

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



**Vliv stárnutí na centrální část sluchového systému
laboratorního potkana**

Jana Burianová

Praha 2014

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc

Školící pracoviště: ÚEM AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Jana Burianová

Školitel: RNDr. Jiří Popelář, CSc.

Oponenti: prof. MUDr. Richard Rokyta, DrSc.
doc. RNDr. Aleš Stuchlík, PhD.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

OBSAH	4
ABSTRAKT.....	5
ABSTRACT.....	7
1. ÚVOD	9
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A METODY.....	14
3.1. Pokusná zvířata	14
3.2. Western blot	15
3.3. Imunohistochemie	15
3.4. Měření sluchových prahů	15
3.5. Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět a prepulzní inhibice.....	16
3.6. Hluková expozice.....	16
3.7. Statistická analýza	16
4. VÝSLEDKY	17
4.1. Změny v imunoreaktivitě a hladinách glutamátdekarboxylázy (GAD).....	17
4.2. Změny v hladinách a imunoreaktivitě u kalbindinu a kalretininu	19
4.3. Změny v úlekové reakci na zvukový stimul (ASR) a prepulzní inhibici (PPI) během stárnutí potkanů dvou kmenů	19
4.4. Změny v úlekové reakci na zvukový stimul a prepulzní inhibici měřené v dospělosti po expozici hluku během raného vývoje	20
5. DISKUZE.....	21
6. ZÁVĚRY.....	24
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	26
8. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	27

ABSTRAKT

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

V první studii jsme ověřovali hypotézu snížené inhibiční funkce mozku u potkana během stárnutí tím, že jsme hodnotili změny v obsahu dvou izoform enzymu GAD (65 a 67), který je klíčovou molekulou pro syntézu GABA. Naše výsledky prokázaly využitím metody western blot celkový pokles hladin proteinů GAD65 a GAD67 a na základě imunohistochemie významné změny v imunoreaktivitě GAD65 a GAD67 v *colliculus inferior* a ve sluchové kůře potkana během stárnutí. Snížil se počet GAD65- a 67-imunoreaktivních těl neuronů a poklesla jejich optická denzita. Získaná data vykazují podobný charakter změn, mají podobný průběh u obou izoform GAD a i u obou sledovaných kmenů potkanů – rychlestárnoucího kmene Fischer 344 (F344) i fyziologicky stárnoucího kmene Long Evans (LE).

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

shodě s daty získanými imunohistochemickými metodami. Navíc jsme prokázali, že pokles v hladinách CB byl výraznější než u CR.

Základem třetího experimentu byla skutečnost, že stárnutí sluchového systému se manifestuje nižší reaktivitou na zvukové podněty. Testovali jsme proto oba zmiňované kmeny potkanů v testu úlekové reakce (ASR) a v testu prepulzní inhibice (PPI), a to ve třech různých věkových kategoriích. Naše výsledky ukazují, že mezi potkany kmene LE a F344 existuje rozdíl ve změnách úlekové reakce na zvukový stimul v souvislosti se stárnutím. Potkani F344 mají menší ASR amplitudy než potkani LE téměř ve všech případech zvukové stimulace. ASR amplitudy u potkanů F344 ve srovnání s kmenem LE klesají během stárnutí rychleji. Stejně tak prepulzní inhibice se manifestuje u F344 potkanů méně než u LE. Nicméně relativní pokles PPI při stárnutí je u obou kmenů podobný a signifikantního snížení PPI se dosahuje pouze u starých zvířat.

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

ABSTRACT

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

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

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

protein analysis was in line with the immunohistochemistry cell analysis. In addition, CB declined more significantly than CR.

The third experiment focused on behavioural observations of well known age-related decreases in responsiveness to auditory stimuli. We evaluated both the aforementioned rat strains at three different stages of their life using the acoustic startle reflex test (ASR) and prepulse inhibition (PPI). Our results confirmed different age-related changes of the startle responses in LE and F344 strains. F344 rats showed lower ASR amplitudes compared to LE rats across all types of acoustic stimuli presented. ASR amplitudes decreased faster at each age in F344 than in LE rats and PPI was manifested to a lesser extent in F344 than LE rats. However, relative decline remained the same for both strains, reaching significance only in aged animals.

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

1. ÚVOD

Stárnutí je přirozeným fyziologickým dějem. Ve sluchovém systému se stárnutí projevuje zhoršenou sluchovou funkcí způsobenou hlavně úbytkem sluchových receptorových buněk ve vnitřním uchu. Sluchová ztráta způsobená stárnutím, nazývaná presbyakuze, se v současné době vyskytuje u 50 % lidí ve věku nad 65 let (Gates & Mills, 2005). Tím se presbyakuze stává jednou z nejčastějších příčin zdravotního postižení starších osob. Navzdory intenzivnímu výzkumu jsou změny sluchu spojené se stárnutím stále málo prozkoumány. Kromě změn na periférii se specifické změny související se stářím projevují i ve sluchových nervových centrech. Cílem této dizertační práce bylo na modelu laboratorního potkana přispět k lepšímu poznání dějů, které se stárnutím v centrálním sluchovém systému souvisejí.

Centrální část sluchového systému má ve vyšších etážích tři hlavní integrační a přepojovací struktury. V mozkovém kmeni je to *colliculus inferior* (CI). V jeho centrálním jádře se přepojuje vzestupná sluchová dráha, nesoucí tonotopicky uspořádanou informaci. Do externí kůry a dorzální kůry se sbíhají vzestupná, ale i sestupná vlákna nespécifického charakteru. CI se vyznačuje poměrně bohatým zastoupením inhibičních neuronů. Naopak v thalamickém jádře *corpus geniculatum mediale* (CGM) je vlastních inhibičních neuronů minimum. Zde se vlákna s tonotopickým uspořádáním nacházejí ve ventrální části, zatímco dorzální a především mediální část dostává rozmanitější, polymodální informaci. Konečnou oblastí sluchové dráhy je sluchová kůra (SK), oblast kde se zpracovávají především komplexní zvuky. Zde je inhibičních neuronů kolem 20–25 % (Syka et al., 1981; Prieto et al., 1994).

Kódování zvukového stimulu staví centrální část sluchového systému v nárocích na přenos nervového vzruchu do specifické pozice. Na mnoha synapsích dochází k mimořádně rychlému přenosu vzruchu i k rychlému navození refrakterní fáze. Hlavní excitační neurotransmise je zprostředkována glutamátem, u nějž nejdůležitější roli při rychlém přenosu vzruchu hrají AMPA receptory. Inhibici ve výše položených

oblastech sluchového systému zajišťuje kys. gamaaminomáselná (GABA), v nižších se uplatňuje i glycin. GABA je syntetizována dekarboxylací glutamátu enzymem glutamátdekarboxylázou (GAD). V savčím mozku se vyskytují dvě izoformy o molekulové hmotnosti 65 kDa (GAD65) a 67 kDa (GAD67), každá je kódována svým vlastním genem. Většina GABAergních neuronů exprimuje obě izoformy, přičemž GAD65 bývá častěji v axonovém zakončení, v němž je pak GABA umísťována do vezikulů, zatímco GAD67 se nachází v průběhu celého neuronu včetně somatu a účastní se nevezikulárního výlevu GABA.

S GABAergní neurotransmisí úzce souvisí vápník vážící proteiny kalbindin (CB), parvalbumin (PV) a kalretinin (CR), které se vyskytují zpravidla v GABAergních neuronech. Představují hlavní nárazníkový systém pro udržování nízké hladiny cytosolického vápníku, a proto mají neuroprotektivní funkci. CR hraje navíc důležitou roli v plastických dějích. Je zásadní, že téměř nikdy se tyto proteiny nevyskytnou zároveň v jednom neuronu, vidáme je tedy jako tři různé neuronální populace. Z toho důvodu se používají jako markery buněčných populací.

K testování schopnosti zvířete vnímat zvukové podněty používáme s výhodou nepodmíněné behaviorální testy, neboť nezahrnují učení. Jedním z nich je test úlekové reakce. Úleková reakce na zvukový stimul je přechodná motorická reakce na neočekávaný intenzivní sensorický podnět. Prepulzní inhibice úlekové reakce je způsobena akustickým stimulem, který je vložen před samotný úlekový signál a samotnou odpověď na úlekový signál zeslabuje.

Ve vývoji sluchového systému, stejně jako u jiných sensorických systémů, se vyskytuje kritická perioda vyznačující se zvýšenou citlivostí na přicházející podněty. U potkana začíná 10. postnatální den, kdy se otevírá zvukovod a mláďata začínají reagovat na zvuk. Její délka je předmětem diskuzí, nicméně vývoj potkaního sluchu je do značné míry ovlivnitelný i ve stáří pěti týdnů (Rybalko & Syka, 2001).

Během stárnutí dochází ve sluchovém systému k narušení jeho funkce (presbyakuze). Rozlišujeme u ní periferní a centrální komponentu. Centrální

komponenta bývá spojována se zhoršováním schopnosti zpracovat komplexní zvukové podněty, jakým je například lidská řeč. V laboratorních podmínkách se k výzkumu stárnutí sluchu často používá potkanů kmene Fischer 344, kteří se vyznačují zrychleným stárnutím způsobeným mnoha patologickými stavy, včetně poškození periferní části (degenerativní změny ve stria vascularis a ligamentum spirale) a centrální části sluchového systému (Syka, 2010). K posouzení změn během stárnutí je výhodné porovnávat rychlestárnoucí kmen F344 s fyziologicky stárnoucím kmenem Long Evans, který má zachován sluch až do pozdního věku. V současné literatuře panuje shoda, že centrální komponenta presbyakuze souvisí s celkovým úbytkem funkce inhibičního systému (Turner et al., 2005). Avšak dosud publikované práce na toto téma vesměs testovaly pouze kmeny, které se ve stáří vyznačují velkou ztrátou sluchu periferního původu (Casparly et al., 2008). Následkem čehož byla dosud preferována hypotéza, že útlum GABAergní inhibice ve sluchové dráze primárně souvisí se ztrátou aferentní stimulace.

