny na zvíře prostřednictvím akustického systému PMA 720 (Denon, Japonsko) a reproduktorového systému sestávajícího z páskového výškového reproduktoru 140-15D (RAAL advanced loudspeakers, Srbsko) a reproduktoru Alpha 6A (Eminence, USA) v podmínkách volného pole. Frekvenční odezva systému byla plochá (± 3 dB) v rozsahu od 1 do 50 kHz. Kalibrace zařízení byla provedena pomocí 1/4palcového mikrofonu Brüel & Kjaer 4939 a zvukoměru B&K 2231 (Brüel & Kjaer, Dánsko).

ABR odpovědi byly vyvolány klikem o délce 0,1 ms a sérií tónů o frekvencích 2, 4, 8, 16 a 32 kHz o celkovém trvání 5 ms, včetně 1 ms náběhu/spádu s četností 15/s. Úroveň obou typů podnětů byla nastavena mezi 110 a 0 dB SPL s krokem 10 dB až 5 dB SPL. Evokované potenciály mozkového kmene byly zaznamenány pomocí podkožních jehlových elektrod umístěných na temeni (aktivní elektroda) a v oblasti krčních svalů (referenční elektroda). Zaznamenané signály byly filtrovány pásmovou propustí (300 až 3 000 Hz) a zprůměrovány z 500 záznamů vyvolaných opakovanou stimulací (software TDT BioSig). Prahovou hodnotou ABR byla minimální intenzita tónu nebo kliknutí, která vyvolala vizuálně detekovatelnou odpověď ABR v očekávaném časovém okně. Amplituda vln ABR byla měřena od negativního

vrcholu po pozitivní vrchol u odpovědi vyvolaných klikem. Amplitudy vln ABR získaných při různých úrovních kliknutí byly použity ke konstrukci růstových funkcí ABR. Absolutní latence byly měřeny od okamžiku, kdy zvukový podnět dosáhl ucha, do okamžiku pozitivního vrcholu každé vlny.

6.2.1.3 ASR a GPIAS

ASR byly studovány pomocí systému Acoustic Startle Response System (Habitest model E10-21, Coulbourn, Pennsylvania, USA) umístěného ve zvukotěsné místnosti. Během testování byla jednotlivá zvířata uzavřena v malé drátěné kleci umístěné na citlivé plošině obsahující snímač zátěže, který převádí tlak na napětí. Výstupní elektrické signály byly získávány a zpracovávány pomocí systému TDT 3 s procesorem RP 2 pracujícím v reálném čase (Tucker Davis Technologies, Alachua, USA). Akustické podněty byly generovány systémem TDT 3 a prezentovány prostřednictvím reproduktoru 29TAF/W (SEAS, Norsko) umístěného nad zvířetem. Frekvenční odezva reproduktoru v testovacím zařízení byla v rozmezí ± 9 dB při frekvenci 1-32 kHz. Zařízení bylo kalibrováno pomocí ¼palcového mikrofону Brüel & Kjaer 4939 a zvukoměru Brüel & Kjaer 2231 (Brüel & Kjaer, Dánsko). Generování podnětů, sběr dat a jejich zpracování bylo řízeno softwarem Matlab. Reakce na stimulační podněty byly analyzovány v rámci 100 ms okna začínajícího na začátku podnětu a byly měřeny jako maximální amplituda napětí od vrcholu k vrcholu.

Testování se skládalo ze dvou až tří stejných sezení, která probíhala odděleně ve dvou po sobě následujících dnech. Cílem prvního sezení bylo přizpůsobit zvíře testovacímu zařízení a jeho výsledky nejsou v této práci uvedeny. Každé sezení začalo desetiminutovou habituací zvířete na experimentální zařízení, po níž následovaly 4 po sobě jdoucí série 21 podnětů vyvolávajících leknutí v intervalech náhodně se měnících od 20 do 30 sekund. Intervaly mezi tréninky byly 10 minut a odpovědi na první z 21 podnětů pro každý trénink nebyly zahrnuty do další analýzy. Sezení zahrnovala tři různé typy behaviorálních paradigmat: (a) vyvolání ASR samotným úlekovým podnětem (bílý šum, 50 ms/110 dB SPL, doba náběhu/spádu 0,5 ms) bez další modulace, (b) inhibice ASR úzkopásmovým šumem pozadí (BGN (background noise), 1/3 oktavového pásma se středem na 10 kHz, 65-85 dB SPL) a (c) inhibice ASR mezerovým pre-pulsem (50 ms, doba náběhu/spádu 3 ms, časový interval 100 ms mezi nástupem pre-pulsu a úlekovým podnětem) v přítomnosti BGN (GPIAS). Paradigma v bodě a) bylo použito během prvních testovacích sérií, zatímco paradigmata v bodech b) a c) byla použita během druhé až čtvrté série jako 10 stimulací bez mezery a 10 stimulací s mezerou prezentovaných v náhodném pořadí za přítomnosti kontinuálního BGN o intenzitě 65 a 75 dB SPL (v případě

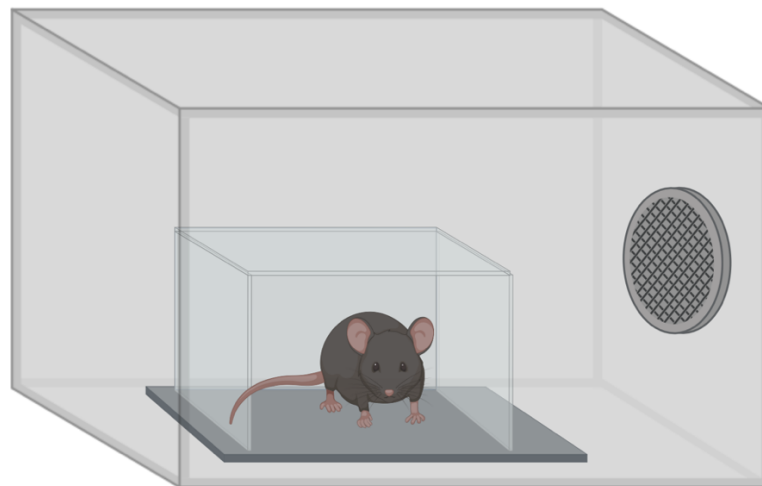
některých myší byly naměřeny hodnoty i pro 85 dB SPL). Bazální amplituda ASR pro každou myš byla kvantifikována jako průměr 10 náhodně vybraných napěťových odpovědí zaznamenaných během první série. Inhibice ASR pomocí BGN byla kvantifikována takto:

$$\text{Relativní amplituda ASR [\%]} = (\text{ASR}_{\text{BGN}}/\text{ASR}_{\text{no BGN}}) \times 100,$$

kde ASR_{BGN} a $\text{ASR}_{\text{no BGN}}$ představují průměrné amplitudy ASR získané z 10 opakovaných měření pro pokusy bez mezery v přítomnosti BGN a z měření získaných během první série v nepřítomnosti BGN. Inhibice ASR pomocí gap-prepulsu byla kvantifikována následovně:

$$\text{GPIAS [\%]} = (1 - [\text{ASR}_{\text{gap}}/\text{ASR}_{\text{no gap}}]) \times 100,$$

kde ASR_{gap} a $\text{ASR}_{\text{no gap}}$ představují průměrné amplitudy ASR, z nichž každá byla získána z 10 opakovaných měření v přítomnosti BGN, s mezerou a bez mezery před úlekovým stimulem.



Obrázek 7-Illustrace měřicí startlové aparatury: Zvíře je umístěno v boxu, který omezuje jeho pohyb na minimum. Samotný box se nachází na snímací piezoelektrické desce, detekující pohyby. Celý box s myší je umístěn v odhlučněném prostoru se zabudovaným reproduktorem. Vlastní zdroj pomocí BioRender.com.

6.2.2 Zpracování dat

Soubory dat byly analyzovány pomocí programu GraphPad Prism 9.5. Všechny hodnoty jsou prezentovány jako průměr \pm SD, hladina významnosti je stanovena na $<0,05$. K posouzení rozdílů v průměrech byly použity dvouvýběrové Studentovy t-testy a dvoucestná ANOVA následovaná Šidákovým testem mnohonásobného porovnání. Normalita dat byla posouzena pomocí D'Agostinova a Pearsonova testu a přítomnost odlehlých hodnot byla ověřena pomocí metody ROUT (Q=0,05 %).

7 Cíle práce

Cílem naší práce bylo ukázat význam proteinu KCTD12 ve sluchovém systému myši. Tuto úlohu jsme testovali pomocí studia změny sluchové funkce u myši s chybějícími KCTD12 proteiny. Na zhodnocení vlivu delece na kochleární funkci bylo použito měření otoakustických emisí. Funkční změny na úrovni mozkového kmene a středního mozku byly monitorovány pomocí elektrofyziologického snímání evokovaných kmenových potenciálů. Pro testování vlivu delece na komplexní sluchové funkce u bdělých zvířat jsme zvolili měření úlekové reakce a její modulace zvukovými prepulsy.

Experimentální práce byly rozděleny do tří etap podle uvedených metodologických přístupů:

1) Akustická měření:

Cílem bylo stanovit amplitudy a prahové hodnoty DPOAE u WT a KCTD12^{-/-} myši. Testovali jsme hypotézu, že KCTD12 exprimovaný podpůrnými buňkami v Cortiho orgánu a fibrocyty ve stria vascularis je zapojen do kochleárních mechanismů udržujících správnou funkci OHC. Očekávali jsme, že rozdíly v parametrech OAE u myši s rozdílnou expresí KCTD12 naznačí změny ve funkčních vlastnostech OHC a tím podpoří platnost naší hypotézy.

2) Elektrofyziologická měření:

Cílem těchto pokusů bylo ověření hypotézy, že delece KCTD12 vede k sensorineurální ztrátě sluchu. Hypotézu jsme testovali porovnáním zvukem vyvolaných ABR u myši WT a KCTD12^{-/-}. Předpokládali jsme, že snížený kochleární výstup u KCTD12^{-/-} myši se projeví posunem prahů ABR a snížením jejich amplitudy.

3) Behaviorální testování:

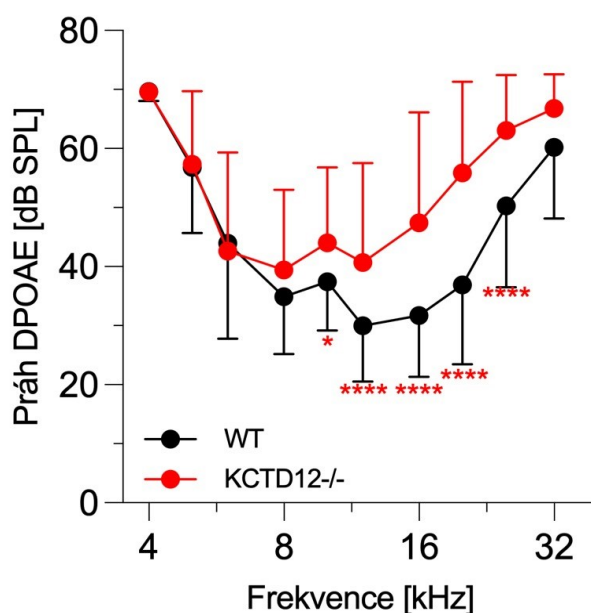
Experimenty v této sérii byly zaměřeny na testování hypotézy, že delece KCTD12 u myši vede k oslabené GABAergní inhibici ve sluchovém systému. Předpokládali jsme, že narušená rovnováha mezi excitací a inhibicí u myši KCTD12^{-/-} vyvolá hyperaktivitu sluchových neuronů a vznik audiologických stavů jako jsou tinnitus nebo hyperakuze. Hypotézu jsme testovali porovnáváním prepulsní inhibice ASR u myši WT a KCTD12^{-/-}.

