

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Neurovědy



MUDr. Profant Oliver

**Organizace sluchové kůry mozku a změny
ve sluchovém systému u presbyakuze.**

Organization of the auditory cortex and changes in the
auditory system in presbycusis.

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. Josef Syka, DrSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Jan Betka, DrSc.

Praha, 2014

Poděkování

Na tomto místě bych především rád poděkoval svému školiteli, prof. MUDr. Josefu Sykovi, DrSc., za jeho trpělivé a laskavé vedení během celého postgraduálního studia. Rovněž děkuji prof. MUDr. Janu Betkovi, DrSc. za vedení v průběhu mé klinické praxe. Můj dík patří také všem spoluautorům publikací, kteří mi pomohli při provedení experimentální části této práce a též kolegům z Oddělení neurofyziologie sluchu a ostatním spolupracovníkům za cenné rady, podporu a vytvoření příjemného a tvůrčího prostředí v pracovním kolektivu.

Prohlášení

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

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

V Praze, 19. 5. 2014

Oliver Profant

Identifikační záznam

PROFANT, Oliver. *Organizace sluchové kůry mozku a změny v sluchovém systému u presbyakuze. [Organization of the auditory cortex and changes in the auditory system in presbycusis]*. Praha, 2014. 123 s., 4 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav experimentální medicíny AV ČR. Vedoucí práce, Syka, Josef.

Abstrakt

Cílem předkládané dizertační práce bylo objasnění vybraných parametrů struktury a funkce neuronů z různých oblastí sluchové kůry u laboratorního potkana a dále identifikace změn inhibičního systému (GAD 65 a 67) v centrální části sluchového systému ve stáří. Na základě výsledků ze zvířecích experimentů jsem se následně zaměřil na změny v oblasti lidské sluchové kůry a sluchové dráhy spojené se stárnutím, které byly sledovány pomocí různých zobrazovacích metod MR (spektroskopie, morfometrie, difuzní tenzorové zobrazování a funkční MR).

Zjistili jsme, že nejvýznamnějším parametrem neuronů sluchové kůry potkana je přítomnost hyperpolarizací aktivovaných kationtových proudů, která významně ovlivňuje funkční vlastnosti neuronů. Jednotlivá sluchová pole a vrstvy sluchové kůry (AC) se odlišují díky funkčním vlastnostem svých neuronů, přičemž v celkové organizaci sluchové kůry a jejích jednotlivých oblastí hraje klíčovou roli tonotopie.

Stárnutí sluchového systému u lidí negativně postihuje schopnost rozumění řeči, která je založena na zpracování časových parametrů zvuků. U zvířat jsme zjistili pokles hladin enzymů GAD65 a 67 (katalyzují syntézu inhibičního neurotransmiteru GABA) v centrálních částech sluchového systému. Právě inhibice je důležitá pro přesné kódování časových charakteristik zvuku. Na základě výsledků audiologických vyšetření sluchu jsme rozdělili stárnoucí populaci na 2 skupiny (EP- těžká forma presbyakuze, MP- lehká forma presbyakuze). MR spektroskopie v obou skupinách starších jedinců prokázala ve sluchové kůře signifikantní pokles hladiny excitačního mediátoru glutamátu a také N-acetylaspratátu, avšak změny inhibičního mediátoru GABA se jednoznačně neprokázaly; ve skupině jedinců s EP jsme našli zvýšenou hladinu laktátu. Použitím morfometrických a DTI metod jsme potvrdili výrazný efekt věku na centrální struktury sluchové dráhy a to především ve smyslu atrofie, ale bez jednoznačného efektu závažnosti periferní složky sluchového postižení. Funkční vyšetření AC pomocí funkční MRI ukázalo podobné trendy, kdy v souvislosti s vysokým věkem bylo nalezeno zvýšení rozsahu aktivace sluchové kůry oproti mladým dobrovolníkům. Stárnutí bylo také spojeno s výraznějším

využitím pravé AC, která při porovnání rozsahu aktivity dominovala nad levou AC. Funkční vyšetření AC však opět nepotvrdilo významný vliv zhoršené funkce sluchové periferie na funkci centrální části sluchového systému (aktivace sluchové kůry při stimulaci čistými tóny byly stejné u skupin EP a MP).

Klíčová slova: sluchová kůra, tonotopie , presbyakuze, GABA, MRI

Abstract

The aim of my study was to identify specific features of the structure and function of neurons in the auditory cortex of rat and to analyze age-related changes in the inhibitory system (GAD 65 and 67) in the central auditory structures of the same species. Based on the findings in the animal model we focused on changes in the central part of the auditory pathway and auditory cortex in aging human population that were examined by various MRI techniques (spectroscopy, morphometry, diffusion tensor imaging and functional MRI).

We found that the most significant feature of neurons in the auditory cortex is the presence of the hyperpolarization-activated cation current that influences functional properties of neurons. The differences among neurons in different fields of the AC were based on their specific functional characteristics, with the tonotopy being the key factor of the AC structural organization.

Aging of the auditory system has a negative influence on the speech understanding in which the processing of temporal parameters of the sound plays a significant role. In animal experiments we observed decreases of the enzymes GAD65 and 67 (that catalyze synthesis of the main inhibitory neurotransmitter GABA) in central parts of the auditory system. Inhibition is the key factor in coding and decoding of temporal parameters of sound. On the basis of audiological examination our group of elderly subjects was divided into two groups (EP- expressed presbycusis, MP- mild presbycusis). In elderly, the spectroscopy showed decreases in the level of glutamate and N-acetylaspartate, with no clear changes in the inhibitory transmitter GABA, however, there was present an increase in the level of lactate in the EP group. Morphometry and DTI findings supported the effect of aging on central structures of the auditory system without any significant effect of the level of hearing loss. Functional examination of the AC with fMRI showed similar trends in aging demonstrated by increased activation of the AC in comparison with young volunteers. Aging also led to an increased use of the right AC, which was more active compared to the left AC. However, the results of the fMRI again did not show any central effect of the hypofunction of the auditory periphery.

Key words: auditory cortex, tonotopy, presbycusis, GABA, MRI

Obsah

1. Seznam zkratek	1
2. Úvod	2
2.1 Aferentní sluchová dráha	2
2.2 Sluchová kůra (AC)	6
2.3 Audiometrická vyšetření u člověka	8
2.3.1 Tónová audiometrie	8
2.3.2 Slovní audiometrie	9
2.3.3 Otoakustické emise	10
2.3.3.1 TEOAE (Transient Evoked Otoacoustic Emissions).....	11
2.3.3.2 DPOAE (Distortion Product Otoacoustic Emissions).....	11
2.3.3.3 Princip kontralaterální suprese.....	12
2.3.4 Sluchové evokované potenciály- kmenová audiometrie (BERA)	12
2.3.5 Další možnosti vyšetření sluchových potenciálů.....	14
2.3.6 Zobrazovací metody sluchové kůry	14
2.3.6.1 Funkční magnetická rezonance (fMRI)	14
2.3.6.2 MR spektroskopie (MRs).....	15
2.3.6.3 MR morfometrie (MRm)	16
2.3.6.4 Difuzní tenzorové zobrazení (diffusion tensor imaging - DTI).....	17
2.3.6.5 Magnetoencefalografie (MEG), EEG, EcoG.....	18
2.3.6.6 Pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT).....	19
2.4 Audiometrická vyšetření u zvířat	19
2.4.1 Snímání jednotkové (single) a mnohočetné (multiunit) aktivity a potenciálů blízkého pole (local field potentials-LFP)	19
2.4.2 Metoda terčíkového zámku (patch clamp) a nitrobuňkové snímání.....	20
2.4.3 Optofyziologické metody (Kalcium a intrinsic imaging)	21
2.5 Presbyakuze	22
2.5.1 Periferní změny u presbyakuze	23
2.5.2 Centrální presbyakuze.....	26
2.5.3 Presbyakuze a inhibice.....	27
2.5.4 Možnosti léčby/rehabilitace presbyakuze	29
3. Cíle práce	30
3.1 Pracovní hypotézy	31
4. Materiál a metody	32
4.1 Experimenty na zvířatech	32
4.1.1 Vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana	32
4.1.1.1 Určení hloubky elektrody a snímacích kanálů v AC	33
4.1.1.2 Analýza vlastností neuronů.....	33
4.1.1.3 Tvorba frekvenčních map	35
4.1.2 Nepublikované výsledky (snímání rozdílů mezi neurony v AI a okrajové oblasti extracelulárně a terčíkovým zámek).....	35
4.1.2.1 Terčíkový zámek.....	35
4.1.2.2 Extracelulární snímání průběhu akčních potenciálů (APT)	36
4.1.3 Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana	36
4.2 MRI experimenty	38
4.2.1 Audiologické vyšetření.....	39

4.2.2	Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka u presbyakuze zobrazené pomocí MR spektroskopie.....	39
4.2.3	Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a sluchové dráhy u člověka ve stáří.....	41
4.2.4	Změna aktivace sluchové kůry člověka ve stáří.....	43
5.	Výsledky.....	45
5.1	Vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana.....	45
5.1.1	Frekvenční organizace sluchové kůry potkana.....	45
5.1.2	Změna CF dle měřícího místa a hloubky.....	47
5.1.3	Typy neuronových odpovědí.....	47
5.1.4	Latence.....	49
5.1.5	Velikost odpovědi.....	50
5.2	Nepublikované výsledky.....	51
5.3	Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana.....	57
5.4	Audiologické změny ve stáří.....	60
5.5	Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka u presbyakuze zobrazené pomocí MR spektroskopie.....	63
5.6	Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a dráhy u člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze.....	65
5.7	Změna aktivace sluchové kůry člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze.....	70
6.	Diskuze.....	74
6.1	Organizace sluchové kůry u potkana a rozdíly ve vlastnostech neuronů v různých polích AC.....	74
6.2	Elektrické vlastnosti neuronů.....	77
6.3	Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana.....	79
6.4	Audiologické změny ve stáří.....	80
6.5	Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka v souvislosti s presbyakuzí zobrazené pomocí MR spektroskopie.....	82
6.6	Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a dráhy u člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze.....	84
6.7	Změna aktivace sluchové kůry člověka ve stáří při různých stupních presbyakuze.....	87
7.	Závěr.....	90
8.	Souhrn práce.....	94
8.1	Vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana.....	94
8.2	Nepublikované výsledky (Elektrické vlastnosti neuronů sluchové kůry potkana).....	95
8.3	Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana.....	96
8.4	Změna aktivace sluchové kůry člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze.....	96
8.5	Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka u presbyakuze zobrazené pomocí MR spektroskopie.....	97
8.6	Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a dráhy u člověka ve stáří při různých stupních presbyakuze.....	97
9.	Summary.....	99
9.1	The response properties of neurons in different fields of the auditory cortex in the rat.....	99

9.2	Unpublished data (Electrical properties of neurons in the auditor cortex of the rat)	100
9.3	Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat.....	101
9.4	Functional changes in the auditory cortex in aging	101
9.5	Metabolic changes in the auditory cortex in presbycusis demonstrated by MR spectroscopy.....	102
9.6	Diffusion tensor imaging and MR mophometry of the central auditory pathway and auditory cortex in aging	103
10.	Literatura	104
11.	Seznam vlastních publikací.....	122
11.1	Publikace použité v dizertační práci:.....	122
11.2	Impaktované publikace nepoužité v dizertační práci:	122
11.3	Neimpaktované publikace:	123
11.4	Kapitoly v knihách:	123
Přílohy - kopie vlastních publikací		

1. Seznam zkratek

AAF- anteriorní sluchové pole (anterior auditory field),

AC- sluchová kůra (cortex auditoria),

AHP- posthyperpolarizační fáze akčního potenciálu (after-hyperpolarization phase),

AI- primární sluchová kůra,

AN- sluchový nerv (auditory nerv),

AP- sluchová dráha (auditory pathway),

APT- akční potenciál,

ASSR- ustálené sluchové potenciály (auditory steady state responses),

AvgL2L3- radiální difuzivita,

BBN- širokospektrální šum (broad band noise),

BERA- kmenová audiometrie (brainstem evoked response audiometry),

BOLD- blood oxygen level dependent,

CF- charakteristická frekvence,

CGM- corpus geniculatum mediale,

CN- kochleární jádro (cochlear nucleus),

CSF- mozkomíšní mok (cerebro-spinal fluid),

DPOAE- distorzní produkt OAE,

DTI- difuzní tenzorové zobrazení,

EcoG- elektrokortikografie,

ECS- extracelulární tekutina (extracellular solution),

EEG- elektroencefalografie,

EP- těžká forma presbyakuze (expressed presbycusis),

FA- frakční anizotropie,

fMRI- funkční magnetická rezonance,

FRA- frekvenčně intenzitní oblast (frequency response area),

FS- rychle pálící neurony (fast spiking),

GABA- kyselina γ -aminomáselná,

GAD- glutamátdekarboxyláza,

GFS- gyrus frontalis superior,

GM- šedá hmota (gray matter),

GR- Gardner-Robertsonova škála,

HG- Heschlův gyrus,

IC- colliculus inferior,

ICS- intracelulární roztok (intracellular solution),

I_h- hyperpolarizací aktivované kationtové proudy,

IHC- vnitřní vláskové buňky (inner hair cells),

LAEP- odpovědi s dlouhou latencí (late auditory evoked potentials),

L1- axiální difuzivita,

LFP- potenciály blízkého pole (local field potentials),

LI- lateralizační index,

LL- lemniscus lateralis,
MD- průměrná difuzivita (mean diffusivity),
MEG- magnetoencefalografie,
MLR- odpovědi se střední latencí (middle latency responses),
MP- lehká forma presbyakuze (mild presbycusis),
MRm- magneticko rezonanční morfometrie,
MRS- magneticko rezonanční spektroskopie,
OAE- otoakustické emise,
OHC- vnější vláskové buňky (outer hair cells),
PAF- posteriorní sluchové pole (posterior auditory field),
PET- pozitronová emisní tomografie,
PSTH- peri/poststimulační histogram,
PT- planum temporale,
PTA- průměr sluchového prahu (pure tone average),
ROI- oblast zájmu (region of interest),
RS- pravidelně pálící neurony (regularly spiking),
SDS- procento diskriminovaných slov na 60 dB (speech discrimination score),
SDT- práh slyšení řeči (speech discrimination threshold),

SNHL- senzorineurální postižení sluchu (sensorineural hearing loss),
SNP- jedno-nukleotidový polymorfismus,
SOC- komplex olivy superior (superior olivary complex),
SOAE- spontánní OAE,
SPIN- diskriminační test v šumu (speech perception in noise),
SPECT- jednofotonová emisní výpočetní tomografie,
SPL- úroveň tlaku zvuku (sound pressure level),
SRAF- suprarhinnální sluchové pole (suprarhinal auditory field),
SRT- práh rozumění řeči (speech reception threshold),
TEOAE- transienční OAE,
UR- nejasná oblast (unclear region),
V1- primární zraková kůra,
VBM- na voxel vázaná morfometrie (voxel-based morphometry),
VOI- objem zájmu (volume of interest),
WM- bílá hmota (white matter),
WM_HG- bílá hmota pod Heschlovým gyrem,
WRT- skóre rozumění řeči (word recognition score),
YC- kontrolní skupina (young controls)

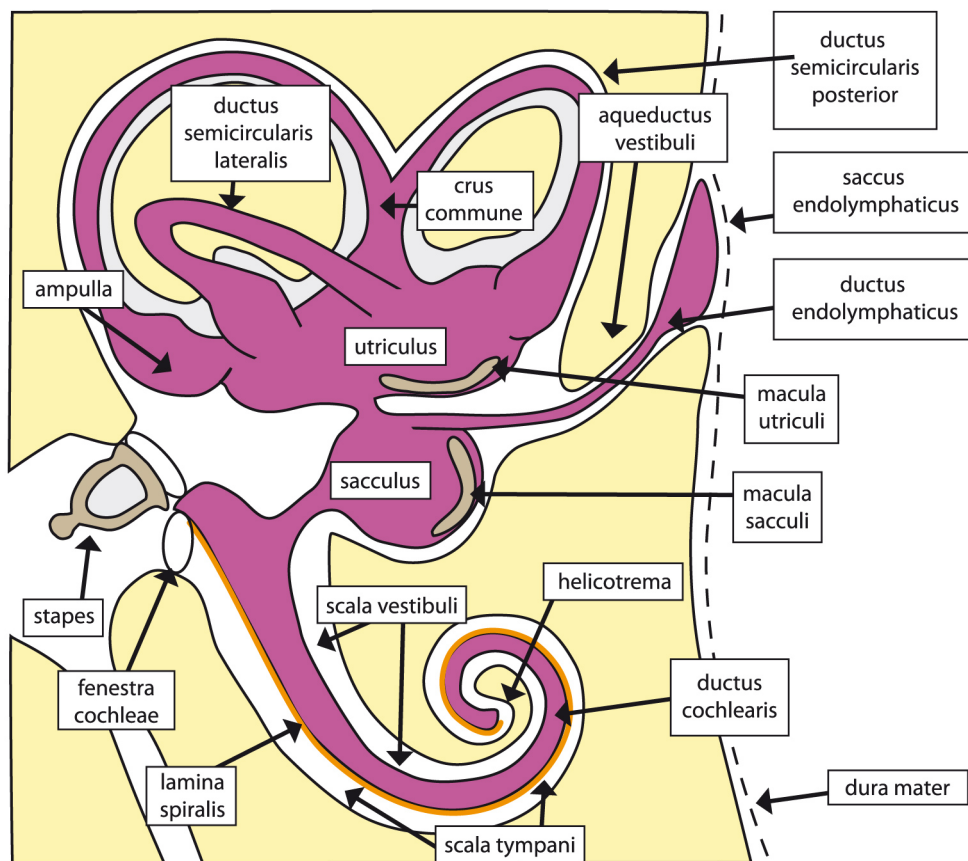
2. Úvod

2.1 Aferentní sluchová dráha

Sluch poskytuje spolu se zrakem nejdůležitější sensorický vjem. Dokonce mnozí autoři považují sluch vůbec za nejdůležitější smysl pro správný vývoj kognitivních funkcí člověka.

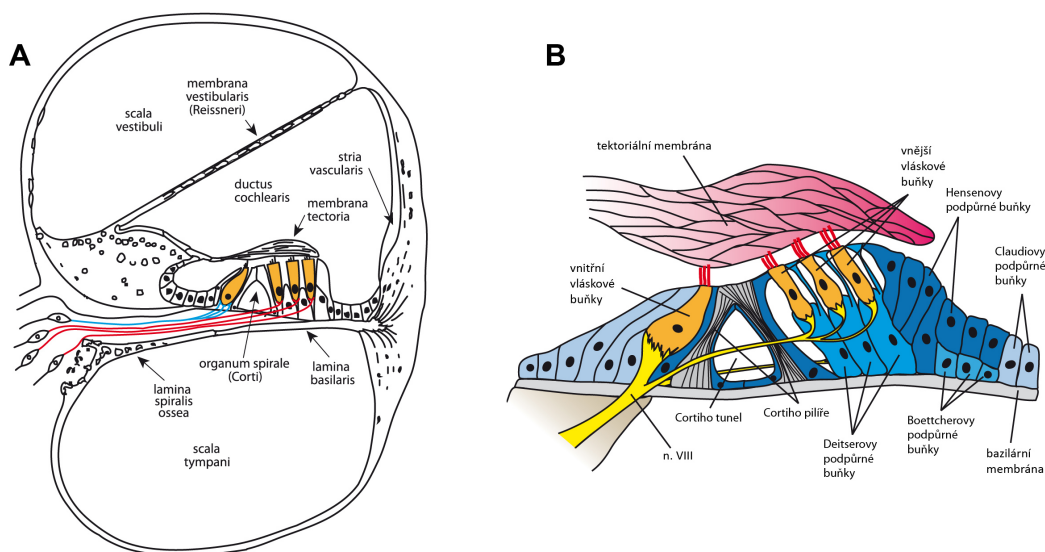
Zvuk, je mechanická energie šířící se ve formě vlnění, které rozkmitává molekuly prostředí. V případě, že je tato energie zpracována sluchovým orgánem, vznikne sluchový vjem. Organizace sluchového systému je u savců velice podobná, před vstupem do vnitřního ucha prochází zvuk zevním a středním uchem), kde dochází ke znásobení akustické energie (dominantně převodem mezi relativně velkou blankou bubínku a menší ploténkou oválného okénka). V převodu energie na struktury vnitřního ucha je důležitá celistvost řetězce středoušních kůstek. V případě snížení funkce středoušního aparátu, se děje přenos energie na receptory vnitřního ucha rezonancí lbi.

U člověka je vnitřní ucho tvořeno orgánem sluchu- kochleou a vestibulárním orgánem odpovědným ze vnímání rovnováhy. Oba jsou složeny z kostěného a membranózního labyrintu (Obr. 1). Zásadní rozdíl je v tekutinách, které oba labyrinty vyplňují. Perilymfa (vyplňuje kostěný labyrint) je produkována transudací z krve a komunikuje s mozkomíšním mokem, který svým složením připomíná. Endolymfa (vyplňuje membranózní labyrint) svým složením připomíná nitrobuněčnou tekutinu. Rozdíl v iontovém složení obou tekutin představuje jednu ze základních funkčních charakteristik vnitřního ucha (Melichar & Syka, 1982).



Obr. 1. Struktury vnitřního ucha. Růžová- membranózní labyrint, žlutá- temporální kost (Profant & Durisin, 2012).

Samotná kochlea je rozdělená na tři části: scala vestibuli (perilymfa), scala media (endolympfa) a scala tympani (perilymfa) (Obr. 2 A). Scala vestibuli a scala tympani spolu komunikují otvorem v hrotu kochley zvaným helikotrema. Helikotrema spolu s oválným a okrouhlým okénkem jsou důležité pro vyrovnání tlaku, který vzniká přenosem energie ze středouší na perilymfu. Energie předána perilymfě způsobí vznik „putující vlny“, která následně rozkmitá bazilární membránu (odděluje scala media od scala tympani). Pokud je frekvence zvuku vyšší, na vyrovnání tlaku přeneseného na perilymfu stačí pouze tento pohyb a k největším rozkmitu dochází v oblasti baze kochley. Při nižších frekvencích vyrovnání tlaků způsobí vyklenutí blanky okrouhlého okénka a k největší amplitudě rozkmitu bazilární membrány dochází v oblasti apexu kochley. Tato frekvenční selektivita, která se nazývá tonotopie, představuje základní kódovací parametr sluchového systému (Bekesy, 1970).



Obr. 2. Průřez kochleou (A) a Cortiho orgánem ve scala media (B) (Profant & Durisin, 2012).

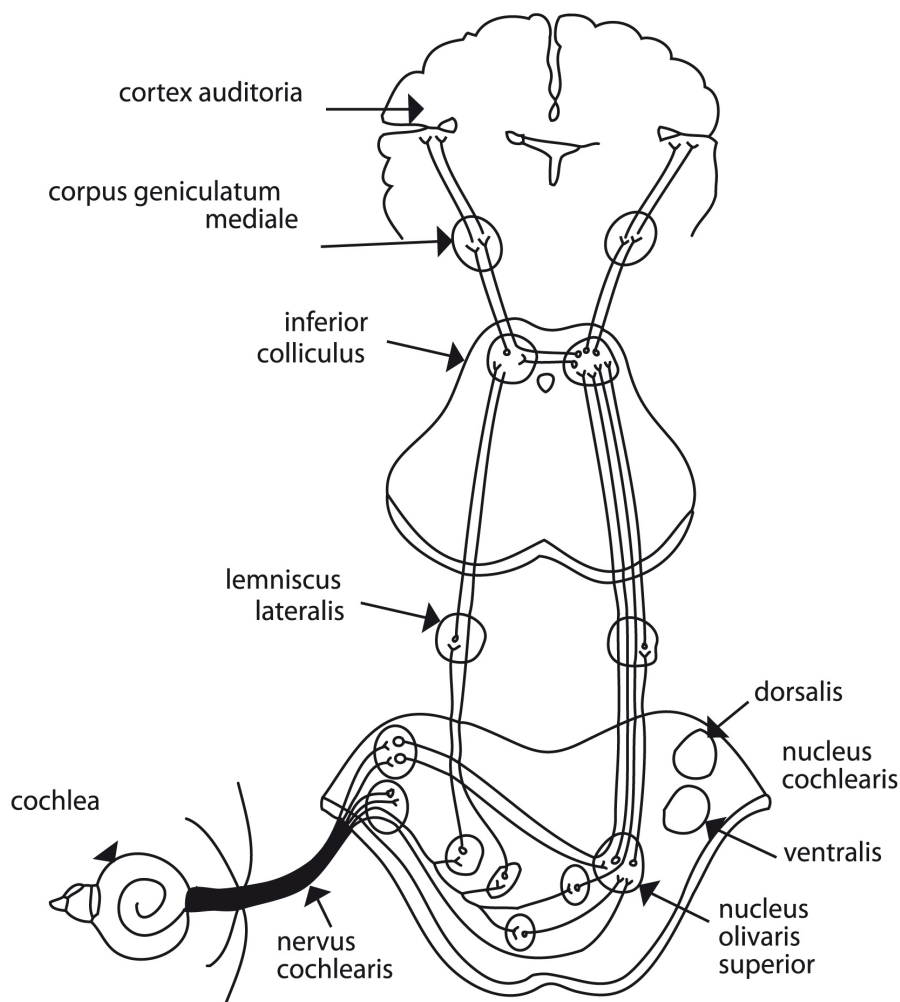
Ve scala media na bazilární membráně je uložen Cortiho orgán (Obr. 2 B). Cortiho orgán je tvořen několika druhy buněk, z kterých nejdůležitější pro zpracování sluchového signálu jsou vláskové buňky. Ty se dělí na vnější (outer hair cells -OHC), kterých je u člověka asi 12000 a vnitřní (inner hair cells - IHC), kterých je přibližně 3500. Vnější vláskové buňky mají svoje vlásky (cílie) ukotvené v tektoriální membráně, která tvoří strop Cortiho orgánu (Syka, 1981c). Jejich úkolem je lokální zesílení pohybu Cortiho orgánu, které dosahují díky vlastní stažlivosti (Dallos & Evans, 1995). Díky aktivitě OHC jsou pak neurony ganglion spirale (1. neuron sluchové dráhy/sluchové nerv) mnohem citlivější na nízké intenzity zvuku, než když by byly závislé jenom na pohybu bazilární membrány. Samotný sluchový vjem vzniká aktivací IHC, na které je napojených asi 95 % vláken sluchového nervu. Samotná aktivace IHC (opět pohyb cílí) způsobí otevření iontových kanálů a vznik receptorového potenciálu s následným vyplavením neurotransmiterů do synaptické štěrbině s vznikem akčního potenciálu na vláknech sluchového nervu (McAnally et al., 1993).

Funkcí sluchové dráhy (Obr. 3) je zpracování a přenos informace o zvuku zakódované ve formě frekvence akčních potenciálů (APT) do sluchové kůry k jejímu konečnému zpracování (Syka, 1981b). Na úrovni vnitřního ucha je zvuk

kódován jak pomocí frekvence APT, tak i aktivací specifických neuronů na základě frekvence zvuku. Při vstupu sluchového nervu do kochleárních jader (2. neuron) vzniká další způsob kódování spoluúčastí inhibičních neuronů (Oertel & Young, 2004). Je důležité si uvědomit, že se stále jedná o ipsilaterální sluchové impulzy. Na úrovni 3. neuronu v jádrech komplexu olivy superior (SOC) dochází již ke zkřížení ipsi a kontralaterální sluchové dráhy. Zde dochází ke kódování zejména časových a intenzitních rozdílů mezi sluchovými vjemy pomocí tzv. „koincidenčních“ neuronů (impulzy z kontralaterální sluchové dráhy mohou být na základě časového posunu přeměněné v trapezoidním tělísku na inhibiční) (Kuwada & Batra, 1999). V oblasti SOC dochází také poprvé k interakci mezi sluchovými vjemy a jinými sensorickými modalitami. Dalším krokem je přenos vzruchů laterálním lemniskem do colliculus inferior (IC). Zde dochází k další binaurální interakci a definitivnímu zpracování informací z obou uší s cílem vytvoření topografické mapy „sluchového“ prostoru. IC se nachází ve středním mozku, jeho lokalizace v blízkosti průběhu zrakové dráhy (colliculus superior) a přímé vstupy ze somatosenzorických jader trigeminálního nervu a prodloužené míchy z něj vytváří místo křížení sluchové a nesluchové stimulace (Druga & Syka, 1984). Toto funkční propojení je umožněno specifickou strukturou IC, kde centrální jádro se zachovanou tonotopií je kryto kůrou (rozdělenou na laterální, rostrální a dorzální), která zpracovává multimodulární informace (Aitkin et al., 1994). IC je nejvyšší úroveň sluchové dráhy, kde dochází k přímé komunikaci mezi kontralaterálními sluchovými drahami (Kuwada et al., 1984).

Thalamickým jádrem sluchové dráhy je corpus geniculatum mediale (CGM). Aferentní sluchové vstupy pochází primárně z IC cestou brachium colliculi, existuje ale i přímé napojení na nižší části sluchové dráhy (LL, SOC, CN) (Kvasnak et al., 2000). CGM lze opět rozdělit na 3 části (ventrální, dorzální a mediální), které mají specifické funkce. V CGM dochází k interakci sluchových, zrakových a somatosenzorických vstupů a všechny informace vedoucí do sluchové kůry prochází přes CGM (Kvasnak et al., 1998). Ventrální (tonotopicky organizována) část vysílá spoje do vstupních vrstev (3. a 4.) primární části (AI) sluchové kůry (AC). Dorzální část do sekundárních sluchových oblastí (u primátů

se označuje jako belt) a mediální část, kde dochází k hlavní interakci mezi různými senzoryckými vstupy (vestibulární, somatické a nociceptivní), vysílá spoje kromě AC, též do oblasti striata a amygdaly (Ledoux et al., 1985).



Obr. 3. Aferentní sluchová dráha (Profant & Durisin, 2012).

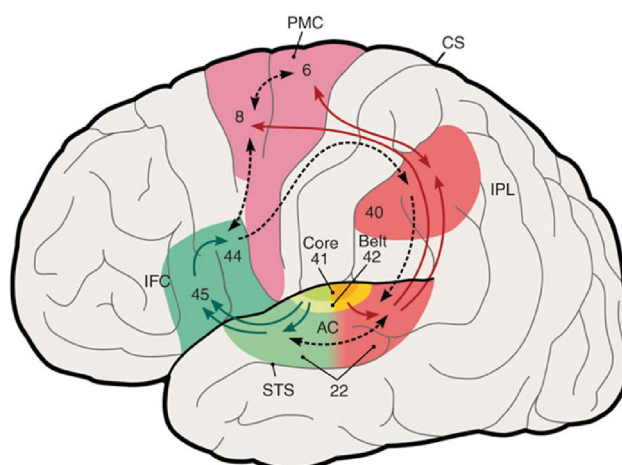
2.2 Sluchová kůra (AC)

Podobně jako u sluchové dráhy, je výhodou při zkoumání AC podobnost v její organizaci mezi savci všeobecně (Schreiner & Winer, 2007). Z tohoto důvodu lze část výsledků výzkumu prováděných na zvířecích modelech (hlodavci, kočky, opice nebo primáti) aplikovat, respektive očekávat i u člověka (Hackett et al., 2001).

Sluchová kůra je součástí neokortexu, má tedy 6 vrstev a je lokalizována v temporálním laloku (Zilles & Wree, 1985). Lze ji rozdělit na 3 základní oblasti: primární sluchovou kůru (AI), jejíž dominantním znakem je tonotopická organizace (Fujioka et al., 2003), sekundární sluchovou kůru (u vyšších savců označovanou jako belt) kde je tonotopie zachována jenom částečně a terciální oblast (parabelt), kterou se označují i tzv. sluchově asociované oblasti (Langers et al., 2007) (Obr. 4). Nomenklatura se bohužel mezi autory i druhy zvířat liší, ale v zásadě toto jednoduché rozdělení zůstává zachováno.

V návaznosti na využití zvukových stimulů v komunikaci u jednotlivých živočišných druhů se zvyšuje složitost organizace. U potkana lze na základě elektrofyziologických vlastností neuronů identifikovat 6 polí v AC (Profant et al., 2013). U morčete, které v komunikaci využívá několik typů vokalizací pro různé situace je sluchových polí v AC 7 (Suta et al., 2013; Syka et al., 1994). U kočky je popsáno 9, u primátů 12 a u člověka se předpokládá přibližně 30 podoblastí (Kaas, 2010; Kaas & Hackett, 2000; Schreiner & Winer, 2007). Takové rozdělení je vytvořeno na základě funkčních vlastností skupin neuronů, existuje možnost rozdělit sluchovou kůru i na základě histologických respektive cytoarchitektonických rozdílů. Při využití prosté histologie pak byly identifikovány u potkana 3 jasně odlišná pole (Zilles et al., 1980), které ale nekorelují jednoznačně s elektrofyziologickými vlastnostmi (jsou označovány jako Te1, Te2, Te3).

Obr. 4. Anteroventrální (zelená) a posterodorzální (červená) informační toky ve sluchové kůře člověka vycházející z beltu. TS- gyrus temporalis superior, IFC- inferiorní frontální kůra, PMC- premotorická kůra, IPL- lobus parietalis inferior, CS- sulcus centralis. Čísla označují oblasti dle Brodmanovy cytoarchitektonické mapy mozkové kůry (Rauschecker & Scott, 2009).



Pro funkční rozdělení sluchové kůry mluví i napojení na podkorovou část sluchové dráhy, CGM (Jones, 2003). Zde lze jednoznačně popsat tonotopickou dráhu inervující AI, hrubě tonotopickou dráhu inervující sekundární oblasti a smíšenou dráhu (kde kromě sluchových stimulů procházejí i informace zrakové, somatosenzorické a nociceptivní), která vede do všech oblastí a tedy i do sluchově asociovaných (Romanski et al., 1999b). Uvedené rozdělení podporuje i myšlenku organizace sluchové kůry v smyslu jak sériového tak i paralelního zapojení (Arnott et al., 2004; Belin & Zatorre, 2000). Dvojitě zpracování má oporu i v elektrofyziologických vlastnostech jednotlivých neuronů. Vzhledem k tomu, že AI je hlavní vstupní brána, reagují i její neurony s relativně nejkratším zpožděním (latencí) a další oblasti kam následně vedou vzruchy mají reakce neuronů vůči AI opožděné o několik ms. Nejdelší latence tedy mají neurony v terciárních oblastech (Winer & Lee, 2007). Pro paralelní aktivaci mluví identifikace neuronů s překvapivě krátkými latencemi v sekundárních a terciárních oblastech, které se aktivují pravděpodobně specifickou stimulací, vyžadující paralelní zpracování informací. Zde lze poukázat zejména na aktivaci více druhů sensorických stimulů, která ovlivňuje i další vlastnost neuronové odpovědi, například její amplitudu (Buchsbaum et al., 2005).

2.3 Audiometrická vyšetření u člověka

2.3.1 Tónová audiometrie

Jedná se o subjektivní vyšetření, při kterém se jako stimuly využívají čisté tóny. Ve většině případů je tónový rozsah 250–8 000 Hz. Vzhledem k rozsahu frekvencí, při kterých je stimulované lidské ucho, se někdy užívá vysokofrekvenční audiometrie se stimulací v rozsahu 250–20 000 Hz.

Samotná tónová audiometrie napomáhá při určení:

1. vážnosti poškození sluchu
2. diagnostice typu (převodní, percepční, smíšená) a charakteru sluchové vady (postiženy jsou nízké/vysoké frekvence)

3. intenzity stimulů při dalších audiologických vyšetřeních

Samotným cílem je identifikace sluchového prahu pacienta. Jedná se o nejnižší hladinu akustického tlaku signálu, která je schopna vyvolat sluchový vjem při určitém množství pokusů. V praxi to znamená, nejnižší intenzitu stimulu, při které vyšetřovaný zareaguje alespoň na 50 % stimulů. Práh se určuje jak pro vzdušné tak i pro kostní vedení (frekvenční rozsah stimulů 250–4 000 Hz v oktávových intervalech) (Doležal & Kabátová, 2012).

2.3.2 Slovní audiometrie

Rozdíl mezi slovní a tónovou audiometrií je v rozsahu anatomického resp. funkčního korelátu, který jednotlivé metody vyšetřují. Tónová audiometrie posuzuje funkčnost sluchové dráhy jako celku, přičemž ale lze jen velice těžce odlišit periferní a suprakochleární lézi. Naopak u slovní audiometrie se k vyšetření sluchové dráhy přidává ještě posouzení funkce centrálního systému v převodu jednotlivých zvuků na sluchový vjem, který je navíc založen i na sémantickém zpracování zvukových stimulů (Kabátová, 2012).

Cílem slovní audiometrie je tedy posoudit jak vyšetřovaný slyší a rozumí řeči. K tomuto vyšetření se využívá několik testů, jejichž cílem je kvantifikovat schopnost rozumění řeči. Jako stimul je využíván soubor slov (nejčastěji 10), pro běžnou klinickou praxi nejčastěji víceslabičná slova. Pro podrobnější vyšetření se může jednat o věty, jednoslabičné slova, slabiky nebo nesmyslné slabiky tzv. logotómy. Výsledkem vyšetření je určení:

1. SDT (speech discrimination threshold- práh slyšení)- intenzita, kdy pacient již slyší, ale nerozumí.
2. SRT (speech reception threshold- práh rozumění)- pacient rozumí 50 % slov ze souboru na dané intenzitě.
3. WRT (word recognition score- skóre rozumění řeči)- procento správně rozpoznávaných slov při MCL (intenzita 30–40 dB nad prahem SRT).

4. SPIN (speech perception in noise- diskriminační test v šumu)- vyšetření srozumitelnosti na pozadí šumu.

Kombinace průměru sluchového prahu na frekvencích 500 Hz, 1, 2 a 4 kHz (pure tone average- PTA) a skóre rozumění řeči (SDS- procento diskriminovaných slov na 60 dB.) je určující pro hodnocení sluchu na tzv. užitečný a neužitečný např. dle Gardner-Robertsonovy (GR) škály (Gardner & Robertson, 1988). Tato škála má 5 stupňů:

1. stupeň I: PTA (dB): 0–30; SDS (%) : 70–100
2. stupeň II: PTA (dB): 31–50; SDS (%) : 50–69
3. stupeň III: PTA (dB): 51–90; SDS (%) : 5–49
4. stupeň III: PTA (dB): 91–max; SDS (%) : 1–4
5. stupeň III: PTA (dB): bez reakce

Pokud PTA a SDS spolu nekorelují dle škály, nález se hodnotí dle horšího ukazatele.

2.3.3 Otoakustické emise

V roce 1978 se na základě objevu otoakustických emisí změnil pohled na činnost kochley. Kemp (Kemp, 1986) prokázal, že mechanickými vibracemi vnějších vláskových buněk (OHC) v Cortiho orgánu kochley vznikají zvuky, které se dají objektivně zaznamenat citlivým mikrofonom umístěným v zevním zvukovodu (Kemp, 2002). Nazývají se otoakustické emise (OAE). Předpokládá se, že kochlea kromě toho, že přijímá akustickou energii, také aktivně zesiluje určité druhy zvukové energie pomocí aktivního pohybu zevních vláskových buněk, což má za následek vznik oscilací. Tato vibrační energie směřuje retrográdně z kochley, přes řetěz sluchových kůstek na blanku bubínku, která posléze pracuje jako membrána reproduktoru. OAE se tedy dají zaznamenat v zevním zvukovodu jenom tehdy, když je práh sluchu normální, respektive mírně zvýšený. Nedají se zaznamenat, když sluchová ztráta přesáhne 30–35 dB (Lonsbury-Martin & Martin, 2003).

Nejčastěji se měří spontánní (SOAE), transientní (TEOAE) a distorzní (DPOAE). Vzhledem k věku pacientů a míře postižení sluchu v naší skupině

vyšetřovaných pacientů jsme nevyužili měření SOAE a proto se jimi nebudu dále zabývat.

2.3.3.1 TEOAE (Transient Evoked Otoacoustic Emissions)

Krátkodobé (přechodné) otoakustické emise vznikají jako odpověď vnitřního ucha na stimulaci krátkým zvukem. Jsou přítomné téměř u všech lidí se zdravým sluchem. Jsou to odpovědi vznikající po stimulaci na hranici slyšitelnosti. Pokud se zvýší hlasitost stimulu, stoupá i hlasitost odpovědi. Tato se však zvyšuje mnohem pomaleji (přibližně na úrovni 20–30 dB při úrovni stimulu kolem 60 dB) (Hall et al., 1994). Za posun hlasitosti je zodpovědná ztráta energie na úrovni kochleárního zesilovače. Na základě měření se zjistilo, že není možné jednoznačně posuzovat úroveň sluchu z hodnoty TEOAE. Možnost zachycení odpovědi na zvukový podnět může být ovlivněna více okolnostmi, jako je hluk v průběhu nahrávání a stav samotného ucha (přesněji stav vláskových buněk).

Nejčastěji se používá stimulace na úrovni kolem 80 dB SPL (sound pressure level), nebo 45 dB nad úrovní prahu sluchu. Jestli po stimulaci není možné zachytit žádnou odpověď, znamená to, že pacient má pravděpodobně poruchu sluchu.

Za výbavné emise považujeme, pokud přesahuje reprodukovatelnost odpovědi 50 %, stabilita stimulu minimálně 80 % a poměr signál/šum je ≥ 3 dB.