Stárnutí se v CI projevuje sníženým výlevem GABA při nezměněné hodnotě u glutamátu (Casparly et al., 1990). Neuronů obecně výrazněji neubývá, zmenšuje se však jejich větvení (Helfert et al., 1999). Překvapivě mírně vzrůstá počet parvalbumin-imunoreaktivních neuronů, které představují subpopulaci GABAergních neuronů (Ouda et al., 2008). V CGM rovněž nedochází k signifikantnímu úbytku neuronů. Stoupá zastoupení NMDA receptorů. Stárnoucí sluchová kůra se vyznačuje snižující se denzitou dendritického větvení a synaptickou konektivitou. Významný je pokles inhibice, projevující se snížením optické denzity GAD67-ir neuronů a počtu PV-ir neuronů (Ling et al., 2005). Je zajímavé, že zatímco u starých potkanů kmene Fischer 344 klesá početní denzita PV-ir neuronů v Te1 a Te3, u kmene Long Evans k poklesu nedochází (Ouda et al., 2008).

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

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

Předpokládali jsme, že:

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

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

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

Předpokládali jsme, že:

- během stárnutí se sníží hladina CB a CR v potkaním CI a SK, méně pak v ZK.
- počet CB-ir a CR-ir neuronů se v CI, CGM a SK sníží.

- ve stáří se rovněž změní velikost a morfologie CB-ir a CR-ir neuronů v uvedených sluchových strukturách.
- změny spojené se stárnutím budou výraznější u rychleji stárnoucího kmene Fischer 344 než u kmene s fyziologickým průběhem stárnutí Long Evans.

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

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

Předpokládali jsme, že:

- během stárnutí se zvýší sluchové prahy v ABR, přičemž u kmene Fischer 344 bude zvýšení výraznější a nastane již v ranějším věku.
- během stárnutí se sníží amplituda ASR; u kmene Fischer 344 bude pokles výraznější.
- reaktivita na vyšší frekvence zvukových podnětů bude nižší.
- účinnost PPI bude s věkem klesat; u kmene Fischer výrazněji.

IV. Narušení normální sluchové funkce během kritické periody má výrazný dopad na její stav v dospělosti. Ohlušení potkanů v P14 krátkou (8 minut) expozicí hluku (125 dB SPL) sice nezpůsobí trvalou ztrátu sluchu, ale vyvolá změny, které lze v dospělosti pozorovat jako výrazné elektrofyziologické a buněčné abnormality

v centrální části sluchového systému (Grécová et al., 2009). Jaké jsou jejich behaviorální koreláty nebylo dosud známo.

Proto naším cílem bylo u dospělých potkanů kmene Long Evans, kteří byli v P14 podrobeni uvedené hlukové expozici, zhodnotit jak prahy ABR, tak behaviorální reaktivitu na zvukové podněty testem úlekové reakce a její prepulzní inhibice a porovnat je s výsledky stejně starých zvířat, která hlukové expozici vystavena nebyla.

Předpokládali jsme, že:

- u exponovaných zvířat nedojde k posunu prahů v ABR.
- exponovaná zvířata vykáží menší amplitudu ASR a nižší účinnost PPI.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Pokusná zvířata

Všechny experimenty byly provedeny v souladu s principy péče o laboratorní zvířata a v souladu s předpisy etické komise Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR a Helsinskou deklarácí.

Celkový počet zvířat zařazených do experimentů uvedených v této práci byl 85 potkanů kmene Long Evans a to ve věku 3–6 měsíců (n=47), 12–14 měsíců (n=5) a 24–35 měsíců (n=33). Dále jsme použili 53 potkanů kmene Fischer 344: věku 3–5 měsíců (n=26), 12–14 měsíců (n=6) a 18–26 měsíců (n=21). Hmotnost čtrnáctidenních mláďat se pohybovala mezi 29–32 g, dospělých potkanů v rozmezí 250–350 g, potkanů ve věku 12–14 měsíců 300–500 g a hmotnost starých 400–600 g. Zvířata byla od 2 měsíců věku chována v areálovém zvěřinci za standardních podmínek: 12/12 hodin cyklus světlo/tma; přístup k potravě a tekutinám *ad libitum*.

3.2. Western blot

Pro metodu western blot byla zvířata v anestézii (ketamin+xylazin) dekapitována, mozky rychle vyjmuty a ponořeny do ledového fyziologického roztoku. Z obou hemisfér byla urychleně odebrána tkáň. Vzorky zahrnovaly vždy celý CI (centrální jádro a externí i dorzální kůru), sluchové oblasti kůry Te1+Te3 a zraková pole V1+V2 (Zilles, 1985; Paxinos a Watson, 1998). Celkové koncentrace proteinů byly stanoveny metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976). Elektroforetické dělení proteinů jednotlivých vzorků bylo prováděno SDS-PAGE podle Ogity a Markerta (Ogita & Markert, 1979). Dalším krokem byl elektropřenos proteinů, neboli western blotting, podle Towbina (Towbin et al., 1979). Po imunodetekci (GAD65 a 67, CB, CR a aktin) na nitrocelulóзовých membránách následovala metoda zesílené chemiluminiscence (ECL). Vyvolané filmy byly naskenovány a pro kvantitativní zhodnocení relativního množství proteinu a aktinu v jednotlivých vzorcích, jsme použili program ImageQuant.

3.3. Imunohistochemie

Pro imunohistochemii byli potkani v hluboké anestézii (ketamin+xylazin) transkardiálně perfundováni. Ze zájmových oblastí (CI, CGM, SK a ZK) byly na zmrazovacím mikrotomu nakrájeny frontální řezy, které byly následně inkubovány s protilátkami (GAD, CB, CR). K hodnocení imunoreaktivity jsme použili světelný mikroskop a program Neurolucida.

3.4. Měření sluchových prahů

Snímání kmenových evokovaných potenciálů bylo provedeno u zvířat v anestézii (ketamin+xylazin či medetomidin hydrochlorid). Po dobu měření byla zvířata položena na vyhřívané podložce udržující tělesnou teplotu 38 °C. Měření probíhalo ve zvukově stíněné bezdozvukové komoře. Pro stanovení sluchových prahů jsme jako

stimuly použili širokopásmové impulsy (kliky) a čisté tóny s frekvencí v rozmezí 2–40 kHz.

3.5. Měření úlekové reakce na intenzivní zvukový podnět a prepulzní inhibice

Behaviorální testování probíhalo ve zvukově izolované komoře. Velikost úlekové reakce byla vyhodnocena v časovém rozmezí 100 ms od spuštění úlekového stimulu. Jako úlekové stimuly jsme použili krátké tóny 2, 4, 8 a 16 kHz nebo krátké impulsy bílého šumu o různé intenzitě: 60–120 dB. Každý stimul byl prezentován v náhodném pořadí 10×.

Pro měření prepulzní inhibice úlekové reakce jsme použili 3 různé typy stimulů: samotný úlekový stimul (bílý šum o intenzitě 110 nebo 115 dB SPL), kombinaci úlekového stimulu a prepulzního tónu o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz a intenzitě 10–80 dB SPL. Každý typ stimulu byl prezentován v náhodném pořadí 10×.

3.6. Hluková expozice

Mláďata potkanů (n=7) byla vystavena 14. postnatální den hlukové expozici bílého šumu o intenzitě 125 dB SPL po dobu 8 minut ve speciálním bezdozvukovém boxu. Kontrolní skupina mláďat (n=7) hlukové expozici vystavena nebyla. Ve 40. postnatálním dni byly potkanům obou skupin stanoveny prahy ABR.

3.7. Statistická analýza

Rozdíly mezi skupinami mladých a starých potkanů pro western blot i imunohistochemii jsme analyzovali Mann-Whitneyho testem. Jednotlivé struktury mezi sebou jsme u dat z western blotu hodnotili pomocí jednoduché ANOVY a Bonferroniho *post-hoc* testu.

Ke statistickému vyhodnocování behaviorálních dat u stárnutí byly použity tyto parametry: prahy ABR, ASR prahy, ASR amplitudy a amplituda ASR ovlivněná

prepulzním tónem. Analyzovány byly dvěma způsoby: mezikmenovým porovnáním potkanů stejného věku a na základě věkové závislosti v rámci daného kmene. Používali jsme dvojcestnou ANOVU s opakováním následovanou Bonferroniho *post-hoc* testem. Statistické vyhodnocení ASR amplitud bylo provedeno v intenzitě stimulu 120 dB SPL. K testování závislosti amplitudy ASR na prazích slyšení jsme použili lineární regresi následovanou F-testem.

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

4. VÝSLEDKY

4.1. Změny v imunoreaktivitě a hladinách glutamátdekarboxylázy (GAD)

V naší práci jsme sledovali pomocí GAD, klíčového enzymu pro syntézu GABA, změny GABAergního systému v *colliculus inferior* a sluchové kůře. Rozhodli jsme se testovat tyto změny u kmene Long Evans, který se vyznačuje jen mírnou ztrátou sluchu ve stáří, a ověřit mezikmenové rozdíly na rychle stárnoucím kmenu potkanů Fischer 344.

Naše výsledky prokázaly v *colliculus inferior* a sluchové kůře výrazný a uniformní úbytek GAD65 a GAD67.

V CI jsme metodou western blotu u starých potkanů LE zjistili pokles obou proteinů, GAD65 i GAD67, o 50 % a 48 % ($P < 0,01$ a $P < 0,001$). Podobně u kmene F344 poklesl GAD65 o 46 % a GAD67 o 47 % ($P < 0,001$). Imunohistochemicky byly u kmene LE statisticky významné změny ve spojení se stárnutím zjištěny jak v centrálním jádře tak externí kůře. V CCI se výrazně snížila optická denzita GAD65

a 67-ir somat o 27 % ($P=0,015$) a 25 % ($P=0,015$). Zároveň se snížil i počet přítomných GAD65 a 67-ir buněk, a to o 14 % ($P=0,03$) a 9 % (nesignifikantní). V ECI došlo pouze k poklesu optické denzity o 16 % ($P=0,03$) a 14 % ($P=0,03$), zatímco počet buněk se neměnil. U kmene F344 jsme hodnotili pouze data z GAD67: Optická denzita GAD67-ir somat poklesla v CCI o 21 % ($P=0,03$), v ECI o 13 %. Počet GAD67-ir buněk se snížil v týchž strukturách v uvedeném pořadí o 6 % a 10 %.

Ve sluchové kůře z výsledků získaných z western blot analýzy vyplynul značný pokles hladin obou izoform GAD u starých potkanů kmene LE ve srovnání s mladými jedinci. Hladiny poklesly o 43 % u GAD65 a o 48 % u GAD67 ($P<0,01$ a $P<0,001$). U kmene F344 se snížilo množství GAD65 o 34 % a GAD67 o 45 % ($P<0,001$). Výsledky imunohistochemické analýzy ukázaly u kmene LE pokles v optické denzitě neuronů u starých potkanů srovnatelný s poklesem v CI. Optická denzita GAD65-ir somat klesla o 20 % ($P=0,015$) a GAD67-ir somat o 22 % ($P=0,015$). Počet GAD65-ir buněk se u starých potkanů ve srovnání s mladými snížil jen nevýznamně (o 8 %), zatímco u GAD67-ir neuronů byl o něco výraznější (13 %, $P=0,03$). U potkanů F344 optická denzita GAD67-ir somat poklesla o 14 % a počet GAD67-ir buněk se snížil o 10 %.

Ve zrakové kůře byly změny mírnější. U kmene LE hladina proteinu GAD65 poklesla o 23 % ($P<0,05$) a GAD67 o 21 % ($P<0,05$), u kmene F344 u GAD65 o 19 % a GAD67 o 24 % ($P<0,01$). Imunohistochemická data ukázala, že u starých potkanů LE došlo ke snížení optické denzity buněk, které bylo poněkud méně výrazné než ve sluchové kůře, konkrétně o 12 % pro GAD65-ir (nesignifikantní) a o 18 % pro GAD67-ir neurony ($P=0,03$). Naproti tomu počet buněk GAD65 a 67-ir se s věkem téměř nesnížil (cca o 5 %, nesignifikantní). U kmene F344 optická denzita GAD67-ir somat poklesla ve zrakové kůře o 15 % a počet GAD67-ir buněk se snížil o 6 %.

4.2. Změny v hladinách a imunoreaktivitě u kalbindinu a kalretininu

Kalbindin (CB) i kalretinin (CR) jsou exprimovány především v GABAergních buňkách. Třebaže existují mnohé studie na myších, doposud chyběla charakteristika změn CB a CR ve vyšších etážích sluchového systému u potkana. I zde jsme porovnávali kmen Long Evans s kmenem Fischer 344, abychom osvětlili, do jaké míry jsou případné změny dány aferentním poškozením. Naše výsledky ukázaly, že u obou kmenů došlo k podobným změnám.

Hladina kalbindinu se snížila zhruba o polovinu ve všech strukturách vyhodnocovaných metodou western blot (CI, SK, ZK), u obou kmenů obdobně (vše $P < 0,001$). CB-ir buněk ubylo v DCI (21 % u LE, $P < 0,01$; 18 % u F344, $P < 0,05$), ECI (16 %; resp. 13 %; obě $P < 0,05$), CGMV (18 %; resp. 23 %; obě $P < 0,01$), stejně tak jako v primární sluchové kůře Te1 (14 %; resp. 16 %; $P < 0,05$). U kmene F344 jsme navíc našli rozdíl mezi mladými a starými zvířaty v CGMD (o 21 %; $P < 0,01$).

Průměrné velikosti CB-ir neuronálních somat se signifikantně snížily pouze v dorzální kůře CI (o 18 % u Long Evans a 16 % u F344 potkanů, obě $P < 0,05$) a ventrální části CGM (obě $P < 0,05$). U kmene F344 jsme navíc opět našli rozdíl v CGMD ($P < 0,05$).

Úbytek v hladině CR byl nižší než u CB a u všech sledovaných struktur se pohyboval kolem 20 %. Úrovně statistické významnosti však dosáhl pouze u CI, a to u obou kmenů ($P < 0,05$). Buněčné změny CR-ir byly významné pouze v rámci CI: v počtu CR-ir neuronů v DCI (pokles o 16 % u LE a 20 % u F344; obě $P < 0,05$), v objemu CR-ir neuronálních somat jak v DCI (pokles o 19 % u LE, $P < 0,05$; 25 % u F344, $P < 0,01$), tak v ECI (15 %, $P < 0,05$; 18 %, $P < 0,05$).

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

Naše data ukázala, že potkani kmene F344, kteří slouží jako model rychlého stárnutí, vykazují jiný průběh změn v ASR během stárnutí než potkani kmene LE,

kteří představují model fyziologického stárnutí. Odhad citlivosti sluchu, založený na záznamu ABR, ukázal, že mladá dospělá zvířata obou kmenů se od sebe lišila pouze ve vysokých frekvencích (32 kHz; $P < 0,01$), zatímco ve středním věku potkani F344 slyšeli hůře v celém průběhu slyšitelných frekvencí. Ve stáří se pak opět prahy srovnaly, s výjimkou vysokých frekvencí (32 kHz). Porovnání hodnot úlekové reakce při intenzitě zvukového stimulu (120 dB SPL) prokázalo, že u potkanů F344 byly amplitudy odpovědi ASR celkově nižší. Nižší amplitudy se rovněž obecně vyskytovaly u vyšších frekvencí úlekových podnětů. Zatímco u potkanů kmene LE nebyly nalezeny rozdíly mezi mladými dospělými a potkany středního věku, u kmene F344 byl statisticky významný rozdíl mezi těmito věkovými skupinami u všech tónových podnětů. Co se týká PPI, oba kmeny vykazují podobný trend změn během stárnutí navzdory rozdílu v účinnosti PPI mezi kmeny. Účinnost během stárnutí klesá u obou kmenů, avšak u mladých dospělých potkanů LE je vyšší než u F344 (pro tóny 4 kHz a 8 kHz, $P < 0,001$; pro 16 kHz, $P < 0,05$) a mírně zvýšená je i u LE potkanů ve středním věku v porovnání s F344 (pro 4 kHz, $P < 0,05$). Výsledky naznačují, že vyhodnocování ASR a její potlačení zvukovým prepulzním podnětem může sloužit jako objektivní měřítko stárnutím způsobených změn v chování ovládaným zvukovými podněty.

4.4. Změny v úlekové reakci na zvukový stimul a prepulzní inhibici měřené v dospělosti po expozici hluku během raného vývoje

U potkanů kmene Long Evans expozice hlukovému stimulu (8 min, 125 dB SPL) v kritické periodě (P 14) neovlivnila v dospělosti křivku prahů ABR v porovnání s neexponovanými zvířaty. Jak jsme dále v testu ASR prokázali, prahové hodnoty amplitud ASR byly pro obě skupiny srovnatelné v rámci všech testovaných frekvencí (2, 4, 8 a 16 kHz). Nadprahové velikosti amplitud ASR byly rovněž srovnatelné mezi experimentálními skupinami, ovšem amplitudy ASR vyvolané maximálními intenzitami (110–120 dB SPL) byly v případě exponovaných zvířat statisticky

významně menší (s výjimkou 2 kHz). V obou experimentálních skupinách byla zřetelná tendence poklesu amplitudy ASR se stoupající frekvencí zvukového stimulu. U kontrolní skupiny zvířat byl tento pokles statisticky významný na frekvenci 16 kHz, u skupiny exponovaných zvířat byl přítomen již na frekvenci 8 kHz ($P < 0,05$). Domníváme se, že menší maximální amplitudy ASR u exponovaných zvířat jsou ukazatelem nezralosti centrálního sluchového systému. Podobně i reduované amplitudy ASR na frekvenci 8 kHz připisujeme narušenému vývoji centrálního sluchového systému.

Účinnost prepulzní inhibice byla testovaná pomocí prepulzních stimulů o frekvenci 2, 4, 8 a 16 kHz. Zatímco průměrná amplituda ASR u kontrolních zvířat pozvolna klesala v závislosti na intenzitě zvukového stimulu (funkce PPI), tvar křivky PPI u exponovaných zvířat byl odlišný: prudký pokles amplitudy ASR (tj. zvýšená účinnost prepulzního stimulu) na nízkých prepulzních intenzitách (20–30 dB SPL) byl vystřídán fází velmi pomalého poklesu amplitudy ASR (od 20–30 dB SPL do 60–70 dB SPL), kdy vzestup intenzity prepulzního stimulu vyvolal jen velmi malé změny amplitud ASR. Zvýšená citlivost na nízké intenzity prepulzního stimulu, kterou vystřídal zhoršená schopnost rozlišování intenzit zvuku v rozsahu středních intenzit, naznačovala u exponovaných zvířat porušené vnímání hlasitosti, které můžeme dát do souvislosti se změnami reprezentace intenzity detekované na úrovni neuronů CCI exponovaných zvířat v jiné studii provedené v naší laboratoři (Grécová et al., 2009).

5. DISKUZE

V souhrnu lze naše data prezentovaná v této dizertační práci chápat jako příspěvek k poznání změn, které nastávají v centrální části sluchového systému potkana v průběhu stárnutí. V současnosti se na změny v CNS ve stáří pohlíží nejen z hlediska kvantitativního úbytku neuronů, ale i jednotlivých neurotransmitterových systémů (Casparý et al., 2008). Průběh změn je o to složitější, že dochází i k různým kompenzačním mechanismům (Gray et al., 2014). Sluchový systém, který využívá