8 Výsledky

8.1 Vliv delece KCTD12 na kochleární parametry

8.1.1 Zvýšené prahy DPOAE u KCTD12^{-/-} myší

Cílem měření bylo odhadnout vliv delece KCTD12 proteinu na funkci OHC. K tomuto účelu jsme u 29 WT a 25 KCTD12^{-/-} myší zaznamenávali a analyzovali DPOAE, které odrážejí schopnost OHC zesilovat signály a generovat zvuky. Nejprve jsme studovali prahové hodnoty DPOAE, vyvolané zvuky o proměnlivé intenzitě a frekvenci. Vynesením prahových hodnot proti frekvenci stimulace (f_2) jsme získali tzv. DP-gramy, které jsme porovnávali u WT a KCTD12^{-/-} myší. Výsledky z měření jsou znázorněny na Obrázku č. 8. Z obrázku je patrné, že obě skupiny zvířat vykazují typické DP-gramy ve tvaru U, přičemž nejnižší hodnoty prahů se u obou skupin vyskytovaly ve střední frekvenční oblasti. Nejvyšší citlivost kochleární odezvy u WT byla pozorována při stimulaci okolo 12 kHz, zatímco u KCTD12^{-/-} myší byla posunuta k nižším hodnotám se středem okolo 8 kHz. V souladu s tím byly prahy zjištěné u KCTD12^{-/-} myší signifikantně zvýšeny ve frekvenčním rozmezí od 10 do 25 kHz. Průměrný posun prahů byl 7.51 ± 0.74 dB SPL. Naše výsledky tak naznačily, že delece KCTD12 vede k významně snížené citlivosti kochleární odezvy na akustickou stimulaci ve vysokofrekvenční oblasti.

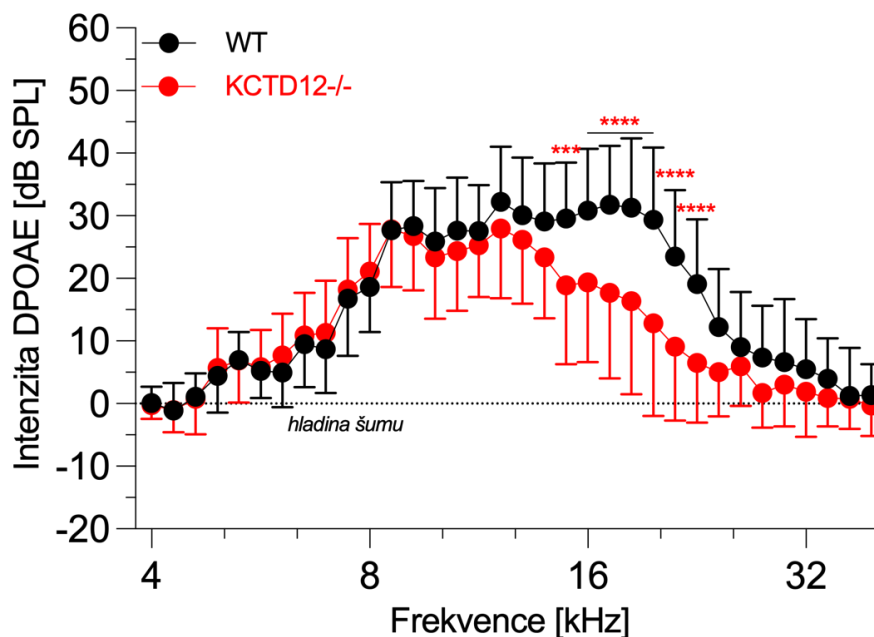


Obrázek 8 -Srovnání sluchových prahů DPOAE u WT a KCTD12^{-/-} myší: Graf znázorňuje závislost průměrné velikosti prahu DPOAE na frekvenci stimulace (f_2) u myší WT (černé kulaté symboly, $n=29$ měřených myší)

a u myší KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=25 myší). KCTD12^{-/-} myší vykazovaly významně zvýšené prahy DPOAE ve frekvenčním rozmezí 10 až 25 kHz (*p<0,05, **** p<0,0001, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

8.1.2 Snížené intenzity DPOAE u KCTD12^{-/-} myší

V další části pokusů jsme studovali intenzity DPOAE u WT a KCTD12^{-/-} myší. Obrázek č. 9 ukazuje závislost průměrné intenzity DPOAE na frekvenci akustické stimulace (4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 25 a 32 kHz). Z dat v grafu je patrné, že intenzity DPOAE u myší KCTD12^{-/-} dosahují nejvyšších průměrných hodnot při nižších stimulačních frekvencích (okolo 12kHz), než u kontrolní skupiny myší WT (okolo 18kHz). Současně se ukázalo, že KCTD12^{-/-} myší generovaly DPOAE s významně nižší intenzitou při frekvencích v rozmezí 15 do 23 kHz. Největší rozdíl mezi intenzitami byl pozorován při frekvenci 19,70 kHz a činil $16,57 \pm 3,65$ dB SPL (p<0,0001, (n = 29 WT a 25 KCTD12^{-/-})).

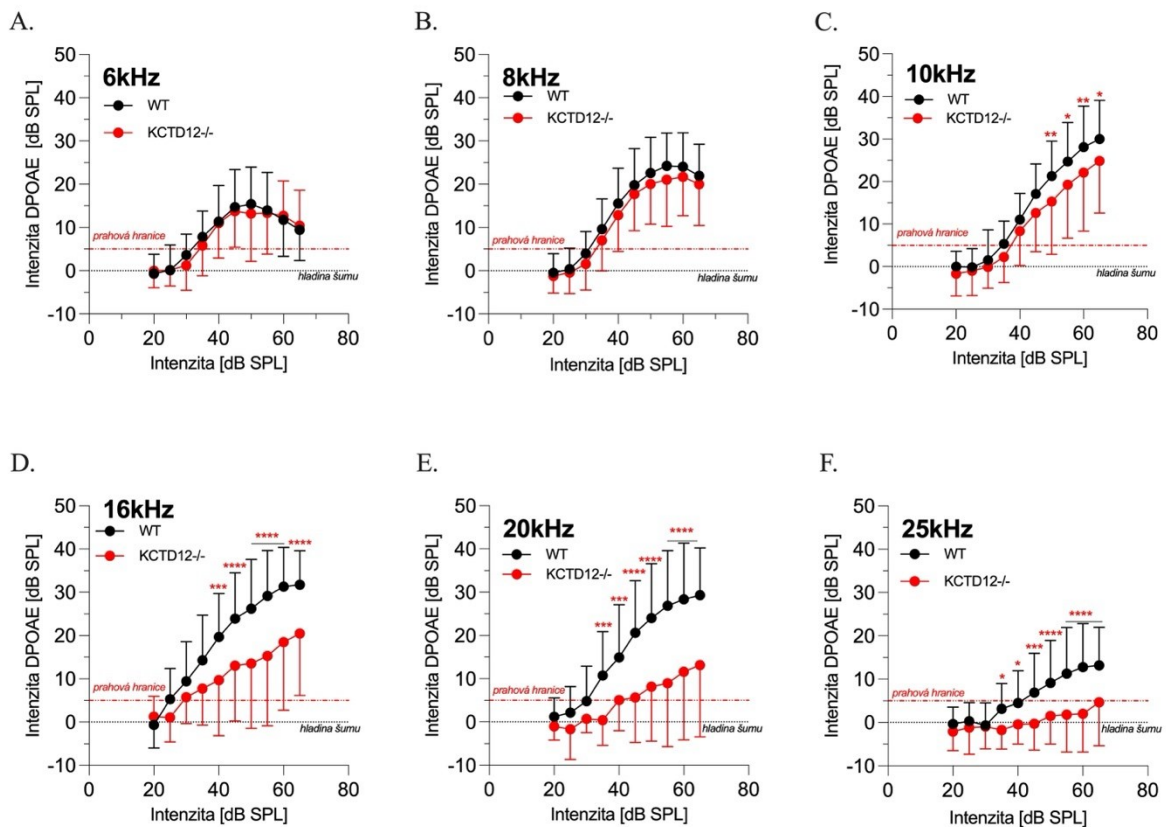


Obrázek 9-KCTD12^{-/-} myši vykazují snížené intenzity DPOAE při středně vysokých frekvencích: Graf znázorňuje DP-gramy u 29 myší WT (černé kulaté symboly) a 25 myší KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly). Každý bod na grafu odpovídá průměrné hodnotě intenzity DPOAE pro danou frekvenci stimulace. Měření byla provedena u stejných zvířat jako na Obrázku č. 8. Signifikantní rozdíly mezi hodnotami z myších skupin byly nalezeny ve frekvenčním rozmezí 14,93 až 22,63 kHz. (***) p<0,001, **** p<0,0001, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

Tyto nálezy jsou tak v souladu s výsledky v předcházející části a ukazují sníženou kochleární odezvu KCTD12^{-/-} myši při vysokofrekvenční stimulaci.

8.1.3 Srovnání I/O funkcí DPOAE u KCTD12^{-/-} myši

V závěrečné sérii pokusů této části jsme testovali dynamický rozsah kochleární odezvy myši lišících se expresí KCTD12 pomocí vstupně/výstupní (I/O) funkce amplitudy DPOAE. Obrázky č. 10A-F znázorňují hodnoty amplitud DPOAE vyvolaných stimuly o frekvenci 6, 8, 10, 16, 20 a 25 kHz a intenzitě 20–70 dB SPL. Takto sestavené DP-gramy ukazují, že při stimulačních frekvencích do 10 kHz jsou I/O funkce u myši WT a KCTD12^{-/-} podobné, zatímco pro frekvence nad 10 kHz jsou významně odlišné (dvoucestná ANOVA pro graf C., D., E, F., $p < 0.0001$ ****). Sklon I/O funkcí ve frekvenčním rozmezí 10–25 kHz byl nižší u myši KCTD12^{-/-}, což naznačilo nižší dynamický rozsah jejich kochleární odezvy.



Obrázek 10-Rozdílná závislost intenzit DPOAE na síle stimulu u WT a KCTD12^{-/-} myši: Grafy ukazují I/O funkce pro DPOAE vyvolané frekvencemi v rozmezí 6 až 25 kHz u myši WT (černé kulaté symboly, n=29 myši) a u myši KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=25 myši). Grafy naznačují rozdílnou strmost funkcí pro frekvence 10, 16, 20 a 25 kHz. Černá tečkovaná čára znázorňuje hladinu šumu, což je amplituda, pod kterou nelze signály detekovat za stejných podmínek měření. Červená čerchovaná čára znázorňuje hodnotu prahu DPOAE.

(* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$,**** $p < 0,0001$, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

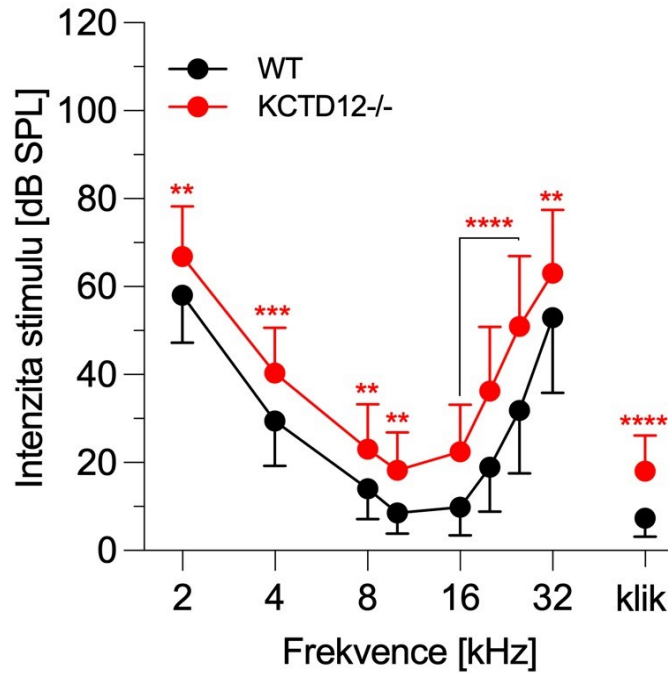
Výsledky uvedené v první experimentální části práce souborně ukazují, že delece KCTD12 u myši vedla k významným změnám v akusticky vyvolaných kochleárních odpovědích. Myši KCTD12^{-/-} vykazovaly zvýšené prahy, snížené amplitudy a omezený dynamický rozsah DPOAE ve srovnání s kontrolními myši WT. Tyto změny se vyznačovaly spektrální závislostí, přičemž největší rozdíly byly pozorovány v oblasti středních a vysokých frekvencí. Tyto nálezy tak podle našeho názoru podporují hypotézu, že KCTD12 protein hraje významnou úlohu v procesech udržujících správnou funkci OHC a tím i kochleárního aparátu.

8.2 Vliv delece KCTD12 na evokované potenciály mozkového kmene myši

8.2.1 Zvýšené prahy ABR u KCTD12^{-/-}

Druhá část experimentálních prací byla zaměřena na hledání rozdílů v evokovaných kmenových potenciálech u myši WT a KCTD12^{-/-}. Nejprve jsme studovali ABR vyvolané čistými tóny o frekvenci 2, 4, 8, 10, 16, 20, 25, 32 kHz a krátkými širokopásmovými pulsy (0,1 ms, kliky) o proměnlivé intenzitě. Z naměřených odpovědí jsme vynesemím frekvence stimulu proti jeho nejnižší intenzitě ještě vyvolávající ABR (prahová hodnota) sestavili audiogramy pro myši WT a KCTD12^{-/-}. Výsledky měření jsou znázorněny na Obrázku č. 11. Obě skupiny myši vykazovaly typické audiogramy s nejnižšími prahy tónu vyvolaných ABR ve frekvenčním rozsahu 8 až 16 kHz, což odpovídá dříve uváděným hodnotám (Zheng et al. 1999).

Dále se ukázalo, že myši KCTD12^{-/-} vykazují ve srovnání s kontrolní skupinou posunutí sluchových prahů směrem nahoru, a to při všech testovaných frekvencích. Průměrný posun prahu u klikem-vyvolaných ABR byl o $10,67 \pm 1,40$ dB SPL ($n = 41$ WT a 36 KCTD12^{-/-} myši; $p < 0,0001$, nepárový Studentův t-test).



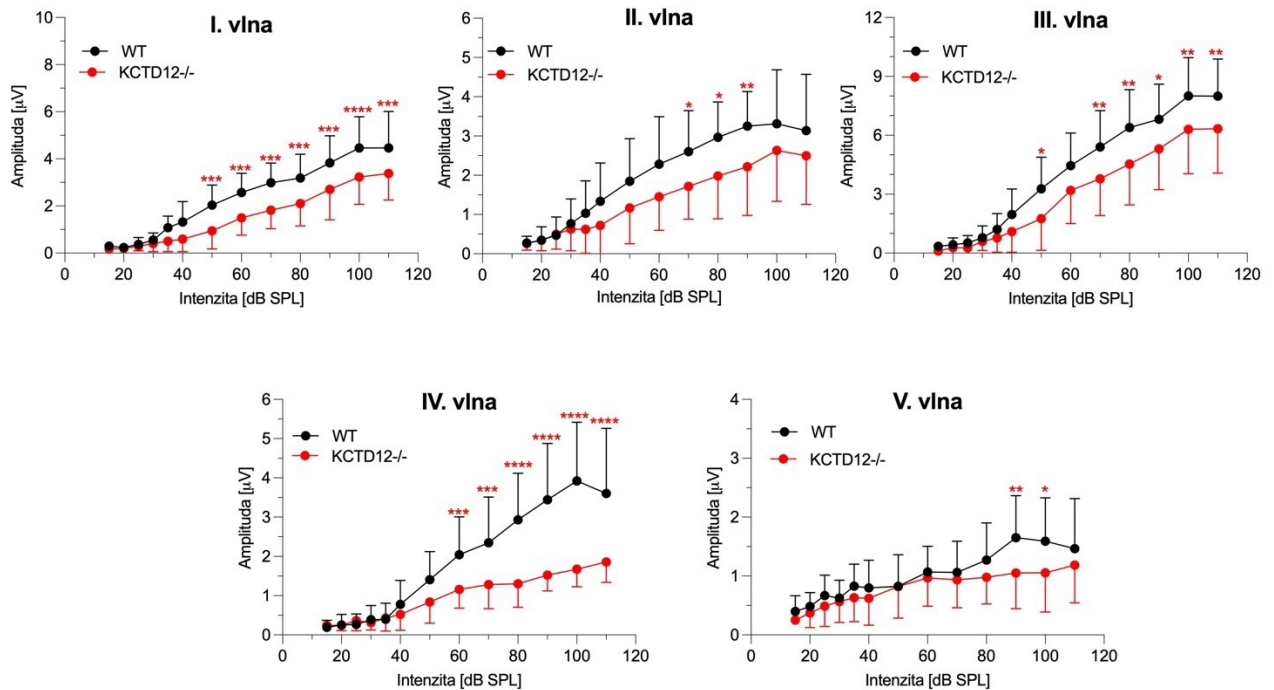
Obrázek 11-Srovnání sluchových prahů ABR u WT a KCTD12^{-/-} myši: Audiogram ukazuje velikosti prahů ABR vyvolaným kliknutím nebo tóny o frekvenci 2 až 32 kHz u myši WT (černé kulaté symboly, n=41 myši) a u myši KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=36 myši). KCTD12^{-/-} myši měly významně zvýšené prahy ABR v celém frekvenčním rozsahu (** p<0,01, **** p<0,0001, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

Tónem vyvolané ABR u KCTD12^{-/-} myši vykazovaly největší zvýšení prahu při stimulaci frekvencemi 16 kHz, 20 kHz a 25 kHz. Průměrné posuny oproti prahům ABR u myši WT byly 12,62 ± 3,62 dB SPL (16 kHz; p<0,0001, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem), 17,35 ± 3,60 dB SPL (20 kHz; p<0,0001) a 19,12 ± 3,60 dB SPL (25 kHz; p<0,0001). Tato pozorování jsou v souladu s výsledky analýzy DPOAE a ukazují, že ztráta KCTD12 u myši zhoršuje jejich audiometrické prahy v oblasti středně vysokých frekvencí.

8.2.2 Snížené amplitudy ABR u KCTD12^{-/-} myši

V další části experimentů jsme analyzovali amplitudy jednotlivých vln ABR vyvolaným kliknutím o proměnlivé intenzitě. Je předpokládáno, že velikosti vln ABR odrážejí synchronní aktivitu neuronů v jednotlivých částech sluchové dráhy od sluchového nervu až po mozkový kmen a střední mozek (viz Obrázek č. 4). S jejich využitím jsme proto chtěli odhadnout lokalizaci vlivu delece KCTD12 na sluchovou funkci. Grafy na Obrázku č. 12 ukazují závislost amplitud vln I až V na intenzitě stimulu u 22 myši WT a u 20 myši KCTD12^{-/-}. Z grafů plyne, že u obou myších skupin vedlo zvyšování intenzity stimulace k nárůstu amplitudy všech vln.

U myší KCTD12^{-/-} ovšem vysoké hladiny zvukové stimulace vyvolávaly vlny o nižší amplitudě než u myší WT. To mělo za následek mírnější sklon jejich vstupně-výstupních funkcí ABR. Rozdíl ve sklonu I/O funkcí u myší WT a KCTD12^{-/-} byl značně zredukován v případě amplitudy pozdní vlny ABR (vlna V). To naznačuje, že poměr amplitud časných a pozdních vln (V/I), který je měřítkem centrálního nervového zisku (Möhrle et al. 2019), byl u obou skupin zvířat rozdílný.

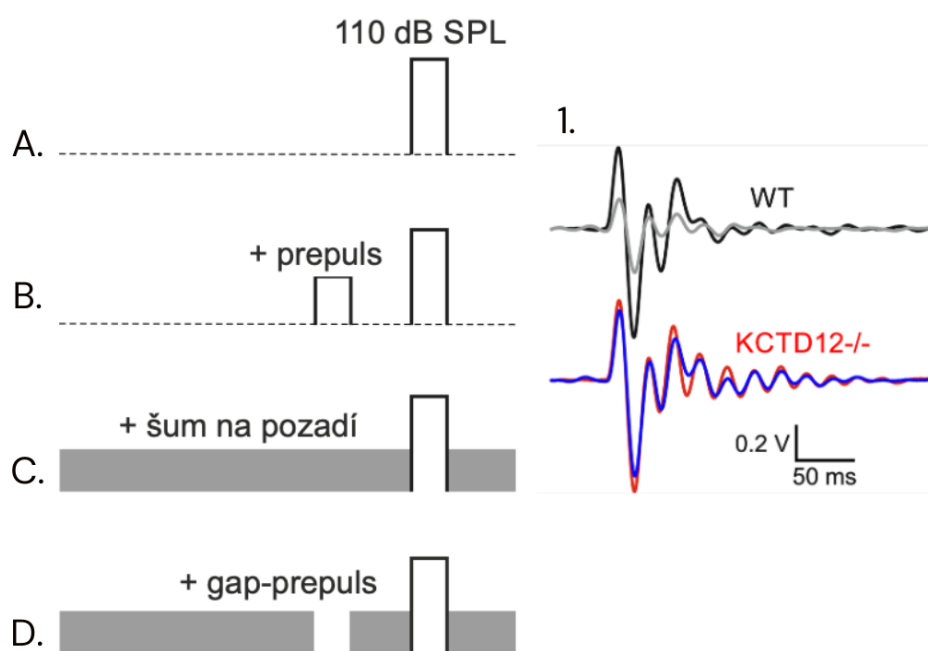


Obrázek 12-Snížené amplitudy vln ABR u KCTD12^{-/-} myší: Grafy ukazují závislost velikosti amplitudy klikem-vyvolaných vln ABR (I až V) u myší WT (černé kulaté symboly, n=22) a u myší KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=20). Každý bod v grafu odpovídá průměrné hodnotě velikosti amplitudy při dané intenzitě kliku. (*p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

Naše výsledky z audiometrických experimentů souborně ukazují, že delece KCTD12 vede k významným změnám v evokovaných kmenových potenciálech myší. KCTD12^{-/-} myši měly zvýšené prahy, snížené amplitudy jednotlivých vln a nižší dynamický rozsah ABR. To je v souladu se sníženou aktivitou kochleárního výstupu a jader mozkového kmene u těchto myší a také to odpovídá negativnímu vlivu delece na kochleární funkci, popsané v předcházející výsledkové části. Rozdíl v I/O funkcích vlny V ABR u myší WT a KCTD12^{-/-} byl méně dramatický než u vln I – IV. To podle našeho názoru naznačuje kompenzaci vlivu delece na úrovni IC. Analýza ABR také podobně jako výsledky měření DPOAE ukázala převažující vliv delece KCTD12 na odpovědi vyvolané zvukovými stimuly o středně vysoké frekvenci

8.3 Vliv delece KCTD12 na behaviorální fenotyp myši

V této experimentální části jsme testovali akusticky vyvolané reakce bdělých myši pomocí behaviorálních metod. Využívali jsme úlekového reflexu, k jehož vyvolání jsme používali tři typy experimentálních protokolů (Obrázek 13). Vyvolávali jsme ASR pomocí širokospektrálního krátkého stimulu v absenci šumu pozadí (A), pomocí stimulu se zvukovým prestimulem v nepřítomnosti šumu pozadí (B), pomocí stimulu v přítomnosti šumu pozadí (C) a pomocí stimulu s mezerovým prepulsem přerušujícím šum pozadí (D).

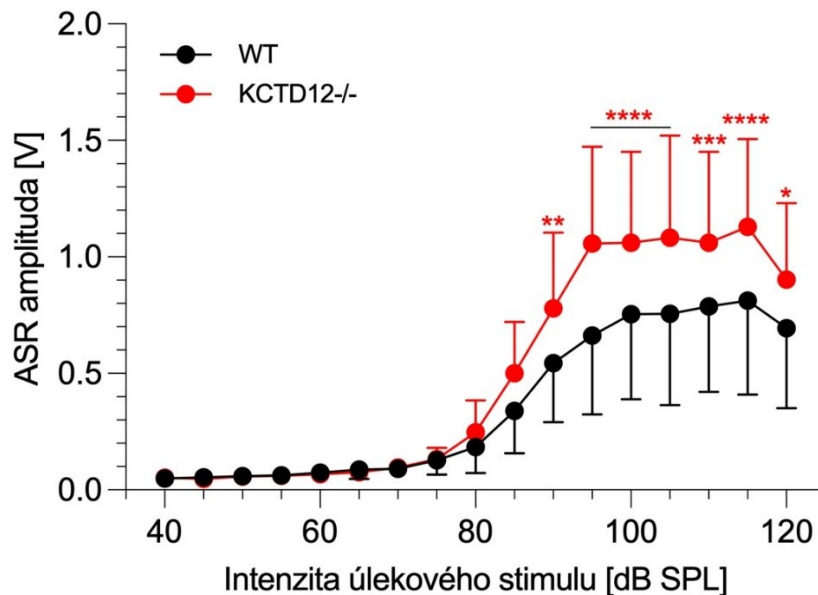


Obrázek 13-Schéma použitých behaviorálních paradigmat při studiu ASR myši (A) Behaviorální paradigma k vyvolání ASR (B) inhibice ASR zvukovým prepulsem (C) měření ASR v přítomnosti šumu pozadí (D) inhibice ASR mezerovým prepulsem v šumu pozadí. Křivky vpravo (1.) ukazují příklady časového průběhu napětí zaznamenaného snímací aparaturou během ASR myši. (Vlastní zdroj).

8.3.1 KCTD12^{-/-} myši vykazují zvýšenou amplitudu ASR.

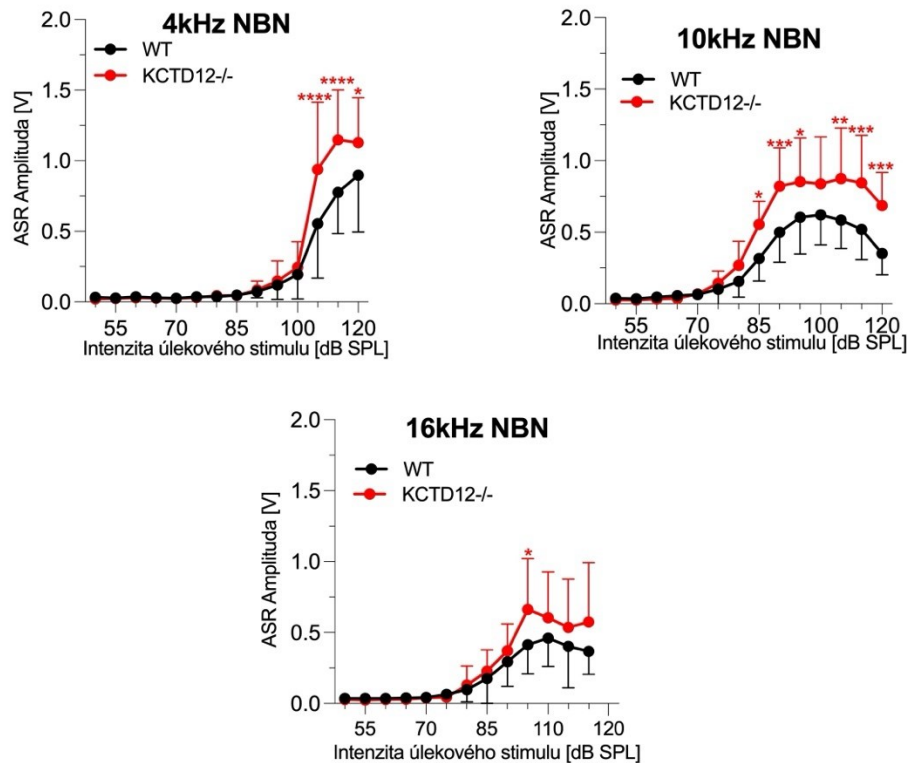
ASR je rychlá motorická reakce na intenzivní zvukový podnět. Tento reflex je součástí přirozeného obranného mechanismu mnoha savců. Měření ASR poskytuje důležité informace o funkci nervového systému, zejména o sluchových drahách a jejich propojení s motorickými oblastmi mozku. K vyvolání ASR jsme použili širokopásmový zvukový stimul o proměnlivé intenzitě od 40 do 120 dB SPL. Studovali jsme odpovědi 34 myši WT a 23 myši KCTD12^{-/-}. Obrázek č. 14 ukazuje výsledky našich měření. Data ukazují, že myši s deletovaným proteinem KCTD12 měly významně zvýšenou amplitudu ASR při vyšších intenzitách startlového stimulu (≥ 90 dB SPL). Porovnání závislosti amplitudy ASR na intenzitě stimulu prokázalo signifikantní

rozdíly mezi kontrolní skupinou WT se skupinou KCTD12^{-/-} (**** p<0,0001, dvoucestná ANOVA). Nárůst amplitudy u KCTD12^{-/-} naznačuje zvýšenou citlivost na zvuky, což je charakteristický znak hyperakuze. Tento fakt by mohl být spojen s narušením regulace signálu ve sluchovém systému, kde by protein KCTD12 mohl představovat důležitou roli.



Obrázek 14-Srovnání amplitudy ASR u WT a KCTD12^{-/-} myší: Graf znázorňuje závislost odpovědi na úlekový stimul při intenzitách od 40 do 120 dB u myší WT (černé kulaté symboly, n=34 myší) a u myší KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=23 myší). KCTD12^{-/-} skupina vykazuje signifikantně vyšší ASR od 90 do 120 dB SPL. (*p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

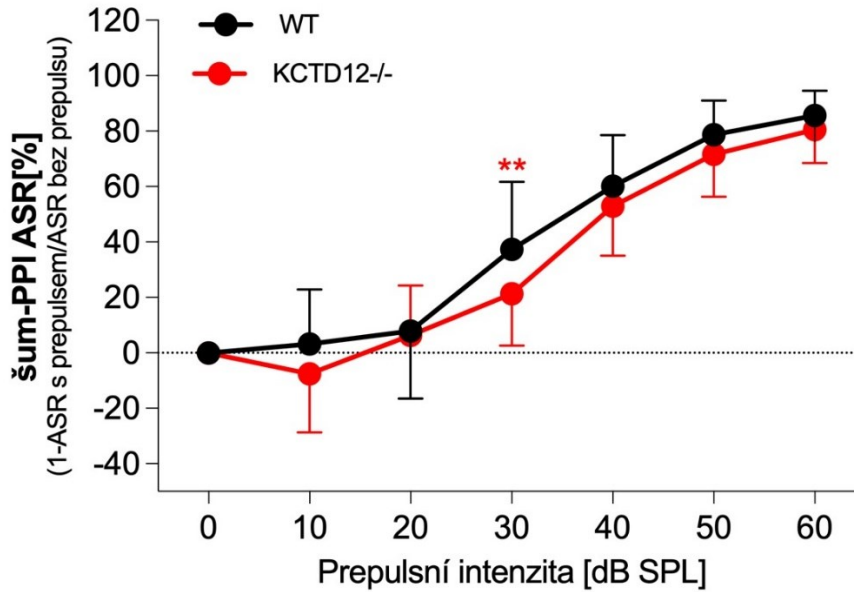
Kromě širokopásmového stimulu jsme k vyvolání ASR použili také úzkopásmové šумы (NBN, narrowband noise) s centrální frekvencí na 4 kHz, 10kHz a 16kHz. Tato doplňková měření také ukázala zvýšenou amplitudu ASR u myší KCTD12^{-/-}, a to nejvýrazněji při použití 10 kHz šumu. V případě 4 kHz šumu se významné rozdíly mezi amplitudami ASR u myší lišících se expresí KCTD12 projevily na vyšších intenzitách, a při 16kHz se statisticky významný rozdíl projevilo jen na jedné intenzitě (Obrázek č. 15).



Obrázek 15-Srovnání amplitudy ASR u WT a KCTD12^{-/-} myši při 4, 10 a 16 kHz NBN: Grafy znázorňují závislost odpovědi na úlekový stimul při intenzitách od 40 do 120 dB u myši WT (černé kulaté symboly, n=34 myši) a u myši KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=23 myši). KCTD12^{-/-} skupina vykazuje signifikantně vyšší ASR při vyšších intenzitách úlekového stimulu. (*p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