2.3.3.2 DPOAE (Distortion Product Otoacoustic Emissions)

DPOAE jsou produkty zkreslení, které vznikají po stimulaci dvěma různými čistými tóny ve specifické části kochley (Prieve et al., 1997). Většinou se používají 2 tóny se vzájemným poměrem frekvencí stimulace 1,22, přičemž nižší tón (f_1) je intenzity 60–70 dB a vyšší tón (f_2) 50–60 dB. Při stimulaci kochley dochází k aktivaci nelineárního zesilovače, který je tvořen OHC. Nejčastěji se samotná emise měří na výsledné frekvenci $2f_2 - f_1$. DPOAE jsou 100% vybavitelné u všech zdravých lidí, ale pochopitelně jsou ovlivněny stavem sluchu. Dalším

faktorem, který ovlivňuje amplitudu emisí, je pohlaví, přičemž u žen je amplituda vyšší. Při měření DPOAE je důležité si uvědomit, že při nižší intenzitě akustického stimulu (kolem 60 dB) je výstupná emise produktem aktivního pohybu zevních vláskových buněk, ale při intenzitách nad 70 dB se již jedná o pasivní produkt. I když zvyšováním intenzity stimulu dochází k zvyšování amplitudy emise, jev není lineární.

Za přítomnost DPOAE se pokládá, pokud má emise amplitudu alespoň o 3 dB vyšší než šum. Emise jsou nevýbavné při nepřítomnosti funkčních OHC.

2.3.3.3 Princip kontralaterální suprese

Kontralaterální suprese je jev, který vzniká při měření emisí a zároveň sluchové stimulaci v kontralaterálním uchu (Popelar et al., 1999). Tento jev je přítomen díky činnosti eferentní sluchové dráhy, která retrográdně ovlivňuje funkci sluchového systému v nestimulovaném uchu. Projevuje se snížením Ca^{++} dependentní motility OHC, což vyústí k snížení amplitudy evokované emise (Brownell et al., 1985). Amplituda suprese je závislá od intenzity kontralaterální sluchové stimulace, přičemž zvýšení intenzity vyvolá snížení evokované emise. Je důležité zdůraznit, že zvyšování intenzity stimulu evokujícího emise má opačný účinek, to znamená, že sníží velikost suprese (De Ceulaer et al., 2001). Efekt suprese je frekvenčně selektivní, přičemž výraznější účinek má na nízké a střední frekvence (VeUILlet et al., 1991) a zdá se, že ovlivňuje víc pravé než levé ucho (Khalifa & Collet, 1996).

2.3.4 Sluchové evokované potenciály- kmenová audiometrie (BERA)

Zvukem vyvolané kmenové potenciály jsou objektivní audiometrická metoda, která je založená na snímání změn elektrických potenciálů vyvolaných zvukovým stimulem v různých úrovních sluchové dráhy pomocí povrchových elektrod.

Po zvukové stimulaci dochází ke zpracování zvuku v různých úrovních sluchové dráhy a podle vzdálenosti vyšetřované anatomické struktury od

vnitřního ucha se mění latence odpovědi. Při BERA vyšetření se zaznamenávají odpovědi na zvukové podněty v průběhu sluchové dráhy od kochley po mozkový kmen. Jejich latence je méně než 10 ms a amplituda přibližně 1 mV. Znamená to, že změny potenciálů jsou vyvolány aktivitou ve vnitřním uchu, sluchovém nervu a jádrech mozkového kmene po úroveň colliculus inferior (IC) (Profant et al., 2012). Vyšetření BERA nehodnotí aktivitu v corpus geniculatum mediale (CGM) a sluchové kůře (AC).

BERA křivka je charakteristická přítomností 5–7 pozitivních vln (mohou ale být i negativní při výměně referenční a aktivní elektrody). Pro zvukovou stimulaci se nejčastěji používá klik, lze ale použít i stimulaci tóny. Hodnotí se latence a amplituda. Jak velikost amplitudy, tak i délka latence je ovlivněna intenzitou stimulu (Syka, 1981a). Při postupném snižování intenzity stimulu, se ztrácí jednotlivé vlny a na úrovni prahu je většinou přítomna jen vlna V. Takto se podaří určit práh sluchu na frekvencích 1000–4000 Hz s největší citlivostí kolem 3 kHz. Při hodnocení BERA záznamu je důležité vědět, která anatomická struktura je odpovědná za vznik jednotlivých vln.

Komplex vln I a II vzniká v oblasti sluchového nervu a latence I vlny je totožná se záznamem N1 při elektrokochleografii (ECochG). To znamená, že vlna I (latence <2 ms) vzniká v distální části sluchového nervu (AN) a vlna II (latence <3 ms) v jeho proximální části.

Vlna III (latence <4 ms) je vyvolána aktivitou v ipsilaterálním kochleárním jádře (CN) a částečně pozdními odpověďmi neuronů AN a kontralaterálního CN.

Vlna IV (latence <5 ms) je pravděpodobně vyvolaná aktivitou v oblasti superiorního olivárního komplexu (SOC), ale ve většině případů splývá s vlnou V.

Vlna V (latence <6 ms) - místem vzniku vlny V je hlavně IC, přičemž při záznamu je viditelný rychlý pozitivní nárůst, za který je odpovědný lemniscus lateralis (LL).

Vlny VI a VII jsou viditelné relativně zřídka a jsou vyvolány pravděpodobně dohasínající aktivitou v IC.

Přestože se jedná o objektivní vyšetření, hodnocení BERA záznamu je subjektivní a snadno může vzniknout omyl zejména při označování jednotlivých vln. Hodnotí se přítomnost vln I–V, jejich amplitudy a latence.

2.3.5 Další možnosti vyšetření sluchových potenciálů

Ustálené sluchové potenciály (ASSR)- jsou odpovědí snímanou ze sluchové dráhy, jsou tvořené několika vlnami se stejnou amplitudou a mezi vrcholovou latencí 25 ms (standardně se využívá aktivace kontinuálním frekvenčně (25 %) a amplitudově (80–90 Hz, 100 %) modulovaným tónem (nosná frekvence 500 Hz, 1, 2 a 4 kHz).

Odpovědi se střední latencí (MLR)- jsou zvukem vyvolané změny potenciálů (3 pozitivní vlny P0, Pa, Pb a 2 negativní vlny Na a Nb) s latencí 10–50 ms z centrální části sluchové dráhy a sluchové kůry, ke kterým se připojují i struktury mimo sluchovou dráhu (tractus thalamocorticalis, formatio reticularis).

Odpovědi s dlouhou latencí (LAEP)- jsou změny potenciálů (10–15 μ V), snímané ze sluchové kůry (EEG), oblasti temporálního laloku (CERA) tvořené negativní a pozitivní vlnou N1P2 s latencí 100–160 ms respektive 160 – 270 ms; dále vznikají vlny N 200, P 300, N 400 a P 600, které jsou označovány jako ERP (event related potentials- na událost vázány potenciály) a nejsou již generovány jenom sluchovou kůrou, ale i asociovanými sluchovými oblastmi.

2.3.6 Zobrazovací metody sluchové kůry

2.3.6.1 Funkční magnetická rezonance (fMRI)

Funkční magnetická rezonance (fMRI) je neinvazivní zobrazovací metoda umožňující nepřímé sledování aktivity mozkové kůry. Pomocí magnetického pole (nejčastěji o síle 1,5 nebo 3 Tesla) dochází k uspořádání spinů protonů ^1H ve směru magnetického pole a k jejich rotaci v magnetickém poli, k tzv. precesi. Přidáním dalšího magnetického pole (např. přidáním kolmo působícího

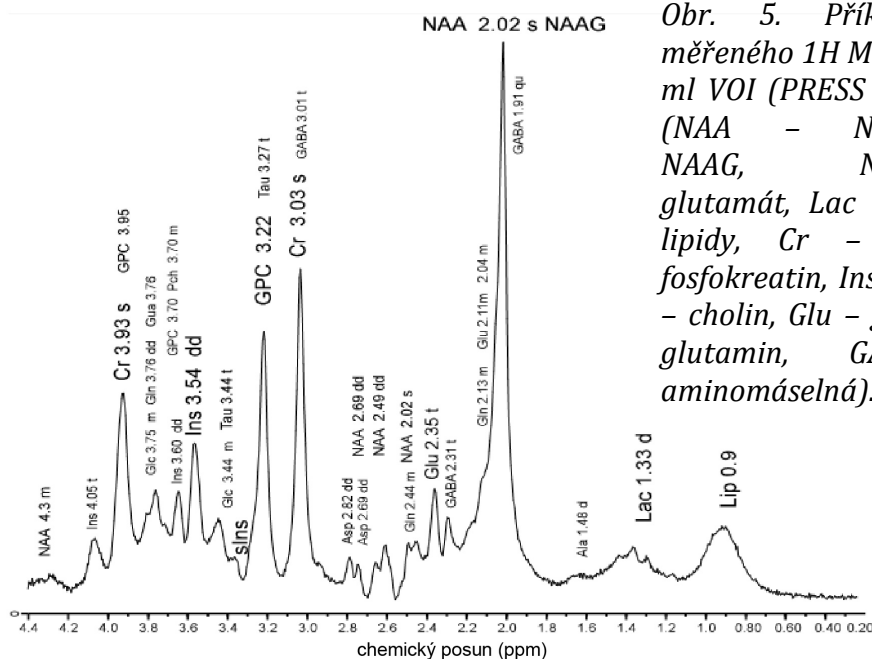
radiofrekvenčního pulzu -RF) rotují tyto spiny také kolem osy druhého pole a vzhledem k hlavnímu poli se sfázují. Při vypnutí radiofrekvenčního pulzu dochází k návratu spinů do rovnovážného energetického stavu- relaxaci. Energie, která se při relaxaci po vypnutí RF pulzu uvolňuje v podobě elektromagnetického záření do prostředí je snímána cívkou a intenzita takového záření z každého konečného bodu 3D objektu (voxelu) je následně převedena do obrazu ve stupních šedi. Pokles velikosti příčné magnetizace v čase je dán dvěma hlavními nezávislými mechanismy – návratem spinů do rovnovážné energetické polohy (popsáno časovou konstantou T1) a postupným rozfázováním spinů (časová konstanta T2).

FMRI využívá kombinaci klasického MRI vyšetření k vytvoření zobrazení struktur mozku (T2 sekvence) a nepřímého měření aktivity mozku pomocí metody BOLD (blood oxygen level dependent). BOLD využívá různé chování oxy (diamagnetický) a deoxyhemoglobinu (paramagnetický) v magnetickém poli, na základě rozdílu jejich náboje. Výsledkem je obraz prokrvení jednotlivých oblastí při jejich aktivaci. Při zvukové stimulaci a snímání z oblasti temporálního laloku nám BOLD fMRI poskytuje obraz o funkci sluchové kůry. Nevýhodou vyšetření sluchu pomocí fMRI je poměrně výrazný zvuk vznikající při vypínání a zapínání cívek, proto se pro vyšetření aktivity sluchové kůry využívají ultrarychlé sekvence (např. Echo-planární sekvence). Dalším problémem je doručení sluchového stimulu do ucha, jednak proto, že v MR přístroji se můžou používat jenom nemagnetické materiály a také pro možnou interferenci frekvencí signálů. Z toho důvodu se používají MR kompatibilní sluchátka, která signál doručí do zevního zvukovodu a zároveň jsou schopny odfiltrout i nežádoucí zvuky MR.

2.3.6.2 MR spektroskopie (MRs)

MRs vychází z klasické spektroskopie, která hodnotí interakci mezi látkou a dodanou energií. V případě MRs je využita energie dodána magnetickým polem (podobně jako u klasické MR), resp. jeho interakce s protony (nejčastěji H, méně často N a P) k měření „koncentrace“ specifických chemických látek (v jednotkách ppm- parts per million, které jsou vztahována k referenčnímu signálu) (Obr. 5).

Díky lehce odlišným rezonančním frekvencím protonů v různých metabolitech (ovlivněno elektrony v daném metabolitu) jsme tedy schopni jednotlivé metabolity odlišit a vznikne specifická křivka spekter. Následně je nutno odfiltrovat signál pro tuk a vodu vzhledem k výraznému množství protonů v obou látkách. Optimální pro MRs v sluchové kůře je již dopředu vygenerovaná oblast zájmu (region of interest- ROI). V případě sluchové kůry je potřebné oddělení bílé hmoty, šedé hmoty a mozkomíšního moku (cerebrospinal fluid – CSF). Následně je potřebné vytvořit krychli (volume of interest, VOI), ve které se pak koncentrace metabolitů měří. Alternativou k tomuto typu měření (single voxel) je tzv. měření chemické posunu (CSI- chemical shift imaging), které umožňuje měření větších oblastí a následné rozdělení.



Obr. 5. Příklad *in vivo* měřeného ^1H MR spektra z 19,7 ml VOI (PRESS TE=30 ms, 3T). (NAA – N-acetylaspartát, NAAG, N-acetylaspartát glutamát, Lac – laktát, Lip – lipidy, Cr – kreatin a fosfokreatin, Ins – inozitol, GPC – cholin, Glu – glutamát, Gln – glutamin, GABA – γ -aminomáselná).

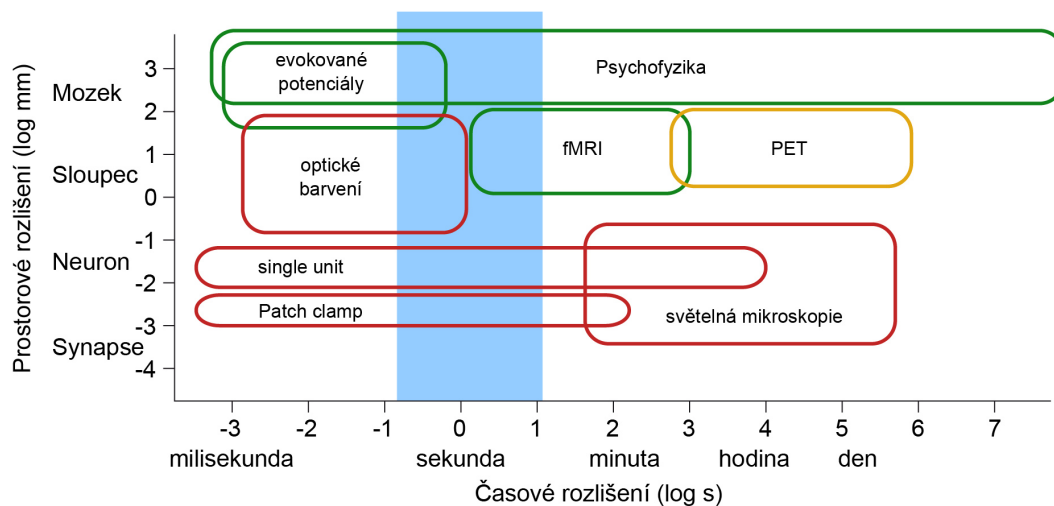
2.3.6.3 MR morfometrie (MRm)

MRm je metoda využívající detailní anatomické zobrazení struktur k hodnocení jejich objektivních parametrů. V rámci mozkové kůry se nejčastěji hodnotí objem, plocha a tloušťka. V zásadě se jedná o standardní zobrazení pomocí MR (většinou snímáné v T1 vážení) s následnou relativně

komplikovanou úpravou a 3D rekonstrukcí. Podobně jako při MRs i zde je nutné oddělit jednotlivé části mozku (mozkomíšni mok, bílá a šedá hmota). Pro přímou analýzu faktorů MRm je možné zvolit měření většího objemu kůry pomocí metody Voxel based morphometry (VBM) a následně hledat rozdíly mezi jednotlivými funkčními oblastmi. Druhou možností je pak cílené měření z dopředu specifikované oblasti (např. sluchová kůra), která se nazývá oblast zájmu (ROI). Výhodou ROI je větší senzitivita, nevýhodou je nutnost manuální segmentace dané oblasti. K minimalizaci subjektivní parcelace a potřebné 3D rekonstrukci měřené oblasti lze pak využít speciální pravděpodobnostní atlasy a analytické programy.

2.3.6.4 Difuzní tenzorové zobrazení (diffusion tensor imaging - DTI)

Podobně jak je k analýze šedé hmoty využívána MRm, se k hodnocení objektivních parametrů bílé hmoty využívá DTI. DTI je metoda založená opět na principech MR, která hodnotí volnost pohybu protonů ve tkáni, k čemuž využívá efektu anizotropie difuze vody. Pohyb vody v nervové tkáni je omezen její strukturou, a tedy ho lze vyjádřit pomocí na sebe kolmých 3 vektorů, respektive jejich tenzoru. Pokud by pohyb omezen nebyl, byly by všechny vektory stejné (izotropní), vzhledem k tomu, že je bílá hmota tvořena nervovými vlákny, je pohyb omezen (anizotropní) a v případě uspořádání vláken v stejném směru (např. sluchová dráha) dochází k nárůstu vektoru, který je směrově nejbližší orientaci dráhy. Difuzibilitu lze vyjádřit pro každý voxel jako tenzor a pomocí matematických algoritmů lze pak předpovědět orientaci v okolních voxlech a následně zkonstruovat nejpravděpodobnější průběh nervové dráhy. Izotropní vlastnosti tkáně, resp. opět ROI lze tedy matematicky vyjádřit pomocí několika hodnot: frakční anizotropie (FA, normalizovaná hodnota, která reprezentuje stupeň anizotropie difuze), průměrná difuzivita (MD, průměrná difuzivita tkáně nezávisle na směru difuze), axiální a radiální difuzivita (velikost vektorů v daném směru v 3D prostoru).



Obr. 6. Časové a prostorové rozlišení některých popisovaných metod používaných ve vyšetření centrálního zpracování zvukové informace.

2.3.6.5 Magnetoencefalografie (MEG), EEG, EcoG

Elektroencefalografie (EEG) a elektrokortikografie (EcoG, někdy nazývaná i intrakraniální EEG) jsou elektrofyziologické metody snímající aktivitu z kůry na základě změn elektrického napětí. EEG využívá elektrody přiložené na kůži hlavy, EcoG snímá přímo z mozkového povrchu. MEG sleduje změny v magnetickém poli vytvořeném prouděním iontů mezi intra a extracelulárním prostorem (zdrojem snímané aktivity jsou pyramidové buňky, respektive změny v dendritických proudech – Ramon et al., 2004) pomocí série magnetometrů (SQUID- superconducting quantum interference devices). U MEG je důležitá orientace pyramidových buněk, které by měly být za optimálních podmínek kolmé na povrch mozku a tedy i snímací elektrodu (měřitelná aktivita je z přibližně 50000 neuronů), jedná se proto primárně o neurony v mozkových rýhách (jsou uloženy tangenciálně). Při EEG snímání orientace neuronů nehraje roli a snímaná aktivita vychází jak z gyrů tak z rýh.

2.3.6.6 Pozitronová emisní tomografie (PET), jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT).

Obě metody využívají měření gama záření pomocí gama kamery v 2D prostoru a následně rekonstrukci 3D zobrazení vyšetřované oblasti. PET používá k měření metabolické aktivity radioaktivně značené látky aplikované do krevního oběhu (např. fluorodeoxyglukóza). Cílem, podobně jako u fMRI, je měřit nepřímou aktivitu mozku pomocí proudění krve a metabolické aktivity (akumulace glukózy).

SPECT používá standardně aplikaci radionuklidu, přičemž ale radionuklid lze navázat na ligand dle oblasti zájmu a měřit tedy konkrétní aktivitu.

2.4 Audiometrická vyšetření u zvířat

Vyšetření sluchu u zvířat se v zásadě shoduje s objektivnímu vyšetřovacími metodami sluchu u člověka. Sluchový práh se standardně určuje pomocí kmenové audiometrie, případně vyšetření MLR přičemž základní rozdíl je ve významném zkrácení latencí vzhledem k velikosti sluchové dráhy. Pokud vyšetření probíhá v narkóze, je jeho kvalita vzhledem k minimalizaci artefaktů dokonce vyšší než u člověka. Vyšetření OAE a elektrokocheografie se provádí u zvířat stejně jako u lidí s cílem objasnění funkce vnitřního ucha, respektive vnějších vláskových buněk.

2.4.1 Snímání jednotkové (single) a mnohočetné (multiunit) aktivity a potenciálů blízkého pole (local field potentials-LFP)

Single i multiunit snímání aktivity neuronů využívá princip zavedení elektrody do tkáně (v našem případě mozkové kůry) a měření změn napětí. Rozdíl mezi oběma metodami je v odporu elektrody. V zásadě platí pravidlo, že čím vyšší odpor má elektroda, tím z menšího pole snímá, proto se pro single unit snímání používají elektrody (v našem případě sklenění mikropipety, běžně se používají i platinové elektrody) s vysokým odporem (řádově megaohmy) a na multiunit (většinou se jedná o aktivitu několika neuronů) s relativně nižším

odporem (méně než 1 megaohm). Při popisovaném extracelulárním snímání se jedná o nepřímé měření akčního potenciálu, resp. změn napětí v okolí buňky (soma, axon) způsobených změnou koncentrace iontů v extracelulárním a intracelulárním prostředí. Mikropipeta je většinou naplněna roztokem KCl, je napojena na zesilovač a následně na analogově-digitální převodník.

Výsledkem snímání je záznam akčních potenciálů (vzhledem k extracelulárnímu snímání je jejich polarita obrácena, respektive jejich tvar závisí i od místa snímání v závislosti na části neuronu), které lze poté analyzovat off-line a na základě časového průběhu APT rozdělit na jednotlivé neurony. K zjednodušení záznamu se používá zobrazení peri/poststimulačních histogramů (PSTH), které zobrazují jenom APT jako jednotku v čase a vytváří sumaci vyvolaných APT při opakování stimulace. K vyhodnocení se následně používá srovnání mezi vyvolanou odpovědí a spontánní aktivitou (nutností je nastavení prahu a tím odfiltrování náhodných výbojů).

K měření potenciálů blízkého pole (LFP) se opět používají elektrody zavedené do kůry (s výrazně nižším odporem než při single nebo multiunit snímání), přičemž se ale snímá aktivita z relativně většího objemu tkáně (přibližně do 3 mm). Na rozdíl od single a multiunit snímání, signál LFP není tvořen jenom APT (ty jsou snímány z neuronů ve vzdálenosti asi 50–350 μm), ale přispívají k němu i pomalejší změny napětí v extracelulárním prostoru (zejména excitační a inhibiční postsynaptické potenciály do vzdálenosti 0,5–3 mm od hrotu elektrody). Jedná se o poměrně nízkofrekvenční aktivitu (<300 Hz), přičemž její využití spočívá v hodnocení celkové aktivity části kůry při zpracování signálu, respektive dynamiky a funkce neuronových okruhů.

2.4.2 Metoda terčíkového zámku (patch clamp) a nitrobuněčné snímání

Nitrobuněčné snímání je typ snímání jednotkové aktivity, kdy elektroda (nejčastěji skleněná mikropipeta s průměrem <1 μm , odpor se pohybuje v desítkách až stovkách $\text{M}\Omega$) penetruje buněčnou stěnu a snímá změny napětí způsobené výměnou iontů mezi intra a extracelulárním prostorem přímo z buňky. Mikropipeta je naplněna roztokem připomínajícím nitrobuněčnou

tekutinu, přičemž do ní vede chloridem potažený stříbrný drátek, který je napojen na zesilovač a následně je signál zpracován. Hrot pipety, resp. roztok může být vyplněn barvičkou k lepší identifikaci pozice buňky při následné histologické kontrole.

Nejčastěji používanou metodou snímání aktivity přímo z buňky je metoda terčíkového zámku (patch clamp). Metoda vyžaduje vytvoření těsného propojení membrány buňky a skleněné mikropipety (gigaohm seal) pomocí podtlaku. Vysoký odpor spojení mezi membránou a mikropipetou a podobné iontové složení intracelulární tekutiny a roztoku elektrody umožňuje měření proudů procházejících membránou. Zjednodušeně lze techniky terčíkového zámku rozdělit na ty, které neporušují membránu (cell attached recording), ty které membránu poruší a snímají z celé buňky (whole-cell, perforated patch) a ty, které snímají jenom z kousku membrány (inside-out nebo outside-out patch). Dále lze rozdělit techniky terčíkového zámku na základě měřené veličiny na current clamp a voltage clamp, kdy je udržován stabilní proud a měří se změny v napětí, resp. je udržováno standardní napětí a měří se změny proudu. V zásadě lze selektivně měřit 1 nebo více kanálů, využívat specifické blokátory nebo aktivátory iontových kanálů, barvičky, v některých případech přidavnými mikropipetami dodávat látky do okolí měřené buňky. Běžně se terčíkový zámeček používá v měření na in vitro preparátech (např. mozkové řezy), buněčných kulturách, méně často se provádí i in vivo.

2.4.3 Optofyziologické metody (Kalcium a intrinsic imaging)

Optofyziologické metody neměří přímo změny napětí jako u klasických elektrofyziologických metod, ale pomocí mikroskopu (nejčastěji je používání 2 fotonový) jsou schopny měřit pohyb resp. změny koncentrace Ca (Ca imaging). Ca i přesto, že se nepodílí přímo na depolarizaci membrány, lze jednoznačně spojit s proběhlým APT na základě zvýšení intracelulární koncentrace Ca. K zobrazení aktivity Ca je nutné mít fluorescenční barvu, která jednak reaguje na vstup Ca do buňky a následné uvolnění intracelulárních zásob Ca a také odlišení gliových buněk, které Ca po jeho „vypumpování“ z buňky zpracují. Fluorescenční

barva se dopraví buď přímo do buňky (patch clamp), do extracelulárního prostoru (následně se pomocí drobných el. pulzů dočasně naruší integrita membrány), jako neoptimálnější se jeví integrace na Ca citlivý protein do buněčné membrány (buď pomocí knock in manipulace nebo virovou transfekcí). Ca imaging má obrovské výhody zobrazení celých populací neuronů a jejich aktivace při různých typech stimulace, nevýhodou je relativně nízká schopnost časové diferenciaci, což je dané měřením změn koncentrací Ca a ne přímo napětí membrány a tedy AP.

Intrinsic imaging je metoda snímající aktivitu mozkové kůry bez nutnosti podání barvy nebo jiné značící látky. Zobrazuje změny odrazu světla od kůry způsobené aktivací lokálních neuronů. Hlavním zdrojem signálu jsou metabolické změny v mikrocirkulaci. Její výhodou je relativně jednoduché přístrojové vybavení a malá invazivita, nevýhodou je malé prostorové a časové rozlišení. Nejčastěji se proto používá k hrubé orientaci v oblasti sluchové kůry.

2.5 Presbyakuze

Zhoršení sluchu ve stáří neboli presbyakuze je fyziologický projev stárnutí sluchového systému. Začíná postihovat muže kolem 60 roku a ženy asi s 5 letým odstupem. Jedná se o senzorineurální postižení sluchu (sensorineural hearing loss- SNHL) začínající na vysokých frekvencích, které má multifaktoriální základ. U mužů je nástup rychlejší než u žen, ale přibližně kolem 80 roku života se sluchové ztráty vyrovnají (Gopinath et al., 2009). Všeobecně lze říct, že riziko SNHL je u lidí >60 let přibližně 30 % a nad >70 let stoupne na 75 % (Gates & Cooper, 1991). Výsledky dlouhodobých studií ukazují přibližně lineární zvyšování rizika SNHL s každým desetiletím již od 20 let (Lin & Bhattacharyya, 2011). Většina postižených spíše než klasické zhoršení sluchu („Já neslyším“) udává zhoršení vnímání řeči („Slyším ale nerozumím“) a to zejména v hlučnějším prostředí. Vzhledem k stárnutí populace se jedná o poměrně závažný faktor s negativním sociálním i ekonomickým dopadem. Sociální aspekt presbyakuze představuje zejména zhoršená komunikace, kdy se postižený postupně straní společnosti vzhledem k nutnosti opakovaně se ptát a relativně, častou záměnu

významů vět (Wu & Bentler, 2012). Tato sociální separace a ztráta interakce přispívá k dalšímu zhoršování kognitivních funkcí a rychlejším projevům stařecké demence (Uhlmann et al., 1989).

Presbyakuze byla dlouhodobě považována za postižení periferie sluchového systému, v posledních letech se ale stále více objevují práce ukazující na centrální složku presbyakuze (Gates et al., 1996).

2.5.1 Periferní změny u presbyakuze

Klasický koncept postupného zvyšování sluchového prahu na frekvencích >2 kHz s postupným zhoršováním výsledku řečové audiometrie je považován za základní projev presbyakuze. V roce 1993 Schuknecht a Gacek definovali 4 typy periferního postižení spojené se stárnutím na základě audiologických a histopatologických nálezů: senzorické, striální, neurální a kochleární. Toto rozdělení platí v zásadě dodnes. Senzorická porucha je charakteristická poškozením Cortiho orgánu, přesněji postupnou ztrátou funkce vláskových a podpůrných buněk v oblasti bazálního závitu. Neurální presbyakuze je charakterizována ztrátou vláken a buněk spirálního ganglia, což se projevuje spíše zhoršením výsledku řečové audiometrie, bez odpovídajícího nálezu změn prahu tónové audiometrie. Striální, někdy nazývaná i metabolická presbyakuze, je výsledkem snížení schopnosti stria vascularis udržovat specifické složení endolymfy a endolymfatický potenciál. Projevuje se pankochlerání elevací sluchových prahů. Mechanická nebo kochleární presbyakuze, i přes zhoršení sluchových prahů, histologicky neukazuje jednoznačné postižení Cortiho orgánu, stria vascularis nebo ganglion spirale. Předpokladem je zhoršená hybnost bazilární membrány a spirálního ligamenta.

Více typů presbyakuze jednoznačně poukazuje na multifaktoriální původ nemoci. Poměrně významný efekt na vznik presbyakuze mají rizikové faktory. Část rizikových faktorů není přímo spojena s postižením sluchu, ale nejčastěji s kardiovaskulárními nemocemi, které způsobují ischemické změny v oblasti vnitřního ucha. Jedná se zejména o hypertenzi, cukrovku, kouření, obezitu a aterosklerózu (Cruickshanks et al., 1998; Uchida et al., 2010). Dalším faktorem

ovlivňujícím průběh, respektive nástup presbyakuze, je hlučné prostředí, zejména expozice hluku v práci. Na rozdíl od předchozích faktorů, které ovlivňují celé vnitřní ucho a tedy všechny frekvence, pro hlukové postižení je typické spíše poškození vyšších frekvencí. Jedním z relativně překvapivých faktorů ovlivňujících presbyakuzi je rasa, resp. příslušnost k černošské populaci, která trpí presbyakuzí výrazně méně (Agrawal et al., 2008). Předpokladem je protektivní účinek melanocytů uložených ve stria vascularis, které pomáhají neutralizovat volné radikály a regulují homeostázu Ca (Lin et al., 2012). Existuje kauzální souvislost mezi deficitem striálních melanocytů, ztrátou podpůrných buněk a poklesem endokochleárního potenciálu (Ohlemiller et al., 2009). Jak již bylo zmíněno mužské pohlaví, respektive nižší množství estrogenu také negativně ovlivňuje vznik presbyakuze.

Poměrně významně ovlivňuje vznik presbyakuze genetická predispozice. Je několik známých genů, které jsou spojeny s postižením sluchu, respektive se syndromy při kterých dochází k sluchové poruše, jejich účinky se projevují obvykle při narození nebo v dětství (např. connexin 26 (Groh et al., 2013)). Vznik presbyakuze je však vázán na poměrně dlouhou fázi (desítky let) fyziologického sluchu, proto je kauzální určení genové patologie a poruchy sluchu složitější. V zásadě se jedná o genetické poruchy označené jako SNP (single nucleotid polymorphism), kdy se sekvence jednoho nukleotidu liší mezi lidmi a může se projevit produkcí patologického proteinu. Druhou možností jsou skupiny patologických haplotypů, tvořené větším množstvím SNP. Jedním z popisovaných haplotypů ovlivňujících průběh presbyakuze je glutamátový metabotropní receptor 7, který je zodpovědný za synaptický přenos a homeostázu synapsí mezi vnitřními vláskovými buňkami a neurony spirálního ganglia (Friedman et al., 2009). Mezi další identifikované mutace spojené s presbyakuzí patří mutace genu KCNQ4, který kóduje napětím ovládaný K kanál nacházející se ve vláskových buňkách a sluchových jádrech (Van Eyken et al., 2006); gen kódující apolipoprotein E lokalizovaný na 19. chromozomu je spojen s opožděným nástupem Alzheimerovy nemoci, je také spojován s aterosklerózou a ischemickým poškozením vnitřního ucha, a tedy s možným vznikem presbyakuze (Kurniawan et al., 2012). Na chromozomu 8q24 je poměrně velká

oblast, která má propojení s bazokochleárním typem SNHL a předpokládá se tedy i korelace s presbyakuzí (Huyghe et al., 2008). Endothelin-1 ovlivňuje vasomotoriku v oblasti arteria modiolaris spiralis a jeho G/T varianta (polymorfismus) je odpovědná za dlouhotrvající spasmy a následné ischemické poškození vnitřního ucha (Scherer et al., 2002), dokonce je potvrzena souvislost mezi G/T typem a zhoršením sluchu se stoupajícím věkem v japonské populaci (Uchida et al., 2009).

Výsadní postavení v genetických faktorech ovlivňujících presbyakuzi mají mutace mitochondriální DNA. U lidí s presbyakuzí byla zjištěna výrazně častější mutace páru bází 4977 označovaná i „common ageing deletion“ v kochleární tkáni (Bai et al., 1997). Další alterací spojenou s presbyakuzí je snížení podjednotky 3 c oxidázy (COX3) v oblasti spirálního ganglia, která bývá spojena s „common ageing deletion“ (Markaryan et al., 2010). Na zvířecích modelech se ukázalo, že dominantní postavení mutací mDNA je spojeno s nastartováním apoptózy, zhoršením funkce cytoskeletu a zejména s chybnou produkcí proteinů zapojených do energetického metabolismu (Niu et al., 2007; Someya et al., 2008). Jedním z faktorů ovlivňujících funkci vnitřního ucha je schopnost neutralizace volných kyslíkových radikálů (reactive oxygen species ROS), které jsou jedním z produktů mitochondriálního metabolismu. Jedná se o O₂, OH (méně stabilní) a H₂O₂, které přispívají k poškození mDNA, membrán a proteinů (Kujoth et al., 2005). Jako protiváha existuje systém antioxidantů tvořen superoxid dismutázou (SOD), katalázou a glutathion peroxidázou (Gpx) (Gutteridge & Halliwell, 2010). Zvířecí pokusy ukazují, že chybění části antioxidantů způsobuje výraznější ztrátu neuronů spirálního ganglia a tloušťky stria vascularis (Buckiova et al., 2007; McFadden et al., 1997). Someya a Prolla (2010) naopak prokázali, že vyšší množství katalázy vede k snížení oxidativního poškození kochley. Tyto nálezy potvrzují, že oxidativní poškození kochley přímo souvisí s poklesem antioxidantů ve stáří a je jedním z faktorů ovlivňujících vznik presbyakuze.

2.5.2 Centrální presbyakuze

V posledních letech se i přes jednoznačné postižení periferní části sluchového aparátu ve stáří diskutuje o možnosti centrálních změn ve sluchové dráze a kůře, které mohou negativně ovlivňovat zpracování zvuku (Humes & Dubno, 2010). Jako jeden z hlavních argumentů je používán popis situace, kdy pacient slyší ale nerozumí, což znamená horší výsledek řečové audiometrie než by se dal předpokládat na základě tónového audiogramu (Middelweerd et al., 1990). Je popsáno několik onemocnění, kdy i přes normálně fungující periferii sluchového systému, mají pacienti problém s centrálním zpracováním zvukového signálu zejména v hlučnějším prostředí. V takovém případě je sluchová porucha označena jako centrální (Miller, 2011).

V rámci vysvětlení příčin presbyakuze existuje několik teorií popisujících vznik centrální presbyakuze (CHABA, 1988). Jedná se o čistou (přímou) centrální presbyakuzi, centrální presbyakuzi způsobenou zhoršováním kognitivních funkcí ve stáří a centrální presbyakuzí (nepřímou), která vzniká důsledkem periferních změn (Humes et al., 1996). Samozřejmě existuje i čtvrtá možnost, kdy se může jednat o kombinaci všech zmíněných typů.

Čistá centrální presbyakuze je charakterizována situací, kdy je porucha sluchové funkce lokalizována do oblasti sluchové dráhy/kůry bez jiného věkem vyvolaného postižení (Walton et al., 2002; Willott et al., 2001). Pravděpodobnější verzí centrální presbyakuze je všeobecná alterace kognitivních funkcí a z ní plynoucí zhoršení centrálního zpracování zvuků (Canlon et al., 2010). Přibližně asi čtvrtina populace trpící presbyakuzí se známkami centrálního deficitu má i snížení kognitivních funkcí (Jerger et al., 1989). Zhoršení kognitivních funkcí, zejména jejich exekutivní složky, kam patří např. pozornost, centrální inhibice, krátkodobá paměť nebo soustředění, hraje poměrně významnou roli ve zpracování řeči zejména v hlučném prostředí, kdy je nutné specificky se zaměřit na řečovou stopu (Syka, 2002). Zde vzniká problém s dostupnými audiometrickými metodami, které využívají kompetitivních stimulů (řeč v šumu, řeč v řeči) nebo dokonce dichotických testů (každé ucho zpracovává jiný typ sluchového signálu), které jsou výrazně závislé na stavu kognitivních funkcí vyšetřovaného (Gates & Mills, 2005). Je jednoznačně potvrzeno, že vyšší věk je

spojen s poklesem kognitivních funkcí; ve věku >70 let je prevalence demence, respektive mírné kognitivní poruchy přibližně 16 % (Lopez et al., 2003; Salthouse, 2010).

Periferní hypotéza centrální presbyakuze, popisuje změny na centrální úrovni sluchové dráhy, které jsou způsobeny sníženou senzoricou stimulací v důsledku zhoršení převodu mechanické energie na energii elektrickou vláskovými buňkami, respektive úbytkem funkčních vláken spirálního ganglia. Již dlouho je známo, že po snížení nebo vymizení sensorické stimulace (v případě sluchového systému- ohluchnutí) dochází díky plasticitě mozku ke změně funkčního využití sluchové kůry. Nejčastěji je sluchová kůra využívána k zpracování znakové řeči, primárně se tedy jedná o zrakovou stimulaci (Lomber et al., 2011). Předpokladem tedy je, že i při dlouhodobé sluchové deprivaci u pacientů s presbyakuzí bude efekt obdobný. Tento typ presbyakuze je i cílem našeho výzkumu.

2.5.3 Presbyakuze a inhibice

Jedním z možných vysvětlení centrální presbyakuze je porucha zpracování časových parametrů zvuků. U lidí s presbyakuzí bývá standardně postižená schopnost rozeznávat drobné časové (Gordon-Salant & Fitzgibbons, 1993; Snell & Frisina, 2000), ale i intenzitní změny (Abel et al., 1990). Jedním ze způsobů vyšetření schopnosti zpracování časových parametrů je vyšetření pauzy v šumu („gap detection“). Mazelová et al. (2003) uvádějí signifikantní zvýšení prahu detekce pauzy v šumu u populace s presbyakuzí ve srovnání s mladými dobrovolníky. Někteří autoři (Bertoli et al., 2002; Gordon-Salant & Fitzgibbons, 1993) korelují zhoršení detekce časových parametrů zvuků i s výsledky psychoakustických a řečových testů.

Výsledky podobných vyšetření u zvířat lze následně spojit i s elektrofyziologickými a imunohistochemickými změnami, co dává mnohem podrobnější a přesnější obraz o presbyakuzi. V naší laboratoři se jako standardní model stárnutí používají 2 kmeny potkanů. Long Evans je outbrední kmen s normálním průběhem stárnutí, dožívající se kolem 36 měsíců, s normálním

sluchem v dospělosti a jen mírným úbytkem sluchové funkce ve stáří (Popelar et al., 2003; Popelar et al., 2006). Naopak kmen Fischer má zrychlený průběh stárnutí s dobou dožití kolem 24-28 měsíců (Sass et al., 1975; Syka, 2010) s projevy ve sluchových strukturách jako degenerace struktur hlemýždě spojená se zvýšením sluchového prahu (Keithley et al., 1992; Simpson et al., 1985), degenerace stria vascularis (Buckiova et al., 2006; Buckiova et al., 2007), pokles ve velikosti amplitudy vyvolaných kmenových odpovědí, vymizení DPOAE a pokles ve středoušní poddajnosti (Popelar et al., 2003; Popelar et al., 2006). Kromě jednoznačných periferních sluchových změn jsou u kmene Fischer přítomny i kognitivní poruchy projevující se při behaviorálním testování (Harker & Whishaw, 2002). V poslední době jsou používány stále častěji i myší modely, zejména z důvodů genetických manipulací. Myší analog k normálně, respektive pomalu stárnoucímu potkanímu kmenu, je kmen CBA/CaJ (Willott, 1986). Za rychle stárnoucí je u myší považován kmen C57BL/6J (Willott et al., 1993; Willott et al., 1988).

Zhoršení identifikace časových parametrů zvuků může být způsobeno poruchou inhibičních okruhů, které se podílí právě na vyladění jednotlivých neuronů při identifikaci jemných časových změn (Caspary et al., 2002; Liang et al., 2002). Porucha inhibice je přítomna hlavně v centrálních částech sluchové dráhy a kůry a bývá spojena se stářím. Jedním ze znaků stárnutí u zvířat je pokles vápník vázících proteinů (calbindin, calretinin a parvalbumin) v interneuronech, které jsou za inhibici přímo odpovědné (Idrizbegovic et al., 2004; Ouda et al., 2008; Zettel et al., 2003). Tyto změny nejsou specifické jen pro sluchové struktury, ale jsou přítomny v mozku všeobecně; v hipokampu (deJong et al., 1996), olfaktorickém bulbu (Hwang et al., 2003) nebo cingulární kůře (Krzywkowski et al., 1995). Co se týče sluchových struktur a presbyakuze, dochází k poklesu počtu buněk exprimujících vápník vázící proteiny v CN (Idrizbegovic et al., 2003), IC (Zettel et al., 1997) a mozkové kůře, ale například v CGM ke změnám nedochází. (Ouda et al., 2012)

Elektrofyzilogicky se u zvířat změny v inhibici spojují s rozšířením receptivních polí neuronů jak v IC (Simon & Frisina, 2004; Walton et al., 2002), tak i v AC (Turner et al., 2005), přičemž Wu et al. (2008) přímo prokázal zapojení

parvalbumin pozitivních interneuronů do „tvarování“ FRA. Rozšíření FRA směrem ke „komplexním“ neuronům reagujícím na větší množství frekvencí, způsobí jejich převahu oproti neuronům s klasickým V/U tvarem FRA, co vede k zvýšení excitability a tím k většímu neuronálnímu „šumu“ ve stáří (Kamal et al., 2013). Výsledkem je porucha zpracování frekvenčně modulovaných zvuků (Razak & Fuzessery, 2009; Zhang et al., 2003), co odpovídá zhoršení rozumění řeči ve stáří u lidí.

2.5.4 Možnosti léčby/rehabilitace presbyakuze

Cílem léčby presbyakuze je zlepšení sluchové stimulace a tím přivedení dostatečné informace do centrálních částí sluchové dráhy a kůry. Vzhledem k tomu, že se jedná o sensorineurální poruchu sluchu, je klasická chirurgická léčba zcela bez efektu. Dominantní roli hraje rehabilitace sluchu pomocí sluchadlové augmentace. I přesto, že část postižení je relativně jednoduše rehabilitovatelná sluchovým pomůckami (sluchadly), jenom málo lidí tuto možnost využije (dle WHO asi 1 z 5), respektive jsou ochotni sluchadlovou augmentaci pravidelně používat (Salonen et al., 2013). Průměrný věk pacienta, který začíná používat sluchadlo je 74 let (Davis et al., 2007), což znamená že pravděpodobně již 10 let má zhoršení sluchu limitující jeho komunikační možnosti. Relativní zlepšení v užívání sluchadlové augmentace přinesla digitální sluchadla, která zlepšují kvalitu zesílení signálu, potlačení šumu v pozadí, možnost přepínání mezi jednotlivými programy (Taylor et al., 2001).

Jedním z důvodů sníženého užívání sluchadel je i nedostatečný efekt, respektive i přes zlepšení sluchového prahu jen mírné zlepšení zpracování řeči v složitých akustických podmínkách (McCormack & Fortnum, 2013), co je pravděpodobně ovlivněno snížením plasticity kůry a zhoršením kognitivních funkcí (Humes et al., 2013).

3. Cíle práce

Naše práce byla zaměřena jednak na objasnění některých charakteristik struktury a funkce sluchové kůry u zvířecího modelu, kdy jsme použili laboratorního potkana, jednak jsme se snažili o poznání změn struktury a funkce lidské sluchové kůry v souvislosti se stárnutím, k tomu jsme použili zobrazovací metody magnetické rezonance

Jedním z cílů bylo objasnit organizaci sluchové kůry potkana, respektive rozdílné vlastnosti jednotlivých polí a vrstev v rámci AC na základě elektrofyziologických odpovědí neuronů na stimulaci čistým tónem a širokospektrálním šumem (BBN). Důvod proč byli vybráni potkani na hranici dospělosti, byla pak následná sada pokusů směřována na identifikaci elektrických vlastností neuronů pomocí metody terčíkového zámku. Výsledky pokusů nás pak zpětně dovedli opět k extracelulárnímu snímání a identifikaci typů neuronů na základě průběhu AP a jejich zastoupení v jednotlivých vrstvách AC.

Po identifikaci polí a zlepšení anatomických znalostí při hledání AC jsme přistoupili k charakteristice změn na úrovni sluchové kůry a dráhy ve stáří. Prvním zkoumaným modelem byli stárnoucí potkani a hladina enzymů glutamátdekarboxyláza (GAD) 65 a 67 specifických pro produkci inhibičního neurotransmiteru kyseliny γ -aminomáselné (GABA).

Výsledkem pokusů na potkanech bylo poměrně výrazné snížení GAD 65 a 67 ve stáří, a tedy předpoklad obdobných změn i u člověka. Sluchová kůra a dráha člověka byla vyšetřena pomocí MRI technik s cílem identifikovat obdobné chemické změny respektive hladiny neurotransmiterů (MR spektroskopie), morfometrické změny v AC (MR morfometrie) a sluchové dráze (DTI) a nakonec i funkční změny AC (fMRI). Výběr dobrovolníků byl směřován k identifikaci všeobecných změn ve stáří, respektive změn v sluchové dráze a kůře způsobených postižením vnitřního ucha ve stáří.

3.1 Pracovní hypotézy

1. Liší se vlastnosti neuronů mezi jednotlivými oblastmi sluchové kůry a v rámci rozdílných korových vrstev?
2. Má rozdílná reakce neuronů na typy zvukové stimulace v primární sluchové kůře a okrajové oblasti základ v rozdílných elektrických vlastnostech neuronů a lze tyto odlišné vlastnosti zaznamenat i při extracelulárním snímání?
3. Dochází ke změně celkových hladin glutamátdekarboxylázy v sluchové kůře, colliculus inferior a zrakové kůře ve stáří a mění se počet a morfologie neuronů exprimujících GAD?
4. Lze identifikovat změny v hladinách základních neurotransmiterů ve sluchové kůře člověka ve spojení se stářím, respektive se stupněm presbyakuze?
5. Dochází k morfometrickým změnám v sluchové kůře a sluchové dráze u člověka ve stáří, respektive při různých stupních presbyakuze?
6. Mění se rozsah aktivace sluchové kůry ve stáří a při zhoršení funkce vnitřního ucha?

4. Materiál a metody

4.1 Experimenty na zvířatech

4.1.1 Vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana

V experimentech spojených s extracelulárním snímáním odpovědí neuronů s cílem porovnat vlastnosti jednotlivých vrstev a polí v AC byly použity potkani kmene Long Evans (2 samci, 8 samic, věk 30–35 dní, váha 80–105 g). K anestezii byla použita intramuskulární aplikace ketaminu (33 mg/kg) a xylazinu (6 mg/kg), tělesná teplota byla udržována na 37°C. Hlava potkana byla fixována držákem, přičemž obě uši zůstaly volné. Kraniotomie s průměrem 5 mm byla provedena nad předpokládanou lokalizací AC a následně byla odstraněna tvrdá plena. Na kůru byl nanesen agar k udržení teploty a vlhkosti. Elektroda byla vždy zaváděna kolmo k povrchu. K pozdější identifikaci polohy elektrody byla pořízena fotografie povrchu mozku.

Zvuková stimulace byla prováděna z volného pole, reproduktor byl vzdálen přibližně 60 cm od hlavy potkana. Ke zvukové stimulaci byly použity náhodně se měnící (1/4 oktávové kroky) čisté tóny (0,5–36 kHz, 60 ms trvajícím stimul, 5 ms náběžná/sestupná hrana, 1 opakování, intenzita 0–100 dB SPL, 5 dB kroky) a širokospektrální šum (60 ms trvajícím stimul, 5 ms náběžná/sestupná hrana, 80 dB SPL, 30 opakování). Aktivita neuronů byla snímána pomocí 16 kanálové elektrody (NeuroNexus, single shank, vzdálenost snímacích kanálů 50 μm) po jejím zavedení do hloubky přibližně pomocí mikromanipulátoru (0,1 μm krok; MCL, Märzhäuser Wetzlar) pod zrakovou kontrolou (mikroskop s 32x zvětšením).

Aktivita neuronů byla zesílena a digitalizována předzesilovačem Medusa RA16PA p (A/D vzorkování 25 kHz) a následně převedena do zesilovače Pentusa RX5-2. Data byly zpracovány pomocí softwaru Brainware a dále pak analyzovány s využitím vlastních programů vytvořených v prostředí MatLab.

4.1.1.1 Určení hloubky elektrody a snímacích kanálů v AC

Za účelem hloubkové analýzy odpovědí byly 4 mozky histologicky zpracovány k potvrzení hloubky zavedení elektrody. Pozice nejhlubšího snímacího kanálu byla označena pomocí el. proudu (12 s, 0,4 mA). Po perfuzi zvířete a fixaci (4% paraformaldehyd), byl mozek nakrájen na 50 μm řízky a barven podle Nissla. Preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Leica DMRXA a pravděpodobná pozice elektrody ve vrstvě kůry byla určena dle práce Games a Winer (1988).

4.1.1.2 Analýza vlastností neuronů

Ve většině případů byla jedním snímacím kanálem zaznamenána aktivita více neuronů. K získání jednotkové aktivity, byla provedena off-line analýza parametrů akčního potenciálu (APT): tvar a časový průběh vlny APT a posthyperpolarizační fáze (AHP), amplituda, čas mezi maximálním a minimální napětím. K vlastní analýze vlastností neuronů byla použita jenom jednotková aktivita.

Odpovědi neuronů na stimulaci pomocí širokopásmového šumu (broad-band noise – BBN) v prvních 250 ms od zahájení stimulace (bin 1 ms) byly použity k vytvoření poststimulačních histogramů a hodnocení následujících parametrů:

- 1) Spontánní aktivita (v průběhu 12 ms od začátku stimulace nebo v době od 190 do 250 ms).
- 2) Minimální latence (časový odstup vyvolané odpovědi od začátku stimulace)
- 3) Velikost odpovědi- vypočtena pro 3 různé časové periody trvající 60 ms. První „on“ perioda trvala od 12 do 72 ms od začátku stimulace; druhá „off“ perioda od 72 do 132 ms a třetí „pozdní off“ perioda od 132 do 192 ms. Velikost odpovědi byla vypočtena jako počet akčních potenciálů (APT) v průběhu stimulace s odečtením spontánní aktivity. Na základě odpovědi spadající do jednotlivých časových period, byly odpovědi neuronů rozděleny na on odpovědi, off a pozdní off.

- 4) 5 rozdílných typů odpovědi neuronů bylo identifikováno v průběhu první periody na základě přechozích publikací (Nuding et al., 1999; Recanzone, 2000):
- i) Fazická (pure onset) odpověď (krátká reakce na začátek stimulace bez další tonické aktivity)
 - ii) Fazicko-tonická (onset-sustained) odpověď (dominantní odpověď na začátek stimulace následovaná menší tonickou aktivitou v průběhu stimulace)
 - iii) Tonická (sustained) odpověď (aktivita bez jasného vrcholu trvající minimálně 20 ms)
 - iv) Dvojvrcholová (double-peak) odpověď (po iniciální fazické odpovědi následovala minimální aktivita po které byla další fazická reakce)
 - v) Pozdní tonická (late onset) odpověď (minimální latence odpovědi přesáhla 32 ms)
- 5) Trvání vrcholu odpovědi (čas mezi prvním a posledním binem, ve kterém vyvolaná odpověď dosáhla alespoň 50 % maxima odpovědi).

Všechna elektrofyziologická data byla analyzována pomocí programů Excell 2007 a GraphPad Prism 5.0. K statistické analýze byla použita jednocestná Anova s Tukeyho korekcí nebo dvoustranný t test s hladinou signifikance $p=0,05$.

Odpověď na stimulaci čistými tóny byla použita k další charakteristice neuronů:

- 1) Frekvenčně intenzitní oblast (FRA) zobrazuje odpověď neuronu jako funkce frekvence a intenzity tónového stimulu.
- 2) Charakteristická frekvence (CF) byla určena jako frekvence odpovědi neuronu na nejnižší intenzitu stimulace (práh odpovědi neuronu).
- 3) Variabilita CF neuronů v rámci měřícího místa byla vypočtena jako rozdíl mezi minimální a maximální CF (v oktávách) zaznamenaných ze snímacích kanálů.

4.1.1.3 Tvorba frekvenčních map

Průměrná charakteristická frekvence (vypočtena z CF naměřených pro každý snímací kanál) byla vypočtena pro každé měřící místo a zaznamenána do fotografie povrchu AC dle pozice elektrody a vaskularizace.

Celková mapa byla vytvořena ze všech individuálních map, které byly překryty jedna přes druhou na základě pozice vůči sulcus rhinalis, arteria cerebellaris media, a hranicím mezi okrajovou oblastí, AI a UR. Hlavním kritériem pro upravení pozice individuálních map byl směr tonotopie. U každého zvířete byly zaznamenány základní hodnoty CF, přičemž vždy byla zachována tonotopická organizace (od nízkých po vysoké frekvence) v AI a AAF (od vysokých po nízké frekvence). Mapy byly následně překryty jedna přes druhou na základě frekvenční distribuce. Pozice cév na povrchu AC byly vysoce individuální bez jasného schématu uspořádání. Ke každé CF byla přiřazena příslušná barva.

4.1.2 Nepublikované výsledky (snímání rozdílů mezi neurony v AI a okrajové oblasti extracelulárně a terčíkovým zámekem)

4.1.2.1 Terčíkový zámek

Pokusy byly prováděny na potkanech Wistar (30–35 dnů). K identifikaci AI a okrajové oblasti bylo použito extracelulární snímání zvukem vyvolané aktivity (akustická stimulace i průběh měření byl stejný jako v práci Vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana, byla použita skleněná elektroda naplněná 3% roztokem KCl). Po identifikaci hranice mezi AI a mediální okrajovou oblastí bylo rozhraní označeno injekcí Evansovou modří. Potkan byl následně usmrcen, mozek po vyjmutí podchlazen, sluchová kůra nakrájena na koronární řízky (tloušťka 350–400 μm), které byly následně 1 hodinu inkubovány při 32–33° C v roztoku (ECS) připomínajícím extracelulární tekutinu (130 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 24 mM NaHCO₃, 1,25 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM CaCl₂, 3,0 mM MgCl₂ a 10 mM glukóza (Atzori et al., 2001)). V průběhu elektrofyziologického záznamu byly řezy průběžně promývány (2–2,5 ml/min)

okysličeným ECS roztokem s upravenými koncentracemi Ca a Mg (1,5 mM) o teplotě 33–34° C. Snímací skleněné mikropipety byly naplněny (ICS) roztokem připomínajícím intracelulární tekutinu (uváděno v mM: 102 K-glukonát, 32,5 KCl, 10 HEPES, 0,1 EGTA, 4 Mg₂ATP, 0,6 NaGTP a 10 TrisPCr, pH bylo upraveno na 7,2–7,3 doplněním KOH a osmolarita byla 275–285 mOsm). Po naplnění měly mikropipety odpor 3–6 MΩ. Pro morfometrickou analýzu snímaných neuronů obsahoval ICS také biocytin, který byl po skončení pokusu konjugován s avidinem nesoucím fluorescenční barvivo. K blokádě I_h kanálu byl použit specifický blokátor ZD 7288. K statistické analýze byla použita jednocestná Anova a Dunnettova korekce, nebo dvoustranný t-test, s minimální úrovní signifikance p=0,05.

4.1.2.2 Extracelulární snímání průběhu akčních potenciálů (APT)

K vyšetření byly použity Wistar potkani (n=10, 30–35 dnů) přičemž průběh experimentu byl stejný jako v práci porovnávající vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana. Neuronů snímaných z celé sluchové kůry byly použity k identifikaci neuronálních podtypů. K další charakteristice podtypů byly dále použity jenom neuronů ze IV. vrstvy AI a jejich odpovědi na měnící se stimulaci (opakující se kliky, interval mezi kliky: 20, 50, 100, 250ms, 80 dB a 50 dB); BBN stimulace (délka stimulu 50, 100, 150 ms; 5 ms náběh/pokles, 80 dB a 50 dB).

4.1.3 Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana

K měření hladin enzymu GAD a následné stereologii bylo použito 30 potkanů Long Evans (3–5 měsíců starých n=15, 30–35 měsíců starých n=15).

Imunohistochemické měření bylo provedeno na Long Evans potkanech (stáří 3–5 měsíců, n=5 a 30–35 měsíců, n=5) pro GAD 67 a pro GAD 65 (stáří 3–5 měsíců, n=4 a 30–35 měsíců, n=4). Po perfuzi zvířete (fyziologický roztok a 4% roztok paraformaldehydu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH = 7,4), byl mozek fixován a následně nakrájen na mikrotomu na jednotlivé řezy (tloušťka 40 μm).

Řezy byly následně inkubovány pod dobu 1h (kozí sérum – Vector) a 24 h v PBS (4° C) obsahujícím anti-GAD67 nebo anti-GAD65 protilátky, dále v roztoku s biotinylovanou sekundární protilátkou po dobu 1h a následně s avidin-peroxidázovým komplexem.

Vyšetření metodou western blot (LE potkani staří 3-5 měsíců, n=6 a 30–35 měsíců, n=6) bylo provedeno na vzorcích sestávajících se z IC, sluchové a zrakové kůry (po dekapitaci a podchlazení byl mozek vyjmut, následně zmrazen až do homogenizace Potter-Elvehjemovým homogenizátorem, v homogenizačním pufru 0,05 M Tris-NaCl (pH 7,4) s inhibitory proteáz). Stanovení koncentrace proteinů ve vzorcích bylo provedeno Bradfordovou metodou s použitím hovězího sérového albuminu (BSA) jako standardu. Po zředění byly proteiny rozděleny do jednotlivých vzorků elektroforézou s následným přenosem na celulózovou membránu. Membrány byly inkubovány v blokovacím roztoku 5% nízkotučného mléka v TBST, promyty (3x krátce 3x5 minut v TBST) a inkubovány přes noc při teplotě 4°C v roztocích primárních protilátek: GAD65, GAD67 a aktin. Po dalším promytí byly následně inkubovány v roztoku sekundární protilátky konjugované oxidační metodou s křenovou peroxidázou. Detekční roztok byl připraven smícháním roztoku A (luminol) a B (H₂O₂) v poměru 40:1. Membrány byly exponovány na autoradiografický film, po vyvolání naskenovány a hladiny GAD stanoveny programem ImageQuant. Hladiny GAD65 a GAD67 byly vypočteny jako podíl optické denzity požadovaného proteinu oproti aktinu.

K stereologickému hodnocení byly vybrány části řezů odpovídající IC, sluchové a zrakové kůře dle anatomických atlasů (George & Charles, 1998; Zilles & Wree, 1985) a s pomocí řezů barvených podle Nissla (především ohraničení sluchové kůry). Pro hodnocení změn imunoreaktivity GAD byl použit optický disektor (West a spol., 1991; Mayhew a Gundersen, 1996). K hodnocení byl použit světelný mikroskop Leica DMRXA spojený s digitální kamerou (Optronics, 1600 x 1200 pixelů) a následně obrazová analýza pomocí softwaru NeuroLucida (MicroBrightField, USA) při 100 násobném zvětšení se stálou velikostí hodnotícího rámečku (3880 μm²), výška optického disektoru byla konstantně na 5 μm. Každý neuron v hodnotícím rámečku byl započítán v okamžiku, kdy jeho

jádro bylo v maximálním zaostření. V této poloze bylo buněčné tělo obkresleno kurzorem a automaticky byly změřeny morfologické parametry a optická denzita. Hodnocena byla jen GAD+ somata větší než 5 μm a s viditelným jádérkem. Objem jednotlivých somat neuronů byl určen pomocí tzv. nukleátoru ($\text{estV} = 4/3 \times \pi \times (\text{ml}^3)$, kde ml^3). Normalizovaná hodnota optické denzity byla počítána v každém řezu jako podíl mezi průměrnou optickou denzitou analyzovaných GAD+ neuronů a průměrnou optickou denzitou odpovídajícího počtu imunonegativních buněk v témže řezu (tj. pouze nespecificky zbarvených – viditelných jako obrysy na pozadí) (Ling et al., 2005). Při nejasném nálezu byl proveden 2. krok, kdy byly neurony s nejasným nálezem vyloučeny z analýzy, pokud naměřená optická denzita nebyla vyšší než dvojnásobek průměrné optické denzity imunonegativních buněk v daném řezu.

K statistické analýze rozdílů v jednotlivých nálezech mezi skupinami mladých a starých zvířat byl použit neparametrický dvoustranný Mann-Whitney test jak pro histochemii a imunohistochemii, tak i pro western blot. Data z western blotu byla použita k analýze rozdílů mezi hladinami proteinů v jednotlivých strukturách a rozdílů v míře velikosti poklesu pomocí jednocestné Anovy s Bonfferoniho korekcí.

4.2 MRI experimenty

Všechna MRI vyšetření byla provedena pomocí systému Siemens TRIO 3 T při použití Tx/Rx hlavové cívky.

Žádný z vyšetřených dobrovolníků nepodstoupil v minulosti operaci ucha, neměl vertigo nebo tinnitus, trauma hlavy, lézi lícního nervu, postižení krční páteře, patologii CNS (postižení krční páteře resp. patologie CNS nebyly cíleně vyšetřovány, dobrovolníci na cílený dotaz neuvedli, že by pro jedno nebo druhé byli sledováni u lékaře; na T2 vážených MRI snímcích bylo ve vyšetřované oblasti temporálního laloku nalezeno jenom minimum gliových změn a nebyly vyšetřujícím považovány za významné) a MR vyšetření nebylo kontraindikováno. V rámci MRI studie bylo vyloučeno 5 dobrovolníků pro náhodně zjištěnou intrakraniální patologii (vzdlené metastázy, schwanom 8.

hlavového nervu, gliové změny (jizvy) v kůře, korová atrofie, zvětšené mozkové komory).

4.2.1 Audiologické vyšetření

Všichni dobrovolníci měli vyšetřený sluch pomocí vysokofrekvenční audiometrie (125 Hz – 16 kHz, 5 dB kroky) s cílem identifikovat sluchový práh. Všichni dobrovolníci měli tympanometrickou křivku typu A, což potvrdilo fyziologické tlakové poměry ve středouší.

OAE byly vyšetřeny pomocí systému ILO 96. Nelineární klik (0,5–6,0 kHz, gain 81 dB) byl použit k vyšetření TEOAE. K vyšetření DPOAE byly použity 2 primární tóny ($f_2/f_1=1,22$ s $L_1=65$ a $L_2=55$ dB SPL), přičemž amplituda DP byla měřena na frekvenci $2f_1-f_2$.

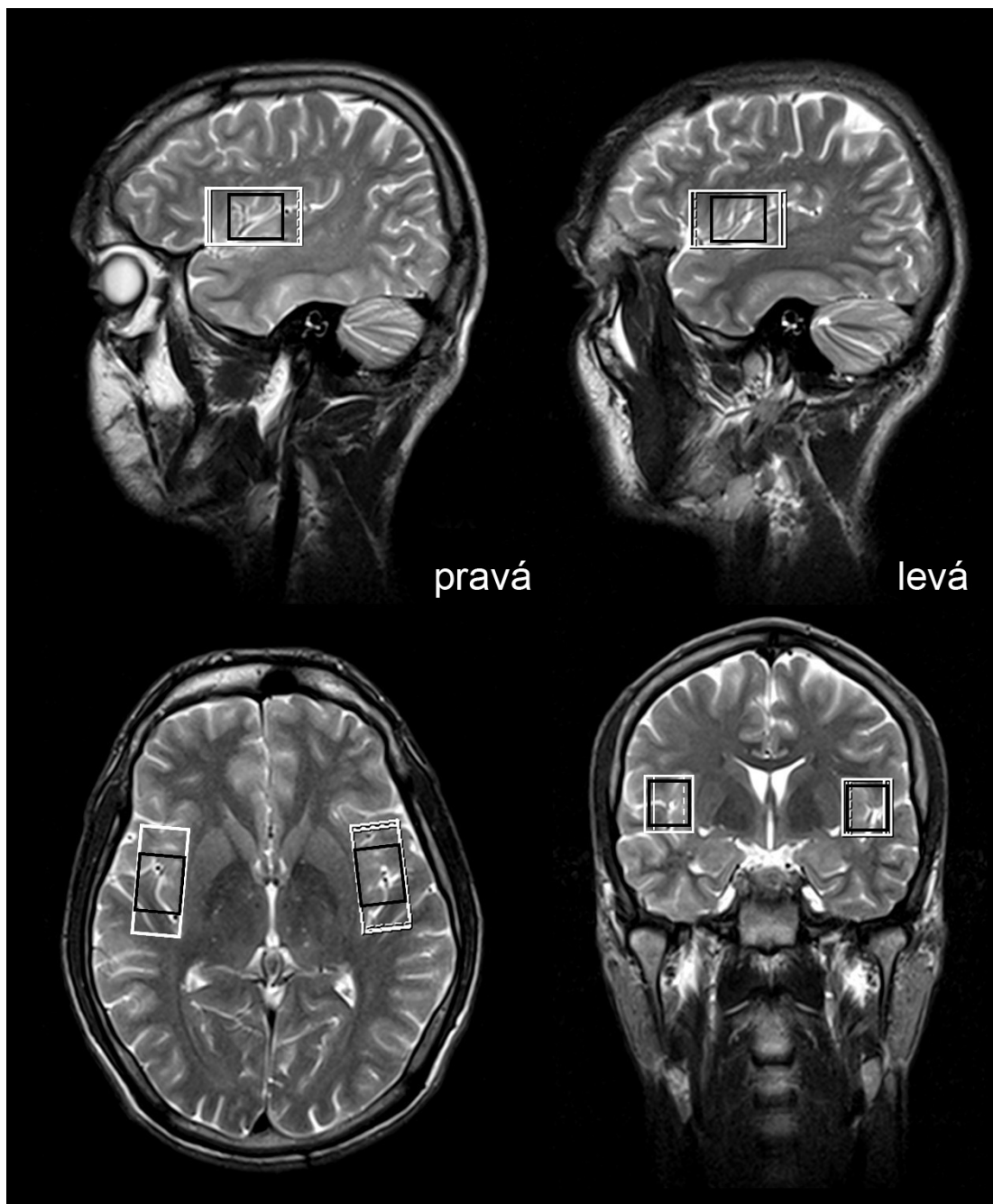
K vyšetření řečové audiometrie byly použity testy dle Seemana (Seeman, 1960) s cílem identifikovat SDS a MDL. K vyšetření srozumitelnosti řeči v šumu byly použita Česká větná audiometrie dle Dlouhé (Dlouhá & Vokřál, 2011), intenzita šumu v pozadí byla 65 a 70 dB SPL. Sluch byl hodnocen i dle Gardner Robertsonovi klasifikace (Gardner & Robertson, 1988).

4.2.2 Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka u presbyakuze zobrazené pomocí MR spektroskopie

K identifikaci hladin metabolitů v AC bylo vyšetřeno 53 subjektů. Na základě audiometrických výsledků mělo 17 subjektů těžkou formu presbyakuze (EP, 8 žen, 9 mužů, průměrný věk 71.2 ± 5.2 let), 18 lehkou formu presbyakuze (MP, 13 žen, 5 mužů, 67.3 ± 1.9 let). 18 mladých dobrovolníků bylo použito jako kontrolní skupina (YC, 7 žen, 11 mužů, 24.4 ± 2.3 let). U všech použitých záznamů byla kvalita spekter dostatečná. Ve 2 případech i přes ručné doladění a opakované snímání byla kvalita spekter nedostatečná, proto nebyly použity k statistickému zpracování.

Základní T2 vážené snímky (turbo spin echo sekvence, TR/TE = 4400/99 ms, 4 mm) byly doplněny k lokalizaci spekter. MPR sekvence (1 mm řezy) byla

použita k separaci bílé hmoty (WM), šedé hmoty (GM) a mozkomíšního moku (CSF). Technika jednoho voxlu (PRESS: TR/TE = 5000/ 30 ms, 64 akvizicí) při velikosti oblasti zájmu (VOI) 8 a 18 ml MRs byla použita k spektroskopickým měřením centrovaným na oblast Heschlova závitů v temporálním laloku (Obr. 7). Data z MRS byly analyzována pomocí LC modelu (Provencher, 1993).



Obr. 7. Příklad lokalizace měřených spekter (malý 8 ml VOI černý a velký 18 ml bílý) v temporálním laloku v obou hemisférách ve VOI centrovaném kolem Heschlova gyru.

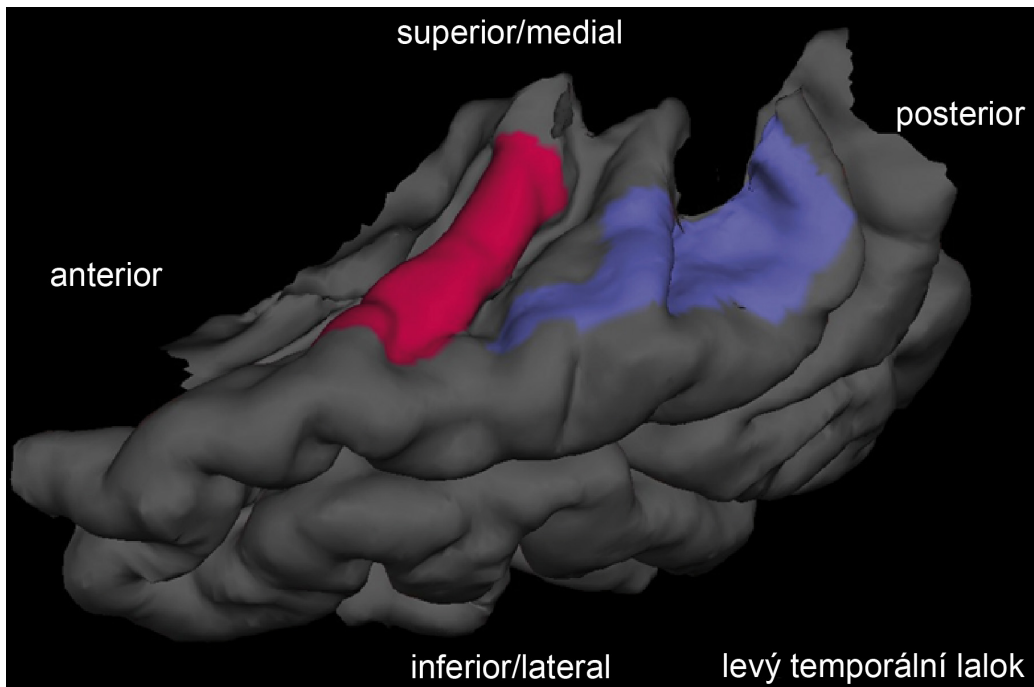
K statistickému zhodnocení výsledků byla použita jednocestná Anova s Tukeyho korekcí (hladina signifikance $p=0,05$).

4.2.3 Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a sluchové dráhy u člověka ve stáří

Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě byly měřeny u 17 dobrovolníků s těžkou formou presbyakuze (EP, $n = 17$ pro morfometrii $70,38 \pm 1,18$; 5 mužů a 12 žen; $n = 15$ pro DTI, $70,43 \pm 1,34$; 9 mužů a 6 žen), 17 dobrovolníků s lehkou formou presbyakuze (MP, $n = 17$ pro morfometrii, $67,9 \pm 0,45$; 5 mužů a 12 žen; $n = 12$ pro DTI, $68,04 \pm 0,6$; 5 mužů a 7 žen) a 20 mladých dobrovolníků tvořících kontrolní skupinu (YC, $n = 20$ morfometrie, $24,34 \pm 0,51$, 11 mužů a 9 žen; $n = 12$ pro DTI; $25,3 \pm 0,72$; 4 muži a 8 žen). Všichni dobrovolníci byli praváci dle Edinburského dotazníku.

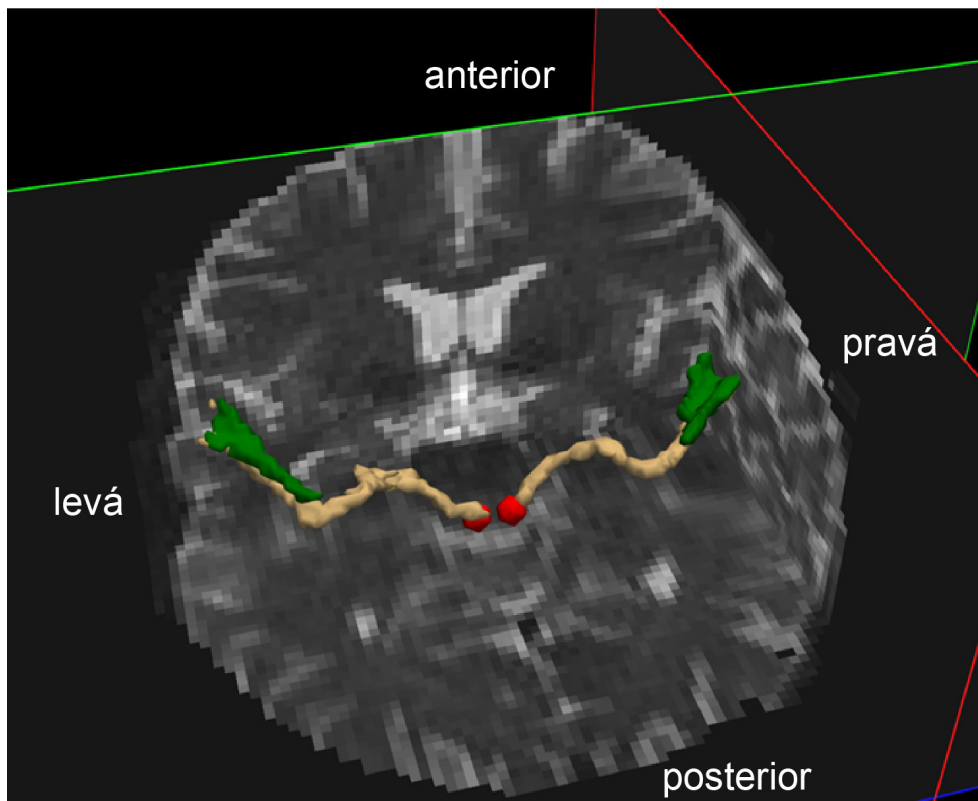
Pro DTI měření byla použita EPI spin echo sekvence (TR/TE = 8000/88 ms, PAT = 2, 64 směrů difuze, $b = 0/1100$, velikost voxelu $2 \times 2 \times 2$ mm). K 3D strukturálnímu snímání byla použita rapid acquisition gradient echo sekvence (MPRAGE; TI/TR/TE = 900/2300/4,63 ms). Strukturální snímky byly použity k morfometrické analýze a vytvoření masky bílé hmoty pod HG. K odstranění geometrických odchylek EPI dat byly použity mapy pole B_0 .

Rekonstrukce kůry (Obr. 8) a volumetrická segmentace byly vytvořeny pomocí programu Freesurfer (Fischl, 2012). Automatická segmentace kůry na gyry a sulky (Desikan et al., 2006) pomocí Destriouvých pravděpodobnostních atlasů (Destrieux et al., 2010) byla použita na parcelaci gyrus temporalis transversus anterior – Heschlův gyrus (HG), planum temporale (PT) a gyrus frontalis inferior. K parcelaci primární zrkové kůry (V1, Brodmanova area 17) byl použit atlas Martinosova centra pro zobrazení a Institutu neurověd a biofyziky (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/fswiki/BrodmanAreaMaps>).



Obr. 8. 3D vizualizace temporálního laloku u 1 dobrovolníka. Barevně jsou vyznačeny ROI sluchové kůry (Heschlův gyrus červeně, planum temporale modře), které byly použity k morfometrickému měření. Část kůry je uměle zvednuta, aby byla přehlednější sluchová kůra, která je uložena hlouběji v laterálním zářezu.

K zpracování DTI měření byl použit program FMRIB (Jenkinson et al., 2012). Pravděpodobnostní traktografie vznikla použitím systému EDPOSTX a PROBTRACKX a modelu křížících se vláken (Behrens et al., 2007). K traktografii části sluchové dráhy byla ručně určena pozice IC a následně byla vytvořena maska dráhy mezi IC a HG (AP) (Obr. 9) při prahování 10 %. Indexy DTI: FA, MD, L1 a AvgL2L3, byly vypočteny jak pro AP tak i pro bílou hmotu pod Heschlovým gyrem (WM_HG).



Obr. 9. 3D vizualizace tří ROI v části sluchové dráhy (béžová) mezi IC (červeně) a bílou hmotou pod Heschlovým závitem (zeleně) u 1 dobrovolníka. Pro lepší DTI analýzu bílé hmoty byly ROI proloženy $b=0$ zobrazením u každého dobrovolníka.

K statistické analýze MR morfometrie a DTI byl použit lineární smíšený model (skupina, lateralita a jejich interakce byly použity jako fixní efekty), bylo sledováno 5 proměnných: věk (YC vs. MP), presbyakuze (MP vs. EP), lateralita a 2 interakce (EP vs. lateralita, YC vs. lateralita). Statistické testy byly provedeny pomocí softvéru environment R (RDC Team, 2010) a nlme (Pinheiro et al., 2010). K hodnocení statistické signifikance byly použity 2 úrovně. Nekorigovaný práh signifikance na úrovni $p=0,05$ a více konzervativní přístup využívající Bonferroniho korekci vícenásobného testování.

4.2.4 Změna aktivace sluchové kůry člověka ve stáří

K fMRI vyšetření AC bylo použito 58 subjektů. Na základě audiometrických výsledků mělo 15 subjektů těžkou formu presbyakuze (EP, 6 žen, 9 mužů, průměrný věk $70,7 \pm 1,37$ let) a 15 lehkou formu presbyakuze (MP,

11 žen, 4 muži, $67,9 \pm 0,49$ let). 18 mladých dobrovolníků bylo použito jako kontrolní skupina (YC, 7 žen, 11 mužů, $23,75 \pm 0,38$ let).

GRE-EPI sekvence (TE = 30 ms, TR = 8 s, flip úhel = 90° , voxel $3 \times 3 \times 3$ mm³, 30 řezů o tloušťce 3 mm) byla použita k fMRI. Pro snímání aktivity kůry byl použit princip hodnocení jednotlivých událostí (event related). K akustické stimulaci byl použit různový šum (1/3 oktávy) centrovaný kolem jedné z 5 frekvencí (350 Hz, 700 Hz, 1,5 kHz, 3 kHz, 8 kHz), přehrán MRI kompatibilními sluchátky. Stimuly byly přehrávány pseudo náhodně (každá frekvence 10x) v průběhu měření, které obsahovalo 152 dynamických objemů (opakování po 8 s) a trvalo 20 minut. Dobrovolníci po uslyšení zvukového stimulu měli za úkol zmáčknout tlačítko.

FMRI záznamy byly hodnoceny programem SPM 8 (Welcome Trust Centre for Neuroimaging, London, UK) s upravením pomocí časování, vyhlazení $6 \times 6 \times 6$ mm a normalizací dle MNI 152. U každého dobrovolníka byla vypočtena individuální aktivační mapa dle všeobecného lineárního modelu (GLM) pro každou stimulační frekvenci (práh pro stanovení aktivace byl u všech dobrovolníků identický). K porovnání rozsahu aktivace jednotlivých skupin byla použita skupinová statistika (t-test, $p=0,05$ FWE korekce). Rozdíly mezi skupinami byly porovnány nepárovým dvou výběrovým t-testem s nekorigovaným prahem $p=0,001$. Metoda bootstrap (Wilke & Lidzba, 2007; Wilke & Schmithorst, 2006) byla použita k vypočtení lateralizačního indexu (LI) rozdílových map (např. MP > YC). Parametry SPM LI toolboxu pro výpočet LI: sub-sample velikost $k=25$ %, nejmenší vzorek 5, maximální velikost vzorku 10 000, použity byly jenom voxly z temporálního laloku.

Průběh zvířecích experimentů i MR studie byly schváleny etickou komisí FN Motol, IKEMu a ÚEM AVČR.

5. Výsledky

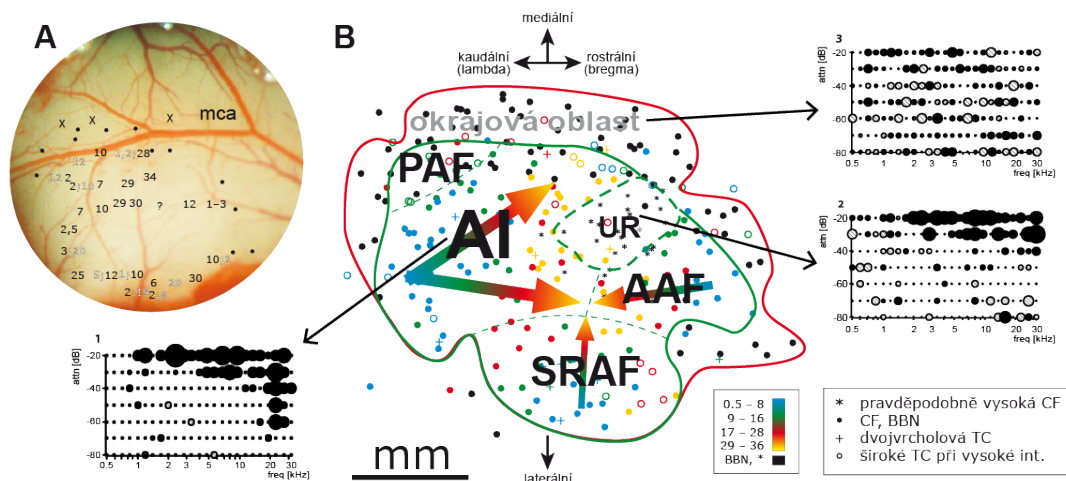
5.1 Vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana

Celkově jsme hodnotili záznamy z 1981 neuronů (AI _ 685, UR _ 316, AAF _ 319, SRAF _ 348, PAF _ 145, okrajová oblast _ 168) v hloubce do 950 μm , které pocházely ze 169 měřících míst (vpichů) v AC 10 potkanů (Obr. 10. A). K vytvoření tonotopické mapy jsme pak použili ještě další měření celkově ze 403 míst v AC.

5.1.1 Frekvenční organizace sluchové kůry potkana

Hranice sluchové kůry, které byly vyznačeny na základě opovědí neuronů na BBN a odpovědí na stimulaci čistým tónem, odlišily centrální sluchová pole a okrajovou – okrajovou oblast. Neuronů lokalizované v okrajové oblasti nereagovaly na stimulaci čistým tónem. Okrajová oblast byla lokalizována hlavně za mediální a dorsální hranicí AI. Identifikovali jsme několik neuronů reagujících jenom na stimulaci BBN, které mohou být součástí okrajové oblasti, rostrálně od AAF.

Neuronů lokalizované v oblastech AI, AAF, SRAF a PAF odpovídaly typicky na stimulaci čistým tónem s jasně identifikovatelnou charakteristickou frekvencí (CF) (Obr. 10. B). CF v našem pokusu byly zaznamenány v rozsahu 0,7 až 36 kHz. Na základě CF, lze určit tonotopické gradienty v AI, AAF a SRAF, přičemž gradient v SRAF byl nejméně průkazný. Neuronů v PAF reagovaly na stimulaci v rozsahu 8,5 až 20 kHz bez evidentního tonotopického uspořádání. Reverzní změna směru tonotopického gradientu je celkem spolehlivý nástroj na určení hranic sluchových polí, zejména mezi AI a AAF.



Obr. 10. Mapa polí sluchové kůry dle CF vpravo. A. Příklad individuální mapy CF z pravé AC (čísla odpovídají CF v místě měřícího místa, černé tečky znamenají měřící místa, kde neurony odpovídaly jenom na stimulaci BBN, X znamená místo kde neurony nereagovaly na BBN nebo čisté tóny). B. Deset individuálních map bylo použito k vytvoření schematické mapy AC. Schematická mapa vznikla proložením map na základě tonotopické organizace a hranic mezi AI, AAF a okrajovou oblastí. K orientaci byly použity arteria cerebri media (MCA) a vena suprarhinalis; jejich pozice ale byla vysoce individuální. Frekvenčně intenzitní oblast (FRA) z AI (B 1) s ostře ohraničenou frekvenční křivkou s výraznou charakteristickou frekvencí (CF), neuron z UR (B 2) odpovídá jenom na zvuky s vysokou intenzitou, u neuronů z okrajové oblasti (B 3) chybí odpověď na čisté tóny. V obrázcích B1, 2 a 3 černé tečky reprezentují vyvolanou odpověď (porovnání reakci v průběhu stimulace a spontánní aktivity); čím větší je rozdíl mezi vyvolanou a spontánní aktivitou, tím větší je tečka, pokud byla odpověď menší než spontánní aktivita, byl použit prázdný kroužek.

Mediálně od společné hranice AI a AAF je vmezeřena nescifická oblast (UR). Neurony UR sice odpovídaly na stimulaci BBN a čistým tónem, ale bez jednoznačné CF (i při stimulaci nejvyššími frekvencemi jsme nebyli schopni nalézt vrchol označující CF). Reakce na stimulaci čistým tónem byla přítomna jenom při intenzitě stimulu 60 dB a více.

Několik neuronů odpovídalo jenom na stimulaci čistými tóny. Tyto neurony byly náhodně rozmístěny ve všech sluchových polích, bez závislosti na CF; 42 neuronů v AI (6,1 %), 13 v AAF (4,1 %), 14 v SRAF (4 %), 2 v PAF (1,4 %) a 6 v UR (1,9 %). Na druhou stranu jsme v centrálních polích našli i neurony odpovídající jenom na stimulaci BBN (podobně jako neurony v okrajové oblasti);

24 takových neuronů bylo nalezeno v AI (3,5 %), 28 v AAF (8,8 %), 25 v SRAF (7,2 %), 2 v PAF (1,4 %) a 40 v UR (12,6 %).

Většina neuronů v centrálních polích měla frekvenční prahovou křivku (frequency response area – FRA) tvaru V nebo U, ale identifikovali jsme i neurony reagující na velice úzké spektrum frekvencí nebo naopak s širokou FRA, nebo bez jednoznačně vyhraněné CF (komplexní). Tyto neurony byly náhodně rozmístěné v AC, bez specifické hloubky a v jejich okolí byly lokalizovány standardně odpovídající neurony.

5.1.2 Změna CF dle měřicího místa a hloubky

Neurony z jednoho měřicího místa nezávisle na umístění snímacího kanálu v hloubce měly téměř vždy podobnou CF (U/V typ FRA) s variabilitou $0,34 \pm 0,035$ oktávy ve AAF, $0,36 \pm 0,043$ v AI, $0,43 \pm 0,039$ v SRAF a $0,33 \pm 0,071$ v PAF (jednocestná Anova, Tukeyho korekce, rozdíly nejsou statisticky signifikantní). Identifikovali jsme několik neuronů, které měly komplexní FRA bez jednoznačné CF a většinou byly lokalizovány do jednoho měřicího místa (avšak různých snímacích kanálů). Největší počet neuronů s komplexní FRA byl nalezen v AAF (20,8 %), dále na 18,2 % měřicích míst v PAF, 14,7 % v SRAF a nejméně v AI 12,5 %.

5.1.3 Typy neuronových odpovědí

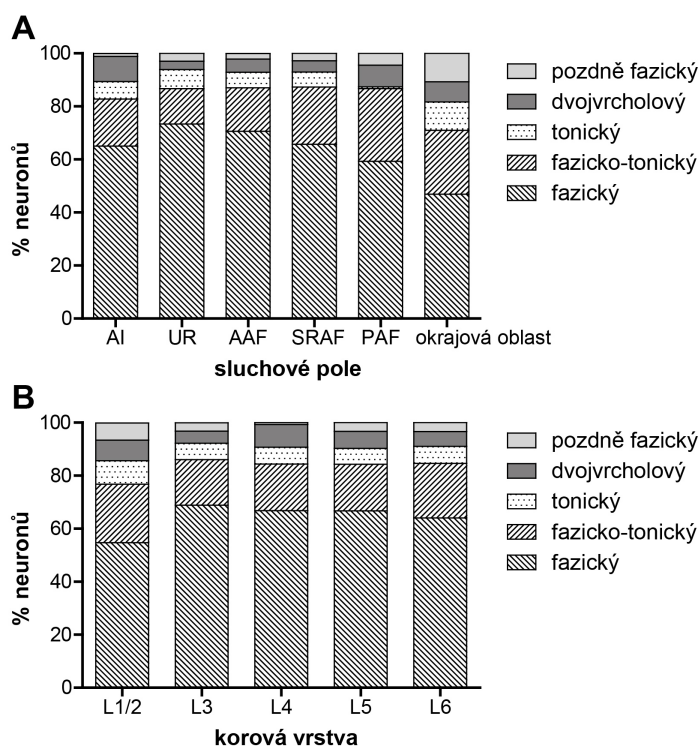
Všechny neurony byly rozděleny do 3 skupin (on, off a pozdní off) na základě jejich odpovědi na stimulaci BBN v rámci specifické časové periody. „On“ odpovědi neuronů (87,94 %) spadaly do periody 12–72 ms od začátku zvukové stimulace. Off odpovědi (6,03 %) a pozdní off odpovědi (6,03 %) byly charakterizovány začátkem reakce až po ukončení zvukové stimulace, buď v průběhu off periody, pozdní off periody, nebo obou.

Nejvíce neuronů s typem reakce off bylo nalezeno v SRAF (10,53 %) a nejméně v UR (3,03 %). Neurony reagující v průběhu pozdní off periody byly hlavně v AAF (7,96 %) a nejméně v PAF (2,1 %). Analýza typu odpovědi na

základě pozice v jednotlivých vrstvách ukázala, že dominují neurony reagující v on periodě nezávisle na vrstvě; podobně i neurony s pozdní off reakcí byly častější téměř ve všech vrstvách než neurony reagující v průběhu off periody (vrstva 1/2 obsahuje 82,8 % on, 6,5 % off a 10,7 % pozdních off odpovědí; vrstva 3 obsahuje 85,8 % on, 5,9 % off a 8,2 % pozdních off odpovědí; vrstva 4 obsahuje 88,5 % on, 4,1 % off a 7,4 % pozdních off odpovědí; vrstva 5 obsahuje 90,8 % on, 5,1 % off a 4,1 % pozdních off odpovědí; a vrstva 6 obsahuje 92 % on, 3,7 % off a 4,3 % pozdních off odpovědí).

Detailnější klasifikace neuronů reagujících v průběhu on periody vychází s analýzy PSTH. Neurony byly rozděleny do 5 kategorií odpovědí: fazické, fazicko-tonické, tonické, dvojrcholové, pozdně-fazické (Obr. 11. B). Pozdně-fazická kategorie byla vytvořena dle histogramu nejkratších latencí odpovědí na BBN stimulaci (Obr. 11. A).

Ve všech sluchových polích byl nejčastější fazický typ, s nejvyšším výskytem v UR (74,52 %) a nejnižším v okrajové oblasti (52,82 %). Druhý nejčastější typ on odpovědi byl fazicko-tonický, který je charakterizován přetrváváním vyvolané aktivity po počátečním fazickém vrcholu. Fazicko-tonický byl nejčastější v PAF (31,11 %) a nejméně častý v UR (13,22 %) (Obr. 11. A). VAAF, UR, SRAF a okrajové oblasti byl třetím nejčastějším typem tonická odpověď (průměrná délka vyvolané odpovědi byla v rozsahu $31,59 \pm 1,29$ v UR a $35,88 \pm 1,75$ ms v AI). V PAF nebyly nalezeny neurony s tonickým typem odpovědi. V AI (10,09 %) a PAF (8,15 %) byl třetím nejčastějším typem dvojrcholová odpověď. Typ pozdně fazický se nejčastěji vyskytoval v okrajové oblasti (8,87 %) a nejméně v AI (0,35 %). Některé neurony neodpovídali žádnému typu odpovědi i přesto, že jejich reakce v průběhu zvukové stimulaci byla jasně vyšší než spontánní aktivita (nebyly pro další statistiku použity).



Obr. 11. Zastoupení typů neuronálních odpovědí na základě příslušnosti k sluchovým polím (A) a vrstvě AC (B). A. Zastoupení jednotlivých typů neuronálních odpovědí v průběhu on periody v centrálních sluchových polích a okrajové oblasti. Poměr vyšetřených neuronů v různých vrstvách byl konstantní pro všechny sluchová pole. B. Zastoupení typů neuronálních odpovědí v průběhu on periody v závislosti na poloze ve vrstvách AC.

Když jsme vzali do úvahy pozici neuronů v sluchové vrstvě a typ odpovědi, ve všech dominoval fazický a nejméně častý byl pozdně fazický typ. Na druhou stranu, byla ale frekvence výskytu fazických neuronů v 1/2 vrstvě (54,8 %) výrazně nižší oproti ostatním (L3 68,9 %, L4 66,8 %, L5 66,7 %, L6 63,9 %) (Obr. 11. B). Reprezentace pozdně fazické odpovědi byla naopak zcela obrácena, nejčastější byla v 1/2 vrstvě (6,5 %) a nejméně častá ve 4. vrstvě (0,7 %).

5.1.4 Latence

Průměrné latence odpovědí neuronů na stimulaci BBN se lišily v různých oblastech AC. Na základě hloubky elektrody a pozice jednotlivých snímacích kanálů byl vytvořen hloubkový profily odpovědí a dle práce Games a Winer (1988) byly vytvořené laminární profily latencí odpovědí. Nejkratší latence byly nalezeny v úrovni L4 a L6 a naopak nejdelší latence v povrchové vrstvě L1/2. Podobné rozložení bylo nalezeno v celé AC s výraznými rozdíly mezi jednotlivými poli. Při porovnání celkových latencí (odpovědi ze všech neuronů

s proporcionálním zachováním zastoupení pro jednotlivé vrstvy) (Tab. 1.), nejkratší latence byly v AI ($17,80 \pm 0,16$), UR ($19,84 \pm 0,2$), AAF ($19,94 \pm 0,2$), SRAF ($20,90 \pm 0,31$) a PAF ($20,90 \pm 0,3$) a nejdelší latence byla v okrajové oblasti ($23,69 \pm 0,3$); (***) AI vs. UR, AAF, SRAF, PAF, okrajová oblast; okrajová oblast vs. UR, AAF, SRAF, PAF, ** UR vs. PAF, * UR vs. SRAF; AAF vs. SRAF, PAF; jednocestná Anova, Tukeyho korekce).

	AI	AAF	pHFF	SRAF	PAF	okrajová oblast
L 1/2	19,21±0,79	21,39±1,07	24,16±0,95	22,21±0,66	22,12±0,92	24,78±0,78
L 3	17,19±0,37	18,63±0,41	18,61±0,36	19,55±0,35	20,85±0,47	22,39±0,56
L 4	16,37±0,34	17,69±0,36	18,23±0,3	18,39±0,44	19,58±0,37	20,76±0,6
L 5	17,28±0,32	19,15±0,31	19,21±0,32	20,38±0,4	20,39±0,5	23,53±0,50
L 6	16,81±0,34	18,28±0,33	18,44±0,24	18,89±0,35	20,12±0,43	21,84±0,45

*P<0.05; **P<0.001; ***P<0.0001; ANOVA (Tukeyho korekce)

* L3 AAF vs. L3 PAF, L3 pHFF vs. L3 PAF, L6 AI vs. L6 AAF

** L1/2 AI vs. L1/2 pHFF, L4 AI vs. L4 pHFF, L4 AI vs. L4 SRAF, L4 SRAF vs. L4 okrajová oblast, L5 AI vs. L5 AAF, L6 AI vs. L6 pHFF

*** L1/2 AI vs. L1/2 okrajová oblast, L3 AI vs. L3 SRAF, L3 AI vs. L3 PAF, L3 AI vs. L3 okrajová oblast, L3 AAF vs. L3 okrajová oblast, L3 SRAF vs. L3 okrajová oblast, L4 AI vs. L4 PAF, L4 AI vs. L4 okrajová oblast, L4 AAF vs. L4 okrajová oblast, L4 pHFF vs. L4 okrajová oblast, L5 AI vs. L5 pHFF, L5 AI vs. L5 SRAF, L5 AI vs. L5 PAF, L5 AI vs. L5 okrajová oblast, L5 AAF vs. L5 okrajová oblast, L5 pHFF vs. L5 okrajová oblast, L5 SRAF vs. L5 okrajová oblast, L5 PAF vs. L5 okrajová oblast, L6 AI vs. L6 SRAF, L6 AI vs. L6 PAF, L6 AI vs. L6 okrajová oblast, L6 AAF vs. L6 okrajová oblast, L6 pHFF vs. L6 okrajová oblast, L6 SRAF vs. L6 okrajová oblast

Tab. 1. Tabulka minimálních latencí odpovědí v různých vrstvách a polích AC (průměrná minimální latence \pm SEM).

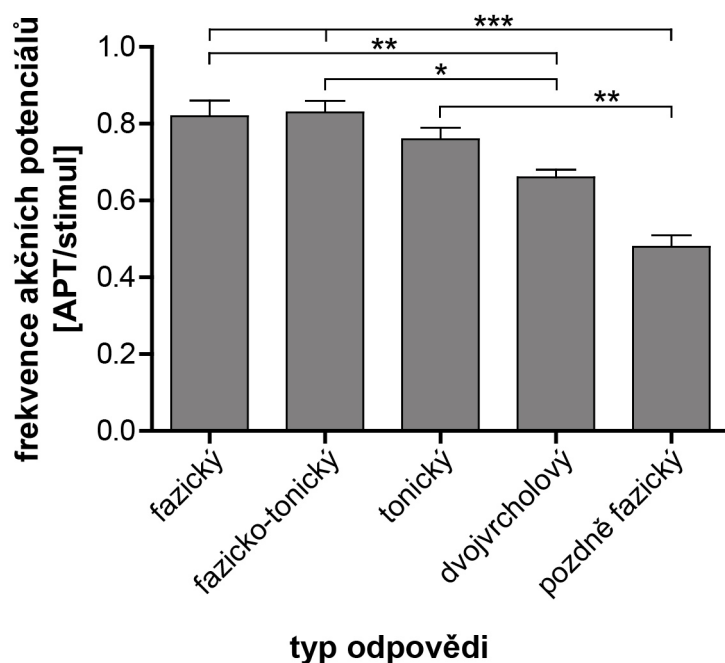
5.1.5 Velikost odpovědi

Vyvolaná frekvence akčních potenciálů jednotlivých neuronů při stimulaci BBN v průběhu on periody byla porovnána mezi jednotlivými vrstvami a poli AC (Obr. 12.). Nejmenší počet vyvolaných APT byl v L1/2 ($0,65 \pm 0,03$), což bylo signifikantně odlišné od L3 ($0,83 \pm 0,03$), L4 ($0,84 \pm 0,04$), L5 ($0,8 \pm 0,03$) a L6 ($0,8 \pm 0,03$). Při porovnání velikosti odpovědi mezi vrstvami L3 – L6 nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl. Podobná analýza byla doplněna i v rámci individuálních polí, ale opět nebyl nalezen signifikantní rozdíl.

Velikost odpovědi byla dále korelovaná s minimální latencí pro každé sluchové pole. V okrajové oblasti nebyla nalezena žádná korelace ($r^2 = 0,0008690$, deviace od 0 není signifikantní). Z centrálních sluchových polí byla

největší korelace nalezena v PAF ($r^2 = 0,07696$), ve všech polích kromě okrajové oblasti byla korelace signifikantní.

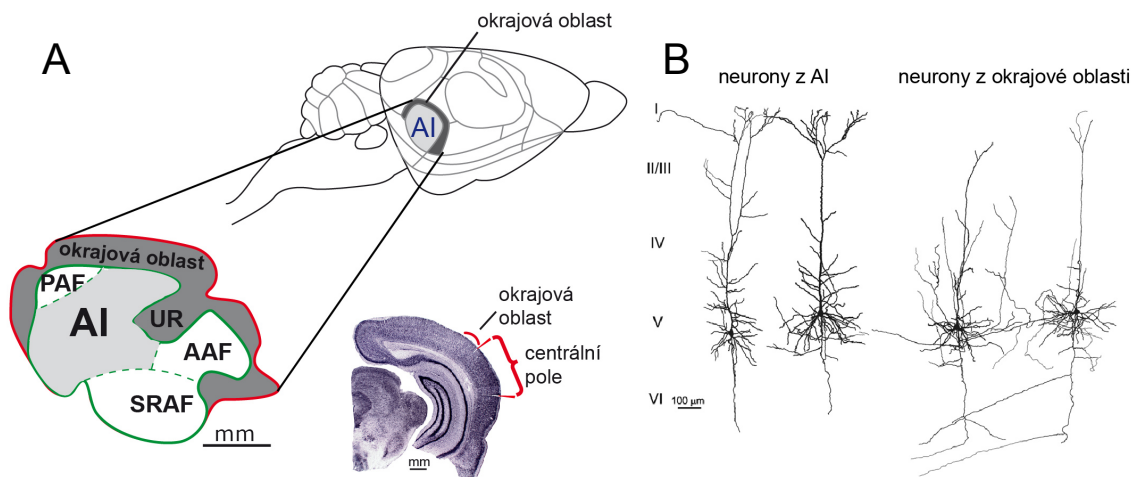
Velikost odpovědi korelovaná s typem odpovědi ukázala, že nejnižší odpověď byla u pozdního fazického typu ($0,48 \pm 0,03$) a nejvyšší u typu fazicko-tonického ($0,48 \pm 0,03$) a tonického ($0,82 \pm 0,02$) typu.



Obr. 12. Vztah mezi velikostí a typem neuronální odpovědi ($p=0,05$, jednocestná Anova, Tukeyho korekce).

5.2 Nepublikované výsledky

Rozdíly v akusticky vyvolaných odpovědích, snímaných z jednotlivých oblastí sluchové kůry potkana, naznačují, že neurony z těchto oblastí zpracovávají příchozí signály odlišně. Převod vstupní informace na výstupní signál u neuronů obecně závisí na jejich pasivních a aktivních elektrických vlastnostech. Rozhodli jsme se proto zkoumat tyto vlastnosti u pyramidových neuronů 5. vrstvy sluchové kůry (obr. 13. B). Vzhledem k tomu, že in vivo odpovědi vykazovaly největší rozdíly mezi primární sluchovou kůrou (AI) a okrajovou oblastí a stejně tak i technické rozlišení těchto dvou oblastí bylo nejjednodušší, zvolili jsme tyto dvě oblasti pro naše pokusy (Obr. 13. A).



Obr. 13. A. Způsob identifikace a označení sluchových oblastí (centrální pole a okrajová oblast) při vyšetření metodou terčíkového zámku. B. Registrované pyramidové buňky byly lokalizovány v 5. vrstvě AC. Po změření eletrofyzilogických vlastností byly buňky naplněny biocytinem s cílem přesné identifikace polohy v kůře.

Výsledky naší analýzy elektrických vlastností neuronů AC ukázaly 2 převažující podtypy: neurony odpovídající na depolarizační stimuly salvou akčních potenciálů o vysoké frekvenci (FS) a neurony odpovídající akčními potenciály o nízké frekvenci (RS). RS neurony dominovaly v obou částech AC. Pasívní elektrické vlastnosti neuronů obou oblastí byly odlišné (Tab. 2). RS neurony z AI vykazovaly signifikantně vyšší klidový potenciál a jejich vstupní odpor a časová konstanta membrány byla o 30 % vyšší než u RS z okrajové oblasti.

Parametr	Zkratka	Centrální pole AC (n=66)	Okrajová oblast (n=55)
Klidový membránový potenciál	E_m (mV)	$-76,2 \pm 2,9^*$	$-77,6 \pm 2,7^*$
Časová konstanta membrány	τ_m (ms)	$17,9 \pm 4,9^{**}$	$22,2 \pm 8,8^{**}$
Vstupní odpor membrány	R_m (M Ω)	$145,6 \pm 42,8^*$	$165,4 \pm 35,9^*$
Prah akčního potenciálu (AP)	E_{thr} (mV)	$-53,1 \pm 2,5$	$-53,8 \pm 2,1$
Prahový stimul	I_{thr} (pA)	$69,4 \pm 33,2^{**}$	$101,2 \pm 33,6^{**}$
Frekvence AP	f_{ss} (Hz)	$51,0 \pm 15,9^*$	$43,2 \pm 9,8^*$
Čas do odpálení AP	t_{delay} (ms)	$5,4 \pm 2,9^*$	$7,3 \pm 4,1^*$
Amplituda AP	AP_{amp} (mV)	$128,5 \pm 5,9$	$128,7 \pm 8,0$
Hyperpolarizací aktivované kationtové proudy	I_h (nA)	$0,54 \pm 0,3^*$	$0,39 \pm 0,2^*$
Výskyt hyperpolarizací aktivovaných proudů	I_h/c (pA/pF)	$4,0 \pm 1,8^{**}$	$2,5 \pm 1,6^{**}$

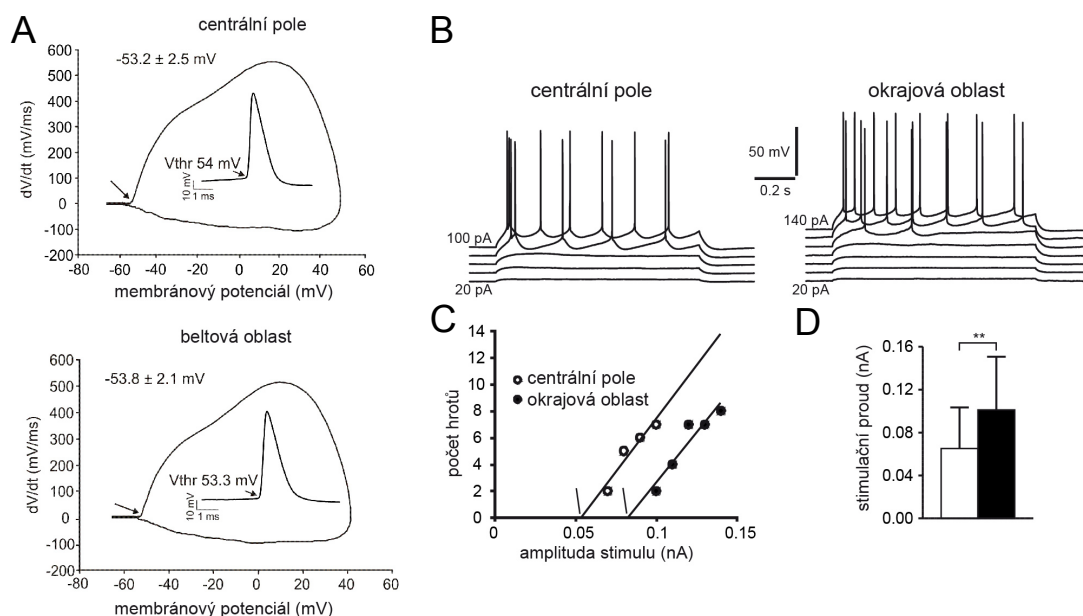
\pm SD

* $P < 0,05$; t-test

** $P < 0,01$; t-test

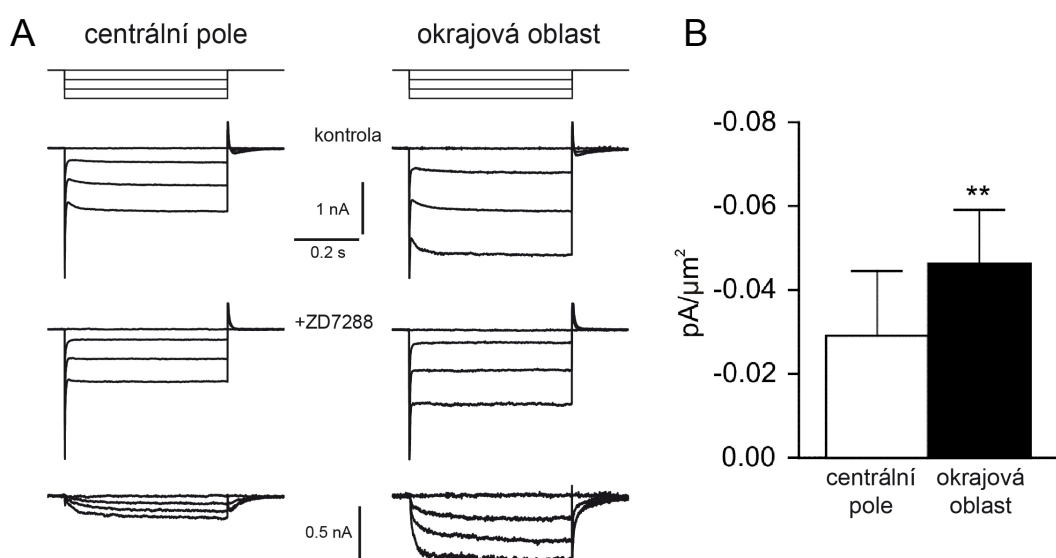
Tab. 2. Elektrické vlastnosti neuronů 5. vrstvy z AI a okrajové oblasti.

Porovnání průběhu akčních potenciálu ukázalo, že RS neurony z AI mají APT s vyšší amplitudou, pálí vyšší frekvencí a mají nižší průměrnou reobázi (Obr. 14). Tyto výsledky naznačují, že rozdíl mezi neurony AI a okrajové oblasti se liší klidovou excitabilitou.



Obr. 14. Nižší excitabilita neuronů okrajové oblasti. A. Klidové napětí bylo stejné u neuronů z AI a okrajové oblasti, se významným rozdílem v reobázi (amplituda prahového stimulu). B. Porovnání různých amplitud stimulace a frekvence vyvolaných akčních potenciálů v centrálních polích a okrajové oblasti s proložením lineární regrese (C) potvrdilo významný rozdíl v reobázi (D) (nepárový t test, ** $p < 0,01$).

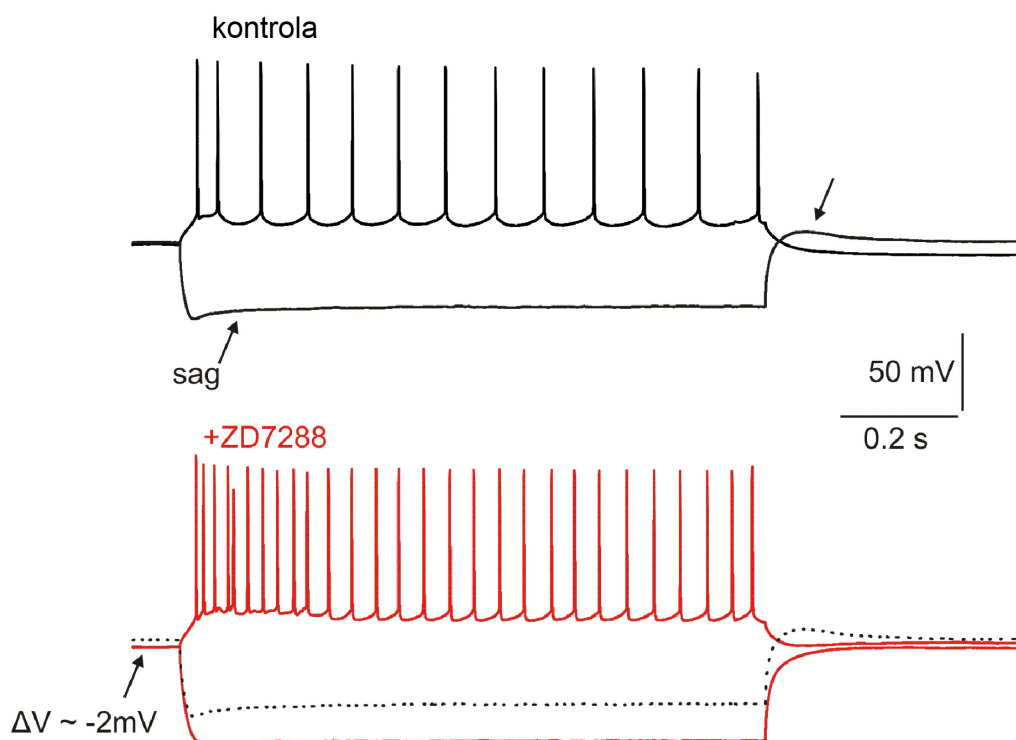
V dalších pokusech jsme proto zkoumali, zdali se neurony neliší obsahem iontových kanálů aktivovaných na úrovni klidového membránového potenciálu. Zjistili jsme nerovnoměrné zastoupení hyperpolarizací aktivovaných kationtových proudů, které bylo vyšší v neuronech z okrajové oblasti o asi 40 % oproti AI (Obr. 15). Vzhledem k tomu, že blokováním I_h pomocí selektivního blokátoru ZD 7288 došlo k vyrovnání pasívních vlastností neuronů z AI a okrajové oblasti, je I_h pravděpodobně hlavním faktorem ovlivňujícím klidové elektrické vlastnosti okrajových neuronů. Dalším efektem I_h proudů je vznik „sagu“ (drobné depolarizační napětí při stimulaci hyperpolarizačním proudem), který je často následován „rebound spikem“, který vzniká při deaktivaci I_h (Obr. 16).



Obr. 15. Vyšší výskyt napětím řízených proudů (I_h) v okrajové oblasti. A. Porovnání amplitud I_h v okrajové oblasti a AI při stimulaci hyperpolarizačními stimuly s a bez specifického blokátoru I_h (ZD 7288). B. Porovnání četnosti výskytu I_h v centrálních polích a okrajové oblasti při normalizaci velikosti neuronů (nepárový t test, ** $p < 0,01$).

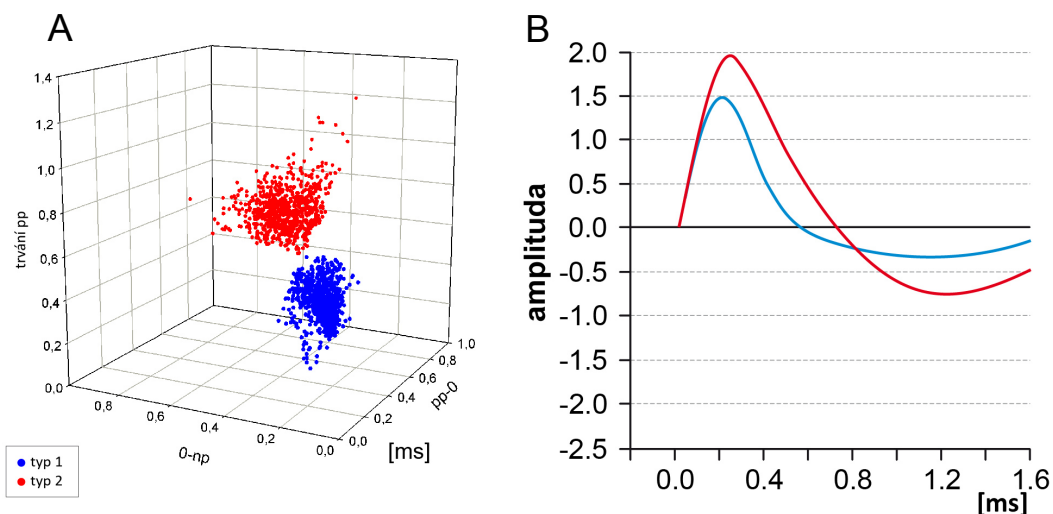
Na základě předchozích zjištění, jsme se zaměřili na průběh posthyperpolarizační fáze (AHP) APT neuronů z obou oblastí AC. Zde se opět potvrdilo, že neurony z AI mají signifikantně delší repolarizaci než neurony z okrajové oblasti i přesto, že amplituda AHP okrajových neuronů je signifikantně vyšší. Asymetrie v průběhu AHP mezi AI a okrajovými neurony se

potvrdila i při repetitivní stimulaci. Při krátkém intervalu mezi stimuly (100 ms) byla variabilita lehce výraznější u okrajových neuronů, při prodloužení interstimulačního intervalu (150 ms) se naopak variabilita APT okrajových neuronů nezměnila ale u neuronů z AI výrazně zvýšila, což je v souladu s větší koncentrací I_h a jejich vlivem na průběh AHP u okrajových neuronů.



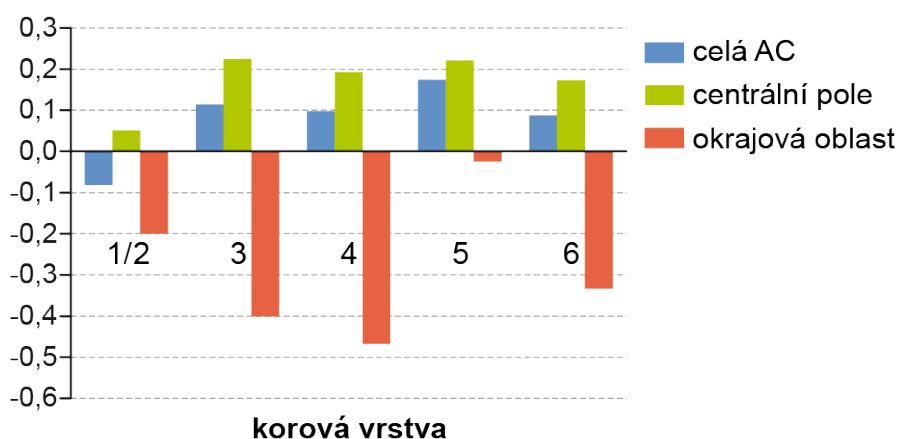
Obr. 16. Zvýšení frekvence akčních potenciálů při specifické blokádě I_h u neuronů z okrajové oblasti. Hyperpolarizace způsobila elevaci klidového napětí o 2 mV u okrajových neuronů. Hyperpolarizační pulz standardně vyústil do vzniku „sagu“, který po blokádě I_h vymizel.

Vzhledem k jednoznačné rozdílnosti vnitřních vlastností neuronů z AI a okrajové oblasti, jsme opět extracelulárně snímali zvukem (širokospektrální šum) vyvolanou aktivitu na časově se různě měnící stimulaci s cílem charakterizovat rozdílné neuronové populace v AI a okrajové oblasti i při extracelulárním snímání. Nutností byla off-line selekce na jednotkovou aktivitu a následná analýza průběhu APT.



Obr. 17. A. Na základě 3 kritérií časového průběhu posthyperpolarizační fáze (AHP) akčního potenciálu (APT) byly neurony rozděleny na 2 typy. Prvním kritériem byl čas od pozitivního vrcholu (PP) po 0, druhým kritériem čas od 0 po negativní vrchol (NP), třetím kritériem byla délka trvání PP. B. Průměry průběhu AHP u neuronů typu 1 (PP-0: $0,2420 \pm 0,04798$; 0-NP: $0,1702 \pm 0,04769$, PP: $0,4588 \pm 0,06145$) a neuronů typu 2 (PP-0: $0,5037 \pm 0,07054$; 0-NP: $0,4303 \pm 0,08124$; délka trvání PP: $0,7556 \pm 0,07802$)

Analýza průběhu extracelulárně snímaného AHP ukázala 2 subpopulace neuronů typ 1 a typ 2, které se liší časovým průběhem (3 základní kritéria: 1. čas od pozitivního vrcholu po 0, 2. čas od 0 po negativní vrchol, 3. délka trvání pozitivního vrcholu měřená při 0 amplitudě) (Obr. 17). Výpočet distribučního indexu zastoupení podtypů neuronů v různých vrstvách AC a pak i samostatně v AI a okrajové oblasti ukázal, že v okrajové oblasti dominuje typ 2, naopak v AI respektive celé AC je častěji zastoupen typ 1. Neurony 2. typu jsou více zastoupeny v povrchových vrstvách AC (Obr. 18). Neurony 1. typu výrazněji reagují na zvýšení intenzity zvukového stimulu oproti neuronům 2. typu. Prodlužování intervalu mezi stimuly a prodlužování délky stimulu potvrzuje rozdílnost mezi podtypy neuronů, ale data nejsou statisticky signifikantní.

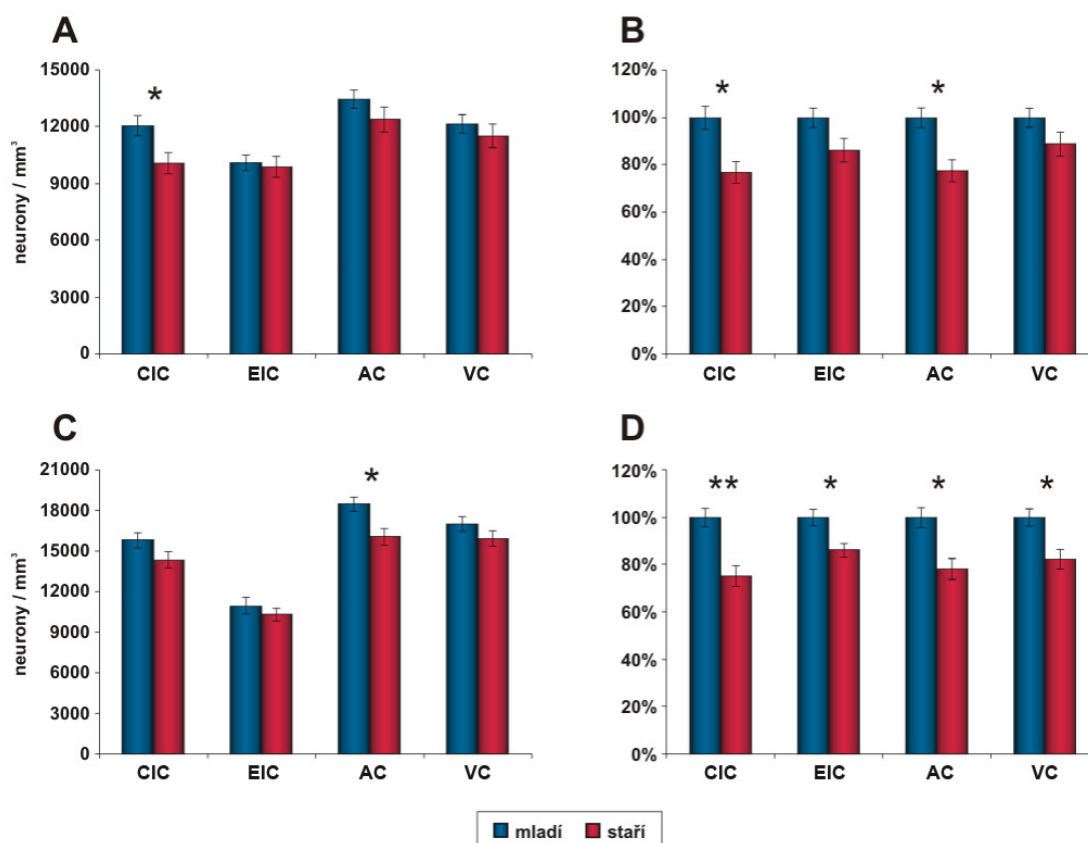


Obr. 18. Zastoupení neuronálních typů v centrálních polích, okrajové oblasti a celé AC a v rámci jednotlivých vrstev kůry. Z důvodu většího množství neuronů typu 1 byl index distribuce vypočítán (nm. neuronů typu 1 - nm. neuronů typu 2 / nm. neuronů typu 1 + nm. neuronů typu 2) s cílem porovnat zastoupení každého typu v korové vrstvě (pozitivní hodnoty zn. převahu typu 1, negativní hodnoty typu 2).

Výsledky analýzy extracelulárně snímaného průběhu APT, resp. jeho AHP jasně ukazují možnost identifikace neuronálních typů, které pravděpodobně zrcadlí vnitřní vlastnosti neuronů a jejich dělení na RS a FS.

5.3 Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana

V oblasti centrálního jádra IC byla nalezena poměrně velká variabilita GAD+ buněk týkající se tvaru, velikosti a intenzity barvení, v externí kůře byly typické malé neurony se shluky intenzivně nabarveného neuropilu a v dorzální kůře dominovaly malé GAD+ buňky. Změny ve stáří byly identifikovány v centrálním jádře IC, kde se snížila optická denzita GAD65 a 67+ somat o 27 % ($p=0,015$) a 25 % ($p=0,015$), sice došlo i ke snížení GAD+ buněk (14 % a 9 %), ale tato změna byla nesignifikantní. V externí kůře IC jsme našli jenom snížení optické denzity ve stáří (16 % ($p=0,03$) a 14 % ($p=0,03$)), bez efektu na počet buněk (Obr. 19). Analýza výsledku western-blotu ukázala statisticky signifikantní pokles hladin obou GAD proteinů u starých zvířat (51 % a 49 % (oboje $p=0,002$)) (Obr. 20). V případě western-blotové analýzy nešlo rozlišit podoblasti IC.

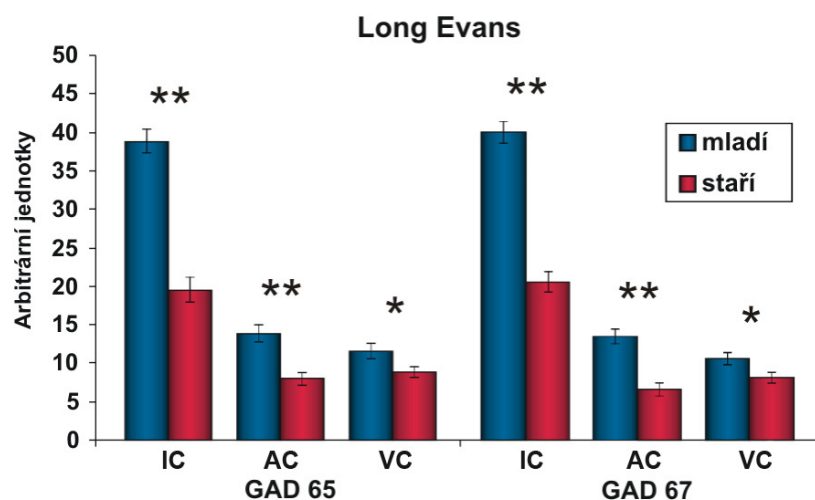


Obr. 19. Výsledky kvantitativního vyhodnocení imunoreaktivity GAD65 a GAD67 u kmene Long Evans. Modré sloupečky označují mladá zvířata, červené stará zvířata. Chybové úsečky představují S.E.M.

A, B) Počet a optická denzita GAD65-imunoreaktivních neuronů v CIC, EIC, AC a VC u mladých (n=4) a starých (n=4) zvířat kmene Long Evans.

C, D) Počet a optická denzita GAD67-imunoreaktivních neuronů v CIC, EIC, AC a VC u mladých (n=5) a starých (n=5) zvířat kmene Long Evans (* - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$).

V AC potkana byly GAD+ neurony přítomny ve všech vrstvách a s vyšší denzitou v 1.-4. vrstvě, bez zjevné asymetrie změn spojených se stářím. Imunohistochemické výsledky byly podobné nálezům v IC, s poklesem optické denzity o 20 % ($p=0,015$) u GAD 65+ a o 22 % ($p=0,015$) u GAD 67+ neuronů. Výraznější pokles v počtu neuronů byl u GAD 67+ (13 %, $p=0,03$) oproti GAD 65+ (o 8 %) (Obr. 19). Western-blot ukázal opět výraznější pokles obou proteinů v kůře starých zvířat (GAD65 o 43 % a u GAD67 o 52 % (oboje $p=0,002$)). Při porovnání množství proteinů mezi IC a AC se ukázala téměř 3krát vyšší hladina v IC ($p < 0,001$), rozdíl nebyl ovlivněn stářím zvířat (Obr. 20).

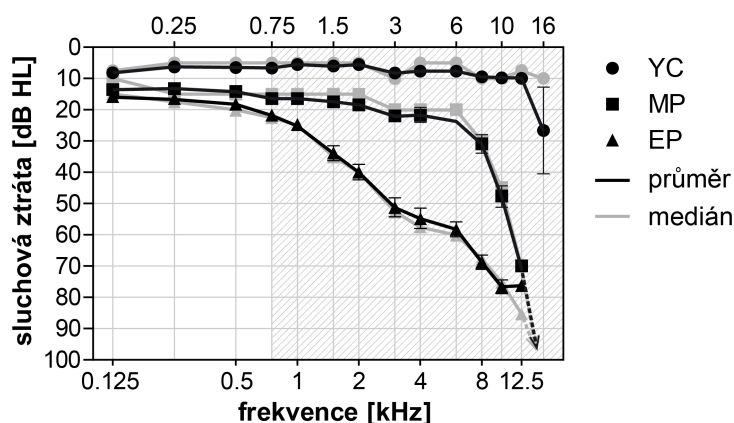


Změny v zrakové kůře měly podobný charakter jako v AC, ale byly méně výrazné (o 12 % pro GAD 65+ - nesignifikantní a o 18 % pro GAD 67+ neurony, $p=0,03$), přičemž se ale počet GAD+ buněk téměř nesnížil (cca o 5 %, nesignifikantní rozdíl). Hladiny proteinů opět s věkem poklesly (GAD65 o 22 %, $p=0,041$ a GAD67 o 20 % , $p=0,028$), ale jejich snížení nebylo tak výrazné jako u sluchových struktur. Porovnání celkového množství proteinu ukázalo vyšší hodnoty v AC než v zrakové kůře u mladých potkanů (v případě GAD67 signifikantně, $p < 0,05$), přičemž ve stáří došlo k vyrovnání hodnot. Celkově pokles proteinů způsoben stářím byl vyšší v sluchovém systému (IC i AC) oproti zrakové kůře ($p < 0,05$).

5.4 Audiologické změny ve stáří

V rámci MRI experimentů byly vždy vyšetřeny 3 skupiny, rozdělené dle věku a sluchových prahů na YC, MP a EP (viz Materiál a metody). I přesto, že se nejednalo vždy o stejné dobrovolníky (skladba se lišila mezi spektroskopickými, morfometrickými a fMRI experimenty), definitivní rozdíly v audiologických výsledcích byly minimální, proto zde uvádím jenom audiologické výsledky fMRI experimentu, které jsou nejpodrobnější.

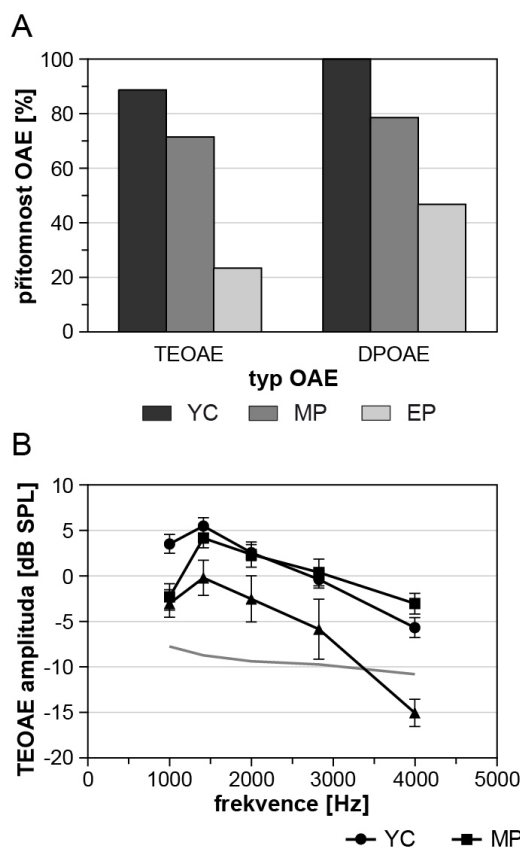
Skupina YC měla sluchové prahy do 20dB, a tedy nepřesáhla hranici fyziologického sluchu. Na základě naměřených sluchových prahů a následném porovnání s normou ISO 7029 (specifickou pro věk dobrovolníka), byly dobrovolníci starší 65 let rozděleni do 2 skupin. Skupina MP měla fyziologické prahy srovnatelné s YC až po frekvenci 4 kHz (Obr. 21). Nad 4 kHz se postupně prahy zvyšovaly až po úroveň sluchové ztráty 70 dB na 12,5 kHz, jenom 4 dobrovolníci měli zachovaný sluch na 16 kHz (skupina pro fMRI; u spektroskopie a morfometrie nebyl žádný dobrovolník se zachovaným sluchem na 16 kHz). Kritéria použitá k odlišení MP a EP vycházela ze zjištění Jilek et al. (2014). Sluchové prahy skupiny EP přesáhly fyziologickou hranici na úrovni 1 kHz a postupně se zvyšovaly až po 76 dB na 12,5 kHz, bez sluchového vjemu při stimulaci 16 kHz tónem. Při porovnání levého a pravého ucha nebyly signifikantní rozdíly, proto byly použity sluchové prahy z obou uší bez rozlišování laterality.



Obr. 21. Výsledky vysokofrekvenční tónové audiometrie u všech 3 skupin (průměr ± SEM a medián; v případě že nebyl přítomen sluchový vjem práh byl stanoven na 110 dB SPL).

TEOAE byly přítomné v 86 % uší YC s průměrnou amplitudou $10,4 \pm 0,7$ dB SPL. Skupina MP měla výbavné TEOAE v 71,4 % uší s amplitudou $9,6 \pm 0,9$ dB

SPL (Obr. 21 A). Významný pokles v obou parametrech byl u skupiny EP, kdy výbavnost TEOAE byla 23,3 % a amplituda $5 \pm 1,6$ dB. Při porovnání amplitud byl nalezen signifikantní rozdíl mezi YC a EP ($p < 0,001$; jednocestná Anova, Tukeyho korekce) a mezi EP a MP ($p < 0,05$; jednocestná Anova, Tukeyho korekce). Rozdíl mezi YC a MP nebyl statisticky signifikantní (Obr. 21 B). Frekvenčně specifické TEOAE byly přítomny na všech stimulovaných frekvencích (1-4 kHz) u YC a MP, u EP jenom na frekvencích ≤ 2 kHz.

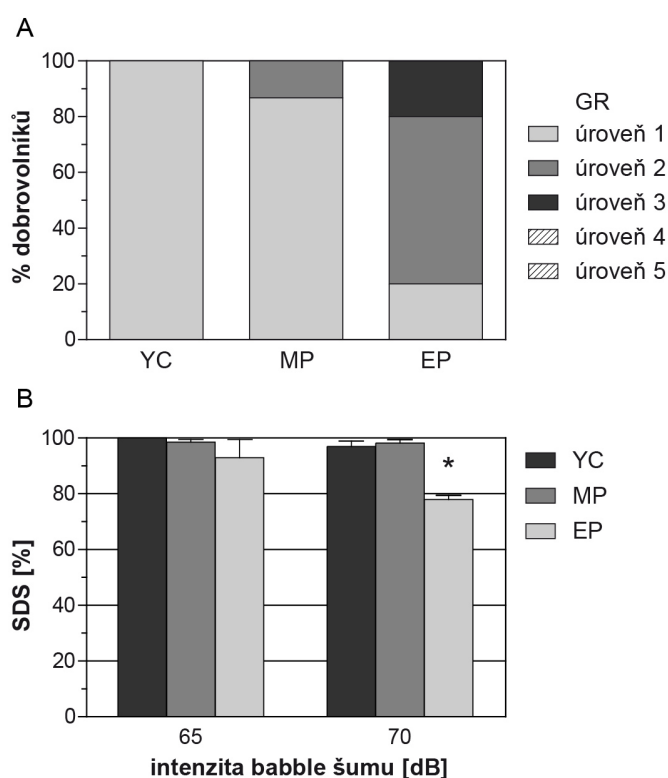


Obr. 21. TEOAE a DPOAE měřené u všech 3 skupin. A. Přítomnost OAE ve všech vyšetřených uších a skupin. B. Frekvenčně selektivní TEOA (průměrné amplitudy \pm SEM). C. Frekvenčně selektivní DPOAE (průměrné amplitudy \pm SEM).

DPOAE byly výbavné u 100 % uší ve skupině YC, v 78,6 % u MP a 46,6 % u EP (Obr. 21 A). Amplitudy DPOAE přesahovaly šum na všech měřených frekvencích kromě 8 kHz u YC a MP. Porovnání amplitud mezi YC a MP potvrdilo signifikantní rozdíly na všech frekvencích kromě 6 kHz ($p < 0,05$ pro 1,5, 2, 4 kHz; $p < 0,01$ pro 1 kHz; $p < 0,001$ pro 3 kHz; jednocestná ANOVA, Tukeyho korekce) (Obr. 21 C). DPOAE u EP skupiny byly přítomny jenom na frekvencích ≤ 2 kHz, s amplitudami srovnatelnými s MP skupinou. U všech skupin byla největší

amplituda odpovědi přítomna na 1,5 kHz (11,6 dB SPL u YC, 5,7 dB SPL u MP a 5,3 dB SPL u EP).

Skóre rozumění řeči (SDS) v tichu bylo měřeno na 65 dB a procentuální výsledek byl korelován s PTA ke zhodnocení kvality sluchu dle Gardner Robertsonovy klasifikace (GR). Všichni dobrovolníci ze skupiny YC dosáhli 1. úrovně, u MP 13 % kleslo do 2. úrovně, přičemž úroveň 1 a 2 je hodnocena jako užitečný sluch. Ve skupině EP dosáhlo 19 % úrovně 1, 61 % úrovně 2 a 20 % úrovně 3, co je již hodnoceno jako neužitečný sluch (Obr. 22 A).



Obr. 22. Výsledek testu rozumění řeči (SDS) u všech 3 skupin.

A. Užitečnost sluchu hodnocena dle Gardner-Robertsonovy klasifikace. B. SDS vyšetřeno s babble šumem v pozadí na intenzitách 65 a 70 dB (průměrné hodnoty±SEM, jednocestná Anova, Tukeyho korekce, * $p < 0,05$).

Řečová audiometrie (SDS) byla sledována i v podmínkách šumu (typ babble) v pozadí. Při intenzitě šumu 65 dB SPL dobrovolníci ze všech skupin dosáhli SDS přesahující 90 % (YC 100 %, MP 99 % and EP 92 %). Po zvýšení intenzity šumu na 70 dB došlo jenom k minimálnímu poklesu SDS u YC (97 %) a MP (98 %), ale k signifikantnímu poklesu u EP ($p < 0,001$: EP vs. YC, MP; jednocestná ANOVA, Bonferroniho korekce). Pokles byl signifikantní i při

srovnání SDS při intenzitách 65 a 70 dB SPL pro EP ($p=0,0095$; jednocestná ANOVA, Bonferroniho korekce) (Obr. 22 B).

5.5 Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka u presbyakuze zobrazené pomocí MR spektroskopie

Vzhledem k chybění rozdílů v množství metabolitů mezi levou a pravou hemisférou, byly výsledky hodnoceny společně jak pro 8 ml VOI, tak i pro 18 ml VOI.

U obou starších skupin byl mozek lehce atrofický v obraze MRI, k zlepšení kvality spektrální kvantifikace bylo proto nutné oddělit objem CSF. U obou VOI byl objem CSF srovnatelný s přibližně 7–8% rozdílem mezi oběma staršími skupinami (vyšší) a YC. Porovnání složení mozkové tkáně ukázalo podobné množství WM ve srovnání s GM u všech dobrovolníků, ale celkové množství se lišilo dle objemu VOI.

Obrázek (Obr. 23) a tabulka (Tab. 3) ukazují koncentrace všech měřených metabolitů pro jednotlivé skupiny a VOI. K porovnání hodnot všech 3 skupin byla použita jednocestná Anova s Tukeyho korekcí. Koncentrace N-acetylaspartátu (včetně N-acetylaspartátglutamátu) byla signifikantně nižší u obou starších skupin ve srovnání s YC nezávisle na objemu VOI (8 ml VOI, $p=0,0078$ YC vs. MP, $p=0,0005$ YC vs. EP; 18 ml VOI: $p=0,0022$ YC vs. MP a $p=0,0001$ YC vs. EP), bez signifikantního rozdílu mezi MP a EP. Podobně i koncentrace glutamátu se snížila s věkem v porovnání s YC (18 ml VOI: $p=0,0001$ YC vs. MP, $p=0,0001$ YC vs. EP), při porovnání koncentrací pro 8 ml VOI rozdíly nebyly signifikantní. Koncentrace glutamínu se s věkem nebo úrovní sluchového postižení nezměnily.

Skupina	GABA	Gln	Glu	Ins	Lac	Cho	NAA	Cr/PCr	Glx	WM	GM
<i>VOI 8 ml</i>											
YC	1,77	4,05	14,27	7,74	0,74	2,2	12,3	10,19	18,33	22	78
	0,9	2	2	1	0,6	0,3	0,8	0,8	3,4		
PH	1,56	3,57	13,08	8,57	1,04	2,33	11,14***	10,2	16,64	23,8	76,2
	0,8	2,4	2	1,3	0,9	0,4	1,8	1,3	3,2		
EP	1,79	4,23	11,80***	8	1,26	2,16	10,79***	9,83	16,03***	23,5	76,5
	0,8	1,7	2,6	1,7	1	0,4	2	1,4	3,2		
<i>VOI 18 ml</i>											
YC	1,22	1,76	12,1	7,59	0,53	2	11,32	9,54	13,86	26,7	73,3
	0,7	1,1	1,4	0,9	0,3	0,3	1,3	0,8	1,9		
PH	1,61	2,04	10,14***	7,68	0,84* [#]	2,15	9,97**	9,4	12,17**	30	70
	0,7	1,7	1,7	1	0,5	0,3	1,8	1	2,9		
EC	1,64 [†]	1,7	9,43***	7,41	1,10***	1,95	9,49***	8,77 [†]	11,13***	28,4	71,6
	0,7	1	1,5	1,5	0,5	0,4	1,8	1,4	2		

* p < 0,05.

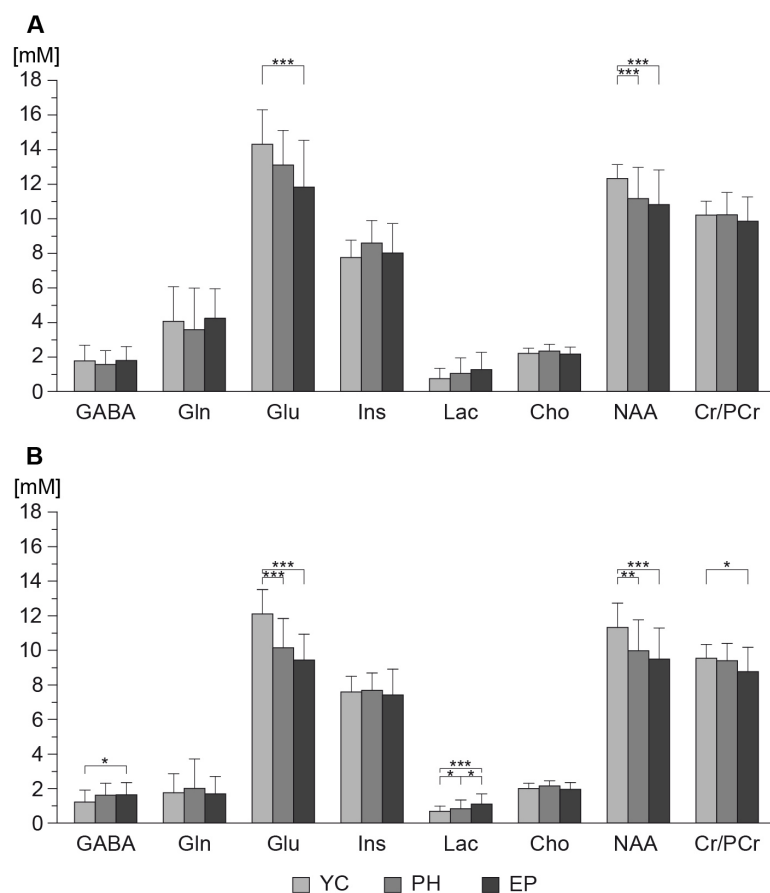
** p < 0,01.

*** p < 0,001 od YC.

[†] p < 0,05 od EP.

Tab. 3. Koncentrace metabolitů [mM] a obsah [%] bílé a šedé hmoty se standardními odchylkami v sluchové kůře počítaných pomocí LCModel se segmentací CSF (GABA — γ -aminomáselná, Gln — glutamin, Glu — glutamát, Ins — myo-inositol, Lac — laktát, Cho — cholín, NAA — N-acetylaspartát + N-acetylaspartátglutamát, Cr/PCr — kreatin + fosfokreatin, WM — bílá hmota, GM — šedá hmota).

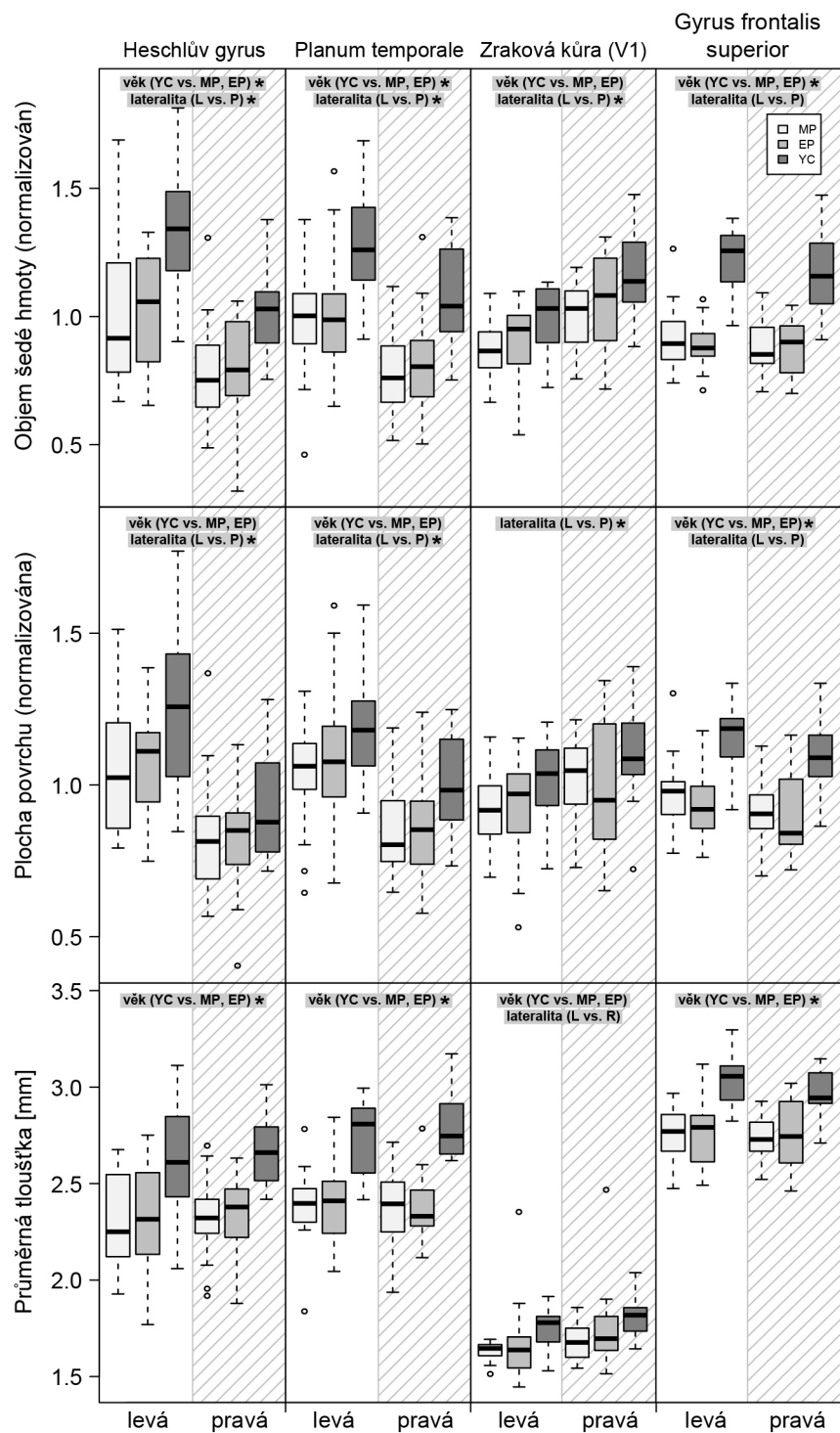
Signifikantní rozdíly v koncentracích laktátu byly přítomné u všech skupin při měření s 18 ml VOI (18 ml VOI: p=0,0001 YC vs. MP, p=0,0143 YC vs. EP, p=0,0493 MP vs. EP), přičemž nejvyšší hodnoty byla nalezeny u EP, následovala MP a nejnižší u YC. Podobný trend byl vidět i u 8 ml VOI, kde ale rozdíly nedosáhly statistické signifikance. Další statisticky významné rozdíly (pokles s věkem) byly naměřeny pro koncentrace kreatinu s fosfokreatinem (Cr/PCr) (18 ml VOI: p=0,0131 YC vs. EP) a GABA (zvýšení u EP v porovnání s YC v 18 ml VOI, p=0,0413). Žádné změny nebyly nalezeny u myoinositolu a cholínu.



Obr. 23. Koncentrace metabolitů [mM] a jejich standardních odchylek v sluchové kůře. A. VOI 8 ml a B. VOI 18 ml. (GABA — γ -aminomáselná, Gln — glutamin, Glu — glutamát, Ins — myo-inositol, Lac — laktát, Cho — cholín, NAA — N-acetylaspartát + N-acetylaspartátglutamát, Cr/PCr — kreatin + fosfokreatin). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a *** $p < 0,001$.

5.6 Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a dráhy u člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze

Změny v šedé hmotě ukazují signifikantní efekt věku nebo alespoň jasný trend ve všech měřených parametrech (tloušťka, plocha povrchu (gyral surface area) a celkový objem šedé hmoty) a oblastech (výjimkou je plocha povrchu V1) (Obr. 24). Ve všech měřených parametrech byly výsledky u obou starších skupin nižší oproti YC. Efekt laterality (rozdíl mezi pravou a levou hemisférou) byl signifikantní při porovnání objemu a velikosti plochy šedé hmoty v AC (HG a PT, vyšší hodnoty vlevo) a V1 (vyšší hodnoty vpravo). Ve frontální kůře (GFS) byl přítomen trend k vyšším hodnotám vlevo.



Obr. 24. Boxploty ukazují porovnání morfometrických parametrů šedé hmoty (objem, normalizovaná plocha povrchu a průměrná tloušťka šedé hmoty) ve 4 oblastech: Heschlův gyrus, planum temporale, primární zraková kůra a gyrus frontalis superior u YC, MP a EP. Objem a plocha povrchu šedé hmoty byly kvůli lepšímu zobrazení normalizovány k jejich celkovým průměrným hodnotám ve všech anatomických oblastech. Signifikance faktorů věku, laterality nebo jejich interakce

je označena v každé části grafu (n.s.- nesignifikantní, hvězdička znamená signifikanci při konzervativní Bonferroniho korekci; šedé pozadí znamená signifikantní efekt při nekorigované prahu (hodnota 0,000 koresponduje s $p < 0,001$)). Centrální linie v jednotlivých „boxech“ znamená medián, přičemž horní a dolní hranice označují 75% a 25% kvartil. Horní odchylka označuje nejvyšší hodnotu, která je nižší než 75% kvartil + 1,5 násobku interkvartilového intervalu (IQR). Dolní odchylka označuje nejnižší hodnotu, která je vyšší než 25% kvartil + 1,5 násobku IQR. Data s hodnotami nižšími než 25% kvartil + 1,5 násobku IQR jsou označena jako prázdné kroužky. IQR je definován jako rozdíl mezi 75% a 25% kvartilem.

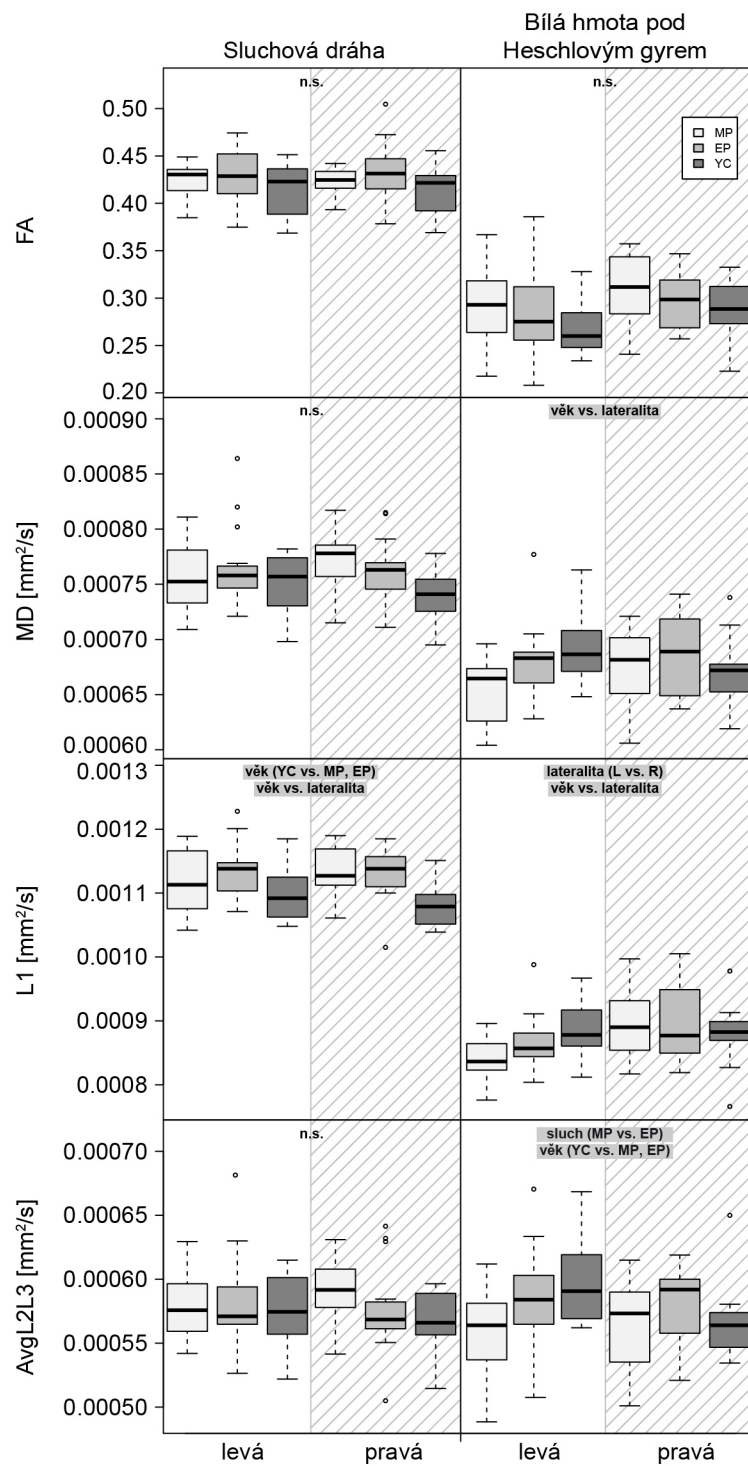
Rozdíly v lateralitě nebyly přítomny při porovnání průměrné tloušťky kůry (výjimkou je prevalence pravé strany V1). Stáří nemělo efekt na změnu laterality. Změny týkající se úrovně sluchového postižení (MP vs. EP) nebyly přítomny u žádného z měřených parametrů (Tab. 4).

Heschlův gyrus	Sluch	Věk	Lateralita	Sluch	Věk
				vs. lateralita	vs. lateralita
Objem [mm ³]	0,7804	*0,0000	*0,0002	0,8024	0,2533
Plocha povrchu [mm ²]	0,9372	0,0113	*0,0000	0,6003	0,1760
Průměrná tloušťka [mm]	0,9788	*0,0000	0,7361	0,7358	0,8040
Planum temporale					
Objem [mm ³]	0,7220	*0,0000	*0,0002	0,8833	0,8689
Plocha povrchu [mm ²]	0,7207	0,0069	*0,0001	0,9182	0,8565
Průměrná tloušťka [mm]	0,9455	*0,0000	0,8516	0,9662	0,4103
Zraková kůra (V1)					
Objem [mm ³]	0,4019	0,0029	*0,0000	0,9903	0,6955
Plocha povrchu [mm ²]	0,9376	0,0871	*0,0000	0,1634	0,4273
Průměrná tloušťka [mm]	0,3389	0,0078	0,0259	0,3370	0,6768
Gyrus frontalis superior					
Objem [mm ³]	0,7132	*0,0000	0,0466	0,1820	0,6461
Plocha povrchu [mm ²]	0,5755	*0,0000	0,0110	0,2325	0,8975
Průměrná tloušťka [mm]	0,8081	*0,0000	0,2602	0,5020	0,1076

Tab. 4. Hodnoty p modelovaných efektů morfometrických indexů (hodnota 0,000 koresponduje s $p < 0,001$). Šedé pozadí zvýrazňuje p hodnoty nižší než 0,05 korespondující s nekorigovanými prahy.

*Hvězdička označuje signifikantní efekt při použití konzervativní Bonferroniho korekce a kontrole “family-wise error” u všech hypotéz morfologických efektů na úrovni 5 % (nastavený práh $p_{\text{adjust}} = 0,05/60 = \approx 0,0008$).

Výsledky DTI v bílé hmotě ukázaly všeobecně menší změny ve stáří oproti morfometrii šedé hmoty (Obr. 25). DTI k popisu změn používá několik indexů, které popisují difuzibilitu vody ve tkáni (FA, MD, L1, L2, L3; podrobnější vysvětlení v úvodu práce). V části sluchové dráhy mezi IC a HG při nastavení prahu na 10 % byl přítomen trend zvyšování L1 s věkem, přičemž byl výraznější v pravé hemisféře.



Obr. 25. Boxploty ukazující porovnání DTI parametrů (FA, MD, L1 a AvgL2L3) z dvou oblastí bílé hmoty: sluchová dráha mezi IC a Heschlovým gyrem (AP) a ROI bílé hmoty pod Heschlovým gyrem. Signifikance faktorů věku, laterality nebo jejich interakce je označena v každé části grafu. Detailnější popis statistiky je uveden v legendě obr. 24.

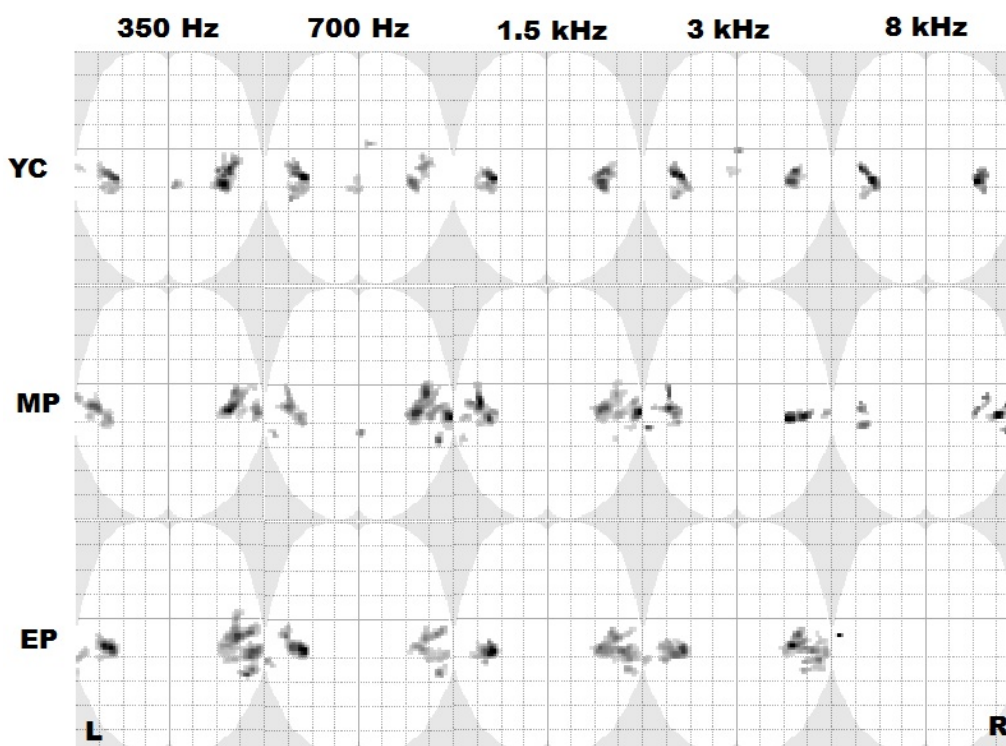
Více změn, respektive trendů bylo přítomno při vyšetření bílé hmoty pod HG. U obou straších skupin bylo levostranné L1 nižší než vpravo a MD klesala v levé hemisféře s věkem. Jediný efekt úrovně presbyakuze byl přítomen u AvgL2L3, kde došlo k zvýšení se stupněm sluchového postižení (Tab. 5).

Sluchová dráha	Sluch	Věk	Lateralita	Sluch vs. lateralita	Věk vs. lateralita
FA	0,4221	0,2585	0,8463	0,6891	0,9239
MD	0,8959	0,0599	0,1407	0,1390	0,0610
L1	0,6208	0,0350	0,1179	0,1553	0,0253
AvgL2L3	0,5836	0,1982	0,2737	0,2441	0,2110
Bílá hmota pod Heschlovým gyrem					
FA	0,3619	0,0840	0,1767	0,9014	0,8603
MD	0,0675	0,0733	0,0980	0,4093	0,0183
L1	0,3283	0,3624	0,0015	0,2789	0,0099
AvgL2L3	0,0377	0,0392	0,7163	0,6224	0,0775

Tab. 5. Hodnoty p modelovaných efektů DTI indexů. Hvězdička označuje signifikantní efekt při použití konzervativní Bonferoniho korekce a kontrole "family-wise error" u všech hypotéz morfologických efektů na úrovni 5 % (nastavený práh $p_{adjust} = 0.05/60 = \approx 0.0008$). Šedé pozadí zvýrazňuje p hodnoty nižší než 0,05 korespondující s nekorigovanými prahy.

5.7 Změna aktivace sluchové kůry člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze

Při stimulaci tóny ≤ 3 kHz byla přítomna signifikantní aktivace AC ($p=0,05$, FWE korekce) u všech dobrovolníků. U 9 dobrovolníků (3 MP, 6 EP) stimulace frekvencí 8 kHz nevyvolala signifikantní aktivaci v AC, i přesto že všichni dobrovolníci potvrdili slyšení stimulu zmáčknutím kontrolního tlačítka (Obr. 26).



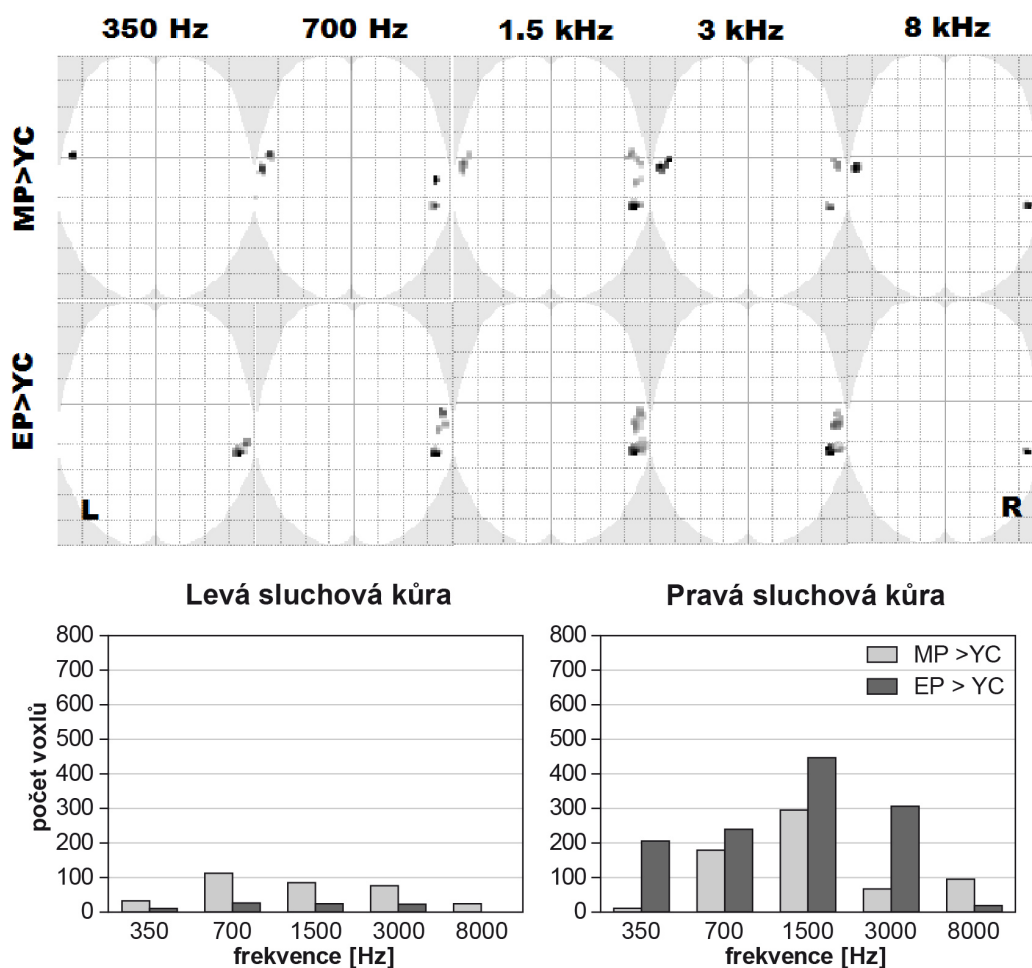
Obr. 26. Mapy korové aktivity vyvolané akustickou stimulací (růžový šum centrováný kolem 5 frekvencí). Zobrazeny výsledky fMRI u všech 3 skupin (skupinová statistika, $p=0,05$ s FWE korekcí).

Zvyšování frekvence stimulu způsobilo posun aktivované oblasti směrem k centrálnímu sulku, ale aktivované oblasti se poměrně významně překrývaly. Zvyšování stimulační frekvence dále vedlo k snížení množství aktivovaných voxelů u všech skupin, přičemž tento pokles byl výraznější u obou starších skupin s nejnižší aktivací při 8 kHz u EP (Tab. 6). Stimulace frekvencemi $\leq 1,5$ kHz aktivovala více voxelů u obou starších skupin v porovnání s YC. Naopak vyšší frekvence (8 kHz a částečně i 3 kHz) vyústily ve větší rozsah aktivace u YC.

skupina	350 Hz		700 Hz		1.5 kHz		3 kHz		8 kHz	
	L	P	L	P	L	P	L	P	L	P
YC	203	315	269	122	208	200	183	109	135	122
MP	227	276	179	531	326	434	96	99	49	131
EP	240	771	228	229	189	456	215	419	21	15

Tab. 6. Počet aktivovaných voxelů při akustické stimulaci v obou temporálních lalocích u všech 3 skupin. Aktivace hodnocena při prahu statistické signifikance $p=0,05$ a korekci FWE.

Zhodnocení efektu presbyakuze vycházelo z porovnání rozsahu aktivace (jenom signifikantně aktivované voxly) mezi skupinami (průměrové mapy). Obě starší skupiny měly signifikantně vyšší aktivaci AC oproti YC, bez signifikantního rozdílu mezi MP a EP (nekorigované $p=0,001$) (Obr. 27).