precizního časoprostorového kódování při přenosu a zpracování nervových impulzů, je závislý především na správné funkci a součinnosti excitačních a inhibičních procesů. Stále přibývá důkazů, že ve stáří dochází ke změnám především v inhibičních dějích (Caspary et al., 2008). Naše data tento předpoklad potvrzují: Metodou western blot jsme prokázali výrazně sníženou expresi obou izoform GAD, enzymu katalyzujícího syntézu GABA, a to v *colliculus inferior* i ve sluchové kůře. Naproti tomu úbytek ve zrakové kůře byl menší. K podobnému výsledku jsme dospěli při vyhodnocování morfologických a kvantitativních změn GAD-ir neuronů. O úbytku GABA inhibice svědčí i výsledky ze studie zaměřené na změny v hladinách CB při stárnutí. Jak již bylo uvedeno, CB-ir neurony nemusí být vždy nutně GABAergní, ale z větší části mezi ně patří, a tak změny v CB můžeme dávat do souvislosti se změnou v GABA. Opět jsme metodou western blot prokázali, že dochází k výraznému úbytku CB v CI, SK, ale i ZK a pomocí imunohistochemie jsme zjistili pokles v počtu CB-ir neuronů a jejich optické denzity ve sledovaných strukturách, které navíc zahrnovaly i CGM. Změny týkající se CR měly obdobný charakter, nebyly však tak výrazné. V souvislosti se sníženou funkcí inhibice tedy dochází i ke snižování hladiny CB a CR, což může vést k neurotoxickému působení zvýšené hladiny intracelulárního vápníku. Je zajímavé, že ve výše uvedených případech jsme nenalezli významnější rozdíl u starých zvířat mezi rychlestárnoucím kmenem Fischer 344 a fyziologicky stárnoucími potkany kmene Long Evans. Nenaplnil se tedy předpoklad, že F344 zvířata budou mít změny během stárnutí výraznější, jak ukázala předchozí studie hodnotící obsah parvalbuminu (Ouda et al., 2008). Nicméně naše výsledky jsou do jisté míry ve shodě s dalším zde prezentovaným experimentem, který hodnotil stárnutí obou kmenů behaviorálně – pomocí testu úlekové reakce a její inhibice pomocí prepulzu. Pokud vezmeme v úvahu věkovou skupinu, kterou jsme hodnotili v předchozích experimentech, tzn. zvířata cca 24–30 měsíců stará, tak ani v případě ASR a PPI nenalzáme výraznější rozdíly mezi kmeny. Pouze v amplitudě ASR na tónový stimul o frekvenci 4 kHz. Mezi oběma kmeny totiž pozorujeme největší rozdíly

ve středním věku (12–14 měsíců), kdy u kmene Fischer 344 dochází již k výrazným degenerativním změnám souvisejícím se zrychleným průběhem stárnutí (Syka, 2010), zatímco zvířata kmene LE v tomto věku nevykazují významnější známky stárnutí. Je však třeba zdůraznit, že u starých zvířat obou kmenů dochází k posunu prahových křivek ABR, který je u kmene F344 výraznější. Neboli stará zvířata F344 oproti LE hůře slyší. Opačný případ jsme zaregistrovali v experimentu, kde jsme sledovali vliv rané expozice hlukovému stimulu na behaviorální výkonost v testu ASR a PPI. Při shodných křivkách ABR u exponované i neexponované skupiny se objevilo v behaviorálních testech několik významných rozdílů. Amplitudy ASR byly u exponovaných zvířat menší při vysokých hlasitostech bílého šumu a tónových stimulů o frekvenci ≥ 4 kHz a účinnost PPI byla u exponovaných zvířat signifikantně vyšší při nízkých intenzitách prepulzu (20–30 dB SPL) oproti kontrolním zvířatům. Stejně jako v předchozích experimentech i zde předpokládáme, že za pozorovanými rozdíly stojí změny v centrální části sluchového systému, v tomto případě především narušená funkce *colliculus inferior* (Bures et al., 2010; Grécová et al., 2009).

Výsledky ukazují možné cíle při prevenci, zmírnění či zvrácení změn souvisejících s centrální komponentou presbyakuze. Hlavní úlohu zjevně hraje snížená hladina GABA. Z jakých příčin však dochází k poklesu jejího obsahu a zda lze tento pokles zpomalit či zablokovat, zůstává stále nedořešeno. Dalším potenciálním terapeutickým cílem se ukázal být kalbindin jako vápník vážící protein, kterého během stárnutí výrazně ubývá. Naše výsledky vzešlé z porovnání dvou kmenů potkanů rovněž ukázaly, že lze pozorovat centrální změny ve sluchovém systému, aniž by bylo zaznamenáno poškození periferní komponenty, což je důležité zjištění vzhledem k poznávání mechanismů lidské presbyakuze.

6. ZÁVĚRY

I. GAD65 a GAD67

- hladina obou proteinů se s věkem výrazně snižuje ve všech studovaných strukturách: CI, SK, ZK
- dochází k signifikantnímu úbytku GAD67-ir neuronů v CCI a jejich optické denzity v CCI a SK
- dochází k signifikantnímu úbytku GAD65-ir neuronů v SK a jejich optické denzity v CCI, ECI, SK, ZK
- v CI je hladina obou izoforem zhruba třikrát vyšší než v SK, bez ohledu na stáří
- u rychlestárnoucího kmene Fischer 344 jsou výsledky podobné jako u výše uvedených výsledků kmene Long Evans.

II. Kalbindin a kalretinin

- hladina CB se se stárnutím snižuje v SK, CI, ZK
- počet CB-ir neuronů se snižuje především v DCI, CGMV a Te1
- průměrný objem somat CB-ir neuronů klesá v DCI a CGMV
- hladina CR se v průběhu stárnutí významně mění pouze v CI
- počet CR-ir neuronů klesá v DCI, objem jejich somat v ECI a DCI
- obecně nejsou výraznější rozdíly mezi kmenem Long Evans a Fischer 344.

III. Vliv stárnutí na ASR a PPI

- podle měření ABR dochází během stárnutí u potkanů kmene Fischer 344 k dřívějšímu posunu prahů než u kmene Long Evans
- potkani F344 mají menší ASR amplitudy než potkani LE téměř ve všech případech zvukové stimulace
- ASR amplitudy u potkanů F344 ve srovnání s kmenem LE klesají během stárnutí rychleji

- prepulzní inhibice se manifestuje u F344 potkanů méně než u LE
- relativní pokles PPI při stárnutí je u obou kmenů podobný a signifikantního snížení PPI se dosahuje pouze u starých zvířat
- mezi prahy slyšení hodnocené metodou ABR a amplitudou ASR nebyla potvrzena závislost.

IV. Vliv raného ohlušení na ASR a PPI

- audiogramy potkanů s ranou expozicí hluku a potkanů bez expozice se od sebe v dospělosti významně neliší
- amplitudy ASR jsou u exponovaných zvířat menší u vysokých hlasitostí bílého šumu a tónových stimulů o frekvenci ≥ 4 kHz
- účinnost PPI je u exponovaných zvířat signifikantně vyšší při nízkých intenzitách prepulzu (20–30 dB SPL) oproti kontrolním zvířatům.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bures Z, Grécová J, Popelár J, Syka J (2010). Noise exposure during early development impairs the processing of sound intensity in adult rats. *Eur J Neurosci* **32**: 155-164.
- Caspary DM, Raza A, Lawhorn Armour BA, Pippin J, Arnerić SP (1990). Immunocytochemical and neurochemical evidence for age-related loss of GABA in the inferior colliculus: implications for neural presbycusis. *J Neurosci* **10**: 2363-2372.
- Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF (2008). Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol* **211**: 1781-1791.
- Gates GA, Mills JH (2005). Presbycusis. *Lancet* **366**: 1111-1120.
- Gray DT, Engle JR, Recanzone GH (2014). Age-related neurochemical changes in the rhesus macaque cochlear nucleus. *J Comp Neurol* **522**: 1527-1541.
- Grécová J, Bures Z, Popelár J, Suta D, Syka J (2009). Brief exposure of juvenile rats to noise impairs the development of the response properties of inferior colliculus neurons. *Eur J Neurosci* **29**: 1921-1930.
- Helfert RH, Sommer TJ, Meeks J, Hofstetter P, Hughes LF (1999). Age-related synaptic changes in the central nucleus of the inferior colliculus of Fischer-344 rats. *J Comp Neurol* **406**: 285-298.
- Ling LL, Hughes LF, Caspary DM (2005). Age-related loss of the GABA synthetic enzyme glutamic acid decarboxylase in rat primary auditory cortex. *Neuroscience* **132**: 1103-1113.
- Ogita ZI, Markert CL (1979). A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **99**: 233-241.
- Ouda L, Druga R, Syka J (2008). Changes in parvalbumin immunoreactivity with aging in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* **43**: 782-789.
- Paxinos G, Watson C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th edn. San Diego; London: Academic.
- Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994). Morphology and spatial distribution of GABAergic neurons in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol* **344**: 349-382.
- Rybalko N, Syka J (2001). Susceptibility to noise exposure during postnatal development in rats. *Hear Res* **155**: 32-40.
- Syka J (2010). The Fischer 344 rat as a model of presbycusis. *Hear Res* **264**: 70-78.
- Syka J, Voldřich L, Vrabc F (1981). *Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu*, 1 edn. Praha: Avicenum.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Turner JG, Hughes LF, Caspary DM (2005a). Effects of aging on receptive fields in rat primary auditory cortex layer V neurons. *J Neurophysiol* **94**: 2738-2747.
- Zilles K (1985). *The cortex of the rat: a stereotaxic atlas*, Berlin; New York: Springer-Verlag.

8. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Publikace v impaktovaných časopisech, které jsou podkladem dizertační práce:

1. **Burianova J**, Ouda L, Profant O, Syka J: Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol*, 2009; 44(3): 161–9.
(IF 3,91)
2. Ouda L, **Burianova J**, Syka J: Age-related changes in calbindin and calretinin immunoreactivity in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol*, 2012; 47(7): 497–506.
(IF 3,91)
3. Rybalko N, Bures Z, **Burianova J**, Popelar J, Poon PWF, Syka J: Age-related changes in the acoustic startle reflex in Fischer 344 and Long Evans rats. *Exp. Gerontol*, 2012; 47(12): 966-973.
(IF 3,91)
4. Rybalko N, Bures Z, **Burianova J**, Popelar J, Grecova J, Syka J: Noise exposure during early development influences the acoustic startle reflex in adult rats. *Physiol Behav*, 2011; 102(5): 453–8.
(IF 3,16)

Ostatní publikace:

1. Profant O, **Burianova J**, Syka J: The response properties of neurons in different fields of the auditory cortex in the rat. *Hear Res*, 2013; 296:51-9.
(IF 2,54)
2. Suta D, Popelar J, **Burianova J**, Syka J.: Cortical representation of species-specific vocalizations in guinea pig. *PLoS One*, 2013; 8(6):e65432.
(IF 3,73)
3. Popelar J, Rybalko N, **Burianova J**, Schwaller B and Syka J: The effect of parvalbumin deficiency on the acoustic startle response and prepulse inhibition in mice. *Neuroscience Letters*, 2013;553: 216–220.
(IF 2,03)
4. Klevstig MJ, Markova I, **Burianova J**, Kazdova L, Pravenec M, Novakova O, Novak F.: Role of FAT/CD36 in novel PKC isoform activation in heart of spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*, 2011; 357(1-2): 163–9.
(IF 2,33)