8.3.2 Srovnání prepulsní inhibice ASR u WT a KCTD12^{-/-} myši.

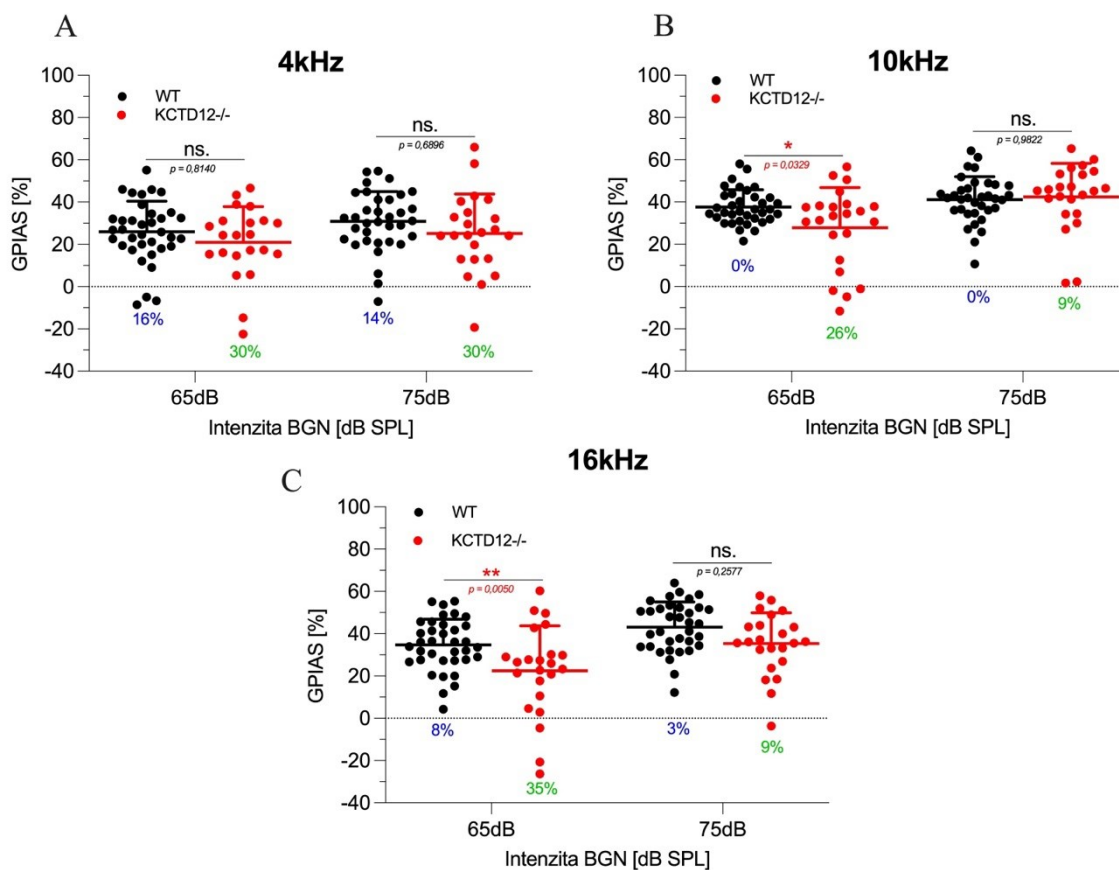
Další část pokusů byla zaměřena na testování citlivosti ASR u myši WT a KCTD12^{-/-} ke zvukovému prepulsu. Obrázek č. 16 ukazuje inhibici ASR vyvolanou pomocí prepulsu, kterým byl šum o různých zvukových intenzitách (od 0 do 60 dB SPL). Inhibice ASR je vyjádřena jako procentuální snížení amplitudy reakce v přítomnosti prepulsu ve srovnání s amplitudou reakce bez prepulsu. Závislost míry inhibice na intenzitě prepulsu sleduje u obou porovnávaných skupin zvířat sigmoidní křivku s maximem okolo 60 dB SPL. Závislosti byly podobné pro myši WT a KCTD12^{-/-} s výjimkou významně vyšší inhibice ASR prepulsem o intenzitě 30 dB SPL u KCTD12^{-/-} myši.



Obrázek 16-Inhibice ASR úzkopásmovým šumem u WT a KCTD12^{-/-} myši: Graf znázorňuje inhibici ASR jako procentuální snížení úlekové reakce za přítomnosti prepulsu ve srovnání s reakcí bez prepulsu u myši WT (černé kulaté symboly, n=27 myši) a u myši KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=29 myši). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami je možné pozorovat pouze na úrovni 30 dB SPL prepulsní intenzity. (** p<0,01, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

8.3.3 Inhibice ASR mezerovým prepulsem

Schopnost detekce pauzy v šumu představuje důležitou schopnost nervové soustavy rozlišovat časové parametry akustických stimulů. Měření jsme uskutečňovali použitím úzkopásmového šumu na pozadí (BGN) o středové frekvenci 4, 10 a 16 kHz a intenzitě 65 a 75 dB SPL. Při těchto intenzitách šum sám o sobě nepotlačuje ASR, a proto je vhodný pro provádění tohoto typu pokusů. Jako prepuls sloužila 50 ms mezera v šumu, která inhibovala amplitudu ASR. Výsledky jsou shrnuty v grafech na Obrázku č. 17.



Obrázek 17-Inhibice ASR mezerovým prepulsem u WT a KCTD12^{-/-} myši: Graf znázorňuje procentuální hodnoty mezerové inhibice u různých frekvencí za použití BGN (A–4 kHz, B–10 kHz, C–16 kHz) při intenzitě 65 a 75 dB SPL u myši WT (černé kulaté symboly, n=37 myši) a u myši KCTD12^{-/-} (červené kulaté symboly, n=23 myši). Procenta znázorňují počet zvířat potenciálně trpící tinnitem. (*p<0,05, ** p<0,01, dvoucestná ANOVA s Šidákovým vícečetným srovnávacím testem).

Ukázalo se, že mezerový prepuls BGN o frekvenci 4 kHz a intenzitě 65 nebo 75 dB SPL vyvolával podobnou inhibici ASR u myši WT a KCTD12^{-/-} (Obrázek č. 17A). Naopak při BGN o středové frekvenci 10 nebo 16 kHz vykazovaly myši KCTD12^{-/-} významně sníženou inhibici ASR ve srovnání s myšmi WT. Toto snížení se projevilo, pokud byla mezerová prezentována v BGN o intenzitě 65 dB SPL ale ne 75 dB SPL (Obrázek č. 17B, C). Kromě průměrné inhibice ASR mezerovým prepulsem (GPIAS) jsme také hodnotili statistickou významnost inhibice z 10 opakovaných měření ASR v přítomnosti a nepřítomnosti prepulsu. To nám umožnilo stanovit procentuální zastoupení zvířat vykazujících buď nevýznamnou nebo jakoukoli významnou inhibici ASR. Výsledky ukázaly, že myši s nevýznamnou GPIAS při 65 dB BGN tvořily zhruba třetinu myši KCTD12^{-/-} a okolo 10 % myši WT, bez ohledu na středovou frekvenci BGN. Zvýšení intenzity BGN na 75 dB SPL vedlo k výraznému snížení procentuálního zastoupení myši s nevýznamnou GPIAS, v souladu se zvýšením průměrné

hodnoty GPIAS, ale pouze u BGN s vysokou středovou frekvencí. Tyto výsledky by mohly naznačovat přítomnost tinnitu u myši KCTD12^{-/-}. Předcházející práce (Turner et al. 2006) ukázaly, že fantomová percepce zvuku u zvířat s tinnitem může maskovat mezerový prepuls prezentovaný v šumu na pozadí o nízké intenzitě a vysoké středové frekvenci. Předpokládáme, že zvýšení intenzity BGN na 75 dB SPL vede u myši KCTD12^{-/-} k výraznějšímu odstupu jeho vjemu od méně „hlasitého“ fantomového zvuku a lepší percepci mezerového prepulsu. Naše výsledky behaviorálního testování sluchové funkce tak souborně ukazují, že myši KCTD12^{-/-} se vyznačují jednak významným zvýšením amplitudy ASR a jednak sníženou citlivost ASR k inhibici mezerovému prepulsu. Tato pozorování jsou v souladu s přítomností audiologických poruch hyperakuze a tinnitu u těchto myší.

9 Diskuze

Audiologické poruchy jako je ztráta sluchu a tinnitus jsou složité a multifaktoriální problémy, jejichž patofyziologie je složitá a do jisté míry stále nejasná. Modifikací genů spojených s různými formami těchto poruch je celá řada. Jen málo je doposud známo o mutacích genů, kódujících proteiny inhibičního GABAergního systému a o jejich vlivu na sluchový systém. Cílem této diplomové práce bylo přispět k pochopení funkce proteinu KCTD12, který funguje jako regulační podjednotka GABA_B receptorů, ve spojitosti s mechanismy sluchu a sluchových poruch jako je tinnitus a hyperakuze. Zároveň jsme si kladli za cíl přispět k poznání potenciálního možného využití KCTD12^{-/-} myši, jako animálního modelu pro studium audiologických poruch. S použitím akustických, elektrofyziologických a behaviorálních metod jsme porovnávali sluchovou funkci kontrolních WT a KCTD12^{-/-} myši. V rámci akustického měření jsme analyzovali kochleární odezvy (DPOAE), které umožnily pochopení vlivu KCTD12 na funkci OHC ve vnitřním uchu myši. Elektrofyziologická měření, při kterých jsme studovali evokované kmenové potenciály, přiblížila pochopení mechanismu na úrovních sluchové dráhy jako jsou mozkový kmen a střední mozek. Pro pochopení komplexního vlivu delece KCTD12 v celé sluchové dráze bylo použito měření ASR a její modifikace prepulsovémi metodami u bdělých zvířat.

9.1 Poznatky o vlivu KCTD12 při použití DPOAE

V rámci akustických metod, které v našem případě představovaly měření otoakustických emisí, byl zkoumán vliv delece KCTD12 proteinů u myši na aktivitu OHC v kochleě. Naše výsledky ukazují zvýšení sluchových prahů u skupiny KCTD12^{-/-}. Tento posun se vyskytoval převážně ve vyšších frekvencích. Zvýšení prahů ukazuje na to, že myši s deletovaným proteinem nejsou schopny efektivně generovat otoakustické emise, což se následně může projevit horší citlivostí k akustickým stimulům. Výsledky tak naznačují, že protein KCTD12 hraje významnou úlohu v periferních oblastech sluchové dráhy. Neschopnost OHC generovat otoakustické signály by se mělo projevit v dalších částech sluchové dráhy jako nedostatečně silný vstup elektrických signálů.

Analýza kochleární odezvy ukázala, že při všech testovaných frekvencích generují KCTD12^{-/-} myši menší intenzity otoakustických emisí než myši kontrolní skupiny. Předpokládáme, že nižší intenzita DPOAE byla způsobena dysfunkcí OHC buněk. Signifikantní rozdíly v intenzitě DPOAE u KCTD12^{-/-} a WT myši byly pozorovány při vyšších

frekvencích, což podporuje hypotézu z měření sluchových prahů, že OHC jsou více postiženy při vyšších frekvencích. Frekvenční specifita kochleárního deficitu u KCTD12^{-/-} myši by mohla souviset s předpokládanou funkcí proteinu KCTD12 ve vnitřním uchu. KCTD12 byl lokalizován ve vyvíjejícím se kochleárním aparátu v podpůrných buňkách a ve fibrocytech stria vascularis (Resendes et al. 2004; Metz et al. 2011). To naznačuje, že by mohl být součástí mechanismů udržujících draslíkovou homeostázu a následně endokochleární potenciál. Pokud by nepřítomnost KCTD12 vedla ke snížení koncentrace K⁺ v endolymfě a k poklesu endokochleárního potenciálu, vedlo by to k narušené funkci jak IHC, tak OHC. Vzhledem k nelineární závislosti funkčních vlastností IHC a OHC na extracelulární koncentraci K⁺, je velmi pravděpodobné, že negativní vlivy delece KCTD12 by se projevily zejména při vysokofrekvenční stimulaci. Zároveň studie (Shiomi et al. 1997) ukázala, že pacienti s normálním sluchem trpící tinnitem mají snížené intenzity DPOAE. Toto snížení se vyskytuje u frekvencí předpokládaného tinnitu pacientů. V našem případě snížené otoakustické emise ve vyšších frekvencích mohou naznačovat výskyt tinnitu v tomto frekvenčním rozsahu.

9.2 Závěry z elektrofyziologického měření

Pomocí elektrofyziologických metod jsme se dále snažili pochopit vliv KCTD12 proteinu na přenos a zpracování elektrických signálů v proximálních částech sluchové dráhy. Analyzovali jsme ABR u anestetizovaných myši. Získané výsledky ukazují, že KCTD12^{-/-} myši mají zhoršenou sluchovou funkci po celém spektru měřených frekvencí. Posun sluchových prahů ABR byl podobně jako prahů DPOAE nejvýraznější při střední až vysokofrekvenční stimulaci. Největší rozdíly byly patrné při 16, 20 a 25 kHz. Posun ABR prahů u myši KCTD12^{-/-} tak pravděpodobně odráží změny vyvolané delecí proteinu již na úrovni vnitřního ucha.

Další pohled na vliv proteinu KCTD12 ve sluchovém systému nám dala analýza amplitud jednotlivých vln ABR. U všech zkoumaných vln I až V bylo možné vidět nižší amplitudu u KCTD12^{-/-} skupiny. Předpokládáme, že tento pokles byl z velké části vyvolán sníženým kochleárním výstupem, protože se projevilo už u časné vlny I, která odráží aktivitu sluchového nervu. Protein KCTD12 také působí jako pomocná podjednotka GABA_B receptorů, důležitých regulátorů neuronální excitability (Schwenk et al. 2010). Dřívější práce ukázaly, že absence KCTD12 v receptorovém komplexu snižuje jeho povrchovou expresi a oslabuje jeho G-proteinovou signalizaci (Ivankova et al. 2013; Tureček et al. 2014). GABA_B receptory byly lokalizovány jak v periferní, tak i v centrální části sluchové dráhy a jejich dysfunkce vede ke zvýšené excitabilitě a spontánní aktivitě sluchových neuronů (Tureček et al. 2023). Nižší

amplitudy evokovaných vln ABR by proto také mohly být důsledkem zvýšené spontánní aktivity neuronů sluchové dráhy. Tato představa by mohla být podporována pracemi, které pozorovaly abnormality v ABR vlnách u jedinců s tinnitem nebo jinými audiologickými poruchami, které jsou důsledkem neuronální hyperaktivity (Kehrle et al. 2008). Naše výsledky také ukazují, že nejmenší rozdíly mezi myšmi WT a KCTD12^{-/-} se projeví u vlny V, která je vyvolána aktivitou neuronů IC. Předpokládáme, že podobnost amplitud vlny V u myších skupin byla způsobena zvýšením vlny u myší KCTD12^{-/-} působením homeostatických mechanismů kompenzujících snížený kochleární výstup (Henton a Tzounopoulos 2021).

9.3 Behaviorální pokusy

V třetí části pokusů nás zajímalo, jaký vliv bude mít delece proteinu KCTD12 na sluchovou dráhu zvířete v bdělém stavu. To jsme testovali pomocí startlové aparatury a modifikacemi startlové odpovědi. Úleková reakce nám poskytla data o zhoršené senzomotorické reakci u KCTD12^{-/-} myší. Zvýšená ASR poukazuje na možnost výskytu hyperakuze u těchto myší. Snížený sluchový vstup do centrální sluchového systému, který může být způsoben poškozeným sluchem, tak může vést k většímu neuronálnímu zesílení a vést k nadměrně aktivitě a vnímání hlasitosti (Rybalko et al. 2019). Vliv delece by mohl představovat predispozice k rozvinutí tohoto typu audiologických poruch. Druhou částí behaviorálních pokusů představují modifikace ASR.

Data z PPI ASR vyvolaného prepulsem v hluku ukazují, že modifikovaná zvířata mají jen mírnější problémy s detekcí akustického prepulsu. Pro správné fungování PPI ASR je vyžadováno správné fungování IC (Leitner a Cohen 1985). Podobné výsledky obou skupin naznačují správné fungování okruhů IC. I přes sníženou inhibici ASR na intenzitě 30 dB SPL jsou si výsledky podobny, a tedy správné fungování IC by tedy nemělo ovlivňovat akustické filtrování informací v případě metody GPIAS.

Třetí fází behaviorálního testování bylo představení výsledků mezerové inhibice ASR. Výsledky z těchto experimentů ukazují na význam proteinu KCTD12 na schopnost zvířat detekovat tiché mezery ve zvukovém pozadí. Dle studie (Turner et al. 2006) se při využití GPIAS předpokládá, že pokud se akustický signál v pozadí bude přibližovat intenzitě a tónu subjektivního tinnitu, jedinec je méně schopný detekovanou tichou mezeru v pozadí. Subjektivní tinnitus mezeru přehluší, což vede k signifikantně horší detekci mezery a tím vyšší relativní ASR než u zdravých kontrolních skupin. V našem případě se statisticky významné rozdíly mezi skupinami vyskytují v přítomnosti BGN o intenzitě 65 dB SPL a středové

frekvenci 10 kHz a 16 kHz. To je v souladu s tím, že tinnitus je často vnímán jako vysokofrekvenční zvuk a v tomto frekvenčním rozmezí by se teoreticky mohlo vyskytovat ladění tinnitu testovaných zvířat KCTD12^{-/-}. Tyto poznatky naznačují důležitou roli proteinu KCTD12 na GABAergní inhibici v centrálním sluchovém systému a na schopnost filtrovat nepodstatné akustické informace.

Do budoucna by bylo možné provést studii, která by u myší KCTD12^{-/-} pozorovala vliv akustického traumatu. Akustické trauma je jedním z nejběžnějších způsobů vzniku tinnitu u zdravých jedinců. U myší KCTD12^{-/-} je pravděpodobný větší předpoklad rozvoje tinnitu na základě již naměřených dat. Porovnání KCTD12^{-/-} a WT skupin před a po akustickém traumatu by mohlo ukázat na potenciální vliv proteinu na predispozici vzniku audiologických poruch jako je tinnitus a hyperakuze. Popřípadě pomoci k idealizaci KCTD12^{-/-} myší jako animálního modelu pro výzkum tinnitu.

10 Závěr

Experimentální část v předkládané diplomové práci byla zaměřena na zkoumání změn ve sluchové funkci myši s chybějícími KCTD12 proteiny. Vliv delece KCTD12 na kochleární funkci a aktivitu neuronů sluchové dráhy myši jsme posuzovali pomocí měření otoakustických emisí, evokovaných kmenových potenciálů, úlekové reakce a její modulace zvukovými prepulsi. Výsledky ukázaly, že delece KCTD12 u myši vedla k významným změnám v kochleárním aparátu. Myši KCTD12^{-/-} vykazovaly zvýšené prahy, snížené amplitudy a omezený dynamický rozsah DPOAE ve srovnání s kontrolními myši WT. Tyto změny se vyznačovaly spektrální závislostí, přičemž největší rozdíly byly pozorovány v oblasti středních a vysokých frekvencí. Uvedené nálezy tak podle našeho názoru podporují hypotézu, že KCTD12 protein, dříve lokalizovaný v podpůrných buňkách v Cortiho orgánu a fibrocytech stria vascularis, hraje významnou úlohu v kochleárních homeostatických mechanismech, nezbytných pro správnou funkci OHC. V souladu s výsledky analýzy DPOAE, porovnání zvukem vyvolaných ABR u myši WT a KCTD12^{-/-} ukázalo, že absence KCTD12 u myši zhoršuje jejich audiometrické prahy v oblasti středně vysokých frekvencí. KCTD12^{-/-} myši vykazovaly rovněž snížené amplitudy jednotlivých vln a nižší dynamický rozsah ABR. Tato pozorování tak souborně dokládají, že delece KCTD12 vede u myši k sensorineurální ztrátě sluchu. Výsledky behaviorálního testování sluchové funkce ukázaly, že myši KCTD12^{-/-} vykazují významně zvýšenou amplitudu ASR a také sníženou citlivost ASR k inhibici mezerovým prepulsem. Tato pozorování naznačují přítomnost audiologických poruch hyperakuze a tinnitu a podporují hypotézu, že delece KCTD12 vede k oslabení GABAergní inhibice, narušení rovnováhy mezi excitací a inhibicí a k hyperaktivitě neuronů sluchového systému.

Souborně vzato, výsledky v diplomové práci jasně dokládají význam proteinu KCTD12 ve sluchovém systému myši. To, že jeho genetická ablace vede ke sluchovým poruchám, přispívá k poznání souvislostí mezi modifikacemi genů kódujících proteiny inhibičního GABAergního systému a patologickými změnami sluchové funkce. Náš budoucí výzkum by se mohl zaměřit na vliv delece KCTD12 proteinu u zvířat po akustickém traumatu. Je známo, že akustické trauma vede k posunu sluchových prahů a je rizikovým faktorem akutního i chronického tinnitu. Dle našich výsledků předpokládáme, že delece proteinu KCTD12 by mohla ještě zvýšit pravděpodobnost výskytu audiologických poruch po hlukové expozici zvířat. Model KCTD12^{-/-} zvířat by tak mohl přispět k porozumění mechanismů audiologických poruch a usnadnit vývoj nových metod pro jejich léčbu.

11 Literatura

Sekundární citace jsou označeny *

ADELFINER, Lisa, Rostislav TURECEK, Klara IVANKOVA, Anders A. JENSEN, Stephen J. MOSS, Martin GASSMANN a Bernhard BETTLER, 2014. GABAB receptor phosphorylation regulates KCTD12-induced K⁺ current desensitization. *Biochemical Pharmacology*. 91(3), 369–379. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2014.07.013

ALVARADO, Juan Carlos, Verónica FUENTES-SANTAMARÍA, Tania JAREÑO-FLORES, José Luis BLANCO a José M. JUIZ, 2012. Normal variations in the morphology of auditory brainstem response (ABR) waveforms: a study in wistar rats. *Neuroscience Research*. 73(4), 302–311. ISSN 01680102. Dostupné z: doi:10.1016/j.neures.2012.05.001

AMARIUTEI, Ana E., Jing-Yi JENG, Saaid SAFIEDDINE a Walter MARCOTTI, 2023. Recent advances and future challenges in gene therapy for hearing loss. *Royal Society Open Science*. 10(6), 230644. ISSN 2054-5703. Dostupné z: doi:10.1098/rsos.230644

ANARI, Mart, Alf AXELSSON, Anette ELIASSON a Lennart MAGNUSSON, 1999. Hypersensitivity to sound: Questionnaire data, audiometry and classification. *Scandinavian Audiology*. 28(4), 219–230. ISSN 0105-0397. Dostupné z: doi:10.1080/010503999424653

ARSLAN, Edoardo, Eva ORZAN a Rosamaria SANTARELLI, 1999. Global Problem of Drug-Induced Hearing Loss. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 884(1), 1–14. ISSN 0077-8923, 1749-6632. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb00277.x

*AUERBACH, Benjamin D., Paulo V. RODRIGUES a Richard J. SALVI, 2014. Central Gain Control in Tinnitus and Hyperacusis. *Frontiers in Neurology*. 5 [vid. 2024-01-26]. ISSN 1664-2295. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2014.00206

AYALA, Yaneri A. a Manuel S. MALMIERCA, 2018. The effect of inhibition on stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus. *Brain Structure & Function*. 223(3), 1391–1407. ISSN 1863-2661. Dostupné z: doi:10.1007/s00429-017-1546-4

BHATT, Ishan Sunilkumar, Nilesh J. WASHNIK, Sarah KINGSBURY, Aniruddha K. DESHPANDE, Hailey KINGSBURY, Srividya Grama BHAGAVAN, Klayre MICHEL, Raquel DIAS a Ali TORKAMANI, 2023. Identifying Health-Related Conditions Associated with Tinnitus in Young Adults. *Audiology Research*. 13(4), 546–562. ISSN 2039-4349. Dostupné z: doi:10.3390/audiolres13040048

BIERMANN, Barbara, Klara IVANKOVA-SUSANKOVA, Amyaouch BRADAIA, Said ABDEL AZIZ, Valerie BESSEYRIAS, Josef P. KAPFHAMMER, Markus MISSLER, Martin GASSMANN a Bernhard BETTLER, 2010. The Sushi Domains of GABA_B Receptors Function as Axonal Targeting Signals. *The Journal of Neuroscience*. 30(4), 1385–1394. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3172-09.2010

BURKE, Kali, Matthew BURKE a Amanda M. LAUER, 2023. Auditory brainstem response (ABR) waveform analysis program. *MethodsX*. 11, 102414. ISSN 22150161. Dostupné z: doi:10.1016/j.mex.2023.102414

*BUTLER, Blake E. a Stephen G. LOMBER, 2013. Functional and structural changes throughout the auditory system following congenital and early-onset deafness: implications for hearing restoration. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 7 [vid. 2024-03-13]. ISSN 1662-5137. Dostupné z: doi:10.3389/fnsys.2013.00092

CAICEDO, Alejandro a Horst HERBERT, 1993. Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 328(3), 377–392. ISSN 0021-9967, 1096-9861. Dostupné z: doi:10.1002/cne.903280305

CALFORD, Mb a Lm AITKIN, 1983. Ascending projections to the medial geniculate body of the cat: evidence for multiple, parallel auditory pathways through thalamus. *The Journal of Neuroscience*. 3(11), 2365–2380. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.03-11-02365.1983

CIORBA, Andrea, Chiara BIANCHINI, Stefano PELUCCHI a Antonio PASTORE, 2012. The impact of hearing loss on the quality of life of elderly adults. *Clinical Interventions in Aging*. 159. ISSN 1178-1998. Dostupné z: doi:10.2147/CIA.S26059

*COHEN, Brandon E., Anne DURSTENFELD a Pamela C. ROEHM, 2014. Viral Causes of Hearing Loss: A Review for Hearing Health Professionals. *Trends in Hearing*. 18, 233121651454136. ISSN 2331-2165, 2331-2165. Dostupné z: doi:10.1177/2331216514541361

DE VILLERS-SIDANI, Etienne, Loai ALZGHOUL, Xiaoming ZHOU, Kimberly L. SIMPSON, Rick C. S. LIN a Michael M. MERZENICH, 2010. Recovery of functional and structural age-related changes in the rat primary auditory cortex with operant training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(31), 13900–13905. ISSN 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1007885107

FRITZIUS, Thorsten, Rostislav TURECEK, Riad SEDDIK, Hiroyuki KOBAYASHI, Jim TIAO, Pascal D. REM, Michaela METZ, Michaela KRALIKOVA, Michel BOUVIER, Martin GASSMANN a

Bernhard BETTLER, 2017. KCTD Hetero-oligomers Confer Unique Kinetic Properties on Hippocampal GABAB Receptor-Induced K⁺ Currents. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 37(5), 1162–1175. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2181-16.2016

GALVEZ, Thierry, Marie-Laure PARMENTIER, Cécile JOLY, Barbara MALITSCHKEK, Klemens KAUPMANN, Rainer KUHN, Helmut BITTIGER, Wolfgang FROESTL, Bernhard BETTLER a Jean-Philippe PIN, 1999. Mutagenesis and Modeling of the GABAB Receptor Extracellular Domain Support a Venus Flytrap Mechanism for Ligand Binding. *Journal of Biological Chemistry*. 274(19), 13362–13369. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.19.13362

GBD 2019 HEARING LOSS COLLABORATORS, 2021. Hearing loss prevalence and years lived with disability, 1990-2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet (London, England)*. 397(10278), 996–1009. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)00516-X

*GELFAND, Stanley A. a Lauren CALANDRUCCIO, 2023. *Essentials of audiology*. 5th edition. New York: Thieme. ISBN 978-1-68420-398-7.

*GOMES, Francisco Isaac Fernandes, Maria Gerusa Brito ARAGAO, Mirna Marques BEZERRA a Hellíada Vasconcelos CHAVES, 2019. GABAergic transmission and modulation of anxiety: A review on molecular aspects. *Brazilian Journal of Biological Sciences*. 6(12), 9–16. ISSN 2358-2731. Dostupné z: doi:10.21472/bjbs.061202

HALL, Amanda J. a Mark E. LUTMAN, 1999. Methods for Early Identification of Noise-induced Hearing Loss. *International Journal of Audiology*. 38(5), 277–280. ISSN 1499-2027, 1708-8186. Dostupné z: doi:10.3109/00206099909073035

*HENRY, J. A., L. E. ROBERTS, D. M. CASPARY, S. M. THEODOROFF a R. J. SALVI, 2014. Underlying Mechanisms of Tinnitus: Review and Clinical Implications. *Journal of the American Academy of Audiology*. 25(01), 005–022. ISSN 1050-0545, 2157-3107. Dostupné z: doi:10.3766/jaaa.25.1.2

*HENTON, A. a T. TZOUNOPOULOS, 2021. What's the buzz? The neuroscience and the treatment of tinnitus. *Physiological Reviews*. 101(4), 1609–1632. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00029.2020

HOFFMAN, Howard S. a John L. SEARLE, 1968. Acoustic and Temporal Factors in the Evocation of Startle. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 43(2), 269–282. ISSN 0001-4966, 1520-8524. Dostupné z: doi:10.1121/1.1910776

*CHAI, Renjie, Hongzhe LI, Tao YANG, Shan SUN a Yongyi YUAN, 2022. Editorial: Hearing Loss: Mechanisms and Prevention. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10, 838271. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2022.838271

CHAND, R. Pratap, A. JAN a H. VYAS, 1993. Acute sensorineural deafness following herpes simplex infection. *European Journal of Pediatrics*. 152(4), 379–379. ISSN 0340-6199, 1432-1076. Dostupné z: doi:10.1007/BF01956762

IVANKOVA, Klara, Rostislav TURECEK, Thorsten FRITZIUS, Riad SEDDIK, Laurent PREZEAU, Laëtitia COMPS-AGRAR, Jean-Philippe PIN, Bernd FAKLER, Valerie BESSEYRIAS, Martin GASSMANN a Bernhard BETTLER, 2013. Up-regulation of GABA(B) receptor signaling by constitutive assembly with the K⁺ channel tetramerization domain-containing protein 12 (KCTD12). *The Journal of Biological Chemistry*. 288(34), 24848–24856. ISSN 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.476770

*KANDEL, E. R., J. KOESTER, S. MACK a S. SIEGELBAUM, ed., 2021. *Principles of neural science*. Sixth edition. New York: McGraw Hill. ISBN 978-1-259-64223-4.

KEHRLE, Helga M., Ronaldo C. GRANJEIRO, André L. L. SAMPAIO, Roberta BEZERRA, Vanessa F. ALMEIDA a Carlos A. OLIVEIRA, 2008. Comparison of Auditory Brainstem Response Results in Normal-Hearing Patients With and Without Tinnitus. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 134(6), 647. ISSN 0886-4470. Dostupné z: doi:10.1001/archotol.134.6.647

KELLY, Jack B. a Sharon L. SALLY, 1993. Effects of superior olivary complex lesions on binaural responses in rat auditory cortex. *Brain Research*. 605(2), 237–250. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/0006-8993(93)91746-F

KEMP, D. T., 1978. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 64(5), 1386–1391. ISSN 0001-4966, 1520-8524. Dostupné z: doi:10.1121/1.382104

KLANG, Nelson Y.S., M.Charles LIBERMAN, William F. SEWELL a John J. GUINAN, 1986. Single unit clues to cochlear mechanisms. *Hearing Research*. 22(1–3), 171–182. ISSN 03785955. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5955(86)90093-6

KNIGHT, A.R. a N.G. BOWERY, 1996. The pharmacology of adenylyl cyclase modulation by GABAB receptors in rat brain slices. *Neuropharmacology*. 35(6), 703–712. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/0028-3908(96)84642-9

KURODA, Tsutomu, 2007. Clinical investigation on spontaneous otoacoustic emission (SOAE) in 447 ears. *Auris Nasus Larynx*. 34(1), 29–38. ISSN 03858146. Dostupné z: doi:10.1016/j.anl.2006.09.023

LEE, Charles C., 2013. Thalamic and cortical pathways supporting auditory processing. *Brain and Language*. 126(1), 22–28. ISSN 0093934X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bandl.2012.05.004

LEITNER, Donald S. a Michelle E. COHEN, 1985. Role of the inferior colliculus in the inhibition of acoustic startle in the rat. *Physiology & Behavior*. 34(1), 65–70. ISSN 00319384. Dostupné z: doi:10.1016/0031-9384(85)90079-4

LIU, X. Z., 2003. Prestin, a cochlear motor protein, is defective in non-syndromic hearing loss. *Human Molecular Genetics*. 12(10), 1155–1162. ISSN 1462083. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddg127

LIU, Xiaopeng, Guang-Di CHEN a Richard SALVI, 2021. Neuroplastic changes in auditory cortex induced by long-duration „non-traumatic" noise exposures are triggered by deficits in the neural output of the cochlea. *Hearing Research*. 404, 108203. ISSN 1878-5891. Dostupné z: doi:10.1016/j.heares.2021.108203

LIVINGSTON, Gill, Jonathan HUNTLEY, Andrew SOMMERLAD, David AMES, Clive BALLARD, Sube BANERJEE, Carol BRAYNE, Alistair BURNS, Jiska COHEN-MANSFIELD, Claudia COOPER, Sergi G. COSTAFREDA, Amit DIAS, Nick FOX, Laura N. GITLIN, Robert HOWARD, Helen C. KALES, Mika KIVIMÄKI, Eric B. LARSON, Adesola OGUNNIYI, Vasiliki ORGETA, Karen RITCHIE, Kenneth ROCKWOOD, Elizabeth L. SAMPSON, Quincy SAMUS, Lon S. SCHNEIDER, Geir SELBÆK, Linda TERI a Naaheed MUKADAM, 2020. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet (London, England)*. 396(10248), 413–446. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)30367-6

MAGNUSSON, Anna K., Thomas J. PARK, Michael PECKA, Benedikt GROTHE a Ursula KOCH, 2008. Retrograde GABA signaling adjusts sound localization by balancing excitation and inhibition in the brainstem. *Neuron*. 59(1), 125–137. ISSN 1097-4199. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2008.05.011

MAISON, Stéphane F., Emilio CASANOVA, Gay R. HOLSTEIN, Bernhard BETTLER a M. Charles LIBERMAN, 2009. Loss of GABAB receptors in cochlear neurons: threshold elevation suggests modulation of outer hair cell function by type II afferent fibers. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO*. 10(1), 50–63. ISSN 1438-7573. Dostupné z: doi:10.1007/s10162-008-0138-7

MARCRUM, Steven C., Peter KUMMER, Christoph KREITMAYER a Thomas STEFFENS, 2016. Average optimal DPOAE primary tone levels in normal-hearing adults. *International Journal of Audiology*. 55(6), 325–332. ISSN 1499-2027, 1708-8186. Dostupné z: doi:10.3109/14992027.2016.1143979

- METZ, Michaela, Martin GASSMANN, Bernd FAKLER, Nicole SCHAEREN-WIEMERS a Bernhard BETTLER, 2011. Distribution of the auxiliary GABA_B receptor subunits KCTD8, 12, 12b, and 16 in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*. 519(8), 1435–1454. ISSN 0021-9967, 1096-9861. Dostupné z: doi:10.1002/cne.22610
- MILBRANDT, J. C., R. L. ALBIN a D. M. CASPARY, 1994. Age-related decrease in GABAB receptor binding in the Fischer 344 rat inferior colliculus. *Neurobiology of Aging*. 15(6), 699–703. ISSN 0197-4580. Dostupné z: doi:10.1016/0197-4580(94)90051-5
- MINERE, Marielle, Martin MORTENSEN, Valentina DOROVYKH, Gary WARNES, Dean NIZETIC, Trevor G. SMART a Saad B. HANNAN, 2024. Presynaptic hyperexcitability reversed by positive allosteric modulation of a GABABR epilepsy variant. *Brain: A Journal of Neurology*. awae232. ISSN 1460-2156. Dostupné z: doi:10.1093/brain/awae232
- MÖHRLE, Dorit, Benedikt HOFMEIER, Mario AMEND, Stephan WOLPERT, Kun NI, Dan BING, Uwe KLOSE, Bernd PICHLER, Marlies KNIPPER a Lukas RÜTTIGER, 2019. Enhanced Central Neural Gain Compensates Acoustic Trauma-induced Cochlear Impairment, but Unlikely Correlates with Tinnitus and Hyperacusis. *Neuroscience*. 407, 146–169. ISSN 1873-7544. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2018.12.038
- MOULIN, Annie, Jean-Christophe BERA a Lionel COLLET, 1994. Distortion Product Otoacoustic Emissions and Sensorineural Hearing Loss. *International Journal of Audiology*. 33(6), 305–326. ISSN 1499-2027, 1708-8186. Dostupné z: doi:10.3109/00206099409071890
- MULDERS, W.H.A.M. a D. ROBERTSON, 2009. Hyperactivity in the auditory midbrain after acoustic trauma: dependence on cochlear activity. *Neuroscience*. 164(2), 733–746. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.036
- NADOL, Joseph B., 1988. Comparative anatomy of the cochlea and auditory nerve in mammals. *Hearing Research*. 34(3), 253–266. ISSN 03785955. Dostupné z: doi:10.1016/0378-5955(88)90006-8
- NGODUP, Tenzin, Tomohiko IRIE, Seán P. ELKINS a Laurence O. TRUSSELL, 2024. The Na⁺ leak channel NALCN controls spontaneous activity and mediates synaptic modulation by α 2-adrenergic receptors in auditory neurons. *eLife*. 12, RP89520. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.89520

OSWALD, Anne-Marie M., Brent DOIRON, John RINZEL a Alex D. REYES, 2009. Spatial profile and differential recruitment of GABAB modulate oscillatory activity in auditory cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 29(33), 10321–10334. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1703-09.2009

*PAULIN, Johan, Linus ANDERSSON a Steven NORDIN, 2016. Characteristics of hyperacusis in the general population. *Noise and Health*. 18(83), 178. ISSN 1463-1741. Dostupné z: doi:10.4103/1463-1741.189244

PENNER, M. J., 1990. An Estimate of the Prevalence of Tinnitus Caused by Spontaneous Otoacoustic Emissions. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 116(4), 418–423. ISSN 0886-4470. Dostupné z: doi:10.1001/archotol.1990.01870040040010

PUNCH, Jerry L., Rose HITT a Sandi W. SMITH, 2019. Hearing loss and quality of life. *Journal of Communication Disorders*. 78, 33–45. ISSN 00219924. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcomdis.2019.01.001

RAPIN, Isabelle a Judith GRAVEL, 2003. “Auditory neuropathy”: physiologic and pathologic evidence calls for more diagnostic specificity. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 67(7), 707–728. ISSN 01655876. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-5876(03)00103-4

RESENDES, BarbaraL., SharonF. KUO, NahidG. ROBERTSON, AnneB.S. GIERSCH, Dynio HONRUBIA, Osamu OHARA, JoeC. ADAMS a CynthiaC. MORTON, 2004. Isolation from Cochlea of a Novel Human Intronless Gene with Predominant Fetal Expression. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 5(2) [vid. 2024-06-25]. ISSN 1525-3961, 1438-7573. Dostupné z: doi:10.1007/s10162-003-4042-x

*RUSSELL, Ian J, 1987. The physiology of the organ of Corti. *British Medical Bulletin*. 43(4), 802–820. ISSN 1471-8391, 0007-1420. Dostupné z: doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072219

RYBALKO, Natalia, Dijana MITROVIC, Daniel ŠUTA, Zbyněk BUREŠ, Jiří POPELÁŘ a Josef SYKA, 2019. Behavioral evaluation of auditory function abnormalities in adult rats with normal hearing thresholds that were exposed to noise during early development. *Physiology & Behavior*. 210, 112620. ISSN 00319384. Dostupné z: doi:10.1016/j.physbeh.2019.112620

*SALVI, Richard, Guang-Di CHEN a Senthilvelan MANOHAR, 2022. Hyperacusis: Loudness intolerance, fear, annoyance and pain. *Hearing Research*. 426, 108648. ISSN 03785955. Dostupné z: doi:10.1016/j.heares.2022.108648

SAND, P. G., B. LANGGUTH, J. ITZHACKI, A. BAUER, S. GEIS, Z. E. CÁRDENAS-CONEJO, V. PIMENTEL a T. KLEINJUNG, 2012. Resequencing of the auxiliary GABA(B) receptor subunit gene

KCTD12 in chronic tinnitus. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 6, 41. ISSN 1662-5137. Dostupné z: doi:10.3389/fnsys.2012.00041

SHIOMI, Yosaku, Jun TSUJI, Yasushi NAITO, Nobuya FUJIKI a Norio YAMAMOTO, 1997. Characteristics of DPOAE audiogram in tinnitus patients. *Hearing Research*. 108(1–2), 83–88. ISSN 03785955. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5955(97)00043-9

SHORE, S. E., 2005. Multisensory integration in the dorsal cochlear nucleus: unit responses to acoustic and trigeminal ganglion stimulation. *European Journal of Neuroscience*. 21(12), 3334–3348. ISSN 0953-816X, 1460-9568. Dostupné z: doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04142.x

SCHOFIELD, Brett R. a Diana L. COOMES, 2006. Pathways from auditory cortex to the cochlear nucleus in guinea pigs. *Hearing Research*. 216–217, 81–89. ISSN 03785955. Dostupné z: doi:10.1016/j.heares.2006.01.004

SCHWENK, J., M. METZ, G. ZOLLES, R. TURECEK, T. FRITZIUS, W. BILDL, E. TARUSAWA, A. KULIK, A. UNGER, K. IVANKOVA, R. SEDDIK, J. Y. TIAO, M. RAJALU, J. TROJANOVA, V. ROHDE, M. GASSMANN, U. SCHULTE, B. FAKLER a B. BETTLER, 2010. Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature*. 465(7295), 231–235. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature08964

STOVER, Lisa, Michael P. GORGA, Stephen T. NEELY a Danielle MONTOYA, 1996. Toward optimizing the clinical utility of distortion product otoacoustic emission measurements. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 100(2), 956–967. ISSN 0001-4966, 1520-8524. Dostupné z: doi:10.1121/1.416207

*SYKA, Josef, Luboš VOLDŘICH a František VRABEC, 1981. *Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu*. Vyd. 1. ISBN (Váz.).

TURECEK, R., J. SCHWENK, T. FRITZIUS, K. IVANKOVA, G. ZOLLES, L. ADELINGER, V. JACQUIER, V. BESSEYRIAS, M. GASSMANN, U. SCHULTE, B. FAKLER a B. BETTLER, 2014. Auxiliary GABAB receptor subunits uncouple G protein $\beta\gamma$ subunits from effector channels to induce desensitization. *Neuron*. 82(5), 1032–1044. ISSN 1097-4199. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2014.04.015

*TUREČEK, Rostislav, Adolf MELICHAR, Michaela KRÁLÍKOVÁ a Bohdana HRUŠKOVÁ, 2023. The role of GABAB receptors in the subcortical pathways of the mammalian auditory system. *Frontiers in Endocrinology*. 14, 1195038. ISSN 1664-2392. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2023.1195038

*TURNER, J. G., T. J. BROZOSKI, C. A. BAUER, J. L. PARRISH, K. MYERS, L. F. HUGHES a D. M. CASPARY, 2006. Gap detection deficits in rats with tinnitus: A potential novel screening tool. *Behavioral Neuroscience*. 120(1), 188–195. Dostupné z: doi:10.1037/0735-7044.120.1.188

TURNER, Jeremy G. a Jennifer PARRISH, 2008. Gap Detection Methods for Assessing Salicylate-Induced Tinnitus and Hyperacusis in Rats. *American Journal of Audiology*. 17(2) [vid. 2024-07-10]. ISSN 1059-0889, 1558-9137. Dostupné z: doi:10.1044/1059-0889(2008/08-0006)

VELTRI, Robert W., William R. WILSON, Philip M. SPRINKLE, Susan M. RODMAN a Debra A. KAVESH, 1981. The Implication of Viruses in Idiopathic Sudden Hearing Loss: Primary Infection or Reactivation of Latent Viruses? *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*. 89(1), 137–141. ISSN 0194-5998, 1097-6817. Dostupné z: doi:10.1177/019459988108900129

WADA, Tetsuro, Hajime SANO, Shin-ya NISHIO, Ryosuke KITO, Tetsuo IKEZONO, Satoshi IWASAKI, Kimitaka KAGA, Atsushi MATSUBARA, Tatsuo MATSUNAGA, Takaaki MURATA, Yasushi NAITO, Mikio SUZUKI, Haruo TAKAHASHI, Testuya TONO, Hiroshi YAMASHITA, Akira HARA a Shin-ichi USAMI, 2017. Differences between acoustic trauma and other types of acute noise-induced hearing loss in terms of treatment and hearing prognosis. *Acta Oto-Laryngologica*. 137(sup565), S48–S52. ISSN 0001-6489, 1651-2251. Dostupné z: doi:10.1080/00016489.2017.1297899

WEDEMEYER, Carolina, Javier ZORRILLA DE SAN MARTÍN, Jimena BALLESTERO, María Eugenia GÓMEZ-CASATI, Ana Vanesa TORBIDONI, Paul A. FUCHS, Bernhard BETTLER, Ana Belén ELGOYHEN a Eleonora KATZ, 2013. Activation of presynaptic GABA(B(1a,2)) receptors inhibits synaptic transmission at mammalian inhibitory cholinergic olivocochlear-hair cell synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 33(39), 15477–15487. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.2554-13.2013

WEISZ, Nathan, Simona MÜLLER, Winfried SCHLEE, Katalin DOHRMANN, Thomas HARTMANN a Thomas ELBERT, 2007. The Neural Code of Auditory Phantom Perception. *The Journal of Neuroscience*. 27(6), 1479–1484. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3711-06.2007

YEOMANS, John S., Daniel BOSCH, Nyresa ALVES, Alexander DAROS, Robert J. URE a Susanne SCHMID, 2010. GABA receptors and prepulse inhibition of acoustic startle in mice and rats. *European Journal of Neuroscience*. 31(11), 2053–2061. ISSN 0953-816X, 1460-9568. Dostupné z: doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07236.x

*ZENG, Fan-Gang, 2020. Tinnitus and hyperacusis: central noise, gain and variance. *Current Opinion in Physiology*. 18, 123–129. ISSN 24688673. Dostupné z: doi:10.1016/j.cophys.2020.10.009

ZHENG, Jing, Weixing SHEN, David Z. Z. HE, Kevin B. LONG, Laird D. MADISON a Peter DALLOS, 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*. 405(6783), 149–155. ISSN 0028-0836, 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/35012009

ZHENG, Qing Yin, Kenneth R. JOHNSON a Lawrence C. ERWAY, 1999. Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hearing Research*. 130(1–2), 94–107. ISSN 03785955. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5955(99)00003-9