Obr. 27 A. Porovnání aktivity v temporálním laloku (byla použita maska temporálního laloku k vyloučení aktivity v jiných oblastech) mezi MP vs. YC a EP vs. YC. Výsledky jsou prezentovány jako rozdílové mapy skupinové statistiky (nekorigovaný práh $p=0,001$). B. Rozdíl v množství voxlů, které jsou signifikantně více aktivovány při sluchové stimulaci při porovnání MP vs. YC a EP vs. YC. Výsledky jsou prezentovány jako rozdílové mapy skupinové statistiky (nekorigovaný práh $p=0,001$).

Výsledky fMRI ukázaly zvýšení rozsahu aktivace AC s věkem, které je výraznější v pravém temporálním laloku (při všech vyšetřovaných frekvencích kromě 8 kHz u EP). Je potřeba přiznat, že výsledek je poměrně výrazně ovlivněn

prahováním použitým k tvorbě skupinových map. Z tohoto důvodu jsem použili k hodnocení výpočet lateralizačního indexu (LI) dle prací Wilke et al. (2006, 2007). LI ukázal jenom lehce vyšší aktivaci v pravém temporálním laloku při nízkofrekvenční stimulaci (350 a 700 Hz) u MP kde se hodnoty blížily 0. Ve všech ostatních případech byly hodnoty LI negativní a potvrdily výraznější aktivaci pravé AC ve stáří (Tab. 7). Výsledky statistiky metodou bootstrap tedy potvrdily zvýšení aktivace pravé sluchové kůry v souvislosti se stárnutím.

skupina rozdíly	350 Hz		700 Hz		1,5 kHz		3 kHz		8 kHz	
	průměr	V průměr	průměr	V průměr	průměr	V průměr	průměr	V průměr	průměr	V průměr
MP>YC:										
LI	0,065	0,014	-0,15	-0,14	-0,34	-0,47	-0,28	-0,27	-0,34	-0,4
std	0,17		0,09		0,22		0,14		0,1	
nejnižší	-0,22		-0,27		-0,79		-0,47		-0,52	
nejvyšší	0,5		0,17		-0,09		0,19		-0,15	
EP>YC:										
LI	-0,26	-0,44	-0,34	-0,5	-0,41	-0,55	-0,44	-0,58	-0,43	-0,6
std	0,34		0,29		0,12		0,24		0,29	
nejnižší	-0,92		-0,92		-0,88		-0,81		-0,9	
nejvyšší	0,04		-0,05		-0,11		-0,16		-0,1	

Tab. 7. Lateralizační index (LI) byl vypočten porovnáním rozdílových map aktivace temporálních laloků při použití bootstrap metody (MP vs. YC, EP vs. YC). Porovnání MP a EP neukázalo žádný rozdíl. Negativní výsledky LI (průměr a vážený průměr pro každou frekvenci) ukazují pravostrannou lateralizaci.

6. Diskuze

6.1 Organizace sluchové kůry u potkana a rozdíly ve vlastnostech neuronů v různých polích AC

Naše výsledky podpořily tonotopickou organizaci polí sluchové kůry potkana, kterou lze na základě tonotopického gradientu rozdělit do 4 polí AI, AAF, SRAF, PAF (Kalatsky et al., 2005; Kelly & Sally, 1988; Polley et al., 2007; Rutkowski et al., 2003b; Sally & Kelly, 1988). Zvláštností je rozdvojení gradientu v AI, které je způsobené vmezeřením pole UR. Neurony z UR i přes aktivitu vyvolanou BBN stimulací, která je téměř identická s odpovědí neuronů v AI a AAF nereagují na stimulaci čistým tónem. Jedna z možností, kterou lze tuto chybějící aktivaci vysvětlit, je, že neurony reagují jenom na vysokofrekvenční stimuly (nad 35 kHz), což ale vyvrací Rutkowski et al. (2003b), který stimuloval frekvencemi do 50 kHz. Dalším možným vysvětlením je rozdílnost thalamických vstupů, co potvrdil pomocí retrográdního „tracingu“ Polley et al. (2007) a identifikoval další pole VAF (ventral auditory field). Naše výsledky ale nepotvrdily rozdíl v elektrofyziologických vlastnostech neuronů v rámci AI. Relativně jednoznačné je odlišení AI a AAF vzhledem k změně tonotopického gradientu. V dorzomediální oblasti AI dochází opět ke změně tonotopického gradientu, respektive chybění jednoznačné tonotopické organizace a tato oblast se označuje jako PAF (Doron et al., 2002; Horikawa et al., 1988). Další změna gradientu je lokalizována do laterální části AC, kde je přechod mezi AI a SRAF, co je opět způsobeno rozdílností thalamických vstupů mezi AI a SRAF (Kaas, 2010). Popsaných 5 polí tvoří tzv. centrální pole, která jsou lemována oblastí reagující jenom na stimulaci komplexními zvuky (v našem případě BBN) označovanou okrajovou oblast. Standardně jsme okrajovou oblast našli dorzálně a mediálně od AI a anteriorně od AAF, výjimku tvoří oblasti kolem PAF, a také v místě kolem UR, kde jsme nenalezli neurony reagující na zvukovou stimulaci.

I přes celkem jednoznačné dělení na oblasti odpovídající na stimulaci čistými tóny a na okrajovou oblast, opakovaně jsem identifikovali i v centru AI neurony reagující jenom na BBN, také jsme identifikovali neurony, které neměly

jasnou charakteristickou frekvenci, ale jejich FRA byla komplexní. Identifikace takových neuronů byla zcela náhodná a nenalezli jsem žádný vzorec, dle kterého by jsem byli schopni tyto neurony identifikovat. Nález neuronů odpovídajících jenom na BBN v rámci centrálních polí nebo neuronů s komplexním FRA podporuje teorii lokální heterogenity (Bandyopadhyay et al., 2010; Rothschild et al., 2010). V rámci hloubky, respektive dle rozdělení neuronů do různých vrstev AC nebyly nalezeny rozdíly v charakteristické frekvenci, což potvrzuje teorii sloupcové organizace AC (Linden & Schreiner, 2003). Je nutné ale zdůraznit, že podobnost vlastností neuronů v jednotlivých sloupcích může být dána nedokonalostí extracelulárního snímání, které měří tzv. dominantní neboli “winners” populaci neuronů a je jenom minimálně ovlivněno méně aktivovanými neurony (Reimer et al., 2011).

V zásadě základním organizačním principem AC je tonotopie, na základě které lze rozdělit AC plošně do specifických oblastí. Dalším kritériem, které jsme testovali byla příslušnost neuronů k různým vrstvám sluchové kůry. Odpovědi neuronů na stimulaci BBN jednoznačně ukazují nejkratší latenci ve 4. a na rozmezí 5. a 6. vrstvy, což je podobný nález jako u dalších savců (Kaur et al., 2005; Sugimoto et al., 1997; Wallace & Palmer, 2008). Jedním z důvodů krátkých latencí ve 4. vrstvě je přímá thalamická inervace (Smith & Populin, 2001), výsledky intracelulárních snímání (Mitani et al., 1985) ukázaly také přímou thalamickou stimulaci neuronů z hlubokých vrstev kůry. Podobně lze vysvětlit i náhodné nálezy neuronů s krátkou latencí ve 2. a 3. vrstvě (Barbour & Callaway, 2008; Winer et al., 1999). Co se týče typu odpovědí na základě PSTH, větší zastoupení pozdně fazických neuronů je pravděpodobně způsobeno sériovým zapojením, respektive lokálními okruhy vycházejícím ze 4. vrstvy, a tedy opožděním způsobeným zpracováním probíhajícím nejdříve v neuronech vstupních vrstev.

I přesto, že v našem souboru dominovaly neurony odpovídající na začátek, respektive v průběhu stimulace, byly identifikovány i neurony které reagovaly na ukončení zvukové stimulace. Tyto neurony na základě latence svoji odpovědi byly rozděleny na off a late-off (He, 2002; Heil, 2004). Jedním z možných důvodů existence tzv. „offsetových“ neuronů je jejich úloha

ve zpracování komplexních zvukových stimulů (Qin et al., 2007), kdy je například fazická aktivita neuronu potlačena dalším typem stimulu (může to být jiný zvuk nebo úplně jiný senzorický podnět) a po jeho ukončení dojde k reverberaci aktivity fazického neuronu (Grécová et al., 2009; Sadagopan & Wang, 2010). Reverberace aktivity může být tedy způsobena ukončením inhibičního efektu lokálního oblouku, nebo také přímým inhibičním thalamickým vstupem. Tuto teorii nepřímě podporuje i námi nalezená vyšší četnost off neuronů v povrchových vrstvách AC, kde jsou predominantně lokalizovány GABAergní interneurony (Prieto et al., 1994).

Časový průběh neuronální odpovědi zobrazené jako PSTH umožňuje definovat několik kategorií neuronů (Aitkin et al., 1994; Ehret & Moffat, 1985; Nuding et al., 1999; Oliver, 2005; Recanzone, 2000; Volkov & Galaziuk, 1989). Na základě jak našich nepublikovaných „patch clamp“ výsledků (Pysanenko et al., 2010), stejně tak intracelulární (Ojima & Murakami, 2002) a „whole cell“ (Scholl & Wehr, 2008; Tan & Wehr, 2009) záznamy naznačují, že průběh neuronové odpovědi je odrazem synaptické excitace a inhibice. Nejčastější typ odpovědi v AC (jak ve vrstvách tak i v jednotlivých polích) je fazický, který je výsledkem okamžité hyperpolarizace pyramidových neuronů při intracelulárním snímání označované jako „early bursting“ (Ojima & Murakami, 2002). Typy fazicko-tonický a tonický pravděpodobně odráží reaktivitu pravidelně pálících pomalu a rychle se adaptujících pyramidových neuronů (Dégenétais et al., 2002), přičemž dvojrcholový typ odpovědi vzniká na základě aktivity „intrinsic bursting“ neuronů (Kang & Kayano, 1994). Posledním identifikovaným typem neuronů byl pozdně fazický. Může se jednat o neurony, které potřebují delší depolarizaci k odpálení APT (Kwegyir-Afful & Simons, 2009), nebo tento typ odpovědi může být důsledkem primárního zpracování v AI a AAF a následné aktivaci neuronů neprimárních oblastí (pozdně fazická odpověď se vyskytovala hlavně v SRAF, PAF a okrajové oblasti). Pokud bereme do úvahy rozložení neuronálních typů do jednotlivých vrstev AC, opět se potvrzuje dominance fazických neuronů ve 4. vrstvě, která je vstupní.

Při porovnání velikosti odpovědí neuronů na základě jejich pozice v různých vrstvách AC se jednoznačně ukázalo, že neurony z povrchových vrstev

mají nejmenší odpovědi, co může být způsobeno jak nižší přímou thalamickou stimulací, tak i poškozením při preparaci, respektive podchlazením kůry. Porovnání velikosti odpovědi a typů neuronů na základě PSTH ukázalo, že největší odpověď vykazují fazické a fazicko-tonické neurony, co znamená dominanci iniciálního „bursting“ pálení neuronů. Naopak nejnižší odpověď byla zaznamenána u pozdně fazických neuronů, co může být důsledkem jak delší depolarizace (vid výše), tak i nedostatečné intenzity stimulu. Předchozí publikace popisující intra (Huggenberger et al., 2009) i extracelulární záznamy (Polley et al., 2007; Rutkowski et al., 2003b) ukazují, že velikost odpovědi je poměrně výrazně závislá na intenzitě stimulu (stejně tak i amplitudě proudu).

Vzhledem k tomu, že naše záznamy byly získány z narkotizovaných zvířat, je nutné vzít v potaz i efekt narkózy. Námi použita anestezie ketamin/xylazin ponechává odpověď na zvukovou stimulaci (i komplexní zvuky) téměř bez efektu (Syka et al., 2005) i přesto že snižuje spontánní aktivitu, což jí dává výhodu oproti standardně používané pentobarbitalovému nebo uretanovému typu anestezie (Wallace & Palmer, 2008; Rutkowski et al., 2003b). Optimální je pochopitelně snímání u bdělých zvířat, kdy dominují spíše tonické typy reakcí nad čistě fazickými (Wang et al., 2005). Zde je pak nutné si uvědomit i důležitost typu stimulace, kdy neuron jinak reaguje na preferovaný typ stimulu (např. komplexní zvuk) oproti běžně používanému čistému tónu. V zásadě se tedy jedná nejenom o frekvenční složení stimulu, ale i o jeho časový průběh (Huetz et al., 2011).

6.2 Elektrické vlastnosti neuronů

Výše zmíněné výsledky charakteristiky jednotlivých polí ukázaly možnost rozlišení podtypů neuronů na základě časového průběhu jejich odpovědi zobrazených jako PSTH. Zdá se, že dominantní funkci hraje iniciální „bursting“, což odpovídá reakci pyramidových buněk. Přesnější rozdělení na podtypy lze identifikovat z intracelulárního snímání.

Výsledky extracelulárního snímání ukázaly největší rozdíly mezi neurony z AI a okrajové oblasti. Tato skutečnost je potvrzena jak různými typy

optimálních zvukových stimulů, tak v inervaci z rozdílných částí CGM (de la Mothe et al., 2006; He et al., 1997; Romanski et al., 1999a; Rutkowski et al., 2003a). Důvodem proč jsme vybrali neurony z 5. vrstvy, byla jednoduchá identifikace pyramidových buněk a relativně malé postižení při extracelulárním snímání při identifikaci hranice mezi oblastmi. Neurony z AI a okrajové oblasti v rámci elektrických vlastností snímaných pomocí metody terčíkového zámku jednoznačně potvrdily rozdíly v časové konstantě membrány, vstupním odporu, prahu a frekvenci generovaných APT. Identifikované rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny vyšší vodivostí membrány, co vyplývá z vyšší četnosti tonicky aktivních proudů při klidovém potenciálu. Vzhledem k přítomnosti depolarizačního „sagu“ a následného „rebound spiku“ se jako nejpravděpodobnější kandidát způsobující rozdíly mezi neurony z AI a okrajovou oblastí jeví pomalý hyperpolarizací aktivovaný kationtový proud (Ascoli et al., 2010). Tato teorie byla potvrzena vymizením „sagu“ a „rebound spiku“ po blokování I_h proudů pomocí specifického blokátoru ZD7288. K změření velikosti „sagu“ jsme místo current clampu použili metodu voltage clamp a výsledkem bylo zjištění, že I_h v okrajové oblasti vykazoval vyšší amplitudu. Blokáda I_h vedla ke zvýšení vstupního odporu a prodloužení časové konstanty membrány z čeho vyplynula nižší excitabilita neuronů. Výraznější efekt ZD7288 na neurony v okrajové oblasti potvrdil vyšší denzitu I_h v této oblasti.

Jedním z možných vysvětlení rozdílného zastoupení I_h proudů mezi neurony 5. vrstvy okrajové oblasti a AI je fakt, že denzita I_h se zvyšuje s rostoucí vzdáleností od těla neuronu zejména v oblasti apikálního dendritu, který je cílem excitačních vstupů z horních vrstev (Williams & Stuart, 2000). Výraznější zastoupení I_h v neuronech z okrajové oblasti tedy naznačuje četnější inervaci z granulárních a supragranulárních vrstev (Burkhalter, 1989; Thomson & Bannister, 1998), což odpovídá dominanci thalamických vstupů sériového zapojení AC (Atencio & Schreiner, 2010).

Pokud se opětovně vrátíme k možnostem extracelulárního snímání, lze na základě časového průběhu APT identifikovat RS a FS neurony (Atencio & Schreiner, 2008). FS relativně často odpovídají parvalbuminovým interneuronům, které jsou součástí lokálních mikrokruhů (Kawaguchi &

Kubota, 1997), naopak pomalejší průběh AP u RS je typický pro pyramidové buňky (Andermann et al., 2004; Bartho et al., 2004). Naše výsledky potvrdili extracelulární možnost identifikace minimálně 2 podtypů neuronů v rámci AC, které se jednoznačně liší v časovém průběhu AP. Distribuce neuronálních typů označených jako 1 a 2 se liší mezi okrajovou oblastí, kde dominuje typ 2 a zbytkem AC kde je poměr obrácený. V rámci vrstev AC, typ 2 dominuje jenom v povrchových vrstvách. Neurony typu 1 relativně odlišně reagují na zvýšení intenzity stimulace, naopak typ 2 reaguje více na frekvenci opakování stimulu. Vzhledem ke kódování temporálních vlastností zvuku již v nižších částech sluchové dráhy, prostá změna frekvence, respektive prodloužení stimulace, se nezdá dostatečným nástrojem k lepší charakteristice neuronových subpopulací v AC.

6.3 Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana

Naše výsledky jednoznačně potvrdily efekt stárnutí na množství GAD 65 a 67 jak v sluchovém systému (IC i AC), tak i zrakové kůře, která byla zvolena jako kontrola. Potvrzuje se jak pokles proteinů GAD 65 a 67, tak úbytek neuronů s expresí GAD 65 a 67 a pokles jejich optické denzity. Vzhledem k tomu, že změny byly velmi podobné ve všech měřených strukturách, lze konstatovat, že pokles obou podtypů GAD je jednoznačně efektem stárnutí. Korelace výsledků imunohistochemie a western blotu ukazuje, že spíše než o úbytek počtu neuronů samotných se jedná o pokles přítomnosti GAD v buňkách. Tento fakt je potvrzen výsledky barvení podle Nissla, kde se nenalezl signifikantní pokles neuronů ve stáří (Merrill et al., 2001; Poe et al., 2001; Stanley & Shetty, 2004). Naše výsledky odpovídají dříve publikovaným pracím zaměřeným na změny GABA ve stáří (Casparly et al., 1995; Gutierrez et al., 1994).

Western blot ukázal relativně významné rozdíly v hladině GAD 65 a 67 mezi AC a IC. I přesto, že se nález imunohistochemicky nepotvrdil, předchozí publikace (Sheikh et al., 1999) a výsledky elektrofyziologie ukazují dominantní

roli IC v inhibici (Frisina, 2001; Merchan et al., 2005), což by mohlo nalezený rozdíl vysvětlit.

Srovnání výsledků změn hladin GAD ve stáří ukazuje rozdílnost mezi sluchovým systémem a zrakovou kůrou, co naznačuje rozdílnost průběhu stárnutí mezi jednotlivými částmi mozku. Minimální změny byly třeba identifikovány v senzomotorické a parietální kůře (Ling et al., 2005; Poe et al., 2001; Shi et al., 2006).

6.4 Audiologické změny ve stáří

Standardním jevem provázejícím stárnutí sluchového systému je zhoršení funkce jeho periferní části. U zvířat je tento stav poměrně podrobně prostudován (Syka, 2010). Na základě audiometrických výsledků, zejména spojených se zpracováním komplexních zvukových stimulů, se u člověka k perifernímu postižení (Kidd & Bao, 2012) přidává i centrální složka. Jak podrobněji popisují v úvodu a v dalších částech diskuze, centrální presbyakuze má několik částí. K optimální identifikaci centrální presbyakuze je nutná podrobná znalost stavu sluchu vyšetřovaných dobrovolníků.

K hodnocení funkce sluchové periferie bylo použita vysokofrekvenční tónová audiometrie se stanovením prahu sluchu a TEOAE a DPOAE k zhodnocení funkce zevních vláskových buněk. Na základě sluchových prahů lze tedy rozdělit stárnoucí populaci do dvou podskupin a to skupinu s lehkou presbyakuzí, která má výsledky srovnatelné s kontrolní skupinou mladých dobrovolníků až do výše 4 kHz a skupinu s těžkou presbyakuzí, kdy dochází k zhoršení sluchu mimo fyziologické hodnoty již od 1,5 kHz. Nález je charakteristický pro presbyakuzi a je pravděpodobně výsledkem několika typů postižení struktur vnitřního ucha (Schuknecht & Gacek, 1993). Na rozdíl od standardních frekvencí použitých k stanovení sluchového prahu, byly v našich pracích použity frekvence nad 8 kHz (do 16 kHz), při kterých je rozdíl jak mezi oběma presbyakustickými skupinami, tak i oproti YC ještě výraznější. Stav sluchových prahů je potvrzen i výsledky vyšetření OAE. Pokles výbavnosti, respektive amplitud TEOAE a DPOAE potvrzuje zhoršení funkce vnitřního ucha zejména u EP.

Vzhledem k identifikaci dvou skupin přibližně stejně starých dobrovolníků se signifikantně odlišnou funkcí vnitřního ucha (příčemž ani jeden z dobrovolníků neudával hlučné pracovní prostředí, chronické středoušní infekty, nebo významné kardiovaskulární onemocnění), lze předpokládat genetickou příčinu ztráty populace funkčních OHC (Bovo et al., 2011).

Kromě již popisované bazokochleární poruchy sluchu je dalším typickým nálezem u presbyakuze zhoršení rozumění řeči zejména při ztížených podmínkách (šum v pozadí). Oba nálezy spolu souvisí, jak ukazuje Vanrooij a Plomp (1990), vysokofrekvenční sluchová porucha je zodpovědná asi za 2/3 horších výsledků řečové audiometrie. Dalším faktorem ovlivňujícím zhoršení rozumění řeči poukazujícím na možnou centrální složku (Gordon-Salant & Fitzgibbons, 1993) je snížená schopnost detekovat jemné časové změny (Mazelová et al., 2003). V našich pracích jsme využili jako jeden ze způsobů hodnocení sluchu Gardner-Robertsonovu (GR) klasifikaci. Skupiny YC a MP dosáhly výsledky spadající do 1. a 2. úrovně GR, což je hodnoceno jako užitečný sluch. U skupiny EP dosáhlo 18 % jenom úrovně 3, která se hodnotí již jako neužitečný sluch. Tento pokles je podpořen signifikantním zhoršením SDS při řečové audiometrii se šumem v pozadí zejména při intenzitě šumu 70 dB.

Podobné výsledky publikovali i Frisina a Frisina (1997), problémem ale zůstává to, že při použití komplexních stimulů (řeč) nelze vyloučit možnost kognitivního deficitu, který ovlivňuje centrální zpracování sluchového signálu (Humes et al., 2012). Jedním z vysvětlení zhoršené kognice a z ní plynoucí zhoršené zpracování řeči může být snížení inhibice a následný deficit při zpracování časových parametrů zvuku (Burkard & Sims, 2001; Caspary et al., 2005). Teorie „poruchy inhibice“ je všeobecně přijímána jako vysvětlení i dalších poruch kognitivních funkcí, např. čtení (Manly et al., 2003), verbální učení a plynulost (Persad et al., 2002; Rodriguez-Aranda & Martinussen, 2006), uvažování (Mutter et al., 2006; Tucker-Drob, 2011).

Zvířecí experimenty ukazují některé nálezy na úrovni AC spojené s poruchou sluchu ve stáří, které ovlivňují zpracování časových parametrů zvuku (Suta et al., 2011) u lidí však zatím nebyly potvrzeny. Inhibice na úrovni AC je doménou sítě inhibičních interneuronů (Levy & Reyes, 2012), specificky

exprimujících Ca vázicích proteiny parvalbumin, calbindin a calretinin. Expresе zmíněných proteinů ve stáří klesá (del Campo et al., 2012; Ouda et al., 2012), co může být zodpovědné za zhoršení inhibice a z ní plynoucí snížení schopnosti detekovat časově-spektrální parametry zvuku (Trujillo et al., 2013), zkrácení latence způsobené chybějící pre-onsetovou inhibicí (Engle & Recanzone, 2013) a náhodnost pálení/aktivace neuronů (Turner et al., 2005).

6.5 Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka v souvislosti s presbyakuzí zobrazené pomocí MR spektroskopie

Jednoznačné změny ve stáří spojené se snížením exprese GAD a GABA zjištěny u zvířat nás přivedly ke snaze potvrdit podobné změny i u člověka. Naše MRs experimenty potvrdily významné změny v celkové produkci metabolitů ve stáří ve sluchové kůře člověka, respektive v části temporálního laloku. Ukázalo se, že efekt sluchové ztráty, respektive postižení periferní části sluchového systému má jenom minimální efekt na metabolity v AC (téměř žádný rozdíl mezi skupiny s lehkou a těžkou presbyakuzí). Vzhledem k tomu, že bylo v našich pokusech použito jenom pasivní měření MRs (tzn. bez akustické stimulace), efekt periferní presbyakuze by se mohl projevit při funkčním vyšetření (změny hladin metabolitů při zvukové stimulaci).

Jasný pokles ve stáří byl zaznamenán u hladin NAA, což odpovídá výraznějšímu neuronálnímu poškození a demyelinizaci, které jsou spojeny se stárnutím (Li et al., 2010; Richards et al., 1997), přičemž samotné NAA bývá používáno k nepřímému určení neuronální integrity a denzity (van Wageningen et al., 2010). Změny v koncentraci NAA nejsou specifické jenom pro AC, ale jsou přítomny i v jiných částech mozku (Kaiser et al., 2005; Schubert et al., 2004).

Část měřených metabolitů kreatin, cholin a myo-inositol (s malou výjimkou kreatinu) neukázala žádné změny ve stáří nebo v závislosti na úrovni presbyakuze. V literatuře je jenom omezené množství podobných vyšetření, ale v zásadě potvrzují námi zjištěná data v AC.

Dalším neurotransmiterem, u kterého se projevil stářím vyvolaný pokles byl glutamát. Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v CNS, což by

mohlo vysvětlit i rozdíl v koncentracích ve skupinách s lehkou a těžkou presbyakuzí vzhledem k snížené excitaci CNS při horší funkci sluchové periferie. Všeobecně lze ale říct, že pokles koncentrace glutamátu je dominantně efektem věku, což se potvrdilo v motorické kůře (Kaiser et al., 2005), parietální kůře a bazálních gangliích (Chang et al., 2009).

Glutamin podobně jako GABA jsou produkty metabolismu glutamátu. Vzhledem k blízkosti MRs spekter pro všechny 3 metabolity, je poměrně složité odlišit GABA a glutamin od glutamátu, což může vysvětlovat proč byly změny ve stáří i vzhledem k úrovni presbyakuze minimální, a tedy nepotvrdily u GABA náš předpoklad ze zvířecích pokusů. I přes složitost identifikace hladin GABA, jsou naše výsledky srovnatelné s již publikovanými daty (Jensen et al., 2005; O'Gorman et al., 2011; Waddell et al., 2011).

Posledním sledovaným metabolitem byl laktát, který se běžně vyskytuje v CNS v relativně malých koncentracích a zvýší se za patologických podmínek. Laktát je zpracován v mitochondriálním TCA cyklu a v CNS je primárně zdrojem energie při stresových/namáhavých podmínkách (Ross et al., 2010). Naše výsledky ukázaly zvýšení koncentrace laktátu u obou starších skupin zejména v 18 ml VOI, což je v souladu s předchozím zjištěním hladin laktátu v mozku (Soros et al., 2006). Jedna z teorií vysvětlující zvýšení koncentrace laktátu ve stáří, podpořena nižší koncentrací glutathionu, je snížení schopnosti reparace respektive ochrany proti oxidativnímu stresu a poškození mitochondriálního dýchání (Emir et al., 2011).

Při porovnání výsledků vztahovaných k velikosti VOI (8 vs. 18 ml) byly zjištěny výraznější změny při měřeních z většího objemu kůry. Možným vysvětlením je větší objem bílé hmoty ve větším VOI (asi o 3–7 %), což může způsobit výraznější efekt metabolitů s vyšší koncentrací v bílé hmotě. Dalším faktorem je pravděpodobně vyšší poměr signál/šum (cca 2 násobně) v 18 ml VOI, což ovlivňuje přesnost měření koncentrací metabolitů. Příznivým zjištěním bylo, že samotná atrofie kůry s věkem vyplývající ze segmentační analýzy neovlivňuje koncentraci metabolitů, a tedy naše zjištění jsou výsledkem efektu věku nebo úrovně presbyakuze.

6.6 Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a dráhy u člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze

Centrální typ presbyakuze a snížení stimulace při poškození periferie spojené se stářím je předpokladem změn i v oblasti AC. V poslední době byly MR morfometrie a DTI použity k identifikaci změn v oblasti kůry u několika centrálních patologií (Alzheimerova nemoc, schizofrenie, epilepsie, roztroušená skleróza) spojených s kognitivní dysfunkcí, ale taky i s poruchou sluchu (Madden et al., 2012; Stebbins & Murphy, 2009).

Rozdělení vyšetřovaného souboru do 3 skupin umožnilo sledovat 3 základní proměnné: efekt věku, efekt presbyakuze a efekt laterality (stranově specifické změny) na 2 předchozí faktory.

V šedé hmotě jsme identifikovali několik změn, které byly jednoznačně spojeny se stářím, na druhou stranu žádná z naměřených změn nebyla způsobená zvýšením sluchových prahů u skupiny s těžší presbyakuzí (EP). Identifikovali jsem snížení objemu a tloušťky šedé hmoty v oblasti Heschlova gyru a planum temporale u obou starších skupin (MP a EP). Vzhledem k postižení periferního vstupu, by se dal očekávat výrazný efekt periferie na centrální struktury, překvapivě to ale není pravda. Naše výsledky ukazují chybění efektu periferní složky presbyakuze. Podobně i u lidí s vrozenou hluchotou chybí změny v objemu šedé hmoty temporálního laloku (Penhune et al., 2003). V případě hluchoty, lze minimum změn v šedé hmotě vysvětlit nahrazením chybějících sluchových vstupů jinými sensorickými modalitami, nejčastěji zrakem a motorikou využívanou ke znakování, což vede k reorganizaci využití AC (Newman & Twieg, 2001; Petitto et al., 2000). Podobné změny spojené se stářím jsme našli v GSF, který je spojen s „pracovní pamětí“ a ta se podílí na kognitivních funkcích (du Boisgueheneuc et al., 2006). Všeobecně je „pracovní paměť“ považována za důležitou při zpracování řeči, zejména u starší populace, kde nahrazuje zhoršení sluchu zvýšením soustředěnosti (Lunner et al., 2009) a lepším využitím sémantické a episodické paměti (Stenfelt & Ronnberg, 2009; Tulving, 2002). I přesto, že některé práce v minulosti ukázaly zvýšenou aktivaci GSF při sluchové ztrátě (Wong et al., 2010), nebo všeobecně ve stáří (Park &

Reuter-Lorenz, 2009; Vermeij et al., 2012), v našem souboru nebyly morfometrické změny spojené s postižením sluchu identifikovány. Jako kontrolu jsem zvolili zrakovou kůru, kde byly identifikovány změny podobné AC a GSF, které ale nebyly statisticky signifikantní. Třetím hodnoceným faktorem byl efekt lateralizace. Všeobecně lze říct, že pro zpracování zvuků je levá AC důležitější, dominuje ve zpracování komplexních zvuků (hlavně řeči), naopak pravá AC zpracovává spektrální parametry zvuku a frekvenční modulaci (např. hudba) (Firszt et al., 2006; Schirmer et al., 2012; Tramo et al., 2005). V populaci dominuje levo-pravá asymetrie, která je ale například u dyslektiků výrazně snížena (Heiervang et al., 2000), což je způsobeno zhoršením zpracování fonologických a časových parametrů (Fitch et al., 1997; Morris et al., 1998). Naše výsledky opět potvrzují levo-pravou asymetrii, která zůstává věkem nebo sluchovým postižením nezměněna.

K zhodnocení změn v sluchové dráze nad IC a bílé hmotě pod HG byla použita metoda DTI. Jedním z předpokládaných efektů stáří a tedy presbyakuze je degradace neuronových sítí, proto se DTI, která je schopna identifikovat mikrostrukturální změny jeví jako vhodnější metoda než klasická volumetrie (Madden et al., 2009).

Naše výsledky z částí sluchové dráhy nad IC ukázaly zvýšení L1 s věkem. Zvyšování L1 bývá znakem vnitřní neuronové degradace a všeobecně morfologických změn neuronálních vláken (Lin et al., 2008). Podobně dochází k věkem vyvolaným změnám průměrné difuzivity, což bylo potvrzeno poškozením mikrostruktury bílé hmoty v oblasti corpus callosum (Aboitiz et al., 1996). V námi sledované části sluchové dráhy nebyla změna MD způsobená věkem nebo úrovní presbyakuze zaznamenána. Frakční anizotropie bývá standardně zvýšená při úplném chybění sensorické stimulace, jak u populace s vrozenou hluchotou ukázal Miao et al. (2012) a u SNHL Chang et al. (2004). V našem souboru nebyla změna FA přítomná, co lze vysvětlit jiným mechanismem účinku sensorické deprivace u SNHL a presbyakuze. Hlavní rozdíl je časový průběh efektu presbyakuze (dlouhodobé postupné zhoršování sluchu s možností adaptace), přičemž idiopatická SNHL je ve většině případů náhlá s okamžitým efektem na suprakochleární struktury sluchové dráhy. Náš

předpoklad je částečně potvrzen imunohistochemickými výsledky zvířecích pokusů, kdy akutní sluchové postižení po ohlušení způsobí asi 30% snížení buněčné denzity na úrovni IC a CGM (Groschel et al., 2010), přičemž presbyakuze způsobí jenom drobné snížení do 10 % (Ouda & Syka, 2012) nebo žádné změny (Helfert et al., 1999).

Všeobecně lze říct, že změny v bílé hmotě ve stáří jsou primárně spojeny s kognitivním postižením a jsou proto zvýrazněny u nemocí jako sclerosis multiplex nebo Alzheimerova demence (Madden et al., 2009). I přesto, že presbyakuze nespadá do skupiny kognitivních poruch, vzhledem k poruše zpracování komplexních zvuků zejména při zhoršených sluchových podmínkách (šum v pozadí) je zcela zřejmá centrální komponenta presbyakuze (Humes et al., 2012). Funkčně je zhoršení kognitivních funkcí a presbyakuze kompenzováno zvýšením využití sluchových asociovaných oblastí, pracovní paměti a pravé AC (Hickok & Poeppel, 2007; Radvansky & Dijkstra, 2007; Sharp et al., 2006). I přesto, že naše práce nebyla zaměřena na intrakortikální dráhy, lze částečně vysvětlit změny v bílé hmotě pod HG právě reorganizací posilující intrakortikální dráhy jako částečnou kompenzaci nedostatečného sluchové stimulace. Změny v bílé hmotě pod HG je obtížné vysvětlit, protože její struktura ztrácí klasickou organizaci (svazek neuronů orientovaných jedním směrem) a dochází ke křížení vláken („crossing and kissing“), co způsobí nemožnost rozlišení na radiální a axiální vektory (Alexander et al., 2001; Basser et al., 2002). Naše výsledky nekorespondují s poklesem FA v bílé hmotě pod HG (Lutz et al., 2007), co lze vysvětlit všeobecně nižší FA (v porovnání se sluchovou dráhou) a jemné změny můžou být tedy maskovány. Dalším výsledkem byl pokles MD a L1 v levé AC u starší populace, přičemž pravostranně tato změna chybí, co může být následkem zvýšeného využití pravé AC jako kompenzace presbyakuze/kognitivního zhoršení ve stáří (Balogová et al., 2013). Zvýšení avgL2L3, které ve většině případů provází demyelinizaci (Madden et al., 2012) provázelo zhoršení sluchu, přičemž se ale ukazuje celkový pokles avgL2L3 ve stáří na levé straně.

6.7 Změna aktivace sluchové kůry člověka ve stáří při různých stupních presbyakuze

Naše předešlé výsledky ukázaly, že i přes jednoznačně postiženou periferní část sluchového systému, jsou změny v AC spíše spojeny se stářím než se sluchovou vadou. MR spektroskopie, MR morfometrie a DTI jsou „statické“ metody, které přímo neměří centrální vnímání postižené sluchové informace. Náš předpoklad vychází z toho, že postižení periferie sníží nebo změní aktivitu vyvolanou v AC, proto se jako nejvhodnější metoda zdá fMRI. Významným faktorem stáří, pravděpodobně ovlivňujícím i presbyakuzi je zhoršení kognitivních funkcí (Cabeza, 2001; Humes et al., 2013; Kidd & Bao, 2012). S cílem minimalizovat kognitivní faktor presbyakuze byla zvolena stimulace růžovým šumem, který je mnohem méně náročný na centrální zpracování než komplexní stimul (řeč).

Naše výsledky ukazují, že aktivace sluchové kůry je všeobecně nižší u YC oproti oběma starším skupinám, mezi kterými se opět nepotvrdil signifikantní rozdíl. Dalším zjištěním byl zmenšující se rozsah aktivace v závislosti na zvyšující se frekvenci, což je zvýrazněno opět u obou starších skupin. Snížení aktivace v závislosti na frekvenci zcela koreluje se zhoršením funkce vnitřního ucha na frekvencích >1,5 kHz. Zajímavé je zjištění, že i na frekvencích kde jsou v rámci sluchové periferie rozdíly mezi skupinami minimální, je aktivace u obou starších skupin signifikantně vyšší, což potvrzuje přítomnost centrální složky presbyakuze. Ve všech našich skupinách byl identifikován posun aktivace mediálně se zvyšující se frekvencí, což potvrzuje alespoň částečnou tonotopickou organizaci AC u člověka, která je ale vícesměrná (mediolaterální a anteroposteriorní) jak ukazuje Weisz et al. (2004) nebo Langers a van Dijk (2012).

Při pohledu na lateralitu aktivace AC, se ukazuje, že s věkem se zvyšuje využití pravé AC. S věkem se také zvyšuje celková aktivace AC (jak u MP tak i u EP), výrazněji v pravé hemisféře u všech vyšetřovaných frekvencí kromě 8 kHz, což koresponduje s výraznou sluchovou ztrátou na této frekvenci. Celkově lze říci, že u obou starších skupin je rozsah aktivace AC vyšší na pravé straně

v porovnání s levou AC, přičemž u YC je rozsah aktivace reverzní (větší aktivace vlevo). Vzhledem k tomu, že nebyly nalezeny rozdíly mezi aktivací AC u MP a EP se zdá, že větší využití AC je jednoznačně spojeno se stářím bez efektu periferní složky presbyakuze.

Centrální typem presbyakuze stojí na 2 základních hypotézách: přímá a nepřímá (Humes & Dubno, 2010; Humes et al., 1996). Jako třetí možností nebo parametrem ovlivňujícím centrální presbyakuzi se jeví zhoršení kognitivních funkcí ve stáří. Několik studií ukázalo, že zhoršení periferní stimulace (Schneider & Pichora-Fuller, 2000; Wingfield et al., 2005) a z ní plynoucí sensorická deprivace (Baltes & Lindenberger, 1997; Humes et al., 2012) může způsobovat zhoršení kognitivních funkcí.

Stárnutí je všeobecně provázeno zhoršováním kognitivních schopností, které se projevuje jako snížení rychlosti zpracování podnětů, pozornosti, vnímání, pracovní paměti, volného vybavování paměťových informací a znovupoznávání (Dennis & Cabeza, 2008). Zhoršení kognice je také dáváno do souvislosti s poklesem objemu a aktivity hipokampu (Raz et al., 2004). Změny v aktivitě spojené s kognitivní kontrolou ve stáří jsou přítomné v prefrontální kůře, zejména její dorzální části (Cabeza & Nyberg, 2000). Při zpracování řeči využíváme část popisovaných kognitivních funkcí k zachycení signálu a obrácení naší pozornosti, krátkodobému uložení sluchového vjemu do paměti, jeho porovnání s již známými fonémami a přiřazení významu ke zvuku (Poeppele et al., 2008).

Snížení sensorické aktivace (nezávisle od typu stimulace) vede k nutnosti využití méně specificky zaměřených kognitivních oblastí (Cabeza et al., 2004). Wong et al. (2008) ukázali, že u starší populace dochází při zpracování řeči v šumu (nejčastější problém spojován s presbyakuzí) k plošně širší aktivaci kůry (včetně některých oblastí frontálního laloku) oproti mladé populaci. Vyšší využití frontálních laloků při zpracování komplexních zvuků je přítomno i při používání paměti (memory processes) (Moffat et al., 2006), nebo úkolech na potlačení odpovědi (response inhibition task) (Milham et al., 2002) a je pravděpodobně výsledkem snahy o kompenzaci snížení schopnosti potlačit irelevantní stimulaci jako např. šum v pozadí. Eckert et al. (2008) pozitivně korelovali zvýšení

aktivace v oblasti gyrus frontalis medius při řečové stimulaci ve stáří se snížením strukturální organizace temporální kůry.

V kontextu diskutovaných kognitivních změn, lze říci, že naše výsledky potvrzují několik komponent presbyakuze: čistě periferní (snížení rozsahu aktivace při vysokofrekvenční stimulaci) a změny na úrovni sluchové kůry spojené se stářím (všeobecně vyšší rozsah aktivací AC u MP a EP, zvýraznění aktivace pravé AC).

7. Závěr

Pokud bychom zkusili srovnat organizaci AC u potkana, respektive dalších hlodavců s vyššími savci (např. kočka), opicemi a primáty a člověkem zjistíme, že tonotopie zůstává základním organizačním vzorcem (Woods & Alain, 2009). Na rozdíl od jiných savců je ale u člověka tonotopie mnohem méně zdůrazněna (Kaas & Hackett, 2000; Talavage & Edmister, 2004), což je dáno komplexnějším zpracováním zvukové informace a jejím využitím pro základní komunikaci. Funkčně lze tedy AC rozdělit na primární sluchovou kůru, která je u člověka pravděpodobně lokalizována do BA 41 odpovídající gyrus temporalis transversus, kolem který se nacházejí sekundární oblasti spadající pod planum temporale (BA 42), kde je alespoň částečně zachována tonotopická organizace a terciální (parabeltové) (Kaas & Hackett, 2000) sluchovou kůru. V zásadě lze říct, že čím větší multimodalita stimulace, tím nižší tonotopická organizace. Podobnost v organizaci AC (primáti/lidi) je potvrzena i v základních cytoarchitektonických znacích (Fullerton & Pandya, 2007; Sweet et al., 2005).

Pravostranná a levostranná sluchová kůra se funkčně liší. Velice zjednodušeně můžeme konstatovat, že levá AC je zodpovědná za zpracování časových parametrů zvuku a pravá za frekvenční změny (Schonwiesner et al., 2007; Tramo et al., 2005). Z této diferenciace vyplývá, že řeč bude více aktivovat levou AC a hudba pravou AC (Tervaniemi & Hugdahl, 2003). Celkově se ukazuje, že ve zpracování řeči dominuje levá nad pravou AC nezávisle na pravo/levorukosti (Knecht et al., 2000). Podobná asymetrie je přítomna i při morfometrické analýze, kdy levé planum temporale je větší v porovnání s pravou stranou o 64-82 % (Shapleske et al., 1999).

Detailnější zaměření na rozdíly mezi levou a pravou stranou ukazuje, že oboustranně centrální část planum temporale zpracovává časové parametry zvuku, na druhou stranu anterolaterální část PT vlevo se cíleně specializuje na časové parametry, přičemž vpravo na spektrální změny (Schonwiesner et al., 2005). Podobné rozdíly nejsou typické jenom pro člověka, ale byly identifikovány již u nižších savců, kdy léze pravé AC způsobí signifikantní

zhoršení rozeznávání frekvenčně modulovaných zvuků (Rybalko et al., 2006) a naopak vlevo časových parametrů zvuku (Rybalko et al., 2010).

V kontextu našich výsledků z MRI experimentů, fMRI potvrzuje morfometrické nálezy ukazující změny využití pravé a levé AC ve stáří. I přesto, že MR morfometrie neukazuje stranovou asymetrii šedé hmoty, DTI jednoznačně ukazuje vyšší myelinizaci pod pravou AC, což naznačuje vyšší využití pravé AC ve stáří.

Nepovedlo se nám potvrdit centrální změny spojené se základním znakem presbyakuze, což je zhoršení funkce vnitřního ucha projevující se zvýšením prahu sluchu na vyšších frekvencích. Naopak je zcela zřejmé, že existuje centrální komponenta presbyakuze, která je spojena se zvyšujícím se věkem a není ovlivněna zhoršením funkce periferní části sluchového systému.

Základní otázkou, zejména v kontextu výsledků zvířecích pokusů je dostatečná citlivost MR zobrazení. Jedním z možných vysvětlení minimálních rozdílů mezi oběma staršími skupinami je právě neschopnost MRI tyto rozdíly zobrazit. Jako možnost se jeví využití silnějšího magnetického pole (7 T), což ale ne vždy znamená citlivější zobrazení, nebo zvolení jiné metody např. MEG. Dále je nutné se zamyslet nad vhodností zvolených stimulů, které sice stimulují hlavně AC, ale právě jejich „jednoduchost“ vylučuje zhodnocení efektu vlivu kognitivních funkcí pacientů, které mohou být ovlivněny sluchovým postižením a z něj plynoucí nižší sensorickou aktivací. V budoucnu by bylo proto vhodné doplnit jednak psychoakustické testy (dichotická kompetitivní stimulace), zhodnocení samotných kognitivních funkcí pacienta (využít i nesluchové testy), a také rozšířit ROI i do oblasti prefrontálního laloku a hipokampu.

1. Liší se vlastnosti neuronů mezi jednotlivými oblastmi sluchové kůry a v rámci rozdílných korových vrstev?
 - Tonotopie je jediná vlastnost, dle které lze rozdělit AC do jednotlivých polí.
 - Reakce na stimulaci čistými tóny odlišuje okrajovou oblast, UR a centrální oblasti AC.
 - Na základě PSTH lze odlišit 5 typů neuronové odpovědi.

- Naše výsledky podporují teorii sériového zpracování zvuků na korové úrovni.
2. Má rozdílná reakce neuronů na různé typy zvukové stimulace v primární sluchové kůře a okrajové oblasti základ v rozdílných elektrických vlastnostech neuronů a lze tyto odlišné vlastnosti zaznamenat i při extracelulárním snímání?
- Neurony z okrajové oblasti potřebují silnější stimulaci k odpálení akčního potenciálu.
 - Nižší excitabilita neuronů v okrajové oblasti je částečně způsobena vyšší denzitou I_h .
 - Jednoznačně lze odlišit 2 podtypy neuronů na základě jejich elektrických vlastností snímaných pomocí terčíkového zámku i extracelulárně.
 - Rozdílnost elektrických vlastností neuronů v AI a okrajové oblasti částečně vysvětluje i jejich odlišnou reakci na zvukovou stimulaci.
3. Dochází ke změně celkových hladin glutamátdekarboxylázy ve sluchové kůře, colliculus inferior a zrakové kůře ve stáří a mění se počet a morfologie neuronů exprimujících GAD?
- Počet GAD65 i GAD67 pozitivních neuronů poklesl ve stáří u obou kmenů v IC, AC a méně výrazně i v VC, obdobný nález byl přítomen i při měření optické denzity.
 - Hladiny GAD65 a 67 detekované pomocí western blotu významně poklesly ve všech sledovaných strukturách, přičemž v IC a AC byl pokles výraznější (50 %) než v VC (20 %).
4. Lze identifikovat změny v hladinách základních neurotransmiterů v sluchové kůře člověka spojené se stářím, respektive stupněm presbyakuze?
- MR spektroskopie prokázala změny v množství metabolitů AC s věkem.
 - Je přítomen signifikantní pokles v množství glutamátu a N-acetylaspartátu u starší populace.

- Jediná identifikovaná změna spojená s úrovní presbyakuze byl pokles hladin laktátu, který byl výraznější u dobrovolníků s těžkou presbyakuzí.
 - MR spektroskopie neprokázala změny v úrovni GABA což je v rozporu s výsledky zvířecích pokusů.
5. Dochází k morfometrickým změnám ve sluchové kůře a dráze u člověka ve stáří, respektive při různých úrovních presbyakuze?
- Difuzivita bílé hmoty v sluchové dráze se mění s věkem.
 - S věkem dochází ke snížení objemu a rozsahu šedé hmoty sluchové kůry.
 - Morfometrie ukazuje dominanci levé AC, která se s věkem nemění
 - Presbyakuze jenom minimálně ovlivňuje morfometrii sluchového systému.
6. Mění se rozsah aktivace sluchové kůry ve stáří a při zhoršení funkce vnitřního ucha?
- Celková aktivace AC je větší u starší populace.
 - S věkem dochází k změně levostranné na pravostrannou dominanci v rámci AC.

8. Souhrn práce

Naše práce byla zaměřena jednak na objasnění některých charakteristik struktury a funkce neuronů z různých oblastí sluchové kůry u laboratorního potkana a dále na identifikaci změn inhibičního systému (GAD 65 a 67) v centrální části sluchové dráhy a kůry ve stáří. Na základě výsledků ze zvířecích experimentů jsme se následně zaměřili na změny v oblasti lidské sluchové kůry a dráhy spojené se stárnutím, které byly vyšetřeny pomocí různých zobrazovacích metod MR (spektroskopie, morfometrie, difuzní tenzorové zobrazení a funkční MR).

8.1 Vlastnosti neuronů v různých polích sluchové kůry potkana

Reakce neuronů na stimulaci BBN a čistými tóny se staly základem rozdělení AC na AI a tři další centrální oblasti: AAF, SRAF a PAF, ke kterým byla přidána ještě UR lokalizována mezi AI a AAF. Tyto centrální oblasti byly ohraničeny okrajovou - okrajovou oblastí. Neurony z AI, AAF, SRAF a PAF měly výrazně definovanou CF při stimulaci čistými tóny, naopak neurony z UR reagovaly jenom při vysokých intenzitách stimulů a bez přesně vymezené CF. Neurony reagující jenom na stimulaci BBN se nacházely hlavně v okrajové oblasti. Pravděpodobné hranice mezi jednotlivými oblastmi byly vytvořeny na základě změn tonotopických gradientů; v PAF tonotopická organizace chyběla. Neurony s nejkratšími latencemi odpovědi při stimulaci BBN jsme našli ve 4. a 6. vrstvě AI, přičemž nejdelší latence odpovědi měly neurony z povrchových vrstev (L1/2) okrajové oblasti. Podobné rozložení jsme našli i při porovnání velikosti odpovědi, kdy největší reakce byla v L4 z AI a nejnižší v L1/2 z okrajové oblasti. Na základě tvarů PSTH byly neurony rozděleny do 5 kategorií: fazické, fazicko-tonické, tonické, dvojrcholové a pozdně-tonické. Nejčastější typ odpovědi ve všech oblastech AC byl tonický, ten dominoval i ve všech korových vrstvách. Analýza vlastností neuronálních odpovědí prokázala, že tonotopie je základním organizačním principem AC.

8.2 Nepublikované výsledky (Elektrické vlastnosti neuronů sluchové kůry potkana)

Na základě elektrických vlastností lze pyramidové neurony z 5. vrstvy AC rozdělit na 2 subpopulace: neurony odpovídající na depolarizační stimuly salvou akčních potenciálů o vysoké frekvenci (FS) a neurony odpovídající akčními potenciály o nízké frekvenci (RS). RS neurony dominovaly v obou vyšetřovaných částech AC (AI a okrajová oblast). RS neurony z AI vykazovaly signifikantně vyšší klidový potenciál a jejich vstupní odpor a časová konstanta membrány byla o 30 % vyšší než u RS z okrajové oblasti. RS neurony z AI mají APT s vyšší amplitudou, jejich aktivita má vyšší frekvenci a mají nižší průměrnou reobázi. Dalším rozdílem bylo nerovnoměrné zastoupení hyperpolarizací aktivovaných kationtových proudů (I_h), které bylo vyšší u neuronů z okrajové oblasti přibližně o 40 % oproti AI. Vzhledem k tomu, že blokováním I_h pomocí selektivního blokátoru ZD 7288 došlo k vyrovnání pasívních vlastností neuronů z AI a okrajové oblasti, je I_h pravděpodobně hlavním faktorem ovlivňujícím klidové elektrické vlastnosti okrajových neuronů. Dalším efektem I_h proudů je vznik „sagu“ (drobné depolarizační napětí při stimulaci hyperpolarizačním proudem). Frekvence APT při repetitivní stimulaci, byla výrazně nižší u okrajových neuronů, což je v souladu s větší koncentrací I_h a jejich vlivem na průběh AHP. Analýza extracelulárně snímaného APT ukázala 2 subpopulace neuronů (typ 1 a typ 2), které se liší časovým průběhem AHP. Distribuční index ukázal, že typ 2 tvoří většinou populaci v povrchových vrstvách a naopak, v AI respektive celé AC je častěji zastoupen typ 1. Dalším rozdílem byla výraznější reakce na zvyšování intenzity stimulu u neuronů 1. typu. Všeobecně lze říct, že rozdíly v denzitě I_h mezi neurony z AI a okrajové oblasti odpovídají rozdílnosti mezi zastoupením fazických a tonických typů neuronů. Analýza výsledků „patch clamp“ dat podporuje hypotézu, že rozdíly v typech odpovědí neuronů naměřených in vivo můžeme částečně vysvětlit rozdíly v jejich pasívních a aktivních elektrických vlastnostech.

8.3 Změny hladiny GAD enzymu ve stáří v sluchovém systému potkana

Změny v koncentracích GAD65 a GAD67 v IC, AC a zrakové kůře potkanů typu Long-Evans spojené se stárnutím jsme vyšetřovali pomocí imunohistochemie a Western blotu. Výsledky ukázaly snížení počtu a optické denzity imunoreaktivních GAD65 a GAD67 neuronů jak v IC tak i v AC. Western blot prokázal pokles hladin GAD65 a GAD67 spojený s věkem opět v obou strukturách, přičemž pokles byl výraznější než v zrakové kůře. Snížení úrovně GAD65 a GAD67 ve stáří částečně vysvětluje zhoršení sluchových funkcí u stárnoucí populace savců včetně člověka.

8.4 Změna aktivace sluchové kůře člověka ve stáří při různých úrovních presbyakuze

S cílem identifikovat centrální složku presbyakuze jsme pomocí funkční MRI měřili aktivitu v sluchové kůře u EP, MP a YC. Skupina s těžkou formou presbyakuze (EP) se lišila od skupiny s lehkou formou presbyakuze (MP) postupným zvyšováním sluchových prahů na frekvencích nad 1 kHz při vyšetření pomocí vysokofrekvenční tónové audiometrie, signifikantním snížením amplitud nebo dokonce chyběním výbavnosti tranzientních otoakustických emisí (TEOAE) a distorzních produktů otoakustických emisí (DPOAE) a signifikantním zhoršením rozumění řeči v tichu i hluku. Skupina MP se lišila jenom minimálně od YC v přítomnosti OAE nebo výsledcích řečové audiometrie, ale amplitudy DPOAE a sluchové prahy byly signifikantně odlišné na frekvencích nad 4 kHz. Zvukem vyvolaná aktivita (růžový šum centrovaným kolem 350 Hz, 700 Hz, 1,5 kHz, 3 kHz, 8 kHz) byla měřena pomocí BOLD fMRI v oblasti kolem Heschlova gyru s cílem identifikace změn v sluchové kůře způsobených stárnutím. Výsledky fMRI ukázaly jenom minimální aktivaci při stimulaci 8 kHz u EP i přes fakt, že všichni vyšetřovaní zvuk slyšeli. U obou starších skupin osob byl rozsah aktivace v temporálních lalocích (TL) vyšší v porovnání s YC. Obě starší skupiny aktivovaly více pravý než levý TL. Porovnání EP a MP neprokázalo statisticky signifikantní rozdíly v aktivaci AC. Naše výsledky ukazují jenom minimální vliv

poruchy sluchu na rozsah aktivace v temporálním laloku, na druhou stranu se ale věk ukazuje jako signifikantní faktor. Naše výsledky ukazují, že větší rozsah aktivace u obou starších skupin v porovnání s YC může být kompenzačním mechanismem zhoršeného rozlišení časových parametrů zvuků spojených se stárnutím.

8.5 Změny hladiny metabolitů v sluchové kůře člověka u presbyakuze zobrazené pomocí MR spektroskopie

Pomocí ¹H MR spektroskopie byly na 3T tomografu změřeny hladiny metabolitů v AC u tří skupin: EP, MP a YC. K vyšetření sluchu byla u všech dobrovolníků použita tónová audiometrie (125–16000 Hz). Identifikovali jsme signifikantní rozdíly v koncentracích glutamátu a N-acetylaspartátu s nižšími hladinami u starších subjektů. Laktát byl naopak zvýšen u skupiny s těžkou formou presbyakuze. U dalších metabolitů, včetně GABA, jsme nenalezli žádné signifikantní rozdíly mezi starší a mladší populací. Výsledky ukázaly, že zhoršení funkce vnitřního ucha je provázeno poklesem koncentrace excitačního neurotransmiteru- glutamátu a zvýšením hladin laktátu v AC, které je výraznější u starší skupiny s vyššími sluchovými prahy,

8.6 Morfometrické změny v šedé a bílé hmotě sluchové kůry a dráhy u člověka ve stáří při různých stupních presbyakuze

MR morfometrie a DTI byly použity k měření změn v centrální části sluchového systému u EP a MP v porovnání s YC. Po rekonstrukci kůry, volumetrické segmentaci a traktografii sluchové dráhy jsme měřili 3 parametry: objem šedé hmoty, plochu povrchu a tloušťku kůry. U všech vyšetřovaných skupin byly plocha povrchu kůry a objem šedé hmoty větší na levé straně v oblasti Heschlova gyru, planum temporale a podobný trend byl přítomen i v oblasti gyrus frontalis superior, naopak u primární zrakové kůry byly oba parametry větší vpravo. Téměř všechny měřené parametry byly signifikantně nižší u starší populace v oblasti Heschlova gyru, planum temporale a gyrus

frontalis superior. Faktor věku neměl vliv na lateralitu kůry. V centrální části sluchové dráhy nad IC byl přítomen trend efektu věku v podobě prodloužení axiální vektoru difuzivity (L1) u starší populace. V levé hemisféře byl přítomen trend poklesu L1, který byl opět výraznější u starší populace. Efekt poruchy sluchu jsme našli u skupiny s těžkou formou presbyakuze v podobě trendu zvýšení radiálních vektorů (L2L3) v bílé hmotě pod Heschlovým gyrem. Tyto výsledky naznačují, že u stárnoucí populace jsou spolu s periferními změnami přítomny i změny v centrální části sluchového systému, velikost sluchové ztráty však nemá signifikantní vliv na centrální změny.

9. Summary

The aim of this study was to identify specific features of the structure and function of neurons in the auditory cortex of rat and in addition to find out by immunohistochemistry changes of the inhibitory systems (GAD 65 and 67) in the central auditory structures. Based on the findings in animal model (rat) we focused on changes in the central part of the auditory pathway and cortex in ageing human population that were studied by different MRI techniques (spectroscopy, morphometry, diffusion tensor imaging and functional MRI).

9.1 The response properties of neurons in different fields of the auditory cortex in the rat

Based on the neuronal responses to broad band noise (BBN) and pure tone bursts, the AC may be divided into the primary auditory cortex (AI) and three other core fields: anterior (AAF), suprarhinal (SRAF) and posterior (PAF) as well as an unspecific region (UR) inserted between the AI and AAF. The core fields are surrounded by a belt area. Neurons in the AI, AAF, SRAF and PAF showed well defined characteristic frequencies (CF) in response to pure tone stimulation; in contrast, UR neurons responded only at high intensities without a clear CF. Neurons responding only to BBN stimulation were found mostly in the belt area. The putative borders between the core fields were determined by changes in their tonotopic gradient; however, no tonotopic organization was found in the PAF. Neurons with the shortest response latencies to BBN stimulation were found in layer 4 (L4) and layer 6 (L6) in the AI, while those with the longest latencies in the superficial layers (L1/2) of the belt area. Similar principles of responsiveness were observed when the spike rate in response to BBN stimulation was evaluated, with the highest rate present in L4 of the AI and the lowest in L1/2 of the belt area. According to the shape of the peristimulus time histograms, the responses of neurons in the AC of the rat may be classified as pure onset, sustained, onset-sustained, double peak or late onset. The most dominant in all fields, as well as in all layers, was the pure onset response. The

response characteristics of auditory cortical neurons reveal tonotopy to be the only unambiguous feature for the parcellation of the AC.

9.2 Unpublished data (Electrical properties of neurons in the auditor cortex of the rat)

Based on the electrical properties, pyramidal neurons from layer 5 can be divided into two subpopulations: regular-spiking (RS) and fast-spiking (FS). We found RS cells to be prevalent among neurons in both AC parts (AI and belt area). Interestingly, RS neurons from the AI showed significantly higher resting membrane potential excitability. Their time membrane constants and input resistance values were increased by 30% compared to RS neurons from the belt area. Accordingly, AI neurons generated APTs with higher amplitudes, shorter latencies and a lower average rheobase. Another difference was in the density of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) that was elevated in belt area neurons by about 40%. Experimental blockade of I_h led to similar electrical properties in both neuronal groups, suggesting I_h was the main factor regulating the excitability of belt neurons at rest. Furthermore, I_h produced a depolarization sag in the voltage responses to low-amplitude current steps injected into AC neurons. The jitter of steady-state action potentials evoked by repetitive current stimuli was significantly reduced in belt neurons compared to their AI counterparts. This suggests that on a longer time scale, I_h could help to maintain the persistent firing of neurons from the belt region. The analysis of extracellular recorded APTs also showed two neuronal subpopulations (type 1 and type 2) based on the time course of the AHP. The distribution index showed that type 2 neurons form majority of population in superficial layers of the AC whereas type 1 dominate in all other layers as well as in the AC overall. Another difference was caused by reaction to increase of the stimulus intensity that was more pronounced in type 1 neurons. We conclude that the differential densities of I_h in AI vs. belt neurons fit their phasic vs. sustained phenotypes. The patch clamp data support the hypothesis that differences in the spiking patterns obtained

in vivo could be at least partially explained by differences in the intrinsic passive and active electrical properties of AI and belt neurons.

9.3 Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat

Age-related changes in GAD65 and GAD67 levels were investigated using immunohistochemistry and Western blotting in the inferior colliculus (IC), the auditory cortex (AC) and the visual cortex in Long-Evans rats. The results show that aging is associated with a decrease in the numbers of GAD65 and 67 immunoreactive neurons and the optical density of their somas in both the IC and AC. Western blot analysis revealed a pronounced age-related decline in the levels of GAD65 and 67 proteins in both the IC and AC. For comparison, in the visual cortex the decrease in both proteins was less pronounced than in the IC and AC. The observed age-related decline in the levels of GAD65 and 67 may contribute significantly to the deterioration of hearing function that accompanies aging in mammals, including man.

9.4 Functional changes in the auditory cortex in aging

With the aim to explore the central component of presbycusis we studied the function of the auditory cortex by functional MRI in EP, MP and YC. The elderly group with expressed presbycusis (EP) differed from the elderly group with mild presbycusis (MP) by a steady decline of hearing thresholds above 1 kHz in high frequency pure tone audiometry, significantly decreased amplitudes or missing transient oto-acoustic emissions (TEOAE) and distortion-product oto-acoustic emissions (DPOAE) and a significantly worse speech understanding in quiet and noise. The MP group showed only minimal differences in the occurrence of OAEs and the results of speech audiometry in comparison with young controls (YC), although their amplitudes of DPOAE and hearing thresholds were significantly decreased at frequencies above 4 kHz. Acoustically evoked activity (pink noise centered around 350 Hz, 700 Hz,

1.5 kHz, 3 kHz, 8 kHz) recorded by BOLD fMRI from an area centered on Heschl's gyrus was used to determine age-related changes at the level of the auditory cortex. The fMRI showed only minimal activation to 8 kHz stimulation in the EP group despite the fact that the stimulus was heard by all subjects. Both elderly groups showed greater activation to acoustical stimuli in both temporal lobes (TL) in comparison with young subjects. In addition, the activation in the right TL was in both elderly groups more expressed than in the left TL. No statistically significant differences in activation of the auditory cortex were found between the MP and EP groups. Our results show only minimal influence of hearing loss on the extent of temporal lobe activation, however ageing seems to be a significant factor. The greater extent of cortical activation in elderly subjects in comparison with young subjects may represent a compensatory mechanism for the decreased temporal processing of auditory information with ageing.

9.5 Metabolic changes in the auditory cortex in presbycusis demonstrated by MR spectroscopy

The ¹H magnetic resonance spectroscopy at 3 T tomograph was used to examine metabolite levels in the auditory cortex of three groups EP, MP and YC. Significant differences were found in the concentrations of glutamate and N-acetylaspartate, with lower levels in aged subjects. Lactate was particularly increased in subjects with expressed presbycusis. Significant differences were not found in other metabolites, including GABA, between young and elderly subjects. The results demonstrate that the age-related changes of the inner ear are accompanied by a decrease in the excitatory neurotransmitter glutamate as well as a lactate increase in the auditory cortex that is more expressed in elderly subjects with large hearing threshold shifts.

9.6 Diffusion tensor imaging and MR morphometry of the central auditory pathway and auditory cortex in aging

MR morphometry and diffusion tensor imaging (DTI) was used to study the state of the central auditory system in EP and MP group compared to YC. Cortical reconstruction, volumetric segmentation and auditory pathway tractography were performed. Three parameters were evaluated by morphometry: the volume of the gray matter, the surface area of the gyrus and the thickness of the cortex. In all experimental groups the surface area and gray matter volume were larger on the left side in Heschl's gyrus and planum temporale and slightly larger in the gyrus frontalis superior, whereas they were larger on the right side in the primary visual cortex. Almost all of the measured parameters were significantly smaller in the elderly subjects in Heschl's gyrus, planum temporale and gyrus frontalis superior. Aging did not change the laterality of the gyri. In the central part of the auditory pathway above the inferior colliculus, a trend toward an effect of aging was present in the axial vector of the diffusion (L1) variable of DTI, with increased values observed in elderly subjects. A trend toward a decrease of L1 on the left side, which was more pronounced in the elderly groups, was observed. The effect of hearing loss was present in subjects with expressed presbycusis as a trend toward an increase of the radial vectors (L2L3) in the white matter under Heschl's gyrus. These results suggest that in addition to peripheral changes, changes in the central part of the auditory system in elderly subjects are also present; however, the extent of hearing loss does not play a significant role in the central changes.

10. Literatura

1. CHABA. (1988) Speech understanding and aging. 99. *Journal of the Acoustical Society of America* 83: 859-895
2. Abel SM, Krever EM, Alberti PW (1990) Auditory detection, discrimination and speech processing in aging, noise-sensitive and hearing-impaired listeners. *Scandinavian Audiology* 19: 43-54
3. Aboitiz F, Rodriguez E, Olivares R, Zaidel E (1996) Age-related changes in fibre composition of the human corpus callosum: Sex differences. *Neuroreport* 7: 1761-1764
4. Agrawal Y, Platz EA, Niparko JK (2008) Prevalence of hearing loss and differences by demographic characteristics among US adults - Data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004. *Archives of Internal Medicine* 168: 1522-1530
5. Aitkin L, Tran L, Syka J (1994) The responses of neurons in subdivisions of the inferior colliculus of cats to tonal, noise and vocal stimuli. *Exp Brain Res* 98: 53-64
6. Alexander DC, Pierpaoli C, Basser PJ, Gee JC (2001) Spatial transformations of diffusion tensor magnetic resonance images. *Ieee Transactions on Medical Imaging* 20: 1131-1139
7. Andermann ML, Ritt J, Neimark MA, Moore CI (2004) Neural correlates of vibrissa resonance: Band-pass and somatotopic representation of high-frequency stimuli. *Neuron* 42: 451-463
8. Arnott SR, Binns MA, Grady CL, Alain C (2004) Assessing the auditory dual-pathway model in humans. *Neuroimage* 22: 401-408
9. Ascoli GA, Gasparini S, Medinilla V, Migliore M (2010) Local control of postinhibitory rebound spiking in CA1 pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* 30: 6434-6442
10. Atencio CA, Schreiner CE (2008) Spectrotemporal processing differences between auditory cortical fast-spiking and regular-spiking neurons. *J Neurosci* 28: 3897-3910
11. Atencio CA, Schreiner CE (2010) Columnar connectivity and laminar processing in cat primary auditory cortex. *PLoS One* 5: e9521
12. Atzori M, Lei S, Evans DI, Kanold PO, Phillips-Tansey E, McIntyre O, McBain CJ (2001) Differential synaptic processing separates stationary from transient inputs to the auditory cortex. *Nat Neurosci* 4: 1230-1237
13. Bai U, Seidman MD, Hinojosa R, Quirk WS (1997) Mitochondrial DNA deletions associated with aging and possibly presbycusis: A human archival temporal bone study. *American Journal of Otology* 18: 449-453
14. Balogová Z, Tintěra J, Profant O, Ibrahim I, Jílek M, Syka J (2013). Central presbycusis examined by fMRI. 11th EFAS Congress; Budapest, Hungary.
15. Baltes PB, Lindenberger U (1997) Emergence of a powerful connection between sensory and cognitive functions across the adult life span: A new window to the study of cognitive aging? *Psychology and Aging* 12: 12-21
16. Bandyopadhyay S, Shamma SA, Kanold PO (2010) Dichotomy of functional organization in the mouse auditory cortex. *Nat Neurosci* 13: 361-368

17. Barbour DL, Callaway EM (2008) Excitatory local connections of superficial neurons in rat auditory cortex. *J Neurosci* 28: 11174-11185
18. Bartho P, Hirase H, Monconduit L, Zugaro M, Harris KD, Buzsaki G (2004) Characterization of neocortical principal cells and Interneurons by network interactions and extracellular features. *Journal of Neurophysiology* 92: 600-608
19. Basser PJ, Pajevic S, Pierpaoli C, Aldroubi A (2002) Fiber tract following in the human brain using DT-MRI data. *IEEE Transactions on Information and Systems* E85D: 15-21
20. Behrens TEJ, Berg HJ, Jbabdi S, Rushworth MFS, Woolrich MW (2007) Probabilistic diffusion tractography with multiple fibre orientations: What can we gain? *Neuroimage* 34: 144-155
21. Bekeesy GV (1970) Travelling waves as frequency analysers in cochlea. *Nature* 225: 1207-&
22. Belin P, Zatorre RJ (2000) 'What', 'where' and 'how' in auditory cortex. *Nature Neuroscience* 3: 965-966
23. Bertoli S, Smurzynski J, Probst R (2002) Temporal resolution in young and elderly subjects as measured by mismatch negativity and a psychoacoustic gap detection task. *Clinical Neurophysiology* 113: 396-406
24. Bovo R, Ciorba A, Martini A (2011) Environmental and genetic factors in age-related hearing impairment. *Aging Clinical and Experimental Research* 23: 3-10
25. Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de Ribaupierre Y (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227: 194-196
26. Buchsbaum BR, Olsen RK, Koch P, Berman KF (2005) Human dorsal and ventral auditory streams subserve rehearsal-based and echoic processes during verbal working memory. *Neuron* 48: 687-697
27. Buckiova D, Popelar J, Syka J (2006) Collagen changes in the cochlea of aged Fischer 344 rats. *Experimental Gerontology* 41: 296-302
28. Buckiova D, Popelar J, Syka J (2007) Aging cochleas in the F344 rat: Morphological and functional changes. *Experimental Gerontology* 42: 629-638
29. Burkard RF, Sims D (2001) The human auditory brainstem response to high click rates: aging effects. *Am J Audiol* 10: 53-61
30. Burkhalter A (1989) Intrinsic connections of rat primary visual cortex: laminar organization of axonal projections. *J Comp Neurol* 279: 171-186
31. Cabeza R (2001) Cognitive neuroscience of aging: Contributions of functional neuroimaging. *Scandinavian Journal of Psychology* 42: 277-286
32. Cabeza R, Daselaar SM, Dolcos F, Prince SE, Budde M, Nyberg L (2004) Task-independent and task-specific age effects on brain activity during working memory, visual attention and episodic retrieval. *Cerebral Cortex* 14: 364-375
33. Cabeza R, Nyberg L (2000) Imaging cognition II: An empirical review of 275 PET and fMRI studies. *Journal of Cognitive Neuroscience* 12: 1-47
34. Canlon B, Illing RB, Walton J (2010) Cell Biology and Physiology of the Aging Central Auditory Pathway. *Aging Auditory System* 34: 39-74

35. Caspary DM, Milbrandt JC, Helfert RH (1995) Central auditory aging - GABA changes in the inferior colliculus. *Experimental Gerontology* 30: 349-360
36. Caspary DM, Palombi PS, Hughes LF (2002) GABAergic inputs shape responses to amplitude modulated stimuli in the inferior colliculus. *Hearing Research* 168: 163-173
37. Caspary DM, Schatteman TA, Hughes LF (2005) Age-related changes in the inhibitory response properties of dorsal cochlear nucleus output neurons: Role of inhibitory inputs. *Journal of Neuroscience* 25: 10952-10959
38. Chang L, Jiang CS, Ernst T (2009) Effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites. *Magnetic Resonance Imaging* 27: 142-145
39. Chang YM, Lee SH, Lee YJ, Hwang MJ, Bae SJ, Kim MN, Lee JM, Woo SK, Lee HJ, Kang DS (2004) Auditory neural pathway evaluation on sensorineural hearing loss using diffusion tensor imaging. *Neuroreport* 15: 1699-1703
40. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BEK, Wiley TL, Nondahl DM, Tweed TS (1998) Cigarette smoking and hearing loss - The epidemiology of hearing loss study. *Jama-Journal of the American Medical Association* 279: 1715-1719
41. Dallos P, Evans BN (1995) High-frequency motility of outer hair-cells and the cochlear amplifier. *Science* 267: 2006-2009
42. Davis A, Smith P, Ferguson M, Stephens D, Gianopoulos I (2007) Acceptability, benefit and costs of early screening for hearing disability: a study of potential screening tests and models. *Health Technology Assessment* 11: 1-294
43. De Ceulaer G, Yperman M, Daemers K, Van Driessche K, Somers T, Offeciers FE, Govaerts PJ (2001) Contralateral suppression of transient evoked otoacoustic emissions: normative data for a clinical test set-up. *Otol Neurotol* 22: 350-355
44. de la Mothe LA, Blumell S, Kajikawa Y, Hackett TA (2006) Thalamic connections of the auditory cortex in marmoset monkeys: core and medial belt regions. *J Comp Neurol* 496: 72-96
45. deJong GI, Naber PA, VanderZee EA, Thompson LT, Disterhoft JF, Luiten PGM (1996) Age-related loss of calcium binding proteins in rabbit hippocampus. *Neurobiology of Aging* 17: 459-465
46. del Campo HNM, Measor KR, Razak KA (2012) Parvalbumin immunoreactivity in the auditory cortex of a mouse model of presbycusis. *Hearing Research* 294: 31-39
47. Dennis NA, Cabeza R (2008) Neuroimaging of healthy cognitive aging. In *The handbook of aging and cognition*, Craik FIM, Salthouse TA (eds), 3rd edn, pp 1-54. New York, NY: Psychology Press
48. Desikan RS, Segonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D, Buckner RL, Dale AM, Maguire RP, Hyman BT, Albert MS, Killiany RJ (2006) An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 31: 968-980
49. Destrieux C, Fischl B, Dale A, Halgren E (2010) Automatic parcellation of human cortical gyri and sulci using standard anatomical nomenclature. *Neuroimage* 53: 1-15
50. Dlouhá O, Vokřál J (2011) Test of sentence intelligibility in babble noise in persons with normal hearing. *Otorinolaringologie a foniatrie* 60: 125-130

51. Doležal P, Kabátová Z (2012) Tónová audiometria. In *Audiológia*, Kabátová Z, Profant M (eds), pp 67-97. Praha: Grada publishing
52. Doron NN, Ledoux JE, Semple MN (2002) Redefining the tonotopic core of rat auditory cortex: physiological evidence for a posterior field. *J Comp Neurol* 453: 345-360
53. Druga R, Syka J (1984) Projections from auditory structures to the superior colliculus in the rat. *Neuroscience Letters* 45: 247-252
54. du Boisgueheneuc F, Levy R, Volle E, Seassau M, Duffau H, Kinkingnehun S, Samson Y, Zhang S, Dubois B (2006) Functions of the left superior frontal gyrus in humans: a lesion study. *Brain* 129: 3315-3328
55. Dégenétais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2002) Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex* 12: 1-16
56. Eckert MA, Walczak A, Ahlstrom J, Denslow S, Horwitz A, Dubno JR (2008) Age-related effects on word recognition: Reliance on cognitive control systems with structural declines in speech-responsive cortex. *JARO-Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 9: 252-259
57. Ehret G, Moffat AJM (1985) Inferior colliculus of the house mouse. II. Single unit responses to tones, noise and tone-noise combinations as a function of sound intensity. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* 156: 619-635
58. Emir UE, Raatz S, McPherson S, Hodges JS, Torkelson C, Tawfik P, White T, Terpstra M (2011) Noninvasive quantification of ascorbate and glutathione concentration in the elderly human brain. *Nmr in Biomedicine* 24: 888-894
59. Engle JR, Recanzone GH (2013) Characterizing spatial tuning functions of neurons in the auditory cortex of young and aged monkeys: a new perspective on old data. *Frontiers in Aging Neuroscience* 4
60. Firszt JB, Ulmer JL, Gaggl W (2006) Differential representation of speech sounds in the human cerebral hemispheres. *Anatomical Record Part a-Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 288A: 345-357
61. Fischl B (2012) FreeSurfer. *Neuroimage* 62: 774-781
62. Fitch RH, Miller S, Tallal P (1997) Neurobiology of speech perception. *Annual Review of Neuroscience* 20: 331-353
63. Friedman RA, Van Laer L, Huentelman MJ, Sheth SS, Van Eyken E, Corneveaux JJ, Tembe WD, Halperin RF, Thorburn AQ, Thys S, Bonneux S, Franssen E, Huyghe J, Pyykkö I, Cremers C, Kremer H, Dhooge I, Stephens D, Orzan E, Pfister M, Bille M, Parving A, Sorri M, Van de Heyning PH, Makmura L, Ohmen JD, Linthicum FH, Fayad JN, Pearson JV, Craig DW, Stephan DA, Van Camp G (2009) GRM7 variants confer susceptibility to age-related hearing impairment. *Human Molecular Genetics* 18: 785-796
64. Frisina DR, Frisina RD (1997) Speech recognition in noise and presbycusis: Relations to possible neural mechanisms. *Hearing Research* 106: 95-104
65. Frisina RD (2001) Subcortical neural coding mechanisms for auditory temporal processing. *Hearing Research* 158: 1-27

66. Fujioka T, Ross B, Okamoto H, Takeshima Y, Kakigi R, Pantev C (2003) Tonotopic representation of missing fundamental complex sounds in the human auditory cortex. *European Journal of Neuroscience* 18: 432-440
67. Fullerton BC, Pandya DN (2007) Architectonic analysis of the auditory-related areas of the superior temporal region in human brain. *Journal of Comparative Neurology* 504: 470-498
68. Games KD, Winer JA (1988) Layer V in rat auditory cortex: projections to the inferior colliculus and contralateral cortex. *Hear Res* 34: 1-25
69. Gardner G, Robertson JH (1988) Hearing preservation in unilateral acoustic neuroma surgery. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology* 97: 55-66
70. Gates GA, Cobb JL, Linn RT, Rees T, Wolf PA, Dagostino RB (1996) Central auditory dysfunction, cognitive dysfunction, and dementia in older people. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 122: 161-167
71. Gates GA, Cooper JC (1991) Incidence of hearing decline in the elderly. *Acta Otolaryngologica* 111: 240-248
72. Gates GA, Mills JH (2005) Presbycusis. *Lancet* 366: 1111-1120
73. George P, Charles W (1998) *The Rat Brain: In stereotaxic coordinates*, 3rd edition edn.: Academic press.
74. Gopinath B, Rochtchina E, Wang JJ, Schneider J, Leeder SR, Mitchell P (2009) Prevalence of Age-Related Hearing Loss in Older Adults: Blue Mountains Study. *Archives of Internal Medicine* 169: 415-416
75. Gordon-Salant S, Fitzgibbons PJ (1993) Temporal factors and speech recognition performance in young and elderly listeners. *Journal of Speech and Hearing Research* 36: 1276-1285
76. Groh D, Seeman P, Jilek M, Popelar J, Kabelka Z, Syka J (2013) Hearing Function in Heterozygous Carriers of a Pathogenic GJB2 Gene Mutation. *Physiological Research* 62: 323-330
77. Groschel M, Gotze R, Ernst A, Basta D (2010) Differential Impact of Temporary and Permanent Noise-Induced Hearing Loss on Neuronal Cell Density in the Mouse Central Auditory Pathway. *Journal of Neurotrauma* 27: 1499-1507
78. 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
79. Gutierrez A, Khan ZU, Morris SJ, Deblas AL (1994) Age-related decrease of GABA(a) receptor subunits and glutamic-acid decarboxylase in the rat inferior colliculus. *Journal of Neuroscience* 14: 7469-7477
80. Gutteridge JMC, Halliwell B (2010) Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393: 561-564
81. Hackett TA, Preuss TM, Kaas JH (2001) Architectonic identification of the core region in auditory cortex of macaques, chimpanzees, and humans. *J Comp Neurol* 441: 197-222

82. Hall JW, Baer JE, Chase PA, Schwaber MK (1994) Clinical application of otoacoustic emissions: what do we know about factors influencing measurement and analysis? *Otolaryngol Head Neck Surg* 110: 22-38
83. Harker KT, Wishaw IQ (2002) Place and matching-to-place spatial learning affected by rat inbreeding (Dark-Agouti, Fischer 344) and albinism (Wistar, Sprague-Dawley) but not domestication (wild rat vs. Long-Evans, Fischer-Norway). *Behavioural Brain Research* 134: 467-477
84. He J (2002) OFF responses in the auditory thalamus of the guinea pig. *J Neurophysiol* 88: 2377-2386
85. He J, Hashikawa T, Ojima H, Kinouchi Y (1997) Temporal integration and duration tuning in the dorsal zone of cat auditory cortex. *J Neurosci* 17: 2615-2625
86. Heiervang E, Hugdahl K, Steinmetz H, Inge Smievoll A, Stevenson J, Lund A, Erslund L, Lundervold A (2000) Planum temporale, planum parietale and dichotic listening in dyslexia. *Neuropsychologia* 38: 1704-1713
87. Heil P (2004) First-spike latency of auditory neurons revisited. *Curr Opin Neurobiol* 14: 461-467
88. 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. *Journal of Comparative Neurology* 406: 285-298
89. Hickok G, Poeppel D (2007) Opinion - The cortical organization of speech processing. *Nature Reviews Neuroscience* 8: 393-402
90. Horikawa K, Kinjo N, Stanley LC, Powell EW (1988) Topographic organization and collateralization of the projections of the anterior and laterodorsal thalamic nuclei to cingulate areas 24 and 29 in the rat. *Neurosci Res* 6: 31-44
91. Huetz C, Gourevitch B, Edeline JM (2011) Neural codes in the thalamocortical auditory system: From artificial stimuli to communication sounds. *Hearing Research* 271: 147-158
92. Huggenberger S, Vater M, Deisz RA (2009) Interlaminar differences of intrinsic properties of pyramidal neurons in the auditory cortex of mice. *Cereb Cortex* 19: 1008-1018
93. Humes LE, Busey TA, Craig J, Kewley-Port D (2013) Are age-related changes in cognitive function driven by age-related changes in sensory processing? *Attention Perception & Psychophysics* 75: 508-524
94. Humes LE, Dubno JR (2010) Factors Affecting Speech Understanding in Older Adults. *Aging Auditory System* 34: 211-257
95. Humes LE, Dubno JR, Gordon-Salant S, Lister JJ, Cacace AT, Cruickshanks KJ, Gates GA, Wilson RH, Wingfield A (2012) Central Presbycusis: A Review and Evaluation of the Evidence. *Journal of the American Academy of Audiology* 23: 635-666
96. Humes LE, Halling D, Coughlin M (1996) Reliability and stability of various hearing-aid outcome measures in a group of elderly hearing-aid wearers. *Journal of Speech and Hearing Research* 39: 923-935

97. Huyghe JR, Van Laer L, Hendrickx JJ, Fransen E, Demeester K, Topsakal V, Kunst S, Manninen M, Jensen M, Bonaconsa A, Mazzoli M, Baur M, Hannula S, Maki-Torkko E, Espeso A, Van Eyken E, Flaquer A, Becker C, Stephens D, Sorri M, Orzan E, Bille M, Parving A, Pyykko I, Cremers C, Kremer H, Van de Heyning PH, Wienker TE, Nurnberg P, Pfister M, Van Camp G (2008) Genome-wide SNP-based linkage scan identifies a locus on 8q24 for an age-related hearing impairment trait. *American Journal of Human Genetics* 83: 401-407
98. Hwang IK, Kim DS, Lee HY, Lee JY, Choi GP, Lee DI, Kim JD, Lee YB, Sohn HS, Kang TC, Won MH (2003) Age-related changes of parvalbumin immunoreactive neurons in the rat main olfactory bulb. *Molecules and Cells* 16: 302-306
99. Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Viberg A, Canlon B (2003) Auditory peripheral influences on calcium binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus during aging in the C57BL/6J mouse. *Hearing Research* 179: 33-42
100. Idrizbegovic E, Bogdanovic N, Willott JF, Canlon B (2004) Age-related increases in calcium-binding protein immunoreactivity in the cochlear nucleus of hearing impaired C57BL/6J mice. *Neurobiology of Aging* 25: 1085-1093
101. Jenkinson M, Beckmann CF, Behrens TE, Woolrich MW, Smith SM (2012) FSL. *Neuroimage* 62: 782-790
102. Jensen JE, Frederick BD, Renshaw PF (2005) Grey and white matter GABA level differences in the human brain using two-dimensional, J-resolved spectroscopic imaging. *Nmr in Biomedicine* 18: 570-576
103. Jerger J, Jerger S, Oliver T, Pirozzolo F (1989) Speech understanding in the elderly. *Ear and Hearing* 10: 79-89
104. Jilek M, Šuta D, Syka J (2014) Reference hearing thresholds in an extended frequency range as a function of age and their mathematical approximation. *J Acoust Soc Am* under review
105. Jones EG (2003) Chemically defined parallel pathways in the monkey auditory system. *Neurosciences and Music* 999: 218-233
106. Kaas J, H. (2010) The Evolution of Auditory Cortex: The Core Areas. In *The Auditory Cortex*, Winer J, A., Schreiner C, E. (eds), 2011 edn, 19, pp 407-427. New York: Springer
107. Kaas JH, Hackett TA (2000) Subdivisions of auditory cortex and processing streams in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11793-11799
108. Kabátová Z (2012) Rečová audiometria. In *Audiológia*, Kabátová Z, Profant M (eds), pp 99-110. Praha: Grada publishing
109. Kaiser LG, Schuff N, Cashdollar N, Weiner MW (2005) Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: H-1 MR spectroscopy study at 4T. *Neurobiology of Aging* 26: 665-672
110. Kalatsky VA, Polley DB, Merzenich MM, Schreiner CE, Stryker MP (2005) Fine functional organization of auditory cortex revealed by Fourier optical imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13325-13330
111. Kamal B, Holman C, de Villers-Sidani E (2013) Shaping the aging brain: role of auditory input patterns in the emergence of auditory cortical impairments. *Front Syst Neurosci* 7: 52

112. Kang Y, Kayano F (1994) Electrophysiological and morphological characteristics of layer VI pyramidal cells in the cat motor cortex. *J Neurophysiol* 72: 578-591
113. Kaur S, Rose HJ, Lazar R, Liang K, Metherate R (2005) Spectral integration in primary auditory cortex: laminar processing of afferent input, in vivo and in vitro. *Neuroscience* 134: 1033-1045
114. Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex* 7: 476-486
115. Keithley EM, Ryan AF, Feldman ML (1992) Cochlear degeneration in aged rats of 4 strains. *Hearing Research* 59: 171-178
116. Kelly JB, Sally SL (1988) Organization of auditory cortex in the albino rat: binaural response properties. *J Neurophysiol* 59: 1756-1769
117. Kemp DT (1986) Otoacoustic emissions, traveling waves and cochlear mechanisms. *Hearing Research* 22: 95-104
118. Kemp DT (2002) Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. *Br Med Bull* 63: 223-241
119. Khalifa S, Collet L (1996) Functional asymmetry of medial olivocochlear system in humans. Towards a peripheral auditory lateralization. *Neuroreport* 7: 993-996
120. Kidd AR, Bao JX (2012) Recent Advances in the Study of Age-Related Hearing Loss: A Mini-Review. *Gerontology* 58: 490-496
121. Knecht S, Drager B, Deppe M, Bobe L, Lohmann H, Floel A, Ringelstein EB, Henningsen H (2000) Handedness and hemispheric language dominance in healthy humans. *Brain* 123: 2512-2518
122. Krzywkowski P, Debilbao F, Senut MC, Lamour Y (1995) Age-related-changes in parvalbumin-immunoreactive and GABA-immunoreactive cells in the rat septum. *Neurobiology of Aging* 16: 29-40
123. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-484
124. Kurniawan C, Westendorp RGJ, de Craen AJM, Gussekloo J, de Laat J, van Exel E (2012) Gene dose of apolipoprotein E and age-related hearing loss. *Neurobiology of Aging* 33
125. Kuwada S, Batra R (1999) Coding of sound envelopes by inhibitory rebound in neurons of the superior olivary complex in the unanesthetized rabbit. *Journal of Neuroscience* 19: 2273-2287
126. Kuwada S, Yin TCT, Syka J, Buunen TJF, Wickesberg RE (1984) Binaural interaction in low-frequency neurons in inferior colliculus of the cat. IV. Comparison of monaural and binaural response properties. *Journal of Neurophysiology* 51: 1306-1325
127. Kvasnak E, Suta D, Popelar J, Syka J (1998) Neuronal connections and types of responses in the medial geniculate body of guinea pig. *European Journal of Neuroscience* 10: 411-411
128. Kvasnak E, Suta D, Popelar J, Syka J (2000) Neuronal connections in the medial geniculate body of the guinea-pig. *Experimental Brain Research* 132: 87-102

129. Kwegyir-Afful EE, Simons DJ (2009) Subthreshold receptive field properties distinguish different classes of corticothalamic neurons in the somatosensory system. *J Neurosci* 29: 964-972
130. Langers DRM, Backes WH, van Dijk P (2007) Representation of lateralization and tonotopy in primary versus secondary human auditory cortex. *Neuroimage* 34: 264-273
131. Langers DRM, van Dijk P (2012) Mapping the Tonotopic Organization in Human Auditory Cortex with Minimally Salient Acoustic Stimulation. *Cerebral Cortex* 22: 2024-2038
132. Ledoux JE, Sakaguchi A, Iwata J, Reis DJ (1985) Auditory emotional memories - establishment by projections from the medial geniculate-nucleus to the posterior neostriatum and or dorsal amygdala. *Annals of the New York Academy of Sciences* 444: 463-464
133. Levy RB, Reyes AD (2012) Spatial Profile of Excitatory and Inhibitory Synaptic Connectivity in Mouse Primary Auditory Cortex. *Journal of Neuroscience* 32: 5609-5619
134. Li XY, Shao XC, Wang NZ, Wang T, Chen GY, Zhou HD (2010) Correlation of auditory event-related potentials and magnetic resonance spectroscopy measures in mild cognitive impairment. *Brain Research* 1346: 204-212
135. Liang L, Lu T, Wang XQ (2002) Neural representations of sinusoidal amplitude and frequency modulations in the primary auditory cortex of awake primates. *Journal of Neurophysiology* 87: 2237-2261
136. Lin FR, Maas P, Chien W, Carey JP, Ferrucci L, Thorpe R (2012) Association of Skin Color, Race/Ethnicity, and Hearing Loss Among Adults in the USA. *JARO-Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 13: 109-117
137. Lin HW, Bhattacharyya N (2011) Otologic Diagnoses in the Elderly: Current Utilization and Predicted Workload Increase. *Laryngoscope* 121: 1504-1507
138. Lin Y, Wang J, Wu C, Wai Y, Yu J, Ng S (2008) Diffusion tensor imaging of the auditory pathway in sensorineural hearing loss: changes in radial diffusivity and diffusion anisotropy. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 28: 598-603
139. Linden JF, Schreiner CE (2003) Columnar transformations in auditory cortex? A comparison to visual and somatosensory cortices. *Cereb Cortex* 13: 83-89
140. 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
141. Lomber SG, Meredith MA, Kral A (2011) Adaptive crossmodal plasticity in deaf auditory cortex: areal and laminar contributions to supranormal vision in the deaf. *Enhancing Performance for Action and Perception: Multisensory Integration, Neuroplasticity and Neuroprosthetics, Pt I* 191: 251-270
142. Lonsbury-Martin BL, Martin GK (2003) Otoacoustic emissions. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11: 361-366
143. Lopez OL, Becker JT, Sweet RA, Klunk W, Kaufer DI, Saxton J, Habeych M, DeKosky ST (2003) Psychiatric symptoms vary with the severity of dementia in probable Alzheimer's disease. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 15: 346-353
144. Lunner T, Rudner M, Ronnberg J (2009) Cognition and hearing aids. *Scandinavian Journal of Psychology* 50: 395-403

145. Lutz J, Hemminger F, Stahl R, Dietrich O, Hempel M, Reiser M, Jager L (2007) Evidence of subcortical and cortical aging of the acoustic pathway: A diffusion tensor imaging (DTI) study. *Academic Radiology* 14: 692-700
146. Madden DJ, Bennett IJ, Burzynska A, Potter GG, Chen NK, Song AW (2012) Diffusion tensor imaging of cerebral white matter integrity in cognitive aging. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1822: 386-400
147. Madden DJ, Bennett IJ, Song AW (2009) Cerebral White Matter Integrity and Cognitive Aging: Contributions from Diffusion Tensor Imaging. *Neuropsychology Review* 19: 415-435
148. Manly JJ, Touradji P, Tang MX, Stern Y (2003) Literacy and memory decline among ethnically diverse elders. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 25: 680-690
149. Markaryan A, Nelson EG, Hinojosa R (2010) Major arc mitochondrial DNA deletions in cytochrome c oxidase-deficient human cochlear spiral ganglion cells. *Acta Oto-Laryngologica* 130: 780-787
150. Mazelová J, Popelar J, Syka J (2003) Auditory function in presbycusis: peripheral vs. central changes. *Exp Gerontol* 38: 87-94
151. McAnally KI, Clark GM, Syka J (1993) Hair cell-mediated responses of the auditory-nerve to sinusoidal electrical-stimulation of the cochlea in the cat. *Hearing Research* 67: 55-68
152. McCormack A, Fortnum H (2013) Why do people fitted with hearing aids not wear them? *International Journal of Audiology* 52: 360-368
153. McFadden SL, Campo P, Quaranta N, Henderson D (1997) Age-related decline of auditory function in the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Hearing Research* 111: 114-126
154. Melichar I, Syka J (1982) Correlation between endocochlear potential and vascular stria potential. *Journal De Physiologie* 78: A42-A42
155. Merchan M, Aguilar LA, Lopez-Poveda EA, Malmierca MS (2005) The inferior colliculus of the rat: Quantitative immunocytochemical study of GABA and glycine. *Neuroscience* 136: 907-925
156. Merrill DA, Chiba AA, Tuszyński MH (2001) Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *Journal of Comparative Neurology* 438: 445-456
157. Miao W, Li J, Tang M, Xian J, Li W, Liu Z, Liu S, Sabel BA, Wang Z, He H (2012) Altered White Matter Integrity in Adolescents with Prelingual Deafness: A High-Resolution Tract-Based Spatial Statistics Imaging Study. *AJNR Am J Neuroradiol*
158. Middelweerd MJ, Festen JM, Plomp R (1990) Difficulties with speech-intelligibility in noise in spite of a normal pure-tone audiogram. *Audiology* 29: 1-7
159. Milham MP, Erickson KI, Banich MT, Kramer AF, Webb A, Wszalek T, Cohen NJ (2002) Attentional control in the aging brain: Insights from an fMRI study of the Stroop task. *Brain and Cognition* 49: 277-296
160. Miller CA (2011) Auditory Processing Theories of Language Disorders: Past, Present, and Future. *Language Speech and Hearing Services in Schools* 42: 309-319

161. Mitani A, Shimokouchi M, Itoh K, Nomura S, Kudo M, Mizuno N (1985) Morphology and laminar organization of electrophysiologically identified neurons in the primary auditory cortex in the cat. *J Comp Neurol* 235: 430-447
162. Moffat SD, Elkins W, Resnick SM (2006) Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation. *Neurobiology of Aging* 27: 965-972
163. Morris JS, Friston KJ, Dolan RJ (1998) Experience-dependent modulation of tonotopic neural responses in human auditory cortex. *Proc Biol Sci* 265: 649-657
164. Mutter SA, Haggbloom SJ, Plumlee LF, Schirmer AR (2006) Aging, working memory, and discrimination learning. *Quarterly Journal of Experimental Psychology* 59: 1556-1566
165. Newman SD, Twieg D (2001) Differences in auditory processing of words and pseudowords: An fMRI study. *Human Brain Mapping* 14: 39-47
166. Niu X, Trifunovic A, Larsson NG, Canlon B (2007) Somatic mtDNA mutations cause progressive hearing loss in the mouse. *Experimental Cell Research* 313: 3924-3934
167. Nuding SC, Chen GD, Sinex DG (1999) Monaural response properties of single neurons in the chinchilla inferior colliculus. *Hear Res* 131: 89-106
168. O'Gorman RL, Michels L, Edden RA, Murdoch JB, Martin E (2011) In Vivo Detection of GABA and Glutamate With MEGA-PRESS: Reproducibility and Gender Effects. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 33: 1262-1267
169. Oertel D, Young ED (2004) What's a cerebellar circuit doing in the auditory system? *Trends in Neurosciences* 27: 104-110
170. Ohlemiller KK, Rice MER, Lett JM, Gagnon PM (2009) Absence of strial melanin coincides with age-associated marginal cell loss and endocochlear potential decline. *Hearing Research* 249: 1-14
171. Ojima H, Murakami K (2002) Intracellular characterization of suppressive responses in supragranular pyramidal neurons of cat primary auditory cortex in vivo. *Cereb Cortex* 12: 1079-1091
172. Oliver LD (2005) Neuronal organization in the inferior colliculus. In *The Inferior Colliculus*, JA W, CE S (eds), 1st edn, pp 709-723. New York: Springer
173. Ouda L, Burianova J, Syka J (2012) Age-related changes in calbindin and calretinin immunoreactivity in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* 47: 497-506
174. Ouda L, Druga R, Syka J (2008) Changes in parvalbumin immunoreactivity with aging in the central auditory system of the rat. *Experimental Gerontology* 43: 782-789
175. Ouda L, Syka J (2012) Immunocytochemical profiles of inferior colliculus neurons in the rat and their changes with aging. *Frontiers in Neural Circuits* 6
176. Park DC, Reuter-Lorenz P (2009) The Adaptive Brain: Aging and Neurocognitive Scaffolding. *Annual Review of Psychology* 60: 173-196
177. Penhune VB, Cismaru R, Dorsaint-Pierre R, Petitto LA, Zatorre RJ (2003) The morphometry of auditory cortex in the congenitally deaf measured using MRI. *Neuroimage* 20: 1215-1225

178. Persad CC, Abeles N, Zacks RT, Denburg NL (2002) Inhibitory changes after age 60 and their relationship to measures of attention and memory. *Journals of Gerontology Series B-Psychological Sciences and Social Sciences* 57: P223-P232
179. Petitto LA, Zatorre RJ, Gauna K, Nikelski EJ, Dostie D, Evans AC (2000) Speech-like cerebral activity in profoundly deaf people processing signed languages: Implications for the neural basis of human language. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 13961-13966
180. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RDC. (2010) NLME: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. .
181. Poe BH, Linville C, Brunso-Bechtold J (2001) Age-related decline of presumptive inhibitory synapses in the sensorimotor cortex as revealed by the physical disector. *Journal of Comparative Neurology* 439: 65-72
182. Poeppel D, Idsardi WJ, van Wassenhove V (2008) Speech perception at the interface of neurobiology and linguistics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 363: 1071-1086
183. Polley DB, Read HL, Storace DA, Merzenich MM (2007) Multiparametric auditory receptive field organization across five cortical fields in the albino rat. *J Neurophysiol* 97: 3621-3638
184. Popelar J, Groh D, Mazelova J, Syka J (2003) Cochlear function in young and adult Fischer 344 rats. *Hear Res* 186: 75-84
185. Popelar J, Groh D, Pelánová J, Canlon B, Syka J (2006) Age-related changes in cochlear and brainstem auditory functions in Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging* 27: 490-500
186. Popelar J, Valvoda J, Syka J (1999) Acoustically and electrically evoked contralateral suppression of otoacoustic emissions in guinea pigs. *Hearing Research* 135: 61-70
187. Prieto JJ, Peterson BA, Winer JA (1994) Laminar distribution and neuronal targets of GABAergic axon terminals in cat primary auditory cortex (AI). *J Comp Neurol* 344: 383-402
188. Prieve BA, Fitzgerald TS, Schulte LE, Kemp DT (1997) Basic characteristics of distortion product otoacoustic emissions in infants and children. *J Acoust Soc Am* 102: 2871-2879
189. Profant O, Burianova J, Syka J (2013) The response properties of neurons in different fields of the auditory cortex in the rat. *Hearing Research* 296: 51-59
190. Profant O, Durisin M (2012) Anatomia a fyziológia sluchového orgánu. In *Audiológia*, Kabátová Z, Profant M (eds), pp 11-43. Praha: Grada Publishing
191. Profant O, Kabátová Z, Kluch J (2012) Sluchové evokované potenciály. In *Audiológia*, Kabátová Z, Profant M (eds), pp 153-173. Praha: Grada
192. Provencher SW (1993) Estimation of metabolite concentrations from localized in-vivo proton NMR-spectra. *Magnetic Resonance in Medicine* 30: 672-679
193. Pysanenko K, Profant O, Syka J, Tureček R (2010). Comparison of the electrophysiological membrane properties of layer V pyramidal neurons in the primary auditory cortex and belt area of the rat. 47th Inner Ear Biology Workshop; Prague, Czech republic.
194. Qin L, Chimoto S, Sakai M, Wang J, Sato Y (2007) Comparison between offset and onset responses of primary auditory cortex ON-OFF neurons in awake cats. *J Neurophysiol* 97: 3421-3431

195. Radvansky GA, Dijkstra K (2007) Aging and situation model processing. *Psychonomic Bulletin & Review* 14: 1027-1042
196. Rauschecker JP, Scott SK (2009) Maps and streams in the auditory cortex: nonhuman primates illuminate human speech processing. *Nature Neuroscience* 12: 718-724
197. Raz N, Gunning-Dixon F, Head D, Rodrigue KM, Williamson A, Acker JD (2004) Aging, sexual dimorphism, and hemispheric asymmetry of the cerebral cortex: replicability of regional differences in volume. *Neurobiology of Aging* 25: 377-396
198. Razak KA, Fuzessery ZM (2009) GABA Shapes Selectivity for the Rate and Direction of Frequency-Modulated Sweeps in the Auditory Cortex. *Journal of Neurophysiology* 102: 1366-1378
199. Recanzone GH (2000) Response profiles of auditory cortical neurons to tones and noise in behaving macaque monkeys. *Hear Res* 150: 104-118
200. Reimer A, Hubka P, Engel AK, Kral A (2011) Fast propagating waves within the rodent auditory cortex. *Cereb Cortex* 21: 166-177
201. Richards TL, Gates GA, Gardner JC, Merrill T, Hayes CE, Panagiotides H, Serafini S, Rubel EW (1997) Functional MR spectroscopy of the auditory cortex in healthy subjects and patients with sudden hearing loss. *American Journal of Neuroradiology* 18: 611-620
202. Rodriguez-Aranda C, Martinussen M (2006) Age-related differences in performance of phonemic verbal fluency measured by Controlled Oral Word Association Task (COWAT): A meta-analytic study. *Developmental Neuropsychology* 30: 697-717
203. Romanski LM, Bates JF, Goldman-Rakic PS (1999a) Auditory belt and parabelt projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 403: 141-157
204. Romanski LM, Tian B, Fritz J, Mishkin M, Goldman-Rakic PS, Rauschecker JP (1999b) Dual streams of auditory afferents target multiple domains in the primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 2: 1131-1136
205. Ross JM, Öberg J, Brené S, Coppotelli G, Terzioglu M, Pernold K, Goiny M, Sitnikov R, Kehr J, Trifunovic A, Larsson NG, Hoffer BJ, Olson L (2010) High brain lactate is a hallmark of aging and caused by a shift in the lactate dehydrogenase A/B ratio. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20087-20092
206. Rothschild G, Nelken I, Mizrahi A (2010) Functional organization and population dynamics in the mouse primary auditory cortex. *Nat Neurosci* 13: 353-360
207. Rutkowski RG, Miasnikov AA, Weinberger NM (2003a) Characterisation of multiple physiological fields within the anatomical core of rat auditory cortex. *Hear Res* 181: 116-130
208. Rutkowski RG, Miasnikov AA, Weinberger NM (2003b) Characterisation of multiple physiological fields within the anatomical core of rat auditory cortex. *Hear Res* 181: 116-130
209. Rybalko N, Suta D, Nwabueze-Ogbo F, Syka J (2006) Effect of auditory cortex lesions on the discrimination of frequency-modulated tones in rats. *European Journal of Neuroscience* 23: 1614-1622
210. Rybalko N, Suta D, Popelar J, Syka J (2010) Inactivation of the left auditory cortex impairs temporal discrimination in the rat. *Behavioural Brain Research* 209: 123-130

211. Sadagopan S, Wang X (2010) Contribution of inhibition to stimulus selectivity in primary auditory cortex of awake primates. *J Neurosci* 30: 7314-7325
212. Sally SL, Kelly JB (1988) Organization of auditory cortex in the albino rat: sound frequency. *J Neurophysiol* 59: 1627-1638
213. Salonen J, Johansson R, Karjalainen S, Vahlberg T, Jero JP, Isoaho R (2013) Hearing aid compliance in the elderly. *B-Ent* 9: 23-28
214. Salthouse TA (2010) The paradox of cognitive change. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 32: 622-629
215. Sass B, Rabstein LS, Madison R, Nims RM, Peters RL, Kelloff GJ (1975) Incidence of spontaneous neoplasms in f344 rats throughout natural life-span. *Journal of the National Cancer Institute* 54: 1449-1456
216. Scherer EQ, Herzog M, Wangemann P (2002) Endothelin-1-induced vasospasms of spiral modiolar artery are mediated by Rho-kinase-induced Ca²⁺ sensitization of contractile apparatus and reversed by calcitonin gene-related peptide. *Stroke* 33: 2965-2971
217. Schirmer A, Fox PM, Grandjean D (2012) On the spatial organization of sound processing in the human temporal lobe: A meta-analysis. *Neuroimage* 63: 137-147
218. Schneider BA, Pichora-Fuller MK (2000) Implications of perceptual deterioration for cognitive aging research. . In *Handbook of aging and cognition.* , Craik FIM, Salthouse TA (eds), pp 155–220. Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Inc
219. Scholl B, Wehr M (2008) Disruption of balanced cortical excitation and inhibition by acoustic trauma. *J Neurophysiol* 100: 646-656
220. Schonwiesner M, Krumbholz K, Rubsamen R, Fink GR, von Cramon DY (2007) Hemispheric asymmetry for auditory processing in the human auditory brain stem, thalamus, and cortex. *Cerebral Cortex* 17: 492-499
221. Schonwiesner M, Rubsamen R, von Cramon DY (2005) Hemispheric asymmetry for spectral and temporal processing in the human antero-lateral auditory belt cortex. *European Journal of Neuroscience* 22: 1521-1528
222. Schreiner CE, Winer JA (2007) Auditory cortex mapmaking: principles, projections, and plasticity. *Neuron* 56: 356-365
223. Schubert F, Gallinat J, Seifert F, Rinneberg H (2004) Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. *Neuroimage* 21: 1762-1771
224. Schuknecht HF, Gacek MR (1993) Cochlear pathology in presbycusis. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology* 102: 1-16
225. Seeman M (1960) Czech speech audiometry, Prague: Státní zdravotnické nakladatelství.
226. Shapleske J, Rossell SL, Woodruff PWR, David AS (1999) The planum temporale: a systematic, quantitative review of its structural, functional and clinical significance. *Brain Research Reviews* 29: 26-49
227. Sharp DJ, Scott SK, Mehra MA, Wise RJS (2006) The neural correlates of declining performance with age: Evidence for age-related changes in cognitive control. *Cerebral Cortex* 16: 1739-1749

228. Sheikh SN, Martin SB, Martin DL (1999) Regional distribution and relative amounts of glutamate decarboxylase isoforms in rat and mouse brain. *Neurochemistry International* 35: 73-80
229. Shi L, Pang H, Linville MC, Bartley AN, Argenta AE, Brunso-Bechtold JK (2006) Maintenance of inhibitory interneurons and boutons in sensorimotor cortex between middle and old age in Fischer 344 X Brown Norway rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 32: 46-53
230. Simon H, Frisina RD (2004) Age reduces response latency of mouse inferior colliculus neurons to AM sounds. *Journal of the Acoustical Society of America* 116: 469-477
231. Simpson GV, Knight RT, Brailowsky S, Prosperogarcia O, Scabini D (1985) Altered peripheral and brain-stem auditory function in aged rats. *Brain Research* 348: 28-35
232. Smith PH, Populin LC (2001) Fundamental differences between the thalamocortical recipient layers of the cat auditory and visual cortices. *J Comp Neurol* 436: 508-519
233. Snell KB, Frisina DR (2000) Relationships among age-related differences in gap detection and word recognition. *Journal of the Acoustical Society of America* 107: 1615-1626
234. Someya S, Prolla TA (2010) Mitochondrial oxidative damage and apoptosis in age-related hearing loss. *Mechanisms of Ageing and Development* 131: 480-486
235. Someya S, Yamasoba T, Kujoth GC, Pugh TD, Weindruch R, Tanokura M, Prolla TA (2008) The role of mtDNA mutations in the pathogenesis of age-related hearing loss in mice carrying a mutator DNA polymerase gamma. *Neurobiology of Aging* 29: 1080-1092
236. Soros P, Michael N, Tollkötter M, Pfeleiderer B (2006) The neurochemical basis of human cortical auditory processing: combining proton magnetic resonance spectroscopy and magnetoencephalography. *Bmc Biology* 4
237. Stanley DP, Shetty AK (2004) Aging in the rat hippocampus is associated with widespread reductions in the number of glutamate decarboxylase-67 positive interneurons but not interneuron degeneration. *Journal of Neurochemistry* 89: 204-216
238. Stebbins GT, Murphy CM (2009) Diffusion tensor imaging in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Behavioural Neurology* 21: 39-49
239. Stenfelt S, Ronnberg J (2009) The Signal-Cognition interface: Interactions between degraded auditory signals and cognitive processes. *Scandinavian Journal of Psychology* 50: 385-393
240. Sugimoto S, Sakurada M, Horikawa J, Taniguchi I (1997) The columnar and layer-specific response properties of neurons in the primary auditory cortex of Mongolian gerbils. *Hear Res* 112: 175-185
241. Suta D, Popelar J, Burianova J, Syka J (2013) Cortical Representation of Species-Specific Vocalizations in Guinea Pig. *Plos One* 8
242. Suta D, Rybalko N, Pelanova J, Popelar J, Syka J (2011) Age-related changes in auditory temporal processing in the rat. *Experimental Gerontology* 46: 739-746
243. Sweet RA, Dorph-Petersen KA, Lewis DA (2005) Mapping auditory core, lateral belt, and parabelt cortices in the human superior temporal gyrus. *Journal of Comparative Neurology* 491: 270-289

244. Syka J (1981a) Poruchy sluchové funkce. In Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu, Syka J, Voldřich L, Vrabec F (eds), pp 233-249. Praha: Avicenum
245. Syka J (1981b) Sluchový nerv a sluchová dráha - struktura a funkce. In Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu, Syka J, Voldřich L, Vrabec F (eds), pp 205-218. Praha: Avicenum
246. Syka J (1981c) Vnitřní ucho - struktura a funkce. In Fyziologie a patofyziologie zraku a sluchu, Syka J, Voldřich L, Vrabec F (eds), pp 186-202. Praha: Avicenum
247. Syka J (2002) Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning. *Physiological Reviews* 82: 601-636
248. Syka J (2010) The Fischer 344 rat as a model of presbycusis. *Hear Res* 264: 70-78
249. Syka J, Rybalko N, Popelar J (1994) Enhancement of the auditory-cortex evoked-responses is awake guinea-pigs after noise exposure. *Hearing Research* 78: 158-168
250. Syka J, Suta D, Popelár J (2005) Responses to species-specific vocalizations in the auditory cortex of awake and anesthetized guinea pigs. *Hear Res* 206: 177-184
251. Talavage TM, Edmister WB (2004) Nonlinearity of fMRI responses in human auditory cortex. *Human Brain Mapping* 22: 216-228
252. Tan AY, Wehr M (2009) Balanced tone-evoked synaptic excitation and inhibition in mouse auditory cortex. *Neuroscience* 163: 1302-1315
253. Taylor RS, Paisley S, Davis A (2001) Systematic review of the clinical and cost effectiveness of digital hearing aids. *British Journal of Audiology* 35: 271-288
254. Team RDC. (2010) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
255. Tervaniemi M, Hugdahl K (2003) Lateralization of auditory-cortex functions. *Brain Res Brain Res Rev* 43: 231-246
256. Thomson AM, Bannister AP (1998) Postsynaptic pyramidal target selection by descending layer III pyramidal axons: dual intracellular recordings and biocytin filling in slices of rat neocortex. *Neuroscience* 84: 669-683
257. Tramo MJ, Cariani PA, Koh CK, Makris N, Braida LD (2005) Neurophysiology and neuroanatomy of pitch perception: Auditory cortex. *Neurosciences and Music II: from Perception to Performance* 1060: 148-174
258. Trujillo M, Carrasco MM, Razak K (2013) Response properties underlying selectivity for the rate of frequency modulated sweeps in the auditory cortex of the mouse. *Hearing Research* 298: 80-92
259. Tucker-Drob EM (2011) Neurocognitive Functions and Everyday Functions Change Together in Old Age. *Neuropsychology* 25: 368-377
260. Tulving E (2002) Episodic memory: From mind to brain. *Annual Review of Psychology* 53: 1-25
261. Turner JG, Hughes LF, Caspary DM (2005) Affects of aging on receptive fields in rat primary auditory cortex layer V neurons. *Journal of Neurophysiology* 94: 2738-2747

262. Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Nakashima T, Shimokata H (2010) Diabetes reduces auditory sensitivity in middle-aged listeners more than in elderly listeners: A population-based study of age-related hearing loss. *Medical Science Monitor* 16: PH63-PH68
263. Uchida Y, Sugiura S, Nakashima T, Ando F, Shimokata H (2009) Endothelin-1 Gene Polymorphism and Hearing Impairment in Elderly Japanese. *Laryngoscope* 119: 938-943
264. Uhlmann RF, Larson EB, Rees TS, Koepsell TD, Duckert LG (1989) Relationship of hearing impairment to dementia and cognitive dysfunction in older adults. *Jama-Journal of the American Medical Association* 261: 1916-1919
265. Van Eyken E, Van Laer L, Franssen E, Topsakal V, Lemkens N, Laureys W, Nelissen N, Vandeveldel A, Wienker T, Van De Heyning P, Van Camp G (2006) KCNQ4: A gene for age-related hearing impairment? *Human Mutation* 27: 1007-1016
266. van Wageningen H, Jorgensen HA, Specht K, Hugdahl K (2010) A H-1-MR Spectroscopy Study of Changes in Glutamate and Glutamine (Glx) Concentrations in Frontal Spectra after Administration of Memantine. *Cerebral Cortex* 20: 798-803
267. Vanrooij J, Plomp R (1990) Auditive and cognitive-factors in speech-perception by elderly listeners. II. Multivariate analyses. *Journal of the Acoustical Society of America* 88: 2611-2624
268. Vermeij A, van Beek A, Rikkert M, Claassen J, Kessels RPC (2012) Effects of Aging on Cerebral Oxygenation during Working-Memory Performance: A Functional Near-Infrared Spectroscopy Study. *Plos One* 7
269. Veuille E, Collet L, Duclaux R (1991) Effect of contralateral acoustic stimulation on active cochlear micromechanical properties in human subjects: dependence on stimulus variables. *J Neurophysiol* 65: 724-735
270. Volkov IO, Galaziuk AV (1989) [Reactions of tonic-type neurons in the cat auditory cortex to tones of various frequency and intensity]. *Neirofiziologia* 21: 498-506
271. Waddell KW, Zanjani P, Pradhan S, Xu L, Welch EB, Joers JM, Martin PR, Avison MJ, Gore JC (2011) Anterior cingulate and cerebellar GABA and Glu correlations measured by H-1 J-difference spectroscopy. *Magnetic Resonance Imaging* 29: 19-24
272. Wallace MN, Palmer AR (2008) Laminar differences in the response properties of cells in the primary auditory cortex. *Exp Brain Res* 184: 179-191
273. Walton JP, Simon H, Frisina RD (2002) Age-related alterations in the neural coding of envelope periodicities. *Journal of Neurophysiology* 88: 565-578
274. Wang X, Lu T, Snider RK, Liang L (2005) Sustained firing in auditory cortex evoked by preferred stimuli. *Nature* 435: 341-346
275. Weisz N, Wienbruch C, Hoffmeister S, Elbert T (2004) Tonotopic organization of the human auditory cortex probed with frequency-modulated tones. *Hearing Research* 191: 49-58
276. Wilke M, Lidzba K (2007) LI-tool: A new toolbox to assess lateralization in functional MR-data. *Journal of Neuroscience Methods* 163: 128-136
277. Wilke M, Schmithorst VJ (2006) A combined bootstrap/histogram analysis approach for computing a lateralization index from neuroimaging data. *Neuroimage* 33: 522-530

278. Williams SR, Stuart GJ (2000) Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83: 3177-3182
279. Willott JF (1986) Effects of aging, hearing-loss, and anatomical location on thresholds of inferior colliculus neurons in C57BL/6 and CBA mice. *Journal of Neurophysiology* 56: 391-408
280. Willott JF, Aitkin LM, McFadden SL (1993) Plasticity of auditory-cortex associated with sensorineural hearing-loss in adult C57BL/6J mice. *Journal of Comparative Neurology* 329: 402-411
281. Willott JF, Chisolm TH, Lister JJ (2001) Modulation of presbycusis: Current status and future directions. *Audiology and Neuro-Otology* 6: 231-249
282. Willott JF, Parham K, Hunter KP (1988) Response properties of inferior colliculus neurons in middle-aged C57BL/6J mice with presbycusis. *Hearing Research* 37: 15-27
283. Winer JA, Larue DT, Huang CL (1999) Two systems of giant axon terminals in the cat medial geniculate body: convergence of cortical and GABAergic inputs. *J Comp Neurol* 413: 181-197
284. Winer JA, Lee CC (2007) The distributed auditory cortex. *Hear Res* 229: 3-13
285. Wingfield A, Tun PA, McCoy SL (2005) Hearing loss in older adulthood - What it is and how it interacts with cognitive performance. *Current Directions in Psychological Science* 14: 144-148
286. Wong PCM, Ettlinger M, Sheppard JP, Gunasekera GM, Dhar S (2010) Neuroanatomical Characteristics and Speech Perception in Noise in Older Adults. *Ear and Hearing* 31: 471-479
287. Woods DL, Alain C (2009) Functional imaging of human auditory cortex. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* 17: 407-411
288. Wu GK, Arbuckle R, Liu BH, Tao HW, Zhang LI (2008) Lateral sharpening of cortical frequency tuning by approximately balanced inhibition. *Neuron* 58: 132-143
289. Wu YH, Bentler RA (2012) Do Older Adults Have Social Lifestyles That Place Fewer Demands on Hearing? *Journal of the American Academy of Audiology* 23: 697-711
290. Zettel ML, Frisina RD, Haider SEA, Oneill WE (1997) Age-related changes in calbindin D-28k and calretinin immunoreactivity in the inferior colliculus of CBA/CaJ and C57Bl/6 mice. *Journal of Comparative Neurology* 386: 92-110
291. Zettel ML, O'Neill WE, Trang TT, Frisina RD (2003) The effects of early bilateral deafening on calretinin expression in the dorsal cochlear nucleus of aged CBA/CaJ mice. *Hearing Research* 183: 57-66
292. Zhang LI, Tan AYY, Schreiner CE, Merzenich MM (2003) Topography and synaptic shaping of direction selectivity in primary auditory cortex. *Nature* 424: 201-205
293. Zilles K, Wree A (1985) Cortex: areal and laminar structure. In *The Rat Nervous System*, Paxinos G (ed), Vol. 1: Forebrain and Midbrain, pp 375-392. New York: Academic Press
294. Zilles K, Zilles B, Schleicher A (1980) A quantitative approach to cytoarchitectonics. VI. The areal pattern of the cortex of the albino-rat. *Anatomy and Embryology* 159: 335-360

11. Seznam vlastních publikací

11.1 Publikace použité v dizertační práci:

Profant, O., Skoch, A., Balogová, Z., Tintěra, J., Hlinka, J., Syka, J. 2014. Diffusion tensor imaging and MR morphometry of the central auditory pathway and auditory cortex in aging. *Neuroscience* 260, 87-97. IF=3,389

Burianova, J., Ouda, L., Profant, O., Syka, J. 2009. Age-related changes in GAD levels in the central auditory system of the rat. *Exp Gerontol* 44, 161-9. , IF=3,741

Profant, O., Burianova, J., Syka, J. 2013. The response properties of neurons in different fields of the auditory cortex in the rat. *Hearing Research* 296, 51-59. IF=2,696

Profant, O., Balogová, Z., Dezortová, M., Wagnerová, D., Hájek, M., Syka, J. 2013. Metabolic changes in the auditory cortex in presbycusis demonstrated by MR spectroscopy. *Exp Gerontol* 48, 795-800, IF=3,911

Profant O., Tintěra J., Balogová Z., Ibrahim I., Jilek M., Syka J. 2014. Functional changes in the auditory cortex in ageing. *Plos One*, under review. IF=3,73

11.2 Impaktované publikace nepoužité v dizertační práci:

Durisin M, Krause C, Arnoldner C, Kontorinis G, Buechner A, Lenarz T, Lesink-Schiedat A, Profant O, Neuburger J. 2011. Electron microscopy changes of cochlear implant electrodes with permanently high impedances. *Cochlear Implants Int.* 12(4):228-33. IF=0,34

Boucek, J., Chovanec, M., Vokral, J., Cerny, L., Kluch, J., Cada, Z., Profant, O., Zabrodsky, M., Kuchar, M., Zverina, E., Betka, J., Fanta, O., Skrivan, J. 2012. Baha as a Solution for Single-Sided Deafness after Vestibular Schwannoma Surgery. *Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie* 75, 602-605. IF=0,366

Chovanec, M., Zverina, E., Profant, O., Skrivan, J., Cakrt, O., Lisy, J., Betka, J. 2013. Impact of video-endoscopy on the results of retrosigmoid-transmeatal microsurgery of vestibular schwannoma: prospective study. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 270, 1277-1284. IF=1,458

Kalitova, P., Cakrt, O., Cada, Z., Profant, O., Chovanec, M., Betka, J., Jerabek, J. 2013. The Importance of Vestibular and Posturographic Evaluation in Patients with Vestibular Schwannoma. Ceska a Slovenska Neurologie a Neurochirurgie 76, 469-474. IF=0,366

Skrivan J, Cada Z, Kluch J, Boucek J, Profant O, Betka J. 2014. Revision operations after previous stapes surgery for persisting hearing loss. Bratisl Med J. No. 182/2012. In press, IF=0,345

Betka J., Zvěřina E., Balogová Z., Profant O., Skřivan J., Kraus J., Lisý J., Syka J., Chovanec M. 2014. Complications of microsurgery of vestibular schwannoma. Biomed Res Int. 315952. In press, IF=2,88

11.3 Neimpaktované publikace:

Čada, Z., Profant, O., Bruthansová, P., Kalitová, P., Kluch, J., Bouček, J., Skřivan, J., Plzák, J., Černý, R., Jeřábek, J., Betka, J. 2013. Vestibulární migréna v ambulanci otorinolaryngologa. Otorinolaryngologie a Foniatrie . 62(3), 107-110.

Čada, Z., Profant, O., Bruthansová, P., Kalitová, P., Kluch, J., Bouček, J., Skřivan, J., Plzák, J., Černý, R., Jeřábek, J., Betka, J. 2013. Downbeat nystagmus v ambulanci otorinolaryngologa. Otorinolaryngologie a Foniatrie . 62(2), 94-96.

11.4 Kapitoly v knihách:

Betka Jan, Chovanec Martin, Zverina Eduard, Profant Oliver, Lukes Petr, Skrivan Jiri, Kluch Jan, Fik Zdenek: Minimally Invasive Endoscopic and Endoscopy-Assisted Microsurgery of Vestibular Schwannoma. Advances in Endoscopic Surgery. Edited by Cornel Iancu, ISBN 978-953-307-717-8, Hard cover, 444 pp, Publisher: InTech, Published: November 25 2011. DOI: 10.5772/1774. In English

Oliver Profant: Differential diagnosis in vertigo. Differential Diagnostics. Editor: MUDr. Petr Herle. Dr. Josef Raabe, s.r.o. Published 2/2012. In Czech

Oliver Profant, Martin Durisin: Anatomy and physiology of auditory system. Audiology. Editor: Kabátová Zuzana, Profant Milan at al. 360 pp. published 29.06.2012 Grada. ISBN:978-80-247-4173-4. In Slovak.

Zuzana Kabátová, Oliver Profant, Jan Kluch: Auditory evoked potentials. Audiology. Editor: Kabátová Zuzana, Profant Milan at al. 360 pp. published 29.06.2012 Grada. ISBN:978-80-247-4173-4. In Slovak