

Aus der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

mit Poliklinik

Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. hc. mult. H. P. Zenner

**Das Hörvermögen von Gerbils unterschiedlicher
Altersgruppen nach drei Monaten Haltung in einem
Environmental Enrichment**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Boris Benjamin Müller

aus

Heidelberg

2014

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1: Berichterstatter: Professor Dr. M. Knipper-Breer +

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Plewnia

Zusammenfassung

Die Altersschwerhörigkeit (im folgenden Presbyakusis), ist aufgrund ihrer hohen Prävalenz und in Anbetracht der immer älter werdenden Bevölkerung ein großes sozioökonomisches Problem, insbesondere in den Industrienationen. Die Presbyakusis führt nicht nur zur durch Kommunikationseinschränkungen bedingten sozialen Isolation der betroffenen Menschen, sie führt auch durch die notwendige Versorgung mit Hörhilfen und durch häufig gemeinsam mit der Presbyakusis vorkommende Komorbiditäten wie z.B. der Demenz, zu einer hohen finanziellen Belastung der Gesundheitssysteme. In Anbetracht dieser Tatsachen ist es von immenser Wichtigkeit, die Pathomechanismen der Presbyakusis zu erforschen, um zielführende Präventionsstrategien gegen die Presbyakusis entwickeln zu können.

Von Untersuchungen am Menschen ist bekannt, dass dem Alterungsprozess durch physische Aktivität und psychische Anforderung entgegengewirkt werden kann. Das Ziel der vorliegenden Studie war es im Tiermodell zu prüfen, ob durch Aktivität der Verlust neuronaler Leistung und die alterungsbedingte Verschlechterung des Hörvermögens beeinflusst werden kann. Hierfür wurden Mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*, Gerbil) über einen längeren Zeitraum in einer angereicherten Umgebung (engl. „environmental enrichment“, EE) gegenüber einer stimulationsdeprivierten Umgebung (engl. „deprived environment“, DE) gehalten. Der Einfluss der angereicherten und der stimulationsdeprivierten Umgebung wurde sowohl in jungen als auch älteren Tieren untersucht. Die Tiere wurden zu diesem Zweck über einen Zeitraum von 3-4 Monaten unter den entsprechenden Umgebungsbedingungen gehalten. In regelmässigen Abständen wurde das Hörvermögen durch Messung der auditorisch evozierten Hirnstammantwort und durch Analyse der otoakustischen Emissionen getestet.

Die Ergebnisse zeigten, dass ältere Tiere nicht von einer stimulationsangereicherten Umgebung profitieren. Ihr Hörvermögen verschlechterte sich partiell sogar in höherem Maße im Vergleich zu Kontrolltieren. Dagegen zeigte sich ein kleiner -jedoch noch nicht signifikanter- Einfluss der stimulationsangereicherten Umgebung in jüngeren Wüstenrennmäusen, bei denen im Gegensatz zu Kontrolltieren die voranschreitende Abnahme der Hörleistung verringert war.

Mit der vorliegenden Studie konnte daher ein erster Hinweis gegeben werden, dass sich eine angereicherte Umgebung mildernd auf die Verschlechterung der Hörschwelle in jungem aber nicht in fortgeschrittenem Alter auswirken könnte. Der experimentelle Ansatz, über die Haltung von Versuchstieren in einer angereicherten Umgebung eine geringere Ausprägung der Presbyakusis zu erreichen, könnte über ein erweitertes Studiendesign zur Aufklärung eines Puzzlesteins in diesem hochkomplexen Themengebiet beitragen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Das auditorische System.....	8
1.2. Presbyakusis.....	11
1.4. Environmental Enrichment.....	13
1.5. Ziel der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Versuchstiere	16
2.2. Haltungsbedingungen	16
2.3. Hörmessungen	21
2.3.1. Auditory Brainstem Response.....	21
2.3.2. Distorsionsprodukte	23
2.3.3. Akustisches Trauma.....	25
2.4. Verhaltenstests	26
2.4.1. Elevated x maze.....	26
2.4.2. Open Field Test.....	27
2.4.3. Labyrinth-Test	29
2.5. Gewebeentnahme.....	31
2.5.1. Gewebeentnahme für PCR.....	31
2.5.2. Gewebeentnahme für die spätere histologische Aufarbeitung.....	31
2.6. Blutproben	32
2.7. statistische Auswertung.....	30
3. Ergebnisse	34
3.1. Hörmessungen	34
3.1.1. Hörvermögen der Tiere vor der Haltungsphase.....	34
3.1.1.1 Klick-ABR	35
3.1.1.2. Frequenz-ABR.....	37
3.1.1.3: DPOAE.....	38
3.1.2. Hörschwellenentwicklung der Tiere nach der Haltungsphase:.....	39
3.1.2.1. Klick-ABR	40
3.1.2.2. Frequenz-ABR.....	42
3.1.2.3. DPOAE	44
3.2. Akustisches Trauma.....	47

3.2.1. Klick-ABR	48
3.2.2. Frequenz	51
3.3. Blutplasma Werte von Östradiol und Cortisol	54
3.3.1. Cortisol Blutplasma Werte	54
3.3.2. Östradiol Blutplasma Werte.....	55
3.4. Verhaltenstests	56
3.4.1. Labyrinth Test.....	57
3.4.2. X Maze Test	59
3.4.3. Open Field Test.....	61
4. Diskussion.....	64
4.1. Environmental Enrichment.....	65
4.2. Akustisches Trauma.....	69
4.3. Die Verhaltenstestungen.....	70
4.3.1. Elevated X – Maze	71
4.3.2. Open Field Test.....	72
4.3.3. Labyrinth -Test	75
4.4. Cortisol und Östradiol Blutplasma Spiegel:	76
4.4.1. Cortisol.....	76
4.4.2. Östradiol	78
4.5. Ausblick.....	79
5. Literatur.....	81

Abkürzungsverzeichnis:

ABR	Auditory brainstem response (Auditorische Hirnstammantwort)
BDNF	Brain derived neurotropic factor, Neurotrophin
DE	Deprived Environment (deprivierte Umgebung)
DPOAE	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
EE	Environmental Enrichment (angereicherte Umgebung)
IHC	Inner hair cells (innere Haarzellen)
OHC	Outer hair cells (äußere Haarzellen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
SPL	Sound pressure level

1. Einleitung

1.1. Das auditorische System

Tritt eine Schallwelle in den äußeren Gehörgang ein, versetzt diese das Trommelfell in Schwingung. Über die Schwingungen des Trommelfells und die mit dem Trommelfell verbundenen Gehörknöchelchen im Mittelohr, Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes), wird der Schall auf die Membran des ovalen Fensters übertragen. Die über die Membran des ovalen Fensters vermittelten Schwingungen der Steigbügelplatte lösen innerhalb der Cochlea eine sogenannte Wanderwelle aus. Dadurch gerät die Basilarmembran in Schwingung.

Hinter dem ovalen Fenster liegt das Innenohr, welches in das Felsenbein eingebettet ist. Das Innenohr besteht aus zwei Organen, dem vestibulären Organ und der Cochlea. Das vestibuläre Organ ist für den Gleichgewichtssinn verantwortlich, wohingegen in der Cochlea als Teil des auditorischen Systems die Schalldetektion stattfindet. Die Cochlea besteht aus drei flüssigkeitsgefüllten Kanälen, sogenannten Skalen, die spiralförmig um die Schneckenachse (Modiolus) aufgerollt sind. Der obere sowie der untere Kanal (Scala vestibuli bzw. Scala tympani) sind mit natriumreicher, extrazellulärer Perilymphflüssigkeit gefüllt und über das Helicotrema miteinander verbunden. Zwischen der Scala vestibuli und der Scala tympani liegt die Scala media. Die Scala media ist von den beiden Skalen apikal durch die Reissnersche Membran und basal durch die Basalmembran abgegrenzt und mit der kaliumreichen Endolymphe gefüllt.

Der Basalmembran liegt das Cortische Organ auf, welches die Haarsinneszellen des Innenohrs enthält. Die sensorischen Zellen, die inneren (inner hair cells, IHC) und äußeren Haarzellen (outer hair cells, OHC) sind entlang der Längsachse der Cochlea entsprechend ihrer charakteristischen Frequenz organisiert und reagieren von basal hochfrequent nach apikal tieffrequent (Békésy, 1960). Die Haarzellen tragen an ihrer apikalen Seite Stereozilien unterschiedlicher Länge, welche von Endolymphe umgeben sind. Durch Schwingung der Basalmembran erfolgt eine relative Verschiebung der Stereozilien. Eine Deflektion der Stereozilien stellt einen adäquaten Reiz für die Haarzelle dar. Durch die relative Verschiebung zwischen Tektorial- und Basalmembran und durch die aktive Verstärkung der Schwingung durch die oszillierenden Längenänderungen der OHC mit Hilfe des Motorproteins Prestin (Liberman et al., 2002) entsteht im subtektorialen Zwischenraum ein Sog, welcher die Deflektion der Stereozilien und damit die adäquate Reizung der IHC bewirkt. Über den Einstrom von Kaliumionen und Erhöhung des Membranpotentials erfolgt die Generierung eines Rezeptorpotentials. Durch die Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen erfolgt die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat und die Signalübertragung auf den afferenten Hörnerv. Über diesen Mechanismus senden die IHC die auditorischen Signale über die Neuronen des Hörnervs zum Hirnstamm und können funktionell auch über eine Rückkopplungsschleife beeinflusst werden (Warr, 1980; Eggermond und Roberts, 2004). Der Hörnerv (Nervus cochlearis) besteht vorwiegend aus Axonen der afferenten (zuführenden) und efferenten (wegführenden) Nervenfasern. 90% der Afferenzen innervieren die inneren Haarzellen. Diese werden Spiralganglienneurone Typ I genannt. Die Spiralganglienneurone Typ II innervieren die äußeren Haarzellen (Nadol et al., 1990; Raphael und Altschuler, 2003). Der Nervus cochlearis verbindet die Cochlea mit dem Cochleariskern (Nucleus cochlearis) (Sando, 1965; Webster, 1971) und dem Olivenkomplex

im Hirnstamm. Dabei existiert eine tonotopische Gliederung (= Gliederung nach Tonhöhe bzw. Tonfrequenz), was den afferenten Fasern aus den basalen und apikalen Schneckenwindungen des Innenohrs entspricht. Die Axone der Spiralganglienneuronen verzweigen sich und projizieren auf den dorsalen bzw. ventralen Cochleariskern, welcher die erste wichtige Verschaltungsstelle im Gehirn darstellt (Wallhäusser – Franke und Langner, 2001). Im Verlauf der aufsteigenden Hörbahn gibt es neben dem Olivenkomplex und den Cochleariskernen noch weitere wichtige Verschaltungsstellen wie dem Colliculus inferior und Corpus geniculatum mediale, bis die Hörbahn als Hörstrahlung im auditorischen Kortex endet. Der auditorische Kortex besteht aus dem tonotop organisierten primären auditorischen Feld (Budinger, Heil und Scheich, 2001) und je nach Spezies, einem oder mehreren umgebenden Feldern, welche ebenfalls tonotop organisiert sein können (Brugge, 1985). Die im primären auditorische Feld ankommenden afferenten Informationen werden von dort aus zu weiteren kortikalen Feldern im Gehirn verschaltet (Philips und Irvine, 1982). Wichtig ist, dass im Verlauf der Hörbahn die tonotopische Gliederung beibehalten wird und die Fasern der Hörbahn an den Verschaltungsstellen auf die kontralaterale Seite und wieder zurück projiziert werden, so dass im auditorischen Kortex Informationen aus beiden Ohren gelangen. Dies erfordert von diesem System eine hohe Flexibilität sowie eine ständige Anpassungs- und Wandlungsfähigkeit, um den komplexen Gegebenheiten der Verarbeitung auditorischer Reize gerecht zu werden.

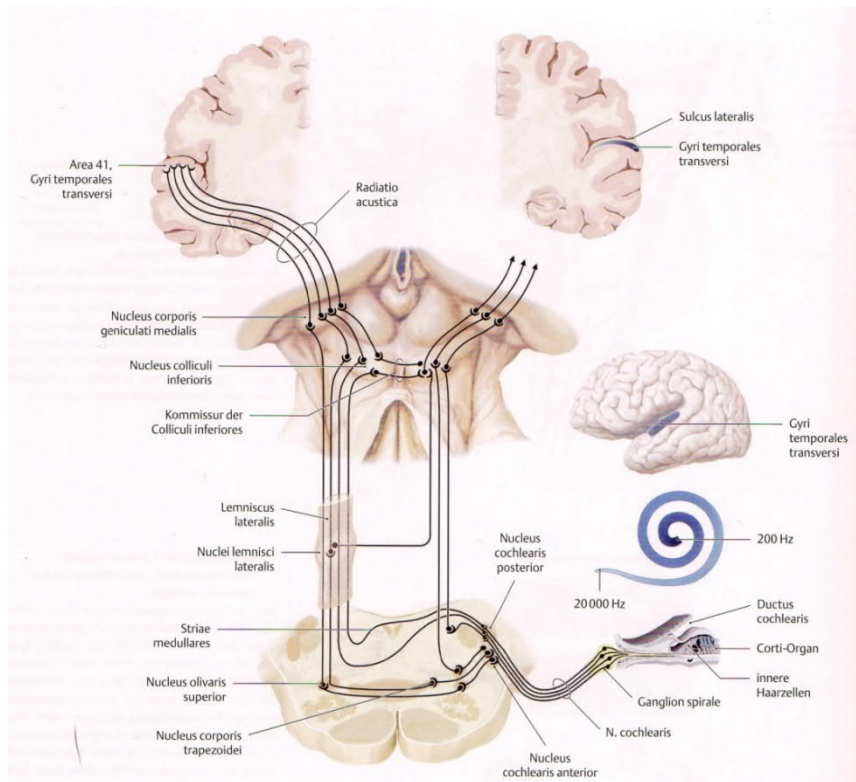


Abb.1: Anatomie der Hörbahn . (Prometheus, Atlas der Anatomie).

1.2. Presbyakusis

Mit zunehmendem Alter nimmt bei Mensch und Tier die Hörfähigkeit ab. Altersschwerhörigkeit, auch Presbyakusis oder Presbycusis genannt, schließt alle Umstände ein, die bei älteren Menschen zu einem Hörverlust führen. Der Begriff beschreibt das Symptom eines Hörverlustes im Alter, wobei Presbyakusis weder die Ausprägung noch die Genese des Hörverlusts differenziert.

Wegen seiner hohen Prävalenz in der Gesamtbevölkerung ist die Presbyakusis ein aktuelles soziales und gesundheitliches Problem. Jeder fünfte Erwachsene und eine überwiegende

Zahl an 80-jährigen leiden an Hörverlust. Die Hälfte aller schwerhörigen Menschen befindet sich immer noch im arbeitsfähigen Alter (www.german.hear-it.org). Presbyakusis, welche für gewöhnlich die für das Sprachverständnis wichtigen hohen Frequenzen betrifft, bedeutet für die Betroffenen häufig eine stark eingeschränkte Lebensqualität durch Ausgrenzung aufgrund der immensen kommunikativen Einschränkungen. Die Hörschädigung im Alter wurde von einigen Autoren auch als Kofaktor für die Entwicklung der senilen Demenz in Verbindung gebracht (Uhlmann et al., 1989). Das Management der Presbyakusis erfordert bei der stetig steigenden Anzahl alter Menschen in den Industrienationen immer größere Ausgaben für die Gesundheitssysteme. Nützliche Kommunikationshilfen sind z.B. die modernen Hörgeräte, welche aber zugleich einen großen Kostenfaktor für die Patienten darstellen. Ein weiteres Problem der Hörgeräteversorgung ist, dass ältere Menschen aufgrund von Überforderung oder aus Angst vor Stigmatisierung die Hörgeräte ablehnen. Verschiedene Studien zeigen, dass sich nur etwa 20% der Menschen, die von einer Verstärkung durch Hörgeräte profitieren würden, überhaupt ein Hörgerät gekauft haben (Kochkin et al., 1989) und dass 25 – 40% der amerikanischen Bevölkerung das Hörgerät entweder unterbenutzen oder ablehnen (Gates et al., 1990). Daher ist es wichtig, die Hörtechnik zu verbessern, zu verfeinern und vor allem die Ursachen für altersbedingte Schwerhörigkeit besser zu verstehen, um langfristige Therapiekonzepte und Strategien zur Primärprävention der Schwerhörigkeit entwickeln zu können. Nur dadurch ist eine Erhöhung der Akzeptanz für Hörgeräte und Präventionsmaßnahmen beim Patienten zu erreichen.

Die spezifischen Veränderungen welche zur Presbyakusis führen, sind noch nicht vollständig bekannt. Vornehmlich betrifft die Hörminderung im Alter die Wahrnehmung der hohen Frequenzen; als Ursache werden primär Schäden der Haarzellen des Innenohres angesehen (Schuhknecht, 1964). Zu den biologischen Alterungsprozessen der zentralen Hörbahn zählen

der Untergang von Neuronen und der Verlust von Neurotransmittern und Rezeptoren (Willot et al., 2001). Noch immer kann die Ursache der Schwerhörigkeit nicht vollständig erklärt werden und es wird vermutet, dass die Schwerhörigkeit im Alter infolge einer „Gesamtlärmsumme“ auftritt (Lenarz und Schönermark, 1995). Welche Gene und Proteine daran beteiligt sind, wird noch untersucht. Der Brain derived neurotropic factor (BDNF) ist ein für das Überleben der cochleären und vestibulären Neurone im Innenohr wichtiges Neurotrophin (Rubel und Fritsch, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von Neurotrophinen in Folge einer neuronalen Aktivitätssteigerung schnell hochreguliert wird (Zafra et al., 1990). In Gerbils und Ratten, die mit zunehmendem Alter eine Presbyakusis entwickeln, konnten die degenerativen Veränderungen im Hörnerv mit fallenden Spiegel des Neurotrophins BDNF korreliert werden (Rüttiger et al., 2006).

1.4. Environmental Enrichment

Die Expression von Neurotrophinen wie z.B. BDNF wird bei der Haltung in einer angereicherten Umgebung verändert. Der Begriff angereicherte Umgebung, auch Environmental Enrichment (EE) genannt, beschreibt die Haltung von Tieren in einer besonderen Umgebung, in der die Tiere besonderen Reizen ausgesetzt sind. Dieser Ansatz hat sich in vielen Studien als eine gute Methode erwiesen, um aktivitätsabhängige Veränderungen im ganzen Körper, insbesondere im Gehirn, zu untersuchen. Schon Charles Darwin erwähnte, dass die Gehirne von domestizierten Hasen im Vergleich zu den Wildlebenden in ihrer Masse deutlich verkleinert waren und folgerte daraus, dass diese Tiere ihren Intellekt, ihre Sinne und ihre Instinkte weniger gebrauchen als diejenigen, die in der Natur leben (Darwin, 1874). Trotzdem dachte man bis 1960, das Gehirn sei ein unveränderliches Objekt, welches nur der genetischen Kontrolle unterworfen ist. In den

frühen sechziger Jahren begann man Vermutungen anzustellen, dass Einflüsse aus der Umgebung in der Lage sind, die Gehirnstruktur zu verändern. 1964 konnten zwei Forschungsgruppen beweisen, dass sich die Morphologie, die Chemie und die Physiologie des Gehirns experimentell verändern lässt, indem man die Tiere mittels eines Environmental Enrichment direkt stimuliert (Bennett et al., 1964; Hubel und Wiesel, 1965). Dadurch, dass gezeigt werden konnte, dass Environmental Enrichment in der Lage ist, strukturelle Komponenten im Gehirn von Ratten in allen Altersstufen zu verändern (Diamond et al., 1964; Diamond, 1988), konnten die Vermutungen über die Gehirnplastizität gefestigt werden. Viele weitere experimentelle Studien konnten die vermuteten Effekte einer angereicherten Umgebung auf das Gehirn und die Sinnesorgane auf unterschiedliche Weise belegen: So konnte z.B. gezeigt werden, dass sich durch die Haltung von Ratten in einem Environmental Enrichment die Stärke der neuronalen Antwort im auditorischen Kortex verstärken lässt. Die von Geräuschen hervorgerufenen Potentiale der angereichert gehaltenen Ratten waren mehr als doppelt so hoch wie die der Ratten, welche unter Standardbedingungen gehalten wurden. Außerdem verbesserte sich die Hörschwelle bei den angereicherten Tieren (Egineer et al., 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich bei Ratten, die längere Zeit in einem Environmental Enrichment gehalten wurden, die BDNF Spiegel im Vergleich zu den Spiegeln von in einer deprivierten Umgebung gehaltenen Ratten in verschiedenen Hirnarealen erhöht sind (Ickes et al., 2000). Die Effekte einer angereicherten Umgebung auf die Tiere sind aber nicht nur auf das Gehörorgan beschränkt. So ließ sich z.B. auch die funktionelle Entwicklung der Retina bei Ratten durch ein Environmental Enrichment beeinflussen (Landi et al., 2007).

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, ob die Haltung von Gerbils in einem Environmental Enrichment zu einer Änderung im Hörvermögen der Tiere führt und wie ausgeprägt diese Veränderungen bei Tieren unterschiedlichen Alters sind. Die Tiere sollten für einige Zeit in einer speziellen angereicherten Umgebung gehalten werden. Als Kontrollgruppe sollten Tiere verwendet werden, die in einer Umgebung mit möglichst wenigen Stimuli gehalten wurden (Deprived Environment, DE). Das Hörvermögen der Tiere sollte vor und nach der Haltungsphase gemessen werden. Einige Tiere sollten einem akustischen Trauma mit nachfolgenden Hörmessungen ausgesetzt werden, um herauszufinden, ob die im Environmental Enrichment gehaltenen Tiere resistenter gegen akustische Traumata sind und eine bessere Erholung von diesem Trauma zeigen als die Kontrolltiere. Durch verschiedene Verhaltenstests sollten die Effekte der unterschiedlichen Haltungsbedingungen weiter validiert werden. Des Weiteren sollten die Blutplasmaspiegel von Cortisol und Östradiol gemessen werden, um über diese Blutwerte einen Zusammenhang zwischen Stress und Hörvermögen herstellen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die vorliegende Studie wurden Wüstenrennmäuse der Art *Meriones unguiculatus* (engl. Gerbil) beiderlei Geschlechts im Alter zwischen 2 und 38 Monaten verwendet. Diese widerstandsfähigen Nagetiere eignen sich für Untersuchungen im HNO - Bereich, da sie ein Hörvermögen im Frequenzbereich von 0,1 – 60 kHz besitzen, mit einer Sensibilität im niederfrequenten, für den Menschen hörbaren Frequenzbereich. Da Gerbils bis zu sechs Jahre alt werden können, sind sie geeignete Versuchstiere, um verschiedene Auswirkungen in Bezug auf das Alter zu untersuchen. Die Behandlungen der Tiere erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Veterinärmedizinischen Abteilung der Universität Tübingen und entsprechend dem §4 Absatz 1a des Tierschutzgesetzes.

2.2. Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden in unterschiedlichen Haltungsbedingungen gehalten, in einer angereicherten und einer deprivierten Umgebung. Die angereicherte Umgebung hatte zum Ziel, die Tiere audiovestibulär, visuell, taktil sowie olfaktorisch zu trainieren und den Tieren möglichst viele Anreize zur aktiven Bewegung zu geben. Im Gegensatz dazu sollte die deprivierte Umgebung den Tieren eine schallgeschützte, möglichst reizarme Umgebung ohne viel Abwechslung bereitstellen.

Die Tiere in der angereicherten Umgebung wurden von den anderen Tieren getrennt in einem separaten Raum gehalten. In diesem Raum wurden auch keine Tiere aus anderen Experimenten gehalten. Die Haltung erfolgte in Standardkäfigen mit bis zu vier Tieren je Käfig, wobei darauf geachtet wurde, möglichst wenige Tiere einzeln in einem Käfig zu halten. Bei den Tieren, die dennoch einzeln gehalten wurden, war eine Partnerhaltung aufgrund des Todes der Partnertiere oder der Unverträglichkeit einer Tiergruppe nicht möglich. Um den Tieren eine angereicherte Umgebung anzubieten, wurde jeder Käfig besonders ausgestattet: Ein geeignetes Laufrad (Durchmesser 17cm) mit feinmaschiger Lauffläche zur Prävention von Verletzungen wurde in das Käfiggitter gehängt, Labyrinth aus Papprollen wurden in den Käfig gelegt, außerdem bekamen die Tiere ein Sandbad. Um den Gleichgewichtssinn der Tiere zu trainieren, wurden größere Äste zum Klettern im Käfig platziert. Auch kleinere Äste zum Nagen waren vorhanden. Zur Aktivierung des Futtersuchverhaltens wurde das Futter nicht mehr in der Raufe angeboten, sondern an geeigneten Stellen in der Einstreu versteckt.

Die auditorische Stimulation wurde auf zweierlei Weisen angeboten: In 110 cm Entfernung von dem Regal mit den Versuchstieren wurde ein Radio aufgestellt. Durch ein Radioprogramm wurden die Tiere 17 Stunden pro Tag mit komplexen Geräuschen (Sprache, Musik) beschallt. Da ein Radio nicht alle hohen Frequenzen abdeckt (ca. 100 Hz bis 12 kHz), Gerbils aber auch in hohen Frequenzbereichen eine ausgezeichnete Hörfähigkeit besitzen, wurde im selben Abstand zusätzlich zum Radio ein Soundgenerator (Stanford Research Systems, Modell: DS345 Synthesized Function Generator) installiert, welcher zwischen 19:00 und 7:30 Uhr in zufälliger Reihenfolge Sweeps und Bursts zwischen 125 Hz und 40 kHz generierte. Bei der Lautstärkeinstellung von Radio und Soundgenerator wurde darauf geachtet, die Maximallautstärke von 75dB SPL nicht zu überschreiten. Zur Lautstärkemessung von Radio und Soundgenerator wurde ein Schallpegelmessgerät mit

einem Vorverstärker (Mikrosystems), ein extra für diese Anwendung gebauter Messmikrofonverstärker und ein Mikrofon (Brühl & Kjähr; Nr. 4191 2113985) verwendet. Zur zusätzlichen Anreicherung der Haltungsbedingungen und zur visuellen Stimulation wurde vor dem Regal eine Lichtreflexkugel installiert, die von einem Scheinwerfer (Eurolite LED PAR64 RGB - mit mehrfarbigen LEDs) angestrahlt wurde. Die dadurch entstandenen Lichtpunkte wurden durch die Drehung der Kugel mittels eines Motors auf die Käfige projiziert. Durch ein Computerprogramm und mit Hilfe eines passenden Interface (DMX - Controller, Hersteller: IMG Stage Line) wurde die Farbe des auf die Käfige projizierten Lichts zu bestimmten Zeiten geändert: In der Dunkelphase (19:00 – 6:00 Uhr, der überwiegenden Aktivitätsphase der vorwiegend nacht- und dämmerungsaktiven Gerbils) wurde schwach blaues Licht auf die Käfige projiziert. Ab 6:00 Uhr veränderte sich das Licht in orange-rot, ab 8:00 Uhr dann schrittweise zusätzlich blaues Licht. Ab 10:00 Uhr war nur noch zusätzliches blaues Licht vorhanden. In der verbleibenden Zeit (7 Stunden, 12:00 – 19:00 Uhr) waren die Standard-Umgebungsbedingungen präsent. In dieser Zeit wurde der Raum durch die Deckenbeleuchtung mit einer Lichtintensität von ca. 100 Lux erhellt.

Die Tiere wurden 3 – 5 mal wöchentlich aus dem Käfig genommen. Um zu kontrollieren, dass die Tiere ausreichend Futter zu sich nehmen, wurde hierbei jeden zweiten bis vierten Tag das Gewicht der Tiere kontrolliert. Zweimal wöchentlich wurde das Einstreu gewechselt, um Verunreinigungen durch nicht gefundenes Futter zu vermeiden. Dabei wurde das Käfiginventar durcheinandergebracht und zerfressene Röhren und Äste wurden gegen neue ausgetauscht. Als zusätzliche olfaktorische Stimulation wurden alle drei Tage in die Einstreu und auf die Steine einige Tropfen eines ätherischen Öls gegeben (Orange, Zitrone, Kräuter).

Im Gegensatz zu den Tieren in der angereicherten Umgebung wurden die Tiere in der deprivierten Umgebung in der Standardhaltung gehalten. Auch diese Tiere wurden durch einen Schallschutzschrank vor den Umgebungsgeräuschen geschützt. Neben den Tieren im Experiment waren in diesem Raum auch noch andere Gerbils vorhanden. Es wurde aber darauf geachtet, in diesen Raum keine weiteren fremden Tiere einzubringen. Die Käfige dieser Tiere waren lediglich mit einem Häuschen ausgestattet. Die Sandbäder wurden bei Beginn des Experiments, nach Absprache mit den Veterinärmedizinern, aus den Käfigen entfernt. Auch das Futter wurde ihnen normal in der Raufe angeboten und war immer im Überfluss vorhanden. Die Tiere in der deprivierten Umgebung waren neben den Geräuschen der anderen Tiere und der Geräusche, die beim Säubern durch das Tierpflegepersonal verursacht wurden, keinen zusätzlichen Geräuschstimuli ausgesetzt.

Jede dieser beiden Gruppen enthielt etwa die gleiche Anzahl an Tieren mit vergleichbarer Altersverteilung und ausgewogener Verteilung der Geschlechter. Die Gesamtzahl beider Gruppen betrug 49 Tiere, davon wurden 24 Tiere in angereicherter und 25 Tiere in deprivierter Umgebung gehalten.



Abb.2: Environmental Enrichment: Dargestellt ist ein im Sinne einer angereicherten Umgebung ausgestatteter Käfig (mit Laufrad, Sandbad, einem Röhrensystem aus Pappe, Holzhaus, Ästen und Steinen (Bild A). Auf Bild B. ist die Lichtreflexkugel und der Scheinwerfer für die Lichtstimulation zu sehen. Bild C zeigt den Soundgenerator mit Lautsprecher, das Radio sowie den PC und das Interface (kleine Box) zur Steuerung der Lichtstimulation.



Abb.3: Deprived Environment: Dargestellt ist ein Käfig in der deprivierten Umgebung. Es ist nur ein Holzhäuschen im Käfig vorhanden.

2.3. Hörmessungen

2.3.1. Auditory Brainstem Response

Die auditorische Hirnstammantwort (auditory brainstem response, ABR) wurde 1971 von Jewett und Williston erstmalig beschrieben (Jewett und Williston, 1971) und ist heute die am meisten eingesetzte Methode, um die Hörfähigkeit bei Versuchstieren zu bestimmen. Sie beruht auf einem durch Töne oder Geräusche evozierten neuronalem Potential, welches über subkutan platzierte Elektroden abgenommen werden kann. Das aufgenommene Signal erlaubt eine Aussage darüber, ab welchem Schalldruckpegel eine Hirnstammantwort erfolgt. Generell kann dies mit breitbandigen Klickgeräuschen (Klick-ABR) oder mit Tönen einer spezifischen Frequenz erfolgen, wobei die erstgenannte Methode ein allgemeines Urteil über die Hörschwelle und letztere eine differenzierte Analyse der frequenzabhängigen Hörfähigkeit zulässt.

Vor den Hörmessungen wurde den Versuchstieren zur Narkose intraperitoneal 75 mg/kg Körpergewicht Ketavet (Ketaminhydrochlorid, Curamed, Karlsruhe, Deutschland) und 5 mg/kg Körpergewicht Rompun (Xylazinhydrochlorid, Bayer, Leverkusen, Deutschland) gespritzt. Zur Gewährleistung einer kontinuierlichen Narkose wurde bei der Auslösbarkeit des Zehenreflexes, welcher immer wieder mittels einer Pinzette überprüft wurde, ein Drittel der Initialdosis subkutan injiziert. Um die Tiere während der Messung vor Auskühlung zu bewahren, wurde durch eine beheizbare Unterlage oder durch Rotlicht die physiologische Körpertemperatur aufrechterhalten und die Körpertemperatur in regelmäßigen Abständen

mittels eines Thermometers rektal gemessen. Die Vitalfunktionen wie Puls und Atmung wurden durch einen an die Elektroden angeschlossenen Oszillographen von außerhalb der Messkabine überwacht.

Durch Zuhilfenahme einer Kanüle wurden drei Silberelektroden (Durchmesser 0,25 mm; Goodfellow, Cambridge, Großbritannien) subkutan angebracht und an das Messgerät angeschlossen. Die Platzierung erfolgte auf dem Vertex, 5 mm kaudal der Augen (Referenz), ventro-lateral zum zu messenden Ohr (aktive Elektrode) und am Rücken des Tieres (dorsale Elektrode, Erdung). Die Positionierung des Ohres erfolgte in etwa zwei Zentimetern Entfernung von der Mitte des stimulusliefernden Lautsprechers (Beyerdynamic DT-911, Heilbronn, Deutschland) und des Mikrofons zur Ermittlung der Stimuluslautstärke (Brüel & Kjaer, Typ 2670, 1/4", 5 mV/Pa; Naerum, Dänemark). Die Stimulusgenerierung erfolgte computergesteuert (PCI-6032E und PCI MIO 16E1; National Instruments, Austin, USA) ebenso wie die Amplifikation und Abschwächung der Stimuli (Wulf Elektronik, Frankfurt, Deutschland). Für die nicht frequenzspezifischen Messungen wurden 100 μ s lange Klicksignale verschiedener Polarität und in 5 dB - Stufen ansteigenden Schalldruckpegeln von 0 bis 100 dB SPL (64-256 mal für jede Lautstärke wiederholt) präsentiert. Das ausgegebene Signal ergab sich aus einer Mittelung der Messwerte der Wiederholungen je präsentem Schalldruckpegel. Frequenzspezifische Hörschwellen wurden über das Abspielen von 3 ms langen Tönen (1 ms ein- und 1 ms ausgeblendet) von 20-100 dB SPL in 5 dB- Schritten in 32-128 Wiederholungen bestimmt. Die Frequenzen lagen im Bereich zwischen 1,0 und 32,00 kHz mit einer Auflösung von zwei Frequenzen pro Oktave. Signale wurden für 20 ms mit einer Wiederholungsrate von 13 Hz aufgezeichnet, 50 000-fach amplifiziert (Neuron1; Wulf Elektronik, Frankfurt, Deutschland), gefiltert (F1; Wulf Elektronik, Frankfurt, Deutschland)

und gemittelt. Lag die Signalamplitude nach Amplifikation über 1,5 V, blieb das Signal von der Software automatisch unberücksichtigt.

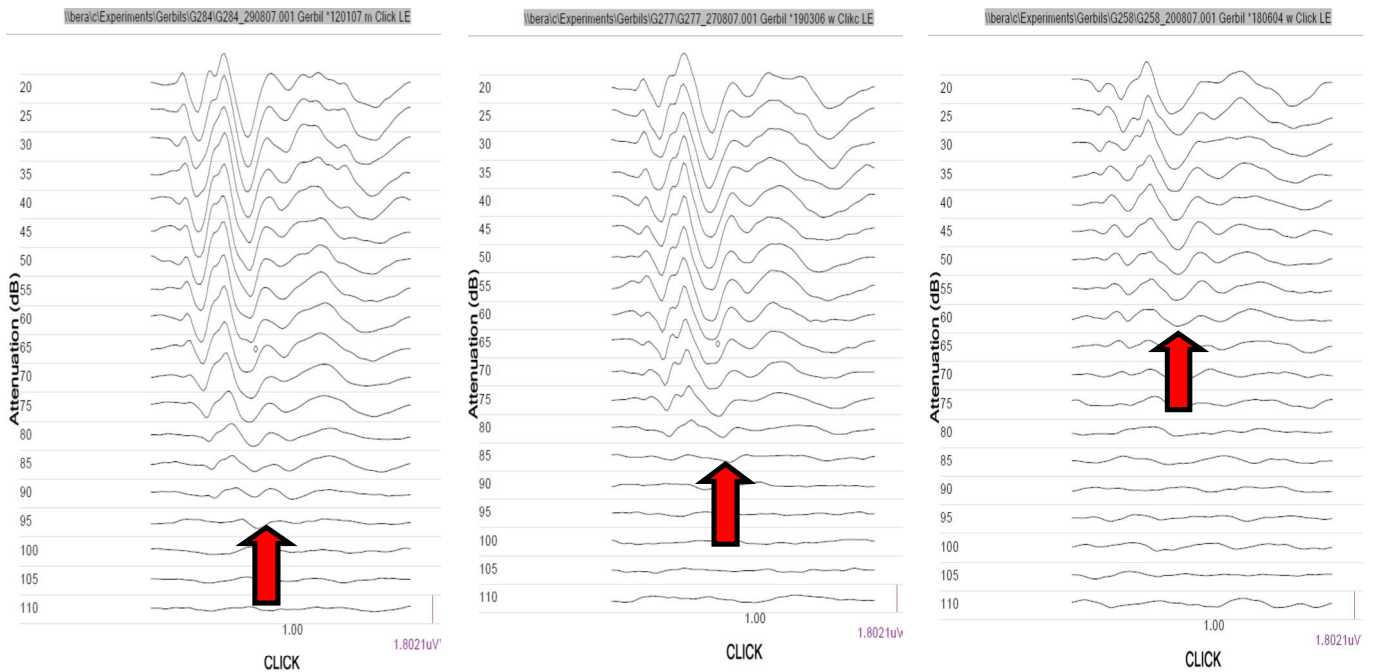


Abb. 4.: Klick ABR Messungen: Dargestellt sind beispielhaft drei Klick ABR Messungen von unbehandelten Tieren verschiedener Altersgruppen. Die Hörschwellen sind jeweils mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. A.: Junges Tier. B.: Mittlialtes Tier. C.: Altes Tier. Man sieht dass sich die Hörschwelle bei den älteren Tieren zu einer geringeren Abschwächung verschiebt.

2.3.2. Distorsionsprodukte

Die Messung von Distorsionsprodukte Otoakustischer Emissionen (DPOAE), auch das akustische Verzerrungsprodukt genannt, wird angewandt um die Funktion des Cortischen Organs, genauer der äußeren Haarzellen, spezifisch zu untersuchen. Es wird angenommen, dass die äußeren Haarzellen im Innenohr Teile eines nichtlinearen Verstärkungssystems darstellen, das bei Anregung mit zwei Reintönen einen dritten erzeugt. Das Ohr reagiert somit auf die Darbietung von zwei Sinustönen unterschiedlicher Frequenz (f_1 und f_2) mit der

Aussendung eines Differenztones, z.B. des kubischen Differenztones ($f_{dp} = 2 * f_1 - f_2$). Teile der im Innenohr erzeugten Schwingung werden über das Mittelohr zurück an das Außenohr übertragen. Hier können sie mit einem empfindlichen Mikrofon gemessen werden. Dieser Differenzton lässt dann Rückschlüsse auf die Integrität der äußeren Haarzellen zu. Das Fehlen von DPOAEs kann als Zeichen einer Innenohrschädigung angesehen werden. In der Messapparatur sind die dynamischen Lautsprecher (Beyer DT48), über welche die akustischen Stimuli generiert werden, sowie das Mikrofon (Bruel and Kjaer 4135) zusammengeschlossen. Diese werden mittels eines Kopplers (Sonde) unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops möglichst nahe an den Gehörgang des narkotisierten Tieres gebracht. Die vom Mikrofon aufgenommenen Distorsionsprodukte wurden erst verstärkt (Nexus; 10 dB Verstärkung) und dann von einer Hauseigenen Software (Labfiew, basiert auf Labwindows /CVI National Instruments, München, Germany; unterstützt auch Fast Fourier Transformation für die Datenauswertung) aufgezeichnet.

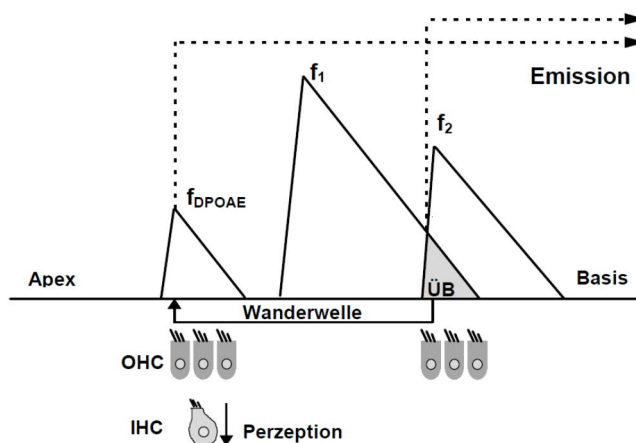


Abb.5: Modell zur Entstehung der DPOAE: Basalmembranauslenkung
 Zweitonstimulation (Erweitert nach Janssen et al., 1995), f_1 und f_2 : Frequenzen der
 Primärtöne ($f_1 < f_2$), hier: Frequenzort des Wanderwellen-Amplitudenmaximums der
 Primärtöne; f_{DPOAE} : Frequenz der DPOAE, hier: Frequenzort des Wanderwellen-
 Amplitudenmaximums der DPOAE; ÜB: Überlappungsbereich der Wanderwellen.

2.3.3. Akustisches Trauma

Um ein akustisches Trauma zu generieren, wurden die Tiere in einer Geräusche emittierenden Kammer akustischen Stimuli mit einer Intensität von 120 dB SPL für eine Stunde ausgesetzt. Die Kammer war mit oben mit einem großen Lautsprecher (DR45N, 8 Ω , Visaton, Haan, Deutschland) und an den Seiten mit sechs kleineren Lautsprechern (Soundcraft piezo, Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland) ausgerüstet. Die Kalibration fand mit einem Mikrophon statt (Brüel & Kjaer, Type 2670, 1/4 ", 5 mV/Pa; Naerum, Dänemark) und der Schalldruck konnte über die gesamte Zeit der Exposition kontrolliert werden. Zur Signalerzeugung sowie zur Abschwächung wurde ein extra für diese Anwendung hergestellter Signalgenerator benutzt (Wulf Electronic, Frankfurt, Deutschland).

Nach der Narkoseeinleitung wurden die Tiere in der durch Rotlicht vorgewärmten Kammer auf einen Drehteller gelegt. Um eine möglichst gleichmäßige und reproduzierbare Vertäubung der einzelnen Ohren und Individuen zu erreichen, wurde die Liegeposition der Tiere alle 20 Minuten von vorwärts nach rückwärts und dann seitwärts der Rotationsrichtung geändert. Zwei Tiere jeder Altersklasse wurden zur Kontrolle scheinexponiert (die Lautsprecher waren hierbei ausgeschaltet). Alle anderen Tiere mit 120 dB SPL vertäubt.

Die Vitalparameter sowie Tiefe der Narkose wurden auch während der Vertäubung kontrolliert und wenn notwendig wurde zusätzliches Narkosemittel subkutan appliziert.

2.4. Verhaltenstests

2.4.1. Elevated x maze

Der Elevated x maze ist ein 4 armiges Labyrinth aus zwei gleich großen überkreuzten Balken (60 x 8 x 0,5 cm), wobei jeweils einer dieser Balken offen war und der andere eine seitliche Begrenzung aufwies. Die Höhe der Begrenzung der geschlossenen Balken betrug 20 cm. Beide Balken waren in der Mitte durch eine Überkreuzung (8 x 8 cm) verbunden. Die Apparatur stand durch Stelzen etwa 1 m erhöht. Das Labyrinth wurde in einem dunklen Raum platziert und von oben durch eine Lampe beleuchtet um eine gleichmäßige Beleuchtung zu gewährleisten.

Der elevated x maze erlaubt es, die angeborene Angst von Nagern vor unbekanntem, offenen Flächen zu untersuchen. Bei Angstverhalten halten sich die Tiere weniger Zeit in den ungeschützten, offenen Armen auf als in den geschlossenen. Diese charakteristische Verhaltensweise kann zur Quantifizierung der Ängstlichkeit der Tiere verwendet werden. Zum Beispiel konnte gezeigt werden dass Tiere, welche mit anxiolytischen, also angstlösenden, Medikamenten wie Benzodiazepinen behandelt wurden, signifikant mehr Zeit zur Exploration des offenen Armes verwendeten als die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe. (Pellow und File, 1985).

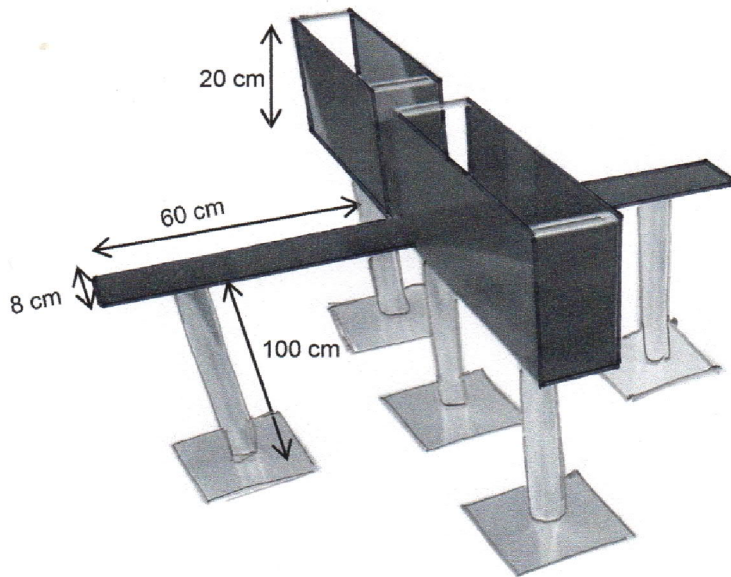


Abb.6: Modell eines elevated x Maze wie es in der Arbeit verwendet wurde: Dargestellt sind die 4 Arme, wobei die 2 Arme mit Begrenzung über eine Überkreuzung mit den Armen ohne Begrenzung verbunden sind.

2.4.2. Open Field Test

Der Standard Open Field Test wird verwendet, um Angstverhalten, Explorationsverhalten und Bewegungsparameter von Labortieren abschätzen zu können.

Ein 100 x 100 cm großes Brett aus schwarzem Plexiglas wurde in 36 Areale unterteilt und war von einer 20 cm hohen, ebenfalls schwarzen Begrenzung umschlossen. Um eine gleich bleibende Lichtintensität zu gewährleisten, wurde das Open Field von einer Lampe direkt beleuchtet. Zu Beginn des Tests wurde jedes Tier in einer Ecke platziert und die Bewegungen wurden 5 Minuten lang gefilmt. Um den Geruch von vorhergegangenen Versuchstieren zu minimieren wurde das Brett nach jedem Versuch mit Desinfektionsmittel gereinigt. Alle Tiere der unterschiedlichen Haltungsbedingungen (Environmental Enrichment / Deprived

Environment) wurden innerhalb einer Woche im open field getestet. Die Tests erfolgten immer zwischen 8:00 und 12:00 Uhr unter gleich bleibenden Bedingungen.

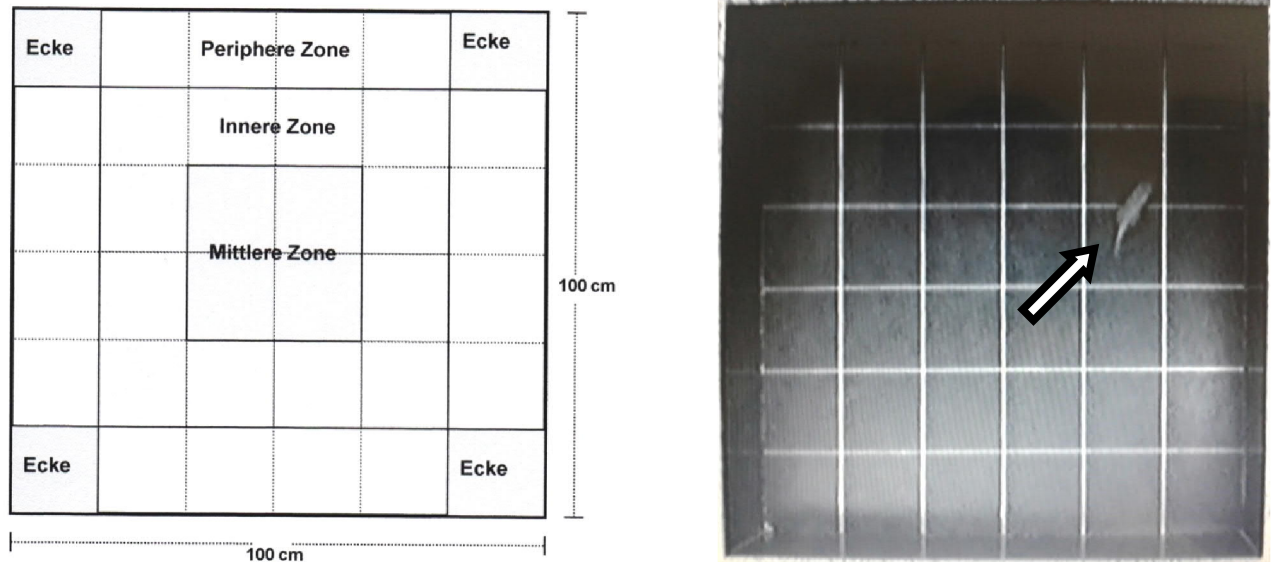


Abb.7: Schematische Darstellung des Open Fields (Aufsicht) und Screenshot aus dem gefilmten Open Field Versuch: In der schematischen Darstellung sieht man die verschiedenen Areale, die wiederum in Zonen aufgeteilt sind (Mittlere, innere, periphere Zone; Ecken). Die Platzierung des Versuchstieres zu Experimentbeginn erfolgte immer in der gleichen Ecke. Im Bildschirmfoto aus einem Versuchsvideo sieht man die auf das Feld eingezeichneten Zonen und den Gerbil (Pfeil).

Mit dem Open Field und dem Elevated x maze wurden die im folgenden beschriebenen Verhaltensweisen getestet:

Exploration: Körperbewegungen wie untersuchendes Schnüffeln in der Luft und auf dem Boden. Laufen: Direkte und relativ schnelle Körperbewegung ohne exploratives Schnüffeln

Grooming: Schnelle Bewegungen, bei denen sich die Tiere putzen wobei sie meist auf den Hinterbeinen stehen. Sitzen: Eine Aktivität ohne Bewegung bei der das Tier in der Regel mit

offenen Augen in der Luft schnüffelt. Stretched attend: Verhaltensweise zur Risikoabschätzung, bei der das Tier seinen Körper streckt, typischerweise von einem „sicheren“ Areal (z.B. Ecken) in ein „weniger sicheres“ Areal (z.B. die Mitte des Feldes).

Beide Experimente (Elevated x maze / Open Field) wurden mit einer Schwarzweiß- Kamera zur späteren Auswertung gefilmt.

A



B



Abb.8: Beispiel der getesteten Verhaltensweisen im X – Maze und Open Field Versuch: Bild A zeigt ein Gerbil im „Rearing“ Verhalten. Bild B zeigt ein Gerbil welches das „Grooming“ Verhalten zeigt.

2.4.3. Labyrinth-Test

Der Labyrinth Test wird benutzt um heraus zu finden ob bei unterschiedlich behandelten Nagetieren Unterschiede in der Lernfähigkeit bestehen. Im Zuge dieser Arbeit wurde der Labyrinth - Test verwendet um beobachten, ob sich die Tiere aus der angereicherten Umgebung von den Tieren aus der deprivierten Umgebung in der Lernfähigkeit unterscheiden.

Vor Beginn des Experiments wurden die Tiere wie im folgenden beschrieben an das Labyrinth gewöhnt: Als Ziel wurde ein Standardkäfig genommen in dessen Einstreu Tierfutter gelegt war. Zur Eingewöhnung wurde jedes Tier so im Labyrinth platziert, dass sich der Käfig direkt in seinem Blickfeld befand. Dies wurde so lange wiederholt, bis jedes Tier den Käfig einmal gefunden hatte. Während der Gewöhnungsphase wurde keine Zeit genommen. Noch am gleichen Tag der Gewöhnungsphase wurde das Experiment durchgeführt. Mittels einer Stoppuhr wurde die Zeit gestoppt welche die Tiere benötigten, um von einem spezifischen, vorher ausgewählten, Punkt ins Ziel zu kommen. Es wurden drei Punkte gewählt (A, B und C, siehe Grafik). Jedes Tier wurde von jedem Punkt aus drei Mal getestet, wobei jedes Tier nur einmal pro Tag im Labyrinth getestet wurde. Wenn ein Zeitraum von 10 Minuten erreicht war, wurde das Experiment abgebrochen und der Zeitwert von 10 Minuten ging in das Protokoll ein.

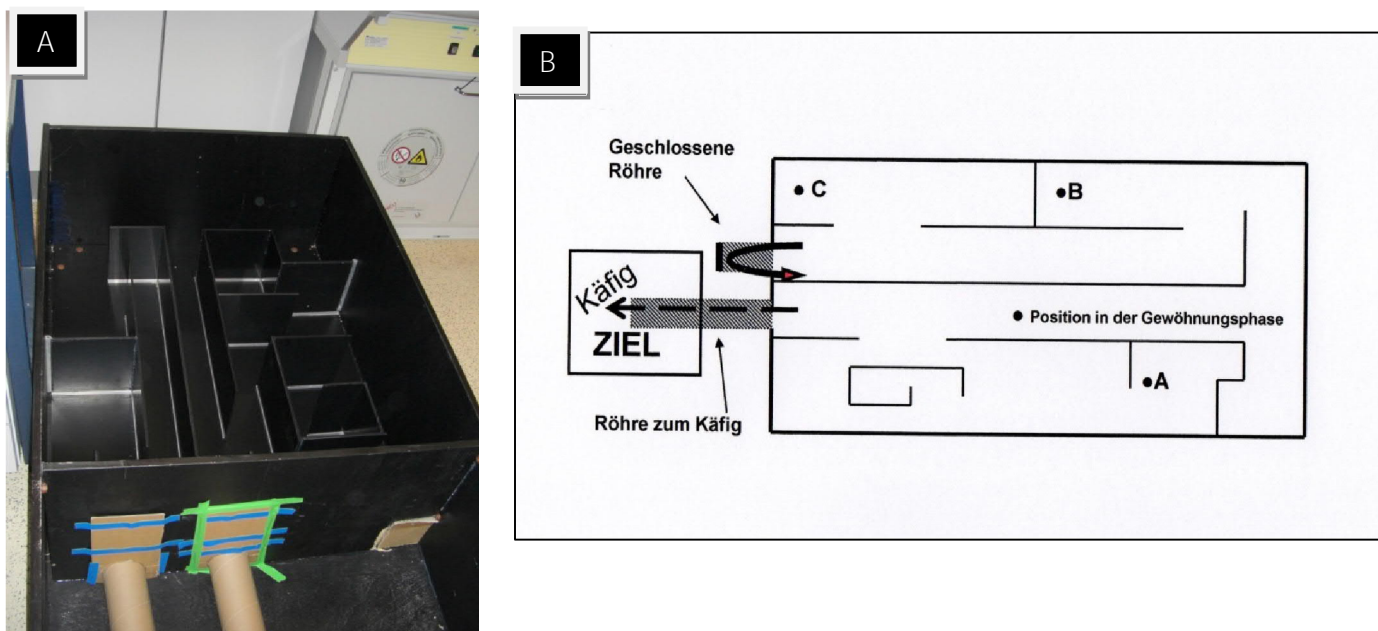


Abb.9: Foto des Labyrinths (Bild A) und Schematische Darstellung es Labyrinths (Aufsicht; Bild B). In der Schematischen Darstellung zu sehen ist der Zielkäfig, die Position der Tiere in der Gewöhnungsphase sowie die drei Positionen (Punkte A,B und C) von welchen die Tiere den Zielkäfig finden mussten.

2.5. Gewebeentnahme

2.5.1. Gewebeentnahme für PCR

Die Tiere wurden mit CO₂ eingeschläfert und darauffolgend dekapitiert. Danach wurden beide Cochleae und das Gehirn entnommen. Am Gehirn wurden der auditorische Cortex und der Colliculus inferior identifiziert und isoliert. Alle aus dem Gehirn entnommenen Gewebe sowie die präparierten Cochleae wurden in Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert, da zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme die geplante PCR-Amplifizierung noch nicht etabliert war.

2.5.2. Gewebeentnahme für die spätere histologische Aufarbeitung

Die frisch präparierten Cochleae wurden für zwei Stunden in 2% Paraformaldehyd (125 mM Saccharose in 100 mM Phosphat gepufferter Saline (Phosphat buffered saline - PBS, pH 7,4) fixiert. Nach der Fixierung wurden sie in RBD (Rapid Bone Decalcifier; Eurobio, Les Ulis Cedex, Frankreich) für 25 – 25 Minuten, abhängig vom Alter des Tieres, entkalkt. Danach schloss sich ein Waschvorgang in 25% Saccharose in Hepes- Hanks- Lösung im Überkopfschüttler bei 4°C über Nacht an. Am nächsten Tag wurden die Cochleae in Tissue Tek O.C.T Medium (Sakura Finetek Europe B.V.; Niederlanden) eingebettet und bei -80 °C gelagert.

2.6. Blutproben

Die Blutproben für die Analyse der Plasmaspiegel von Östradiol und Cortison wurden während der Präparation und Gewebeentnahme entnommen. Nach Einschläferung der Tiere in CO₂ und Dekapitation wurde das Blut in speziellen Röhrchen aufgefangen. Das für die Östradiolwerte bestimmte Blut wurde in ein Röhrchen mit Heparin gefüllt, wohingegen für die Cortisolwerte ein EDTA-Röhrchen verwendet wurde. Danach wurden die Röhrchen einige Male über Kopf geschwenkt und bis zur Auswertung auf Eis gekühlt.

2.7. statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Statistikprogramm Prism Version 6 (Graph Pad Software, Inc.; La Jolla, USA) verwendet. Absolute Hörschwellen für Klick-evozierte Hirnstammpotenziale wurden mit der 1-Way ANOVA und dem Signifikanzkriterium $\alpha=0,05$ auf statistisch relevante Unterschiede überprüft. Im Fall von Signifikanz wurden als Post-Test mit dem Dunnett's multiple comparison test Einzelpaarvergleiche durchgeführt (ebenfalls mit $\alpha=0,05$). Frequenzspezifische Hörschwellen wurden mit der 2-Way ANOVA auf signifikante Unterschiede bezüglich der Einzelfaktoren ‚Gruppenzugehörigkeit‘ (Alter und Haltungsbedingung) und ‚Stimulationsfrequenz‘ überprüft und mit dem Dunnett's multiple comparison test auf frequenzspezifische Hörschwellenunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen verglichen. Maximale Distorsionsproduktantworten und frequenzspezifische Distorsionsproduktschwellen wurden in gleicher Weise mit der 1-Way ANOVA bzw. der 2-Way ANOVA auf statistische Signifikanz überprüft.

Hörschwellenabwanderungen nach der Haltungsphase, direkt nach Lärmexposition und nach der Erholung von der Lärmexposition wurden für die Klick- und frequenzspezifischen Hörschwellenabwanderungen mit der 1-Way ANOVA bzw. der 2-Way ANOVA auf statistische Signifikanz überprüft. Im Falle von statistischer Signifikanz in der ANOVA wurden multiple

Paarvergleiche mit dem Post-Test nach Sidak (Klick-ABRs) bzw. dem Post-Test nach Holm-Sidak (frequenzspezifische ABRs) durchgeführt.

Die Mindestanzahl bzw. die Streuungsgleichheit in der Versuchsgruppe alter Tiere war nach der längeren Haltungsphase bzw. nach der Lärmexposition nicht immer erfüllt. Die Verhaltensstudien ergaben keine normalverteilte Daten und keine vergleichbare Streuungen zwischen den Versuchsgruppen. Damit waren die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der statistischen Verfahren nicht für alle Versuchsgruppen und Versuchsteile gegeben. Es wurden daher einzelne Versuchsgruppen bzw. Versuchsansätze von den statistischen Vergleichen ausgenommen. Für diese Versuchsgruppen werden Mittelwerte und Streuungsdaten deskriptiv dargestellt, ohne eine statistisch wertende Aussage zu machen.

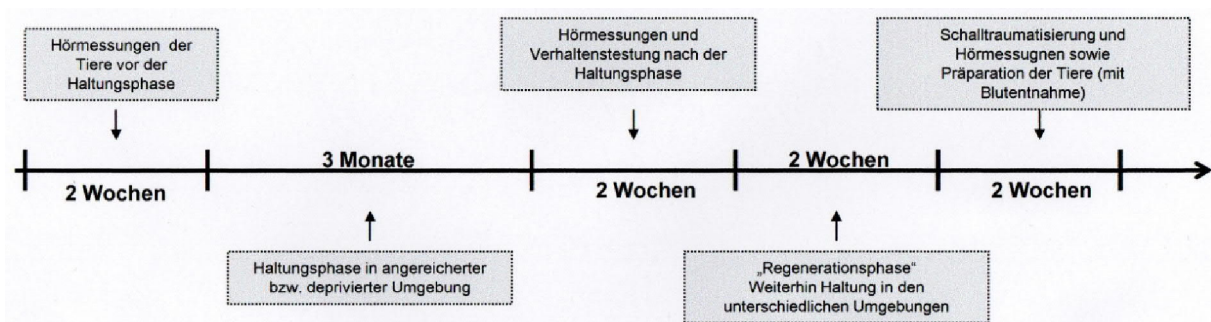


Abb.10 : Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Experiments.

3. Ergebnisse

3.1. Hörmessungen

Vor und nach der Haltungsphase im Environmental Enrichment (EE) bzw. im Deprived Environment (DE) wurden an allen Tieren Hörmessungen durchgeführt. Nach der Haltungsphase von drei Monaten wurden ausgewählte Tiere einem akustischen Trauma ausgesetzt und jeweils direkt nach dem Trauma sowie sechs Tage nach der Traumatisierung auf ihre Hörschwellen hin gemessen. Die Klick Messungen erfolgten grundsätzlich an beiden Ohren. Die Frequenzmessungen dagegen erfolgten vor der Haltungsphase und nach dem akustischen Trauma nur an einem Ohr, wohingegen nach der Haltungsphase sowie sechs Tage nach dem akustischen Trauma beide Ohren gemessen wurden. Auch Distorsionsprodukte otoakustische Emissionen (DPOAEs) wurden vor und nach der Haltungsphase gemessen. Die Anzahl der Tiere zum Zeitpunkt der ersten Messungen betrug 19 junge (< 12 Monate), 17 mittelalte (> 12 Monate) und 15 alte (> 32 Monate) Tiere. Aufgrund einer hohen Sterblichkeit reduzierte sich die Gruppe der alten Tiere bis zum Ende der Haltungsphase auf insgesamt sechs Tiere. Die hohe Sterblichkeit unter den alten Tieren war auch der Grund dafür, bei den verbliebenen sechs alten Tieren das Experiment schon nach zwei anstatt wie bei den anderen Tieren nach drei Monaten Haltungsphase zu beenden. Die Gruppen der jungen und mittelalten Tiere reduzierten sich bis zum Ende der Haltungsphase durch plötzlichen Tod zweier Tiere nur um jeweils ein Tier.

3.1.1. Hörvermögen der Tiere vor der Haltungsphase

Um das Hörvermögen der Tiere vor Beginn des Experiments (der Haltungsphase im EE bzw. DE) festzuhalten, wurden alle Tiere vor Beginn der Haltungsphase Klick-ABR-Messungen und

Frequenz-ABR-Messungen unterzogen. Ebenso wurden Distorsionsprodukte otoakustische Emissionen (DPOAE) gemessen. Aus den gemessenen Daten wurden jeweils die Mittelwerte der entsprechenden Behandlungsgruppen berechnet, wobei bei den Frequenzmessungen und bei den Distorsionsprodukten für jeden gemessenen Frequenzbereich zwischen 1 und 32 kHz die Mittelwerte der Tiere der entsprechenden Behandlungsgruppe gemittelt wurden.

3.1.1.1 Klick-ABR

Es zeigte sich, dass bei den jungen sowie bei den mittelalten Tieren keine statistisch signifikanten Unterschiede im Hörvermögen bestanden. Die mittelalten und jungen Tiere hatten eine mittlere Hörschwelle, die kleiner als 10.5 dB SPL war. Die alten Tiere hingegen zeigten einen ausgeprägten Hörverlust im Sinne einer Altersschwerhörigkeit mit einer Hörschwelle im Mittel von 54.2 dB SPL. Die Hörschwellen der verschiedenen Altersgruppen unterschieden sich signifikant (1-Way ANOVA; $F(2,86) = 110.9$; $P < 0.0001$).

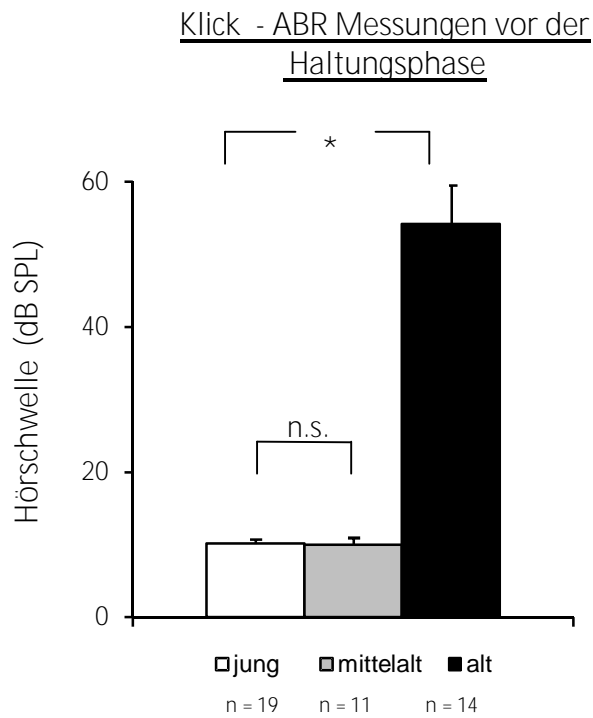


Abb. 11: Klick-ABR-Messungen: Hörvermögen der jungen, mittelalten und alten Tiere vor der Haltungsphase. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler der Hörschwellen in dB SPL beider Ohren. n gibt die Anzahl der Tiere an. Die Hörschwellen unterschieden sich signifikant (1-Way ANOVA, $p < 0.0001$, *: $p < 0.05$, Dunett's Post-Test. n.s.: Nicht signifikant, Dunett's Post-Test).

3.1.1.2. Frequenz-ABR

Bei den Frequenzmessungen vor Beginn des Experiments zeigten die jungen und mittelalten Tiere ähnliche Hörkurven. Die alten Tiere zeigten eine Verschiebung der Hörkurve hin zu höheren Schalldruckpegeln bis 90 dB SPL bei 32 kHz. Die frequenzspezifischen Hörschwellen unterschieden sich signifikant für die unterschiedlichen Altersstufen (2-Way ANOVA $F(2,273)=395,1$; $p<0.0001$). Es konnte keine Interaktion zwischen Alter und Frequenz gefunden werden (2-Way ANOVA; $F(10,273)=1.478$; $p=0.1470$).

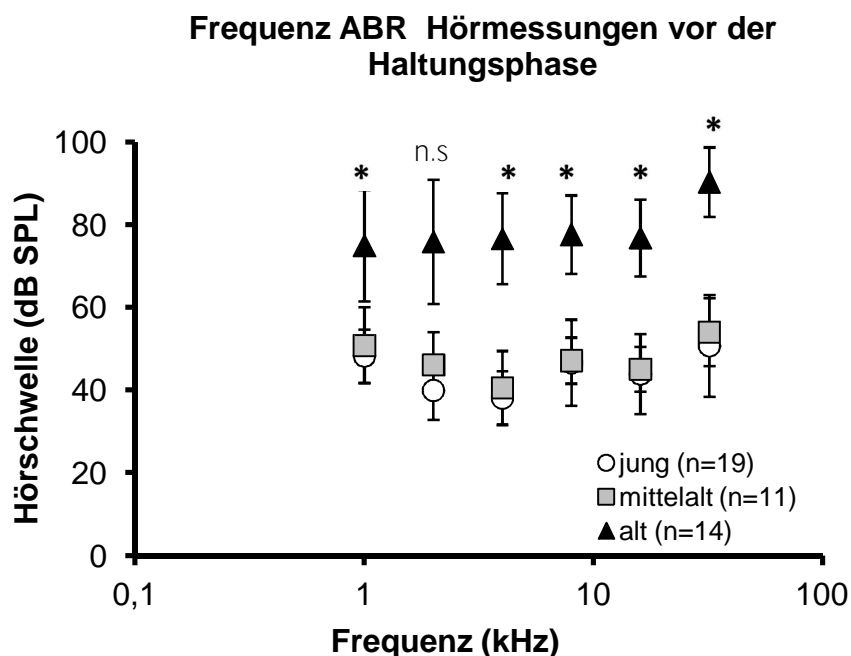


Abb. 12: Frequenz-ABR-Messungen: Hörvermögen der jungen, mittelalten und alten Tiere vor der Haltungsphase. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler der Hörschwellen in dB SPL der gemessenen Frequenzen (in kHz). Gemessen wurde jeweils ein Ohr. n gibt die Anzahl der Tiere an. Die Hörschwellen alter und junger Tiere unterschieden sich signifikant (2-Way ANOVA, $P<0.0001$, *: $p<0,05$, Dunett's Post-Test (alt vs. jung). n.s.: Nicht signifikant, Dunett's Post-Test (mittelalt vs. jung). Die Hörschwellen mittelalter und junger Tiere unterschieden sich nicht ($p>0,05$, nicht signifikant, Dunett's Post-Test).

3.1.1.3: DPOAE

Das höchste Maximum der otoakustischen Emission des Distorsionsprodukts über den für Gerbils spezifischen, funktionellen Frequenzbereich des Hörens (Maximum des F-Scans) konnte für junge Tiere gemessen werden. Die mittelalten Tiere hatten ein geringeres und die alten Tiere das geringste Maximum. Die DPOAE F-Scan Maxima unterschieden sich signifikant zwischen den verschiedenen Altersgruppen (1-Way ANOVA; $F(2,41)=8.527$; $p=0.008$).

Bei den DPOAE-Hörschwellen zeigten die jungen Tiere die besten DPOAE Schwellen für alle gemessenen Frequenzen. Erwartungsgemäß waren die DPOAEs der mittelalten und der alten Tiere zu höheren Anregungs-Schalldruckpegeln verschoben. Die DPOAE-Hörschwellen zwischen 2.8 und 22.6 kHz unterschieden sich signifikant zwischen den Altersgruppen (2-Way ANOVA $F(2,273)=395.1$; $p<0.0001$). Es konnte keine Interaktion zwischen Alter und DPOAE-Hörschwelle in Abhängigkeit von der Stimulusfrequenz gefunden werden. (2-Way ANOVA; $F(10,273)=1.478$; $p=0.1470$).

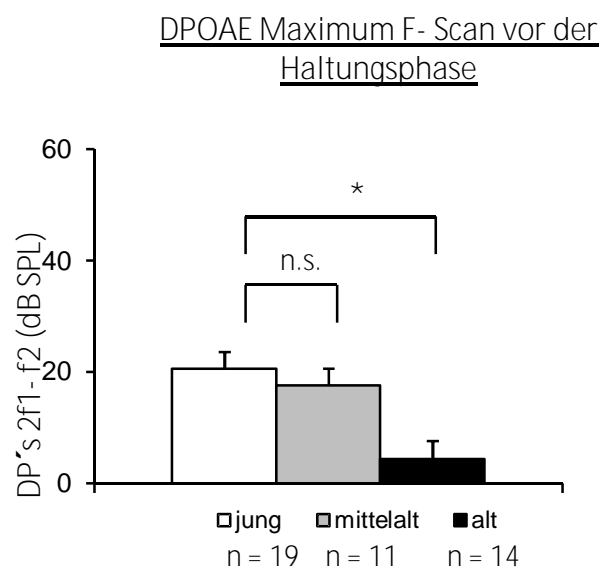


Abb. 13.: DPOAE - Messungen: F - Scan Maxima der jungen, mittelalten und alten Tiere vor der Haltungsphase. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler der Maxima in dB SPL. Gemessen wurde jeweils ein Ohr. n gibt die Anzahl der Tiere an. Die Maxima des 2f1-f2 Distorsionsprodukts unterschieden sich signifikant (1-Way ANOVA, $p<0.0001$, *: $p<0.05$, Dunett's Post-Test. n.s.: nicht signifikant, Dunett's Post-Test).

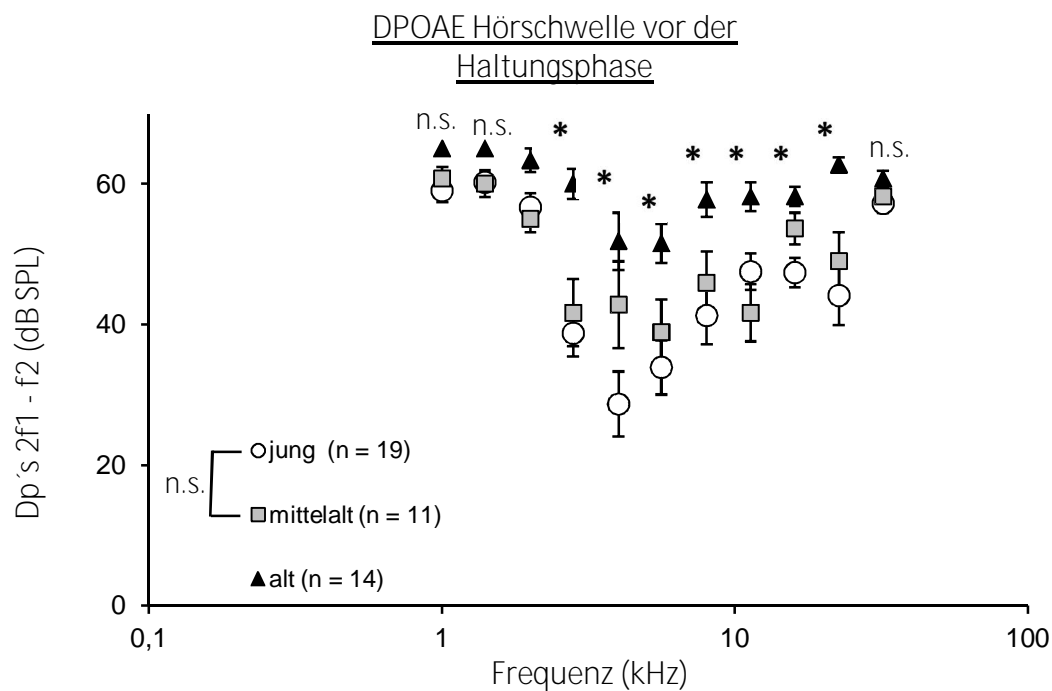


Abb. 14.: DPOAE-Messungen: DPOAE-Hörschwelle der jungen, mittelalten und alten Tiere vor der Haltungsphase. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler der DPOAE-Hörschwellen in dB SPL der Stimulationsfrequenzen (in kHz). Gemessen wurde jeweils ein Ohr. n gibt die Anzahl der Tiere an. Die DPOAE-Hörschwellen von 2.8 kHz bis 22.6 kHz alter Tiere unterschieden sich signifikant von denen junger Tiere (2-Way ANOVA, $p < 0.0001$, *: $p < 0.05$, Dunett's Post-Test, n.s.: nicht signifikant, Dunett's Post-Test).

3.1.2. Hörschwellenentwicklung der Tiere nach der Haltungsphase:

Um herauszufinden, welchen Einfluss die verschiedenen Haltungsbedingungen auf das Hörvermögen der Tiere hatten, wurden die Hörschwellen der Tiere vor und nach der Haltungsphase von drei Monaten (bzw. zwei Monaten bei den alten Tieren) miteinander verglichen. Zur Ermittlung der Hörschwellen wurden die Differenzen aus den Mittelwerten der Hörmessungen vor und nach der Haltungsphase errechnet. Ebenso wurden auch hier wieder die Otoakustischen Emissionen gemessen, wobei hier nicht die Differenzen aus den Mittelwerten sondern die direkten Messwerte dargestellt wurden.

3.1.2.1. Klick-ABR

Nach der Haltungsphase zeigte sich bei den meisten jungen Tieren der EE Gruppe eine leichte bis deutliche Verbesserung der Hörfähigkeit (sechs Tiere von zehn), wohingegen alle Tiere der DE Gruppe eine Hörverschlechterung aufwiesen (Die Veränderungen in der Hörfähigkeit erwiesen sich leider als nicht signifikant). Dieser Trend bestätigte sich auch in den Mittelwerten dieser Gruppen. Die mittelalten Tiere zeigten in beiden Gruppen (EE und DE) alle eine Hörverschlechterung wobei die Mittelwerte bei den DE Tieren geringfügig besser waren als bei den EE Tieren. Die alten Tiere zeigten fast alle eine stark ausgeprägte Hörverschlechterung, wobei ein Tier aus der DE – Gruppe keine Verschiebung der Hörschwelle aufwies. Über die Dauer der Haltungsphase konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Veränderung der Hörschwelle für Klickreize zwischen den Gruppen in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen und den jungen und mittelalten Altersgruppen festgestellt werden (1-Way ANOVA; $F(3,30)=1.329$; $p=0.6858$). Die Hörschwellen für Klickreize veränderten sich also nicht statistisch signifikant über die Dauer der Haltungsphase. Für die alten Tiere konnte aufgrund der geringen Überlebensrate und Stichprobengröße keine statistische Aussage gemacht werden. Unter beiden Haltungsbedingungen traten bei alten Tieren Veränderungen von bis zu 40 dB Hörverlust auf. Im Mittel konnte keine Tendenz für eine ausgeprägtere Hörschwellenänderung in einer der beiden Haltungsbedingungen abgelesen werden.

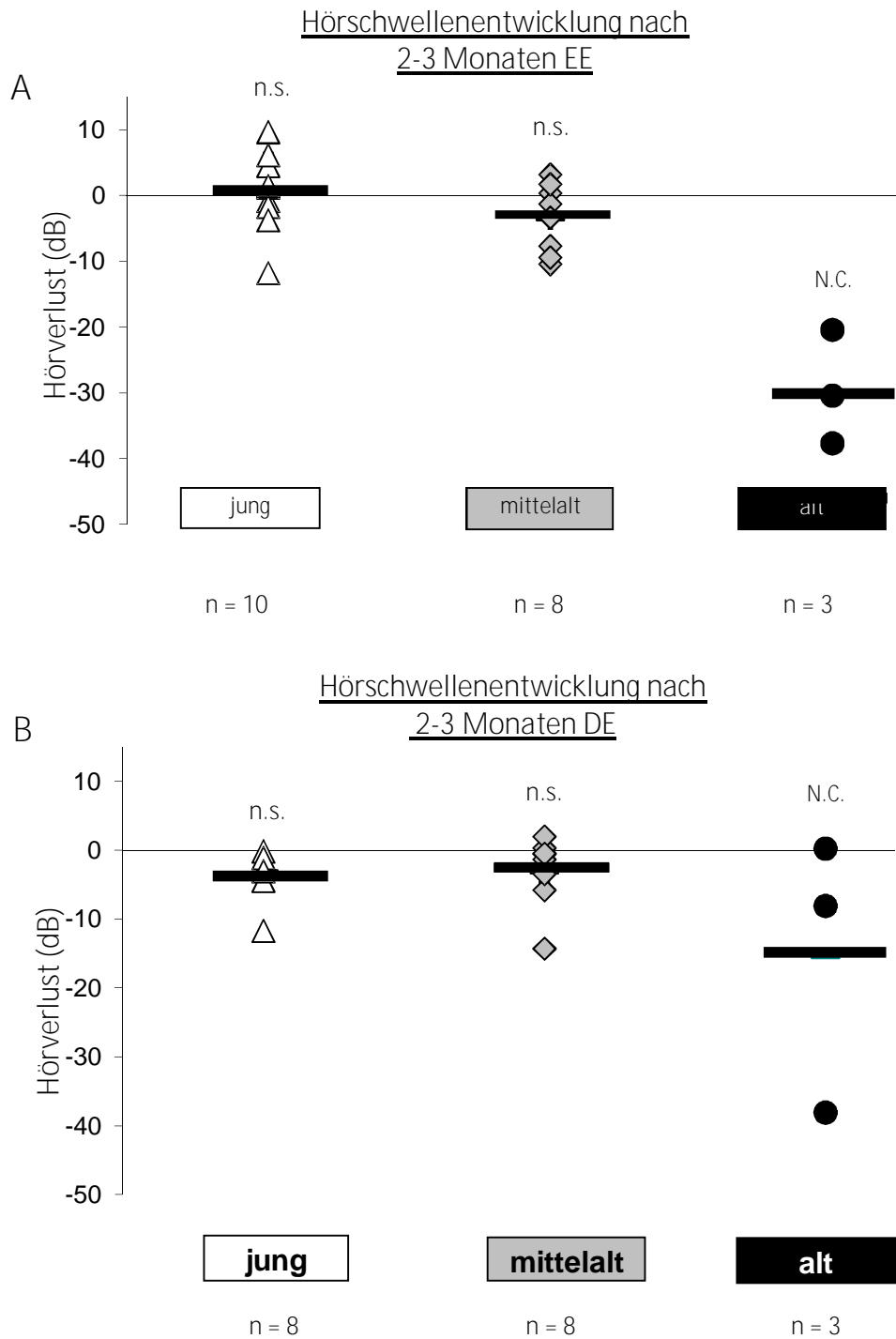


Abb. 15 und 16: Klick-ABR-Messungen: Hörschwellenabwanderung der Tiere nach 2 Monaten (alte Tiere) bzw. 3 Monaten (junge und mittelalte Tiere) aus EE (A) bzw. DE (B). Dargestellt sind die Hörverluste der Einzeltiere in dB nach der Haltungsphase. Der Hörverlust wurde aus den Differenzwerten der Klick-ABR Messungen für jedes einzelne Tier vor und nach der Haltungsphase ermittelt. Die Mittelwerte der Gruppen sind als horizontale Balken dargestellt. Die Nulllinie kennzeichnet die Grenze zwischen Hörschwellenverschlechterung (abwärts der Nulllinie liegende Datenpunkte) und Hörschwellenverbesserung (über der Nulllinie liegende Datenpunkte). n gibt die Anzahl der Tiere an. n.s.: nicht signifikant, 1-Way ANOVA. N.C.: not certified, Daten wegen Nichterfüllung der statistischen Voraussetzungen nicht auf statistische Signifikanz geprüft.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den Klick-Messungen bei der Mehrzahl junger Tieren der EE-Gruppe nach der Haltungsphase bei der Tiere eine Hörverbesserung zu beobachten war, wohingegen alle anderen Tiere eine Hörverschlechterung oder keinen Unterschied in der Hörschwellenverschiebung zeigten. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant.

3.1.2.2. Frequenz-ABR

Die jungen Tiere zeigten in den Frequenzmessungen in beiden Gruppen (EE und DE) eine Hörverschlechterung, wobei die Tiere der EE-Gruppe einen stärker ausgeprägten Hörverlust in den Frequenzen ab 4 kHz zeigten als die Tiere der DE Gruppe. Auch die mittelalten Tiere zeigten in beiden Gruppen einen Hörverlust, wobei dieser bei der EE-Gruppe vor allem in den hohen Frequenzen geringfügig stärker ausgeprägt war. Bei den alten Tieren zeigten die Gruppen keinen Unterschied bezüglich der Hörverluste. Wie auch bei der Hörschwelle für Klickreize konnte über die Dauer der Haltungsphase auch bei der Hörschwelle für frequenzspezifische Reize keine statistisch signifikante Veränderung in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen und den jungen und mittelalten Haltungsgruppen festgestellt werden (2-way ANOVA; $F(5,210)=0.6367$; $p=0.6720$).

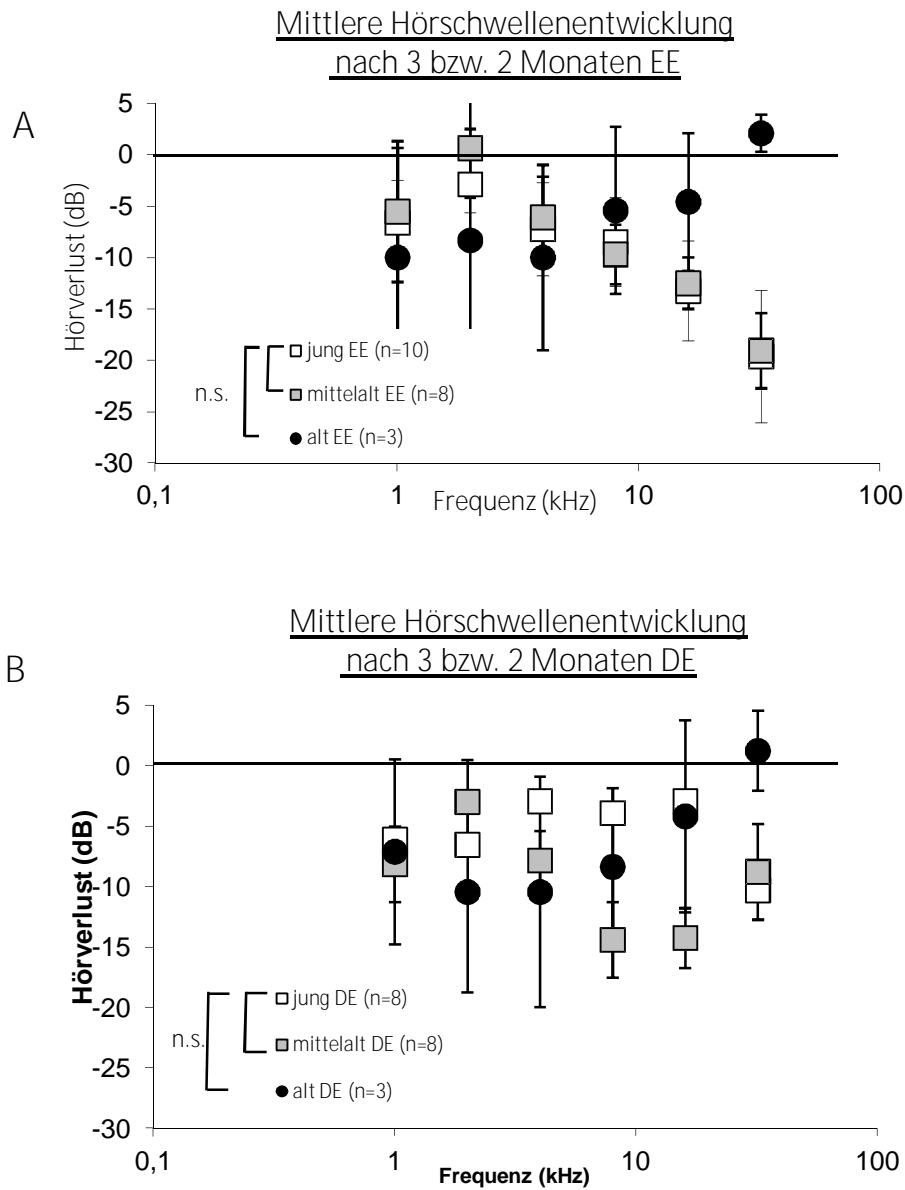


Abb. 17 und 18 Frequenz – ABR Messungen nach der Haltungsphase: Darstellung der mittleren Hörschwellenentwicklung der Tiere nach der Haltungsphase in EE (A) und in DE (B). Die Hörschwellenentwicklung wurde aus den Differenzwerten der Mittelwerte der Frequenz ABR Messwerte für die Hörschwellen vor und nach der 3 monatigen (alte Tiere 2 monatigen) Haltungsphase in EE bzw. DE ermittelt. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sind als Funktion der Stimulusfrequenz (kHz) mit den entsprechenden Standardfehlern abgebildet. Die Nulllinie kennzeichnet die Grenze zwischen Hörschwellenverschlechterung (niedrigerer Datenpunkt) und Hörschwellenverbesserung (höherer Datenpunkt). n gibt die Anzahl der Tiere in den Gruppen an. Vor der Haltungsphase wurde jeweils ein Ohr, nach der Haltungsphase wurden beide Ohren gemessen. Die Unterschiede in der Hörschwellenentwicklung für alle Gruppen und Frequenzen waren statistisch nicht signifikant (2-Way ANOVA, $p > 0.05$).

Bei den Frequenzmessungen lässt sich zusammenfassen, dass hier alle Tiere unabhängig von den Haltungsbedingungen eine Hörverschlechterung zeigten, die bei den jungen und mittelalten Tieren der DE-Gruppe im Vergleich zu den Tieren der EE Gruppe am geringsten ausgeprägt war.

3.1.2.3. DPOAE

DPOAE Maximum im Frequenz (F) – Scan:

Bei den Maxima des F – Scans zeigten die jungen Tiere in beiden Gruppen (EE und DE) die größten Maxima, wobei die jungen DE Tiere im Durchschnitt höhere Maxima zeigten als die EE Tiere. Im Gegensatz dazu zeigten die mittelalten und überraschenderweise auch die alten Tiere in der EE Gruppe im Durchschnitt deutlich bessere F – Scan Maxima als die Tiere der DE Gruppe. In beiden Gruppen unterschieden sich die DPOAE-Maxima signifikant (1-Way ANOVA; EE Gruppe: $F(2,30)=115.4$; $p<0.0001$; DE Gruppe: $F(2,20)=28.45$; $p<0.0001$).

DPOAE Hörschwellen

Tendenziell waren die DPOAE Hörschwellen der jungen Tiere in der EE Gruppe vor allem in den niedrigen Frequenzen (1.8 – 2.4 kHz) im Vergleich zu den mittelalten und alten Tieren der EE Gruppe besser. Junge Tiere der DE Gruppe hatten allen Frequenzbereichen die besten Distorsionsprodukte. Im direkten Vergleich der jungen EE und DE Tiere zeigten sich bei den

DE Tieren in den meisten Frequenzen die besseren Distorsionsprodukte, wobei die größten Unterschiede zwischen 8 und 16 kHz bestanden. Bei den mittelalten und alten Tieren unterschieden sich die Distorsionsprodukte zwischen den EE und DE Gruppen nur gering. Die alten Tiere zeigten erwartungsgemäß in beiden Gruppen die schlechtesten Schwellen für Distorsionsprodukte. In den beiden Haltungsgruppen unterschieden sich die frequenzspezifischen DPOAE Hörmessungen nicht signifikant für die verschiedenen Altersgruppen. 2-Way ANOVA; EE Gruppe: $F(6,110)=1.272$; $p=0.2762$. DE Gruppe: $F(5,80)=1.198$; $p=0.3177$. Es konnte bei beiden Gruppen keine Interaktion zwischen Alter und Frequenz gefunden werden: 2-Way ANOVA; EE Gruppe: $F(12,110)=0.9742$; $p=0.47788$. DE Gruppe: $F(10,80)=1.081$; $p=0.3868$. Es wurden nur die Frequenzen zur statistischen Kalkulation herangezogen für die in allen drei Gruppen Schwellen gemessen werden konnten (2 bis 32 kHz).

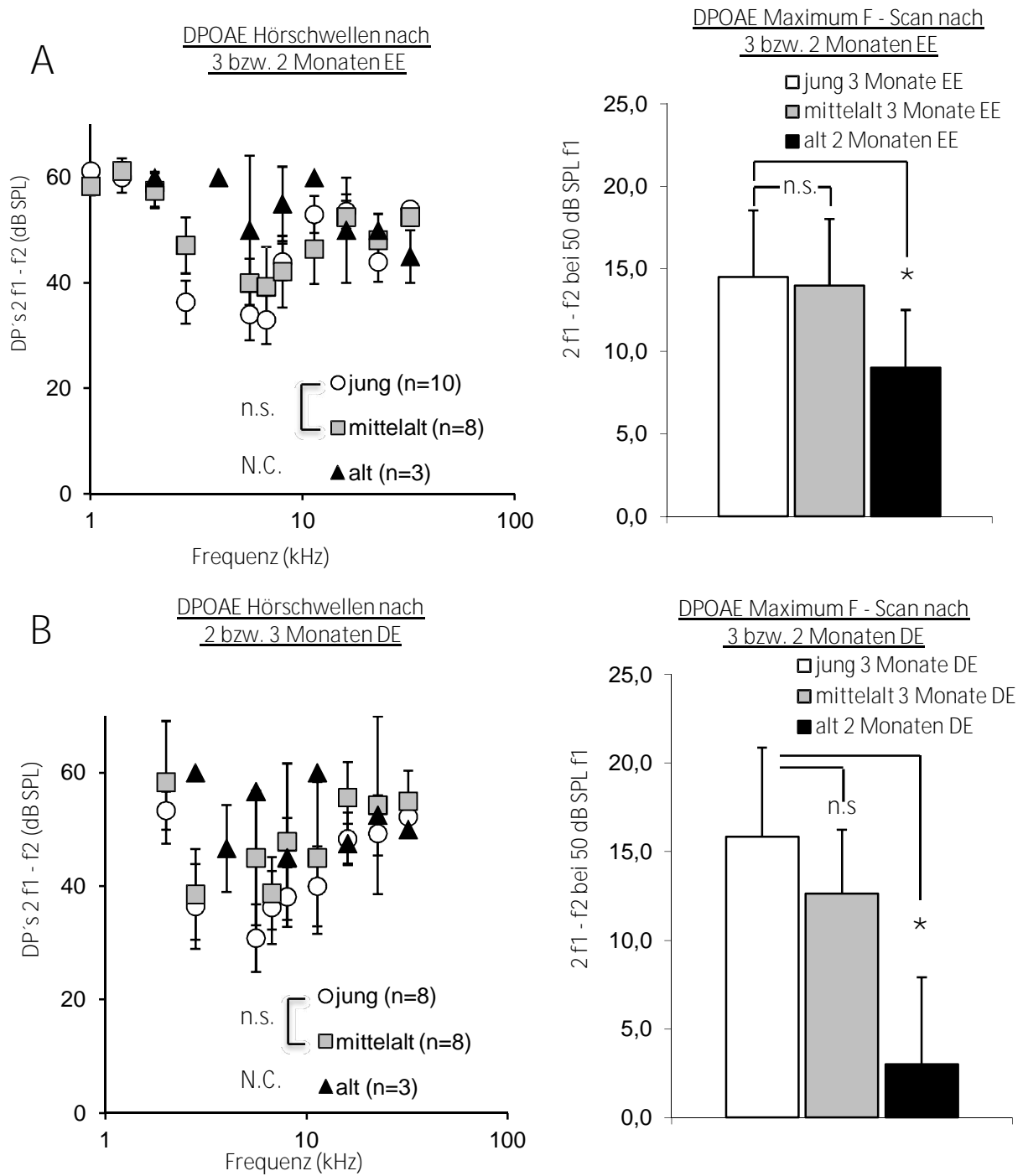


Abb. 19 und 20: DPOAE-Messungen: DPOAE-Hörschwellen und F-Scan Maxima der jungen, mittelalten und alten Tierenach 3 Monaten (alte Tiere 2 Monate) Haltungphase in EE (A) bzw. in DE (B). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler der DPOAE-Hörschwellen in dB SPL der gemessenen Frequenzen (in kHz) und die jeweiligen Mittelwerte der Maxima mit ihren Standardfehlern. Gemessen wurde jeweils ein Ohr. n gibt die Anzahl der Tiere in den Gruppen an. Für die frequenzspezifischen DPOAE-Hörschwellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (2-Way ANOVA, n.s.: nicht signifikant, $p > 0.05$) oder die Daten erfüllten nicht die Voraussetzung für statistische Überprüfung (N.C.: not certified). Die F-Scan Maxima unterschieden sich statistisch signifikant für die verschiedenen Altersgruppen (1-Way ANOVA, $p < 0.0001$, *: $p < 0.05$, Dunett's Post-Test., n.s.: nicht signifikant, Dunett's Post-Test).

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass sich bei den Messungen der DPOAE Maxima im Frequenz - Scan die größten Maxima bei den jungen Tieren in beiden Gruppen zeigten, mit den ausgeprägtesten Maxima bei den jungen DE Tieren. Die Messungen der DPOAE - Hörschwellen ließen keine eindeutige Interpretation zu, welche Gruppe der Tiere die besseren DPOAE besaß.

3.2. Akustisches Trauma

Nach der Haltungsphase in den unterschiedlichen Haltungsbedingungen wurden einige Tiere einem akustischen Trauma (160 dB, 4 – 16 kHz, 1 Stunde) ausgesetzt. Mit diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die in der angereicherten Umgebung gehaltenen Tiere im Vergleich zu den in der deprivierten Umgebung gehaltenen Tieren nach dem Trauma eine ausgeprägtere Hörschwellerholung zeigen würden. Da sich die Gruppe der alten Tiere zu diesem Zeitpunkt aufgrund des Todes einiger Tiere schon stark dezimiert hatte, wurden bei diesem Experiment nur die jungen und die mittelalten Tiere aus den EE- und DE-Gruppen berücksichtigt. Von jeder Gruppe wurden fünf Tiere für das akustische Trauma ausgewählt. Es wurden pro Tier zwei Hörmessungen gemacht: Direkt nach der Traumatisierung und nochmals nach einer Rekonvaleszenz-Zeit von sechs Tagen (Erholung). Zur Messung der Hörschwellen wurden Klick-ABRs sowie Frequenz-ABRs gemessen. Auch hier wurden zur Ermittlung der Hörschwellen die Differenzen aus den Mittelwerten der Hörmessungen nach der Haltungsphase und nach dem Trauma bzw. nach der Erholungsphase errechnet.

3.2.1. Klick-ABR

3.2.1.1. Nach akustischem Trauma

Vor dem akustischen Trauma bewegten sich die Hörschwellen unabhängig von ihren Haltungsbedingungen bei den jungen Tieren zwischen 7,6 und 14,3 dB SPL und bei den mittelalten Tieren zwischen 9,9 und 23,1 dB SPL. Dies galt auch für die Hörschwellen der Tiere unmittelbar nach Aufenthalt in Kontrollboxen ohne akustische Stimuli. Die jungen Tiere beider Haltungsgruppen (EE/DE) zeigten nach dem Trauma eine fast gleich stark ausgeprägte mittlere Hörschwellenabwanderung (-14,6 dB EE vs. -13 dB DE = Differenzialwert aus den Mittelwerten nach Behandlung und nach akustischem Trauma). Auch bei den mittelalten Tieren zeigte sich nur ein kleiner Unterschied in der Hörschwellenabweichung (-30,2 dB EE vs. -32,5 dB DE). Direkt nach Lärmexposition (post AT) gab es signifikante Effekte bei der Hörschwellenabwanderung für Klick-Stimuli (1-way ANOVA; $F(3,16)=4.294$; $P=0.0211$) aufgrund von Unterschieden in den zwei verschiedenen Altersklassen nur bei Tieren aus der Versuchsgruppe, die in reizarmer Umgebung gehalten wurde (jung-DE vs. mittelalt-DE, $p<0.05$, Sidak's multiple comparison test). Tiere der Versuchsgruppe, die unter angereichernten Bedingungen gehalten wurde, zeigten diesen Unterschied nicht (Sidak's multiple comparison test, n.s., nicht signifikant).

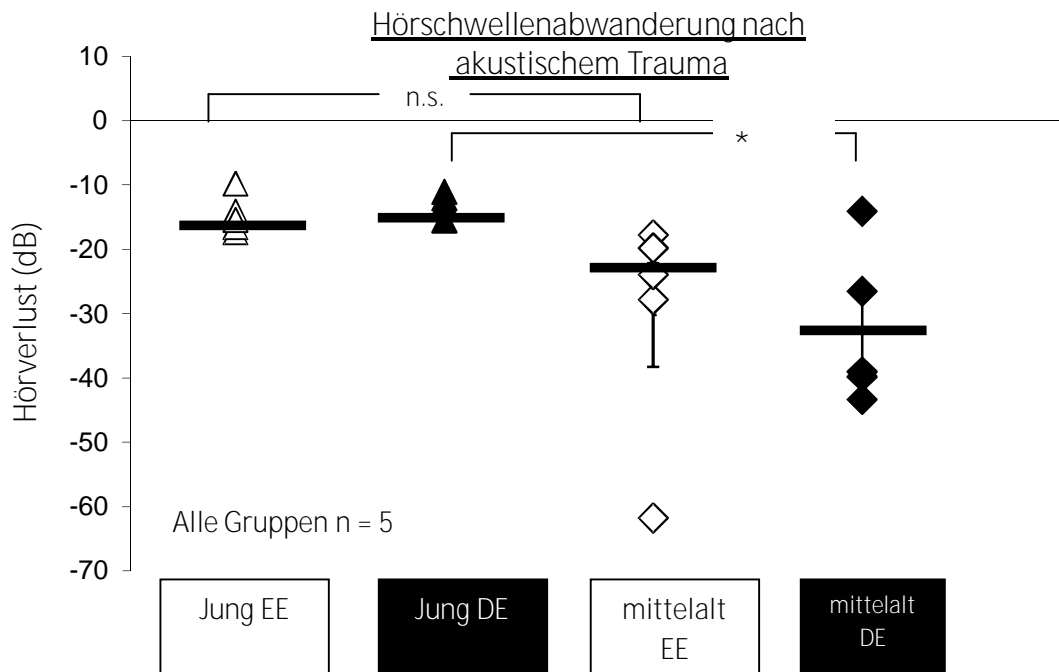


Abb. 21: Klick ABR Messungen: Hörschwellenabwanderung der Tiere nach akustischem Trauma: Dargestellt sind die Hörverluste in dB der Einzeltiere mit akustischem Trauma (120 dB, 4 – 16 kHz, 1 Stunde). Die Hörschwellen wurden aus den Differenzwerten der Mittelwerte der Klick-ABR Messungen pro Tier nach der Haltungsphase und direkt nach der Schallexposition ermittelt. Mittelwerte der Gruppen sind als horizontale Linien dargestellt. Die Nulllinie kennzeichnet die Grenze zwischen Hörschwellenverschlechterung und Hörschwellenverbesserung. Die vertikalen Linien sind die Standardfehler der Mittelwerte beider Ohren. n gibt die Anzahl der Tiere an. Die Hörschwellenabwanderung war signifikant verschieden zwischen jungen und mittelalten Versuchsgruppen in der DE Haltung (1-Way ANOVA, $p < 0.0211$, *: $p < 0.05$, Sidak's multiple comparison test. n.s.: Sidak's multiple comparison test nicht signifikant).

3.2.1.2. Nach 6 Tagen Erholung

Bei den jungen EE-Tieren zeigte sich eine stärker ausgeprägte Hörschwellenerholung als bei den jungen DE-Tieren. Das umgekehrte Bild konnte bei den mittelalten Tieren beobachtet werden, wo sich bei den DE-Tieren eine stärkere mittlere Hörschwellenerholung im Vergleich zu den EE Tieren zeigten. Nach einer Erholungszeit von 6 Tagen nach der Lärmexposition unterschied sich die Hörschwellenabwanderung für Klick-Stimuli signifikant

für die Versuchsgruppen (1-way ANOVA; $F(3,16)=4.927$; $p=0.0126$). Dieser Effekt war auf einen signifikanten Unterschied der Erholung der mittelalten Versuchsgruppen in verschiedenen Haltungsgruppen zurückzuführen (mittelalt EE v.s. mittelalt DE, $p<0.05$, Sidac's multiple comparison test).

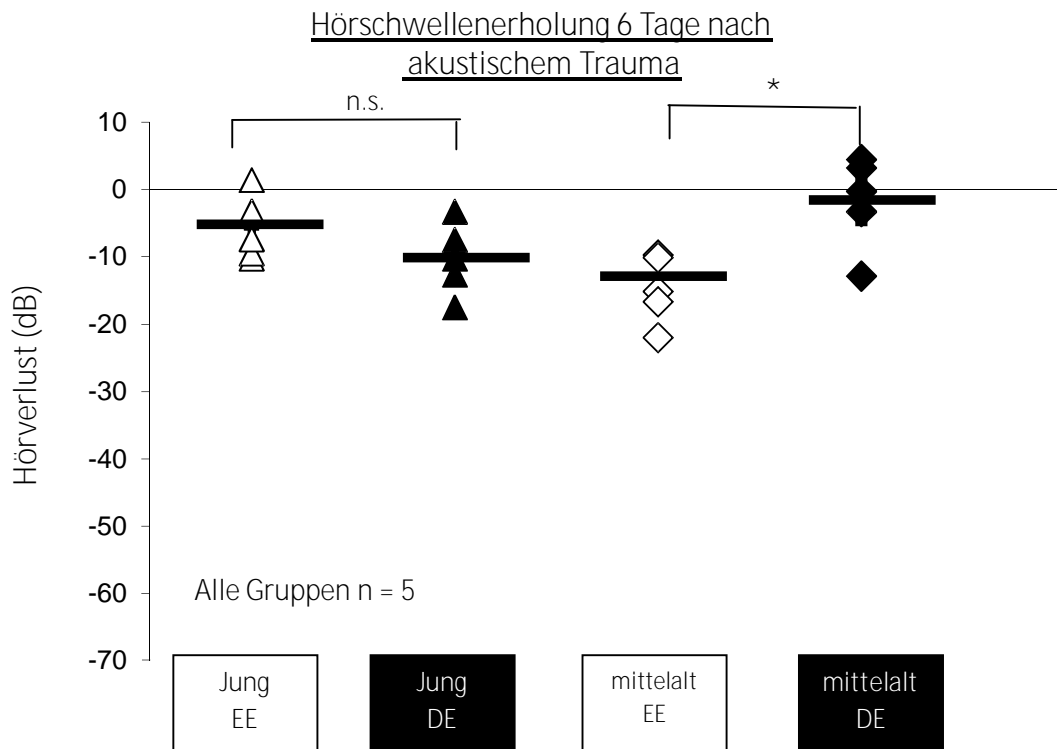


Abb. 22: Klick ABR Messungen: Hörschwellenabwanderung der Tiere 6 Tage nach der Schallexposition: Dargestellt sind die Hörverluste in dB der Einzeltiere nach der Erholungsphase. Die Hörschwellen wurden aus den Differenzwerten der Mittelwerte der Klick-ABR Messungen pro Tier nach der Haltungsphase und 6 Tage nach dem Trauma ermittelt. Mittelwerte der Gruppen sind als horizontale Linien dargestellt. Die Nulllinie kennzeichnet die Grenze zwischen Hörschwellenverschlechterung und Hörschwellenverbesserung. Die horizontalen Balken sind die Mittelwerte beider Ohren. n gibt die Anzahl der Tiere an. Die Hörschwellenerholung mittelalter Tiere unterschied sich signifikant für die verschiedenen Haltungsbedingungen (1-Way ANOVA, $p<0.0211$, *: $p<0.05$, Sidac's multiple comparison test, n.s.: Sidac's multiple comparison test nicht signifikant).

Zusammenfassend zeigte sich bei den Klick-ABR-Messungen nach dem Trauma weder bei den jungen noch bei den mittelalten Tieren beider Behandlungsgruppen große

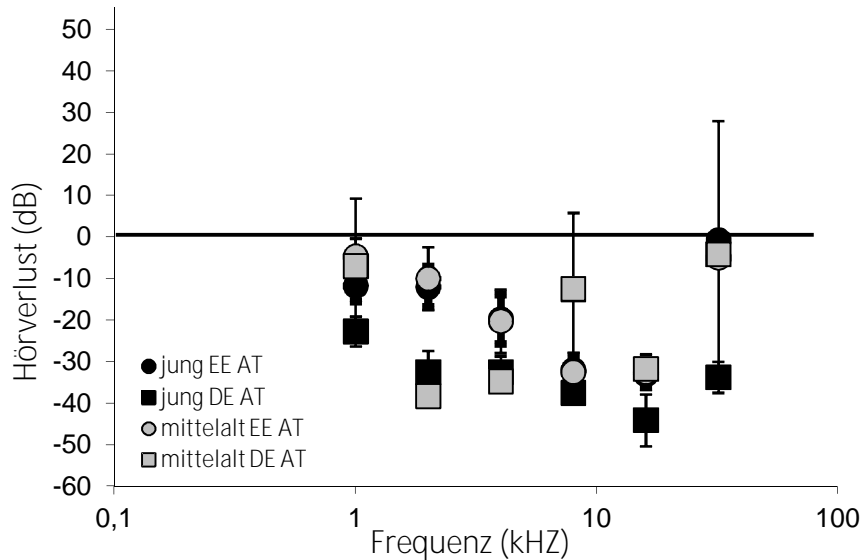
Unterschiede. Nach dem Trauma konnte vor allem bei den jungen EE-Tieren und überraschenderweise auch bei den jungen DE-Tieren eine gute Erholung der Hörschwelle beobachtet werden.

3.2.2. Frequenz ABR

3.2.2.1. Nach akustischem Trauma

Bei den jungen Tieren zeigten beide Gruppen (EE/DE) nach dem Trauma einen Hörverlust, wobei die in der deprivierten Umgebung gehaltenen Tiere eine stärkere mittlere Hörschwellenabwanderung zeigten als die EE Tiere. Auch bei den mittelalten Tieren ließ sich ein Hörverlust beobachten. Die DE Tiere zeigten in den tieferen Frequenzen (2 bis 4 kHz) einen stärkeren Hörverlust, während die EE Tiere in den hohen Frequenzen den stärkeren Hörverlust zeigten. Zwischen 16 und 32 kHz glichen sich die Hörkurven der beiden Gruppen wieder an. Die Hörschwellenabwanderung für frequenzspezifische Stimulationsreize direkt nach Lärmexposition war signifikant verschieden für die verschiedenen Behandlungsgruppen (2-way ANOVA; $F(3,83)=4.395$; $p=0.0064$), wobei die Hörschwellenabwanderung aufgrund des frequenzspezifischen Lärmstimulus frequenzspezifisch war (2-Way ANOVA, Faktor Frequenz; $F(5,83)=4.822$; $p=0.0006$). Es konnte keine signifikante Interaktion zwischen Haltungsbedingung bzw. Altersklasse und Stimulationsfrequenz nachgewiesen werden (2-Way ANOVA; $p=0.5099$).

Mittlere Hörschwellenentwicklung
nach AT junge Tiere EE/DE



Alle Gruppen n = 5

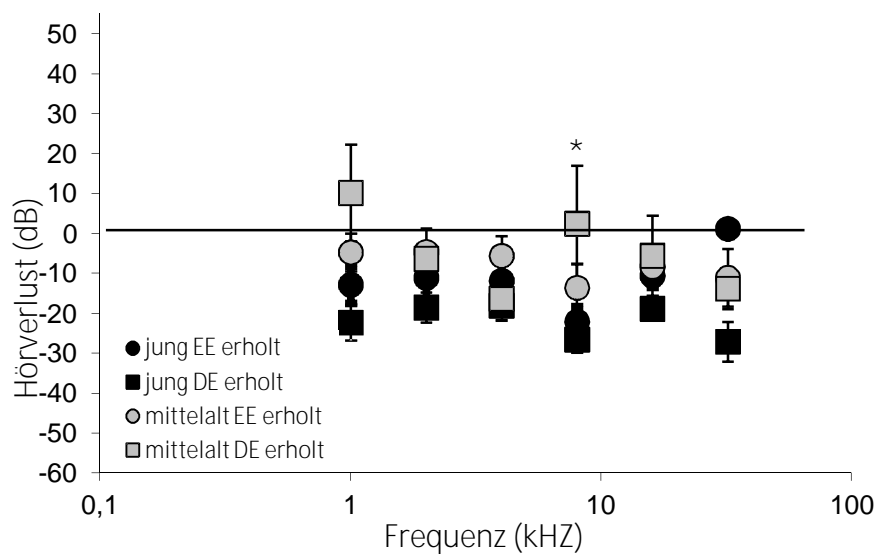
Abb.23 : Darstellung des mittleren Hörverlusts nach der Schallexposition: Der Hörverlust wurde aus den Differenzwerten der Mittelwerte der Frequenz-ABR-Messwerte nach der Haltungsphase und den Frequenz ABR Messwerten nach der Schallexposition ermittelt. Die Hörverluste in dB der EE Tiere sind im Vergleich zu denen der DE Tiere mit den entsprechenden Standardfehlern abgebildet. Die Nulllinie kennzeichnet die Grenze zwischen Hörschwellenverschlechterung und Hörschwellenverbesserung. n gibt die Anzahl der Tiere in den Gruppen an. Nach der Haltungsphase wurden beide Ohren, nach dem Trauma wurde jeweils ein Ohr gemessen. Die Hörschwellenentwicklung war für die verschiedenen Versuchsgruppen signifikant verschieden, allerdings erlaubten die Post-Test multiplen Paarvergleiche aufgrund der notwendigen strengen Anpassung des Signifikanzniveaus keine statistische Aussage über den Ursprung der Signifikanz (2-Way ANOVA, Faktor Gruppe: $p=0.0064$, Faktor Frequenz: $p=0.0006$).

3.2.2.2. Nach 6 Tagen Erholung

Die jungen Tiere zeigten in beiden Gruppen eine Erholung des Hörverlusts, wobei die Tiere der EE Gruppe nach der Erholungsphase eine etwas bessere Hörschwelle aufwiesen als die DE Tiere. Auch bei den mittelalten Tieren stellte sich eine Erholung vom Hörverlusts ein, wobei sich hier die Hörkurven in verschiedenen Frequenzbereichen stark überschneiden. Interessanterweise hatten die mittelalten Tiere der EE- und der DE-Gruppe nach der Erholungsphase ein etwas besseres Hörvermögen als die jungen EE und DE Tiere nach der Erholung. Nach der Erholungsdauer von 6 Tagen waren die Hörschwellenabwanderung zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen signifikant verschieden (2-way ANOVA; $F(3,91)=7.203$; $p=0.0002$), wobei sich die Hörschwellenverluste der Versuchstiere

verschiedenen Altersklassen aus der reizarmen Haltung für 8 kHz Stimulationsfrequenz signifikant unterschieden ($p < 0.05$, Holm-Sidak's multiple comparison test). Für die Versuchsgruppen aus den angereicherten Haltungsbedingungen konnte kein signifikanter Unterschied in der Hörschwellenabwanderung 6 Tage nach Lärmexposition festgestellt werden.

Mittlere Hörschwellenentwicklung
6 Tage nach AT, junge Tiere EE/DE



Alle Gruppen n = 5

Abb. 24: Darstellung des mittleren Hörverlusts 6 Tage nach der akustischen Schallexposition: Der Hörverlust wurde aus den Differenzwerten der Mittelwerte der Frequenz-ABR-Messwerte nach der Haltungsphase und den Frequenz-ABR-Messwerten 6 Tage nach dem Schallexposition ermittelt. Die Hörverluste in dB der EE Tiere sind im Vergleich zu denen der DE Tiere mit den entsprechenden Standardfehlern abgebildet. Die Nulllinie kennzeichnet die Grenze zwischen Hörschwellenverschlechterung und Hörschwellenverbesserung. n gibt die Anzahl der Tiere in den Gruppen an. Nach der Haltungs- sowie nach der Erholungsphase wurden beide Ohren gemessen. Die Erholung der Hörschwelle war 6 Tag nach Lärmexposition für die Tiere aus DE-Haltungsbedingungen bei 8 kHz signifikant verschieden (2-Way ANOVA, $p = 0.0002$, *: $p < 0.05$, Sidak's multiple comparison test: jung DE vs. mittelalt DE).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich bei allen Tieren ein ausgeprägter Hörverlust zeigte, der vor allen bei den jungen DE-Tieren im Vergleich zu den jungen EE-Tieren ausgeprägt war. Nach der Erholungsphase waren es die jungen EE-Tiere, die sich in der Altersgruppe der jungen Tiere besser vom Trauma erholten. Bei den mittelalten Tieren ist die Interpretation, welche Gruppe das beste Ansprechen auf das Trauma bzw. die bessere Erholung zeigte, aufgrund der Überschneidung der Kurven in verschiedenen Frequenzbereichen nicht eindeutig möglich.

3.3. Blutplasma Werte von Östradiol und Cortisol

Zur Messung der Blutplasmawerte von Östradiol und Cortisol wurden einigen Tieren nach der Haltephase und einigen Tieren nach dem akustischen Trauma Blutproben entnommen, welche dann in einem veterinärmedizinischen Labor ausgewertet wurden. Zur Auswertung wurden die Werte pro Tier addiert und gemittelt.

3.3.1. Cortisol Blutplasma Werte

Die höchsten mittleren Cortisolwerte fanden sich bei den jungen DE-Tieren. Die Cortisolkonzentration nahm mit zunehmendem Alter innerhalb der Gruppen (DE/EE) ab. Bezüglich einer Korrelation der Cortisolwerte mit dem Hörvermögen der Tiere konnten keine Anhaltspunkte gefunden werden.

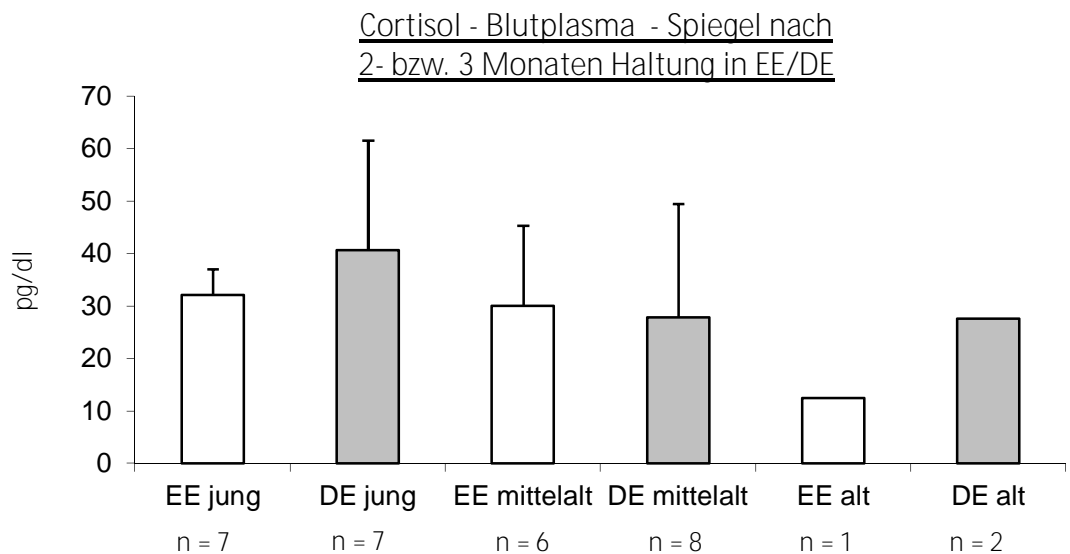


Abb. 25: Cortisol Blutplasma Spiegel: Dargestellt sind die Mittelwerte der Cortisol-Blutplasma-Spiegel der Tiere (in pg/dl) aus den verschiedenen Alters- (jung, mittelalt, alt) und Haltungsgruppen (DE/EE) nach der Haltungphase (jung und mittelalt = 3 Monate/ alt = 2 Monate) mit ihren Standardfehlern. n gibt die Anzahl der Tiere an.

3.3.2. Östradiol Blutplasma Werte

Bei den Östradiolwerten faden sich die höchsten Werte bei den mittelalten DE-Tieren. Bei den im EE gehaltenen Tieren nahm die mittlere Östradiolkonzentration mit dem Alter der Tiere geringfügig ab. Die DE-Tiere zeigten diese Tendenz nicht. Auch bei den Östradiolwerten konnten keine Anhaltspunkte für eine Korrelation mit dem Hörvermögen gefunden werden.

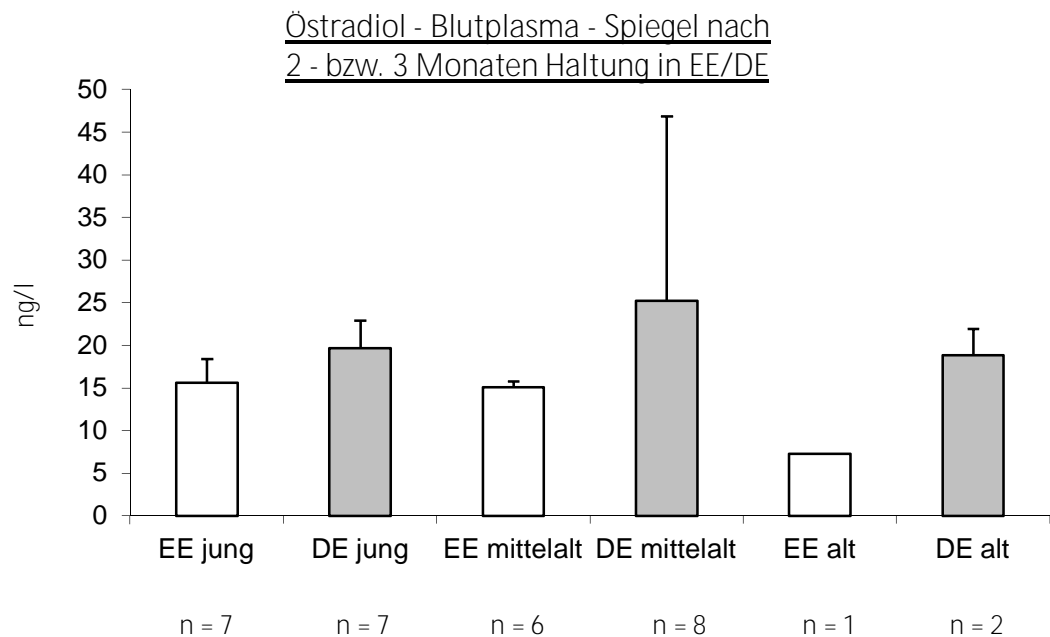


Abb. 26: Östradiol Blutplasma Spiegel: Dargestellt sind die Mittelwerte der Cortisol-Blutplasma-Spiegel der Tiere (in pg/dl) aus den verschiedenen Alters- (jung, mittelalt, alt) und Haltungsgruppen (DE/EE) nach der Haltungsphase (jung und mittelalt = 3 Monate/ alt = 2 Monate) mit ihren Standardfehlern. n gibt die Anzahl der Tiere an.

3.4. Verhaltenstests

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Haltung der Tiere in einem Environmental Enrichment bzw. in einer deprivierten Umgebung auf das Verhalten der Tiere hat, wurden nach der drei monatigen Haltungsphase verschiedene Verhaltenstests durchgeführt. Alle Verhaltensteste wurden nach der Haltungsphase und nach den letzten Hörmessungen durchgeführt. Da einige Gerbils während der Verhaltensteste wiederholt epileptische Anfälle bekamen, wurden die Tiere, welche beim zweiten Testversuch erneut einen Anfall zeigten, aus der Auswertung genommen. Während beim Open Field und beim Labyrinth - Test noch alte Tiere mit getestet werden konnten, konnte beim X - Maze Test durch den Tod des letzten alten Tieres aus der deprivierten Haltung keine alten Tiere mehr getestet werden.

3.4.1. Labyrinth Test

Der Labyrinth Test wurde durchgeführt um Informationen über den Einfluss der verschiedenen Haltungsbedingungen auf die Lernfähigkeit der Tiere zu bekommen. Die Tiere wurden an einem Punkt im Labyrinth ausgesetzt und die benötigte Zeit bis zum Ziel wurde gemessen. In den ersten Testläufen lagen die Durchschnittszeiten der Tiere aus den verschiedenen Alters- und Haltungsgruppen stark auseinander, wobei vor allem die jungen in einem Environmental Enrichment gehaltenen Tiere und die alten in der deprivierten Umgebung gehaltenen Tiere am schnellsten das Ziel fanden. Von den alten Tieren konnten aufgrund der hohen Sterblichkeit in dieser Gruppe allerdings nur zwei Tiere gemessen werden. Die Tiere der anderen Gruppen, sowie die mittelalten in einem Environmental Enrichment gehaltenen Tiere, benötigten zu Beginn des Experiments mehr Zeit um das Ziel zu finden. In den weiteren Testläufen stellte sich in allen Gruppen eine Lernkurve ein und die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden geringer. In den letzten drei Testläufen (Test C1, C2 und C3) waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen nur noch geringfügig vorhanden.

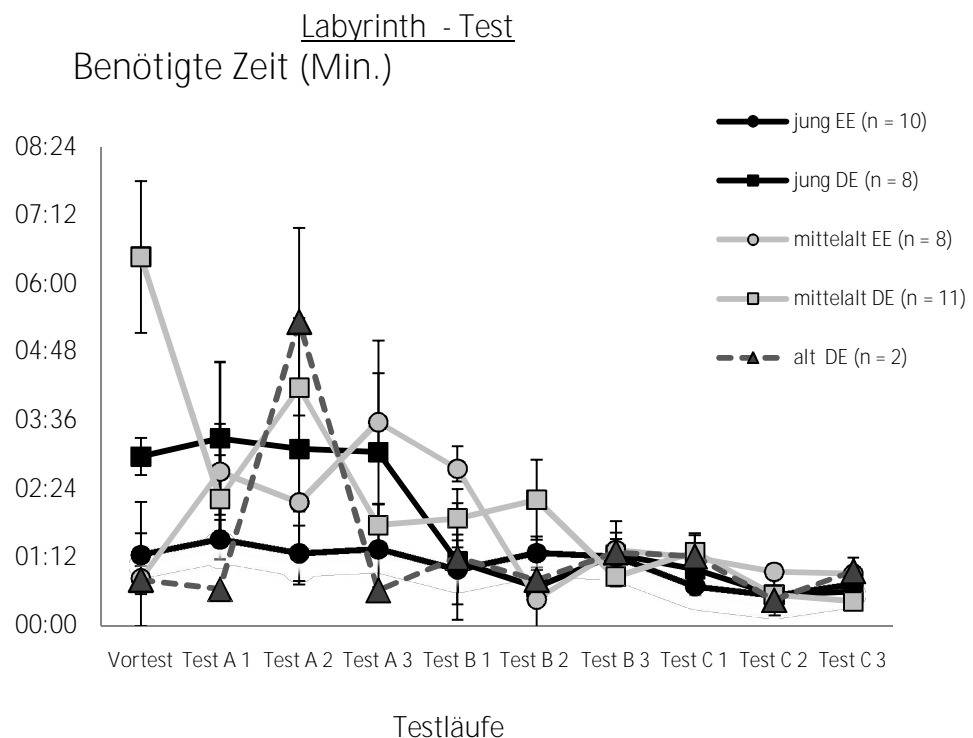


Abb. 27: Labyrinth - Test: Dargestellt sind die Durchschnittszeit mit ihren Standardfehlern, die die Tiere der verschiedenen Alters- und Haltungsgruppen benötigten, um von einem Punkt im Labyrinth zum Ausgang zu finden. Der Vortest beschreibt einen einfachen Testverlauf zur Gewöhnung der Tiere an das Labyrinth. Die Teste A, B und C beschreiben drei verschiedene Startstellen des jeweiligen Tieres im Labyrinth, wobei von jeder Startstelle jeweils drei Testläufe gemessen wurden (1,2 und 3). n gibt die Anzahl der Tiere je Gruppe an.

Es lässt sich zusammenfassen, dass sich bei allen Tieren unabhängig vom Alter und dem Haltungsbedingungen mit zunehmenden Testverläufen ein Lernprozess einstellte wodurch die Tiere in immer kürzerer Zeit das Ziel fanden. Es konnte beobachtet werden, dass die jungen Tiere aus dem Environmental Enrichment schon zu Beginn der Testreihe schnell ihr Ziel fanden und dass die mittelalten „Deprivierten“ – Tiere eine etwas schnellere Lernkurve aufwiesen als die mittelalten EE und DE Tiere. Die alten Tiere benötigten zum Teil noch

weniger Zeit als die jungen EE Tiere um das Ziel zu finden, wobei aber nur zwei Tiere dieser Altersgruppe im Versuch getestet wurden.

3.4.2. X Maze Test

Beim X – Maze Test wurden verschiedene Parameter erfasst um Aufschlüsse über spezielle Verhaltensweisen wie Angst und Explorationsverhalten zu erlangen und um herauszufinden ob sich diese Parameter unter dem Einfluss der verschiedenen Haltungsbedingungen in den verschiedenen Gruppen unterscheiden.

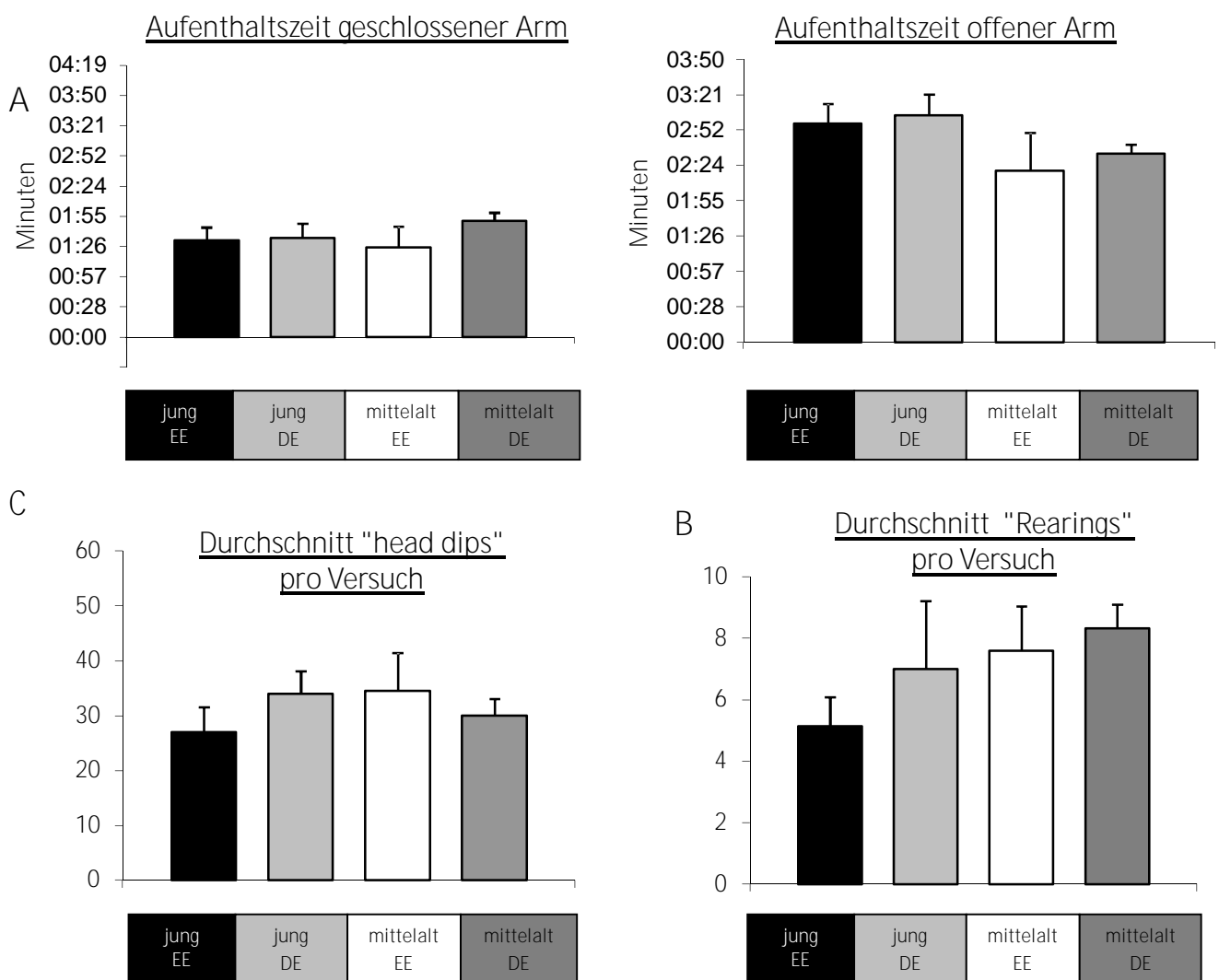
Aufenthaltszeit im geschlossenen Arm: Die kürzeste Aufenthaltszeit im geschlossenen Arm konnte bei den mittelalten Tieren der EE Gruppe gemessen werden. Die jungen Tiere der EE und DE Gruppe hielten sich im Durchschnitt gleich lange im geschlossenen Arm auf. Die längste Aufenthaltszeit in diesem Teil des X Maze wurde bei den mittelalten Tieren der DE Gruppe gemessen.

Aufenthaltszeit im offenen Arm: Die jungen Tiere hielten sich im Vergleich zu den mittelalten Tieren erwartungsgemäß am längsten im offenen Arm dieses Labyrinths auf, wobei die DE Tiere dieser Altersgruppe die längste Aufenthaltszeit im offenen Arm zeigten. Auch bei den mittelalten Tieren war die durchschnittliche Aufenthaltszeit im offenen Arm bei den DE Tieren länger als bei den mittelalten Tieren aus den angereicherten Haltungsbedingungen.

Head dips: Die Anzahl der durchschnittlichen „head dips“ pro Versuch war bei der Gruppe der jungen im Environmental Enrichment gehaltenen Tiere am geringsten. Die häufigsten „head dips“ zeigten mittelalten EE und die jungen DE Tiere mit der fast durchschnittlich fast gleichen Anzahl dieses Verhaltens.

Rearings: Die häufigste Anzahl der durchschnittlichen „rearings“ pro Versuch zeigen die mittelalten in der deprivierten Umgebung gehaltenen Tiere. Die geringste Anzahl der „rearings“ war bei den jungen, im Environmental Enrichment gehaltenen Tieren zu beobachten.

X – MAZE – Test



jung EE n = 8 mittelalt EE n = 6

jung DE n = 6 mittelalt DE n = 9

Abb. 28, 29, 30 und 31: X – Maze – Test: Dargestellt sind die im Versuch gemessenen Durchschnittswerte der Parameter der verschiedenen Gruppen mit ihren Standardfehlern. A.: Aufenthaltszeit im geschlossenen Arm in Minuten. B.: Aufenthaltszeit im offenen Arm in Minuten. C.: Anzahl der „Head Dips“ pro Versuch. D.: Anzahl der „Rearings“ pro Versuch. n gibt die Anzahl der Tiere pro Gruppe an.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die einzige Gruppe, die mit ihren Ergebnissen herausstach die Gruppe der Environmental Enrichment Tiere bei den Aufenthaltszeiten im offenen Arm war. Hier zeigen beide EE Gruppen, die jungen sowie die mittelalten Tiere eine längere Aufenthaltszeit als die Tiere der DE Gruppe. Bei der Aufenthaltszeit im offenen Arm und bei den Head Dips lässt sich keine Dominanz einer Gruppe ausmachen. Lediglich bei den Rearings zeigen die Deprivierten Tiere die höhere Anzahl als die Tiere der Enrichment - Gruppe.

3.4.3. Open Field Test

Ebenso wie beim X Maze - Versuch wurden beim Open Field Test verschiedene Parameter gemessen um Aufschlüsse auf Verhaltensweisen wie Angst und Explorationsverhalten zu erlangen. Von besonderem Interesse waren bei diesem Versuch die Länge des Aufenthalts in den verschiedenen Zonen des in Zonen aufgeteilten Open Field Areal.

Es zeigte sich, dass die Tiere der Environmental Enrichment Gruppe (mit Ausnahme der alten Tiere) im Vergleich zu den deprivierten Tieren der jeweiligen Altersgruppe geringfügig länger in der inneren und mittleren Zone aufhielten. die Aufenthaltslänge in den Ecken war bei den EE Tieren größer während sich die DE Tiere jeweils länger in den Ecken aufhielten als die EE Tiere ihrer Altersgruppe.

Bei den „Rearings“ zeigten bei den jungen Tieren die der Enrichment Gruppe die größte durchschnittliche Anzahl wohingegen bei den mittelalten Tieren die DE Gruppe die meisten

durchschnittlichen „Rearings“ zeigte. Bei den zwei gemessenen alten Tieren zeigte das alte Tier aus der deprivierten Umgebung die meisten Rearings.

Bei der durchschnittlichen Anzahl der „Groomings“ zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier zeigten die jungen EE Tiere und die mittalten DE Tieren die größte Anzahl dieser Verhaltensweise. Nur bei den zwei alten Tieren zeigte nun hier das alte Tier aus der angereicherten Umgebung die meisten „Groomings“.

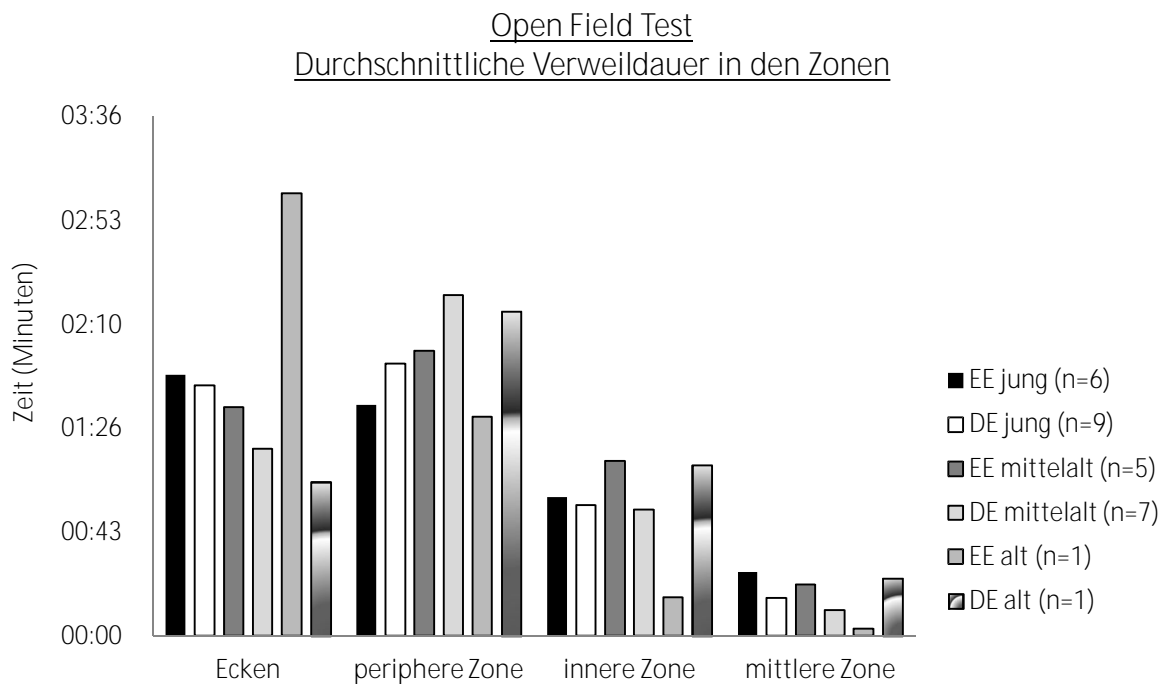
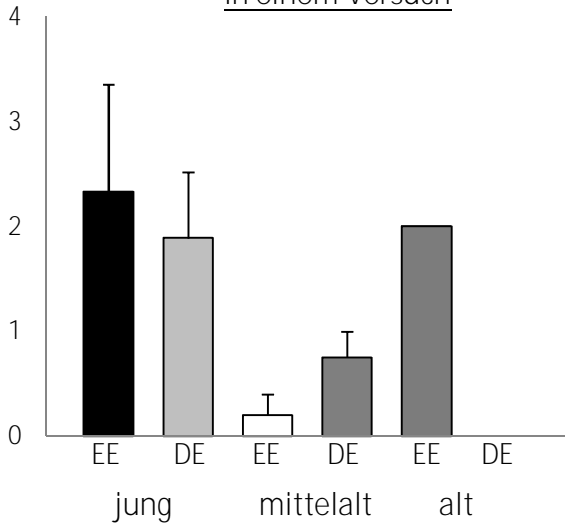


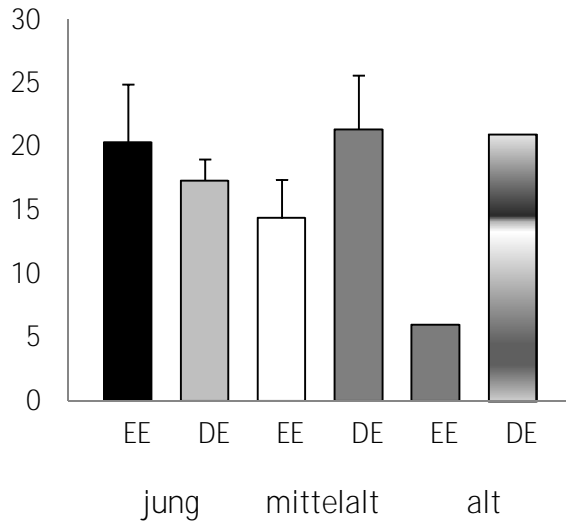
Abb. 32: Open Field Test: Dargestellt sind ist durchschnittliche Verweildauer der Tiere in der verschiedenen Gruppen in den Zonen des Open - Fields. n gibt die Anzahl der Tiere an.

A Anzahl durchschnittliche "Groomings"
in einem Versuch



jung EE: n = 6 mittelalt EE: n = 5 alt: EE n = 1

B Anzahl durchschnittliche "Rearings"
in einem Versuch



jung DE: n = 9 mittelalt DE: n = 7 alt DE: n = 1

Abb. 33 und 34: Open Field Test: Dargestellt sind die Anzahl der durchschnittlichen „Rearings“ (A) und „Groomings“ (B) pro Versuch und Gruppe mit Standardfehlern. n gibt die Anzahl der Tiere an.

4. Diskussion

Presbyakusis ist eines der vier häufigsten chronischen Gesundheitsprobleme alter Menschen (US Department of Health and Human Services und Bureau of the Census, US Department of Commerce, Economics and Statistics Administration) und ein großes sozio – ökonomisches Problem vor allem in den Industrienationen. Trotz vieler Bemühungen konnte noch immer nicht herausgefunden werden, wie sich das Fortschreiten der Presbyakusis therapeutisch minimieren oder sogar aufhalten lässt.

In dieser Studie sollte nun ein bestimmtes Paradigma verfolgt werden das sich auf Studienergebnisse stützt, die besagen, dass ebenfalls Gerbils und auch Ratten im Alter eine Presbyakusis erwerben und diese Presbyakusis mit niedrigen Spiegeln der Neurotrophine BDNF und Arc und anderen Neurotrophinen assoziiert ist (Johnson et al. 1996; Rüttiger et al. 2006). Des weiteren konnte in zahlreichen Studien herausgefunden werden, dass eine Haltung in angereicherten Umgebungsbedingungen ("Environmental Enrichment") die Expression von Neurotrophinen wie BDNF positiv verändern kann (van Praag et al. 1999, Landi et al. 2007, Gelfo und Agelucci et al. 2011).

Die Hypothese, dass die Transkription des BDNF – Gens aktivitätsabhängig ist, wurde erstmals durch die Untersuchungen unterstützt, die eine stark erhöhte BDNF – mRNA Expression im Hippokampus von Tieren feststellen konnten, welche zuvor einem experimentellen, induzierten epileptischen Anfall ausgesetzt waren (Zafra et al. 1990, Ernforde et al. 1991, Isackson et al. 1991, Dugich-Djordjevic et al. 1992). Später konnte gezeigt werden, dass BDNF - mRNA - Spiegel nach Induktion einer Langzeit – Potenzierung durch tetanische Stimulation deutlich ansteigen und dass diese Stimulation keinen oder nur

kaum einen Effekt auf andere Neurotropine hatte (Patterson et al. 1992; Castren et al. 1993; Draguow et al. 1993; Kesslack et al. 1998; Morimoto et al. 1998). Weitere Unterstützung findet die „Aktivitäts – Hypothese“ in der Tatsache, dass auch ein Enriched Environment die Gen – Expression von BDNF erhöht (Young et al. 1999; Ickes et al. 2000; Zhao et al. 2001).

Gemäß dieser Idee sollte in dieser Studie mittels Hörmessungen und unter Verwendung eines akustischen Traumas untersucht werden, ob die Haltung von Gerbils in einem Environmental Enrichment im Vergleich zu einer deprivierten Haltung einen positiven Einfluss auf das Hörvermögen der in den unterschiedlichen Bedingungen gehaltenen Tiere hat. Zusätzlich wurden an diesen Tieren verschiedenen Verhaltenstests durchgeführt um den Einfluss der unterschiedlichen Haltungsbedingungen zu evaluieren. Weiterhin wurden den Tieren zu Ende des Experiments Blut entnommen um Blutplasmaspiegel von Corticosteron und Östradiol zu untersuchen und diese mit dem Hörvermögen der Versuchstiere zu korrelieren.

Im Folgenden sollen nun die Verschiedenen Experimente und die Ergebnisse dieser Studie abschnittsweise diskutiert werden:

4.1. Environmental Enrichment

In einer typischen angereicherten Tierhaltung sollten die Tiere in einem Umfeld leben, das aus der Sicht des Experimentators ein Tierparadies sein muss. Im Gegensatz zur normalen Käfighaltung, in welcher der Käfig nur Einstreu und Futter beinhaltet, ist der Käfig in der angereicherten Umgebung mit Tunneln, Röhren, Spielsachen und Material zum Nestbau angefüllt. Leider gibt es in den zahlreichen Veröffentlichungen mit dem Thema

„Environmental Enrichment“ keinen klaren Konsens, wie ein Environmental Enrichment in Bezug auf Dauer, Beginn und Ausstattung am besten verwirklicht werden kann, was eine Vergleichbarkeit der Studien untereinander und ein Evidenz-basiertes Vorgehen erschwert.

So werden in einigen Studien große Käfige mit verschiedenen Ebenen verwendet (wie zum Beispiel in der Studie von Engineer et al. 2004), welche die Einrichtung von komplexen, dreidimensionalen Ausstattungen erlauben, während wiederum andere Studien zweidimensionale Käfige bevorzugen, welche dann mit Tunneln, Nestmaterial und anderen, die Aktivität der Tiere stimulierenden Materialien, angereichert werden (wie auch in dieser Studie).

Zwei Faktoren, die in verschiedenen Environmental Enrichment Studien immer wieder variieren, sind zum einen die Dauer des Enrichments mit einer Dauer von einigen Wochen (Tang, Wang et al, 2001 und Bruel und Jungerman et al. 2005) bis hin zu einem Jahr (Pham TM et al. 1999) und das Alter, ab dem das Environmental Enrichment begonnen wird, welches ab der Geburt (Kohl et al. 2002) und im höheren Alter (Diamond 1988, Frick et al. 2003) geschehen kann. Dass ein Environmental Enrichment besonders in jungem aber auch in hohem Alter kortikale Veränderungen bei Nagetieren induzieren kann und das das Gehirn auch in hohem Alter seine strukturelle Plastizität bewahrt, konnten einige Studien belegen (James et al 1980; Warren et al. 1982, Diamond et. al. 1985).

Dass man Mäuse eine bestimmte Zeit einem Environmental Enrichment aussetzen muss, um einen Effekt durch diese Haltungsbedingungen zu erzielen, konnte die Arbeitsgruppe um Amaral et al (2007) zeigen. Um die Effekte eines Environmental Enrichment darzustellen, wurde untersucht, inwieweit die Tiere im einem Open Field Versuch eine schnellere Gewöhnung an diese Umgebung, also eine Verminderung der Bewegungen zeigten. So

konnte beobachtet werden, dass ein kurzes Environmental Enrichment von zwei Wochen Dauer diesbezüglich keine Effekte zeigte, während die Haltung in einer angereicherten Umgebung für mindestens vier Wochen einen signifikanten Effekt im Open Field Test zeigte. Diese Ergebnisse waren unabhängig davon, ob die Tiere direkt nach dem Absetzen vom Muttertier oder erst im höheren Alter dem Enrichment ausgesetzt wurden. Ebenso konnten Amaral et al. 2007 zeigen, dass der Effekt eines Environmental Enrichment nach Abbruch dieser besonderen Haltungsbedingungen länger anhielt, je länger die Tiere im zuvor im Environmental Enrichment gehalten wurden.

Dem entgegen stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Engineer, die anhand einer akustischen Anreicherung der Haltungsbedingungen zeigen konnte, dass sich schon innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne rapide kortikale Veränderungen einstellten. Kortikale Veränderungen im Sinne einer verstärkten Antwort von auditorischen Neuronen, die man der akustischen Anreicherung zusprechen konnte, konnten schon nach einer Zeitspanne von unter zwei Wochen beobachtet werden. Interessant ist auch, dass diese Effekte wieder verloren gingen, nachdem man die Tiere eine Woche wieder in einer außerhalb der angereicherten Umgebung gehalten hatte (Engineer et al. 2004).

Gemäß dieser Studien wurde die Haltungsdauer der Tiere im Environmental Enrichment auf drei Monate festgelegt und die Käfige wurden, wie schon im Methodenteil beschrieben, aufwendig ausgestattet um den Tieren eine möglichst attraktive Umgebung anzubieten.

Nach der drei monatigen Haltung im Environmental Enrichment sowie in der deprivierten Umgebung konnten vorerst keine Veränderungen der Hörfähigkeit gemessen werden, die die Arbeitshypothese bestätigten. Die jungen Tiere der Environmental Enrichment Gruppe hatten vereinzelt zwar eine bessere Hörfähigkeit als die jungen, im Deprived Environment

gehaltenen Tiere, im Durchschnitt deutete aber nichts auf einen eindeutigen positiven Effekt des Environmental Enrichments auf das Hörvermögen hin. Nach dem akustischem Trauma, welches im folgenden noch diskutiert werden wird, zeigten die Daten, dass sich auch bei den Vergleichen der Hörschwellen direkt nach dem akustischen Trauma und nach der Erholungsphase von 6 Tagen keine eindeutigen Effekte eines Environmental Enrichment zeigten. Warum sich trotz des aufwändig gestalteten Environmental Enrichment kein positiver Effekt auf die Hörfähigkeit ergab, könnte es mehrere Gründe gegeben haben:

Eine Ursache für das Nichtansprechen der meisten Tiere auf das Environmental Enrichment könnte sein, dass die meisten Gegenstände, welche die Aktivität der Tiere anregen sollten, auf einen Schlag und nicht nach und nach in die Käfige integriert wurden. Die Arbeitsgruppe um Diamond et al. (1988) welche die ersten großen Environmental Enrichment Studien durchführte, konnte zeigen, dass sich Tiere mit der Zeit an die „angereicherte“ Umgebung gewöhnen und dass sich dann kein Effekt des Environmental Enrichment mehr einstellt. Zwar wurde in dieser Studie darauf geachtet, dass sich die Tiere der angereicherten Umgebung durch häufigeres Wiegen der Tiere und Reinigen der Käfige und regelmäßige Erneuerung bestimmter Spielzeuge nicht zu sehr an den aktuellen Zustand gewöhnten. Ob dies aber ausreichend genug war, lässt sich in Anbetracht der Ergebnisse nicht bestätigen. Ob man mit einem anderer Studiendesign, in dem die Tiere von Geburt an in den beiden Umgebungsbedingungen, Environmental Enrichment und Deprived Environment gehalten werden, um dann in verschiedenen Altersstufen Messung zu machen, konsistentere Ergebnisse erzielen kann, bleibt eine offene Frage.

Neben den Schwierigkeiten, eine suffiziente angereicherte Umgebung zu schaffen, hat die Studie auch gezeigt, dass es schwierig ist, Environmental Enrichment – Studien wie mit dem hier verwendeten Studiendesign bei alten Gerbils durchzuführen. Die Environmental Enrichment – Gruppe mit den alten Tieren verzeichnete eine hohe Sterblichkeit und die meisten Tiere dieser Gruppe verstarben plötzlich und ohne vorherige Zeichen einer Erkrankung. Grund hierfür könnte eine verminderte Anpassungsfähigkeit der alten Tiere an die neuen und ungewohnten Haltungsbedingungen des Environmental Enrichments sein, während die deprivierte Haltung keine so großen Veränderungen im Vergleich zur „normalen“ Haltung darstellte, da hier lediglich das Sandbad entnommen und der Lärmpegel durch Schallisolation minimiert wurde. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Forschungsgruppe um Diamond et al. ähnliche Beobachtungen mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate von alten Ratten in einem Environmental Enrichment machte. Sie folgerten daraus, dass alte Tiere wohl ein anderes Environmental - Enrichment Equipment mit mehr Rückzugsmöglichkeiten und einer anderen Platzierung der zusätzlichen Käfigausstattung benötigten (Diamond, 1988).

4.2. Akustisches Trauma

Das akustische Trauma sollte dazu dienen herauszufinden, ob die in der angereicherten Umgebung gehaltenen Tiere nach der akustischen Traumatisierung eine bessere Erholung der Hörschwelle zeigen, als die Tiere der deprivierten Umgebung. Da die Vermutung besteht, dass die BDNF Expression durch Environmental Enrichment erhöht wird und dass BDNF ein wichtiges Neurotrophin für die Instandhaltung und für die Plastizität auditorischer Neurone ist, lag die Vermutung nahe, dass sich die in einem Environmental Enrichment gehaltenen

Tiere durch eine Neuroprotektion durch BDNF schneller von einem akustischen Trauma erholen als die Tiere der Kontrollgruppe.

Akustisches Trauma ist eine Möglichkeit, einen Lärm - assoziierten Hörverlust herbeizuführen. Lärm - assoziierter Hörverlust basiert auf einer Schädigung der Cochlea (Liberman und Kiang, 1978; Liberman and Dodds, 1987; Liberman, 1987) und der Nervenfasern (Puel, 1995; Puel et al., 1998; Pujol und Puel, 1999). In diesem Kontext ist es Interessant, dass eine Vorbehandlung mit nicht – traumatisierenden Geräuschen vor einem akustischen Trauma das Ausmaß des Hörverlusts nach dem Trauma vermindert (Canlon et al; 1988; Niu und Canlon, 2002; Niu et al., 2003). Außerdem kann ein Lärm – induzierter Hörverlust bei Tieren limitiert werden, wenn die Tiere nach der akustischen Traumatisierung in einer angereicherten akustischen Umgebung gehalten werden (Noren und Eggermont; 2005). Trotz der akustischen Stimulation der Gerbils mittels verschiedener Geräusche und einem Radioprogramm in der Haltungsphase vor der Traumatisierung und in der Phase unmittelbar nach dem akustischen Trauma konnte in dieser Studie kein das Trauma vermindender Effekt dieser Stimulation beobachtet werden.

4.3. Die Verhaltenstestungen

Additiv zu den Hörmessungen und dem akustischen Trauma wurden die Verhaltensleistungen der Tiere in verschiedenen Verhaltenstest überprüft. Verhaltensteste wurden schon in einigen Environmental – Enrichment Studien verwendet um das Verhalten von Tieren zu beobachten (Pham und Ickes et al. 1999; Kobayashi et al. 2002; Amaral et al. 2007). Unter

Verwendung verschiedener Verhaltenstest wie des Labyrinth Tests, des X – Maze und des Open Field Test sollte in dieser Studie untersucht werden, inwieweit die Haltung der Tiere in den verschiedenen Haltungsbedingungen einen Einfluss auf die Lernfähigkeit (Labyrinth - Test) und das Verhalten (X - Maze und Open Field Test) der Tiere hatte.

4.3.1. Elevated X – Maze

Das Testprinzip des Elevated X – Maze geht auf Vorarbeiten von Montgomery (1958) zurück. Montgomery benutzte ein Y - Förmiges Labyrinth mit einer wechselnden Anzahl von offenen und geschlossenen Armen und in seinen Experimenten bevorzugten Ratten in jedem Fall die geschlossenen Arme (Montgomery, 1958). Der X Maze Test, wie er in dieser Studie verwendet wurde, wurde von Pellow et al. (1985) und Lister (1987) zur Messung von Angst bei Ratten und Mäusen eingeführt. Dieser Test ist als Tiermodell zur Verifizierung von Angst mittlerweile weit verbreitet. Wie schon im Methodenteil beschrieben ist das Elevated X - Maze ein erhöht angebrachtes, kreuzförmiges Labyrinth, mit zwei „offenen“ und zwei „geschlossenen“ Armen. Das Testprinzip basiert auf der natürlichen Aversion von Nagetieren gegenüber offenen und erhöhten Räumen. Somit ist der wichtigste Parameter des X – Maze Test die Aufenthaltszeit im offenen Arm des Labyrinths.

Bei den Auswertungen der X - Maze Tests wurden neben den Aufenthaltszeiten der Gerbils im offenen und geschlossen Arm auch die Aktivitätszeiten der Tiere erfasst. Als zusätzliche Verhaltensparameter wurden explorative „head dips“ und „Rearings“ erfasst. Da gezeigt werden konnte, dass eine Applikation von anxiolytischen Medikamenten die Anzahl der explorativen „head dips“, also das Herunterschauen des Tieres von der erhöhten Plattform der Testapparatur, signifikant erhöhte (Griebel et al. 1997; Dalvi und Rodgers 1999; Silva

und Brandao 2000), scheint es sich hierbei um einen Parameter zu handeln, mit dem man das Angst- bzw. Mutverhalten der Tiere evaluieren kann.

Auch das "Rearing" - Verhalten, also das Aufstellen des Tieres auf die Hinterbeine um von dieser erhöhten Position eine bessere explorative Übersicht zu haben, kann herangezogen werden um Angst- und Mutverhalten zu validieren.

Bei der Aufenthaltszeit in den beiden unterschiedlichen Armen des Labyrinths zeigten sich im Experiment keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der unterschiedlichen Haltungsgruppen. Stets wurde hier der offene Arm gegenüber dem geschlossenen Arm bevorzugt. Die längste Aufenthaltszeit im geschlossenen Arm zeigten die mittelalten Tiere aus der deprivierten Haltung.

Bei Betrachtung der aktiven Bewegung der Tiere zeigten die Tiere aus der deprivierten Umgebung die höheren Aktivitätsindizes. Bei den "Head Dips" zeigte sich keine Dominanz einer Gruppe, während die Tiere aus der deprivierten Umgebung die häufigsten Rearings zeigten. Ein Grund für die zahlenmäßig häufigeren Rearings der deprivierten Gruppe könnte auf die erhöhte Ängstlichkeit dieser Tiere in neuen, unbekanntem Umgebungen sein, welche die Tiere zu diesem, im Vergleich zu der angereicherten Gruppe, vermehrten explorativen Verhalten veranlasste.

4.3.2. Open Field Test

Als weiterer Verhaltenstest wurde der Open Field Test durchgeführt. Seit seiner Einführung hat der Open Field Test den Status der am häufigsten verwendeten Testverfahren in der Tierpsychologie erlangt. Die Popularität dieses Tests ergibt sich zum einen wohl durch die

Einfachheit des benötigten Equipments und zum anderen auch durch die Möglichkeit schnell und einfach viele Testungen durchzuführen. Außerdem sind wesentliche Vorteile dieses Testverfahrens, dass die beobachteten Verhaltensweisen klar definiert und deren Interpretation generell akzeptiert ist. Außerdem gestaltet sich die Bewertung der Testungen relativ unkompliziert.

Der Erstbeschreiber des Open Field Tests, Calvin Hall (Hall, 1934) deutete Defäkation im Open Field Test als Zeichen von Angstverhalten. Im Laufe der Zeit wurde dieses Testverfahren von zahlreichen Anwendern weiterentwickelt und es kamen immer mehr Testparameter hinzu. Im Wesentlichen ist der Open Field Test ein Verfahren, bei dem bestimmte Verhaltensweisen eines Tieres untersucht werden. Diese Verhaltensweisen werden dadurch hervorgerufen, indem man das Tier in ein bisher unbekanntes, offenes Areal, welches in der Regel von einer Wand begrenzt ist, aussetzt. Das Auslösen der Verhaltensweisen beim Versuchstier ist abhängig von der Interaktion des Tieres mit einer Vielzahl von Testfaktoren wie die Stimulation die sich aus der Entnahme des Tieres aus der gewohnten Umgebung (Heim – Käfig) ergibt, das Umsetzen des Tieres in das Open Field, das Aussetzen der Tiere im Open Field und die Erfahrung des Tieres mit der Testsituation (Walsh und Cummins, 1976). Neben diesen unmittelbar mit der Testsituation assoziierten Faktoren ist das Verhalten des Versuchstieres auch von der Vorbehandlung des Tieres abhängig, wie von der Applikation verhaltensmodulierender Medikamente wie z.B. Benzodiazepinen (Pellow und File, 1985) und von Faktoren wie Stress und Wohlbefinden des Tieres in Bezug auf die Haltungsbedingungen (Walsh und Cummins, 1976).

Die Arbeitsgruppe unter Amaral et al. (2007) konnte zeigen, dass der Open Field Versuch geeignet ist, um den Einfluss von Environmental Enrichment auf das Verhalten von Mäusen

zu untersuchen. Von besonderer Bedeutung im Open Field ist der Aktivitätsindex der Tiere, also wie viel sich die Tiere im Open Field bewegen. Es wird angenommen, dass die in einem Environmental Enrichment gehaltenen Tiere schneller an die neue Umgebung habituierten als die in einer deprivierten Umgebung gehaltenen Tiere und somit einen geringeren Aktivitätsindex haben (Pham et al. 1999; Amaral et al. 2007; Workman et al. 2010). Weitere wichtige Parameter, die auch in der Studie erfasst wurden sind „Rearing“ und Putzverhalten („Grooming“), die auf Explorationsverhalten hindeuten sowie die Aufenthaltszeit der Tiere in den peripheren Feldern und Ecken des Open Fields.

Es zeigte sich, dass sich die Tiere der Deprived Environment Gruppe länger in der peripheren Zone und seltener in den Ecken aufhielten als die Environmental Enrichment Gruppe, sie also explorativer und mutiger zeigten. Zudem zeigte die Deprived Environment Gruppe, wie auch beim X Maze Test, einen durchschnittlich höheren Aktivitätsindex mit mehr Bewegungen pro Versuch, was mit den Beobachtungen anderer Studien übereinstimmt, bei welchen allerdings Ratten getestet wurden (Pahm et al. 1999; Falkenberg et al. 1992; Mohammed et al. 1990; Renner und Rosenzweig, 1986). Dies kann so interpretiert werden, dass Tiere aus einer angereicherten Umgebung an wechselnde Situationen und Umgebungsbedingungen gewohnt sind und dadurch schneller an das Open Field habituierten. So kann der geringere Aktivitätsindex der Tiere aus dem Environmental Enrichment als Effekt der angereicherten Umgebung angesehen werden. Bei den Rearings konnten sich keine großen Unterschiede einer Haltungsgruppe finden. Bei den Groomings zeigte sich ebenfalls keine Dominanz einer Haltungsgruppe.

4.3.3. Labyrinth -Test

Unter Verwendung des Labyrinth - Test sollte in dieser Studie die Lernfähigkeit der Tiere der unterschiedlichen Haltungsgruppen untersucht werden. Schon 1949 formulierte Hebb die Hypothese, dass Tiere, die früh in ihrem Leben in angereicherten Umgebungen gelebt haben, permanente kortikale Veränderungen erlangen, die ihre Fähigkeiten zur Problemlösung verbessern (Hebb 1949). Hebb stützte seine Hypothese auf die Beobachtung dass Ratten, die als Haustiere verwendet wurden und somit eine angereicherte Umgebung erfahren hatten im Vergleich zu Ratten, welche nicht in einer angereicherten Umgebung gehalten wurden, eine schnellere Lernfähigkeit im Labyrinth – Versuch zeigten. Später bestätigte sich diese Hypothese und es konnte gezeigt werden, dass in einer angereicherten Umgebung gehaltene Ratten ein besseres Lernvermögen im Labyrinthversuch zeigten als in einer deprivierten Umgebung gehaltenen Ratten (Forgays und Raid, 1962; Kyono et al. 2003)

In dieser Studie wurde das „klassische“ Labyrinth verwendet, welches aus einer großen Plattform und mehreren vertikalen Begrenzungen bestand.

Bei allen Tieren stellte sich mit zunehmenden Testdurchläufen ein Lernprozess ein. Diese zeigte sich dadurch, dass alle Tiere, unabhängig von ihren Haltungsbedingungen, den Zielkäfig mit zunehmenden Testläufen schneller fanden.

Auffällig war, dass vor allem die jungen Tiere aus dem Environmental Enrichment vom Experimentbeginn an schnell ihr Ziel fanden und dass die Lernkurve der mittelalten deprivierten Tiere besser war als die der mittelalten Tiere aus dem Environmental Enrichment. Der Grund für diese Ergebnisse könnte sein, dass das Environmental Enrichment vor allem bei den jungen Tieren eine Verbesserung Lernfähigkeit bewirkte, während die

mittelalten Tiere aufgrund ihres Alters in Bezug auf die Lernfähigkeit nicht in von der Haltung in einem Environmental Enrichment profitierten.

4.4. Cortisol und Östradiol Blutplasma Spiegel:

4.4.1. Cortisol

Cortisol gehört zur Gruppe der Glukokortikoide. Glukokortikoid - Rezeptoren werden in fast allen Zellarten exprimiert, wenn auch die Rezeptorendichte in den verschiedenen Zelltypen variiert (Barnes und Adcock 1993). In der Cochlea finden sich Glukokortikoid - Rezeptoren vor allem in der Stria vascularis, im Spiralligament, im Spiral Limbus und in den Spiralganglien (ten Cate et al. 1993; Zuo et al. 1995; Rarey und Curtis, 1995). Glukokortikoide werden von den adrenergen Drüsen sezerniert und Stress sowie mit Stress assoziierte Situationen erhöhen ihre Blutplasmaspiegel und führen zu einer Adaptation des Organismus an die Stresssituation. Eine solche Stresssituation ist auch das Akustische Trauma, aus welchem ebenfalls ein Anstieg der Cortikoid – Blutplasmaspiegel resultiert (Canlon und Meltser 2011). So konnte gezeigt werden, dass Tiere in der Zeit des Cortikosteroid – Anstiegs weniger anfällig für einen lärmbedingten Hörverlust sind (Wang und Liebermann 2002). Eine Blockade der Rezeptoren mit Glukokortikoid - Rezeptor - Antagonisten verstärkt hingegen einen mit akustischem Trauma assoziierten Hörverlust (Mori et al. 2004). Die Mechanismen, über die Glukokortikoide zum Schutz des Hörsystems beitragen, sind nach wie vor Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Einigkeit besteht darüber, dass wohl mehrere Mechanismen für die schützenden Effekte verantwortlich sind. So wirken Glukokortikoide als Inhibitoren der Synthese und Freisetzung inflammatorischer Zytokine immunmodulatorisch und wirken dem intrazellulären Effekt dieser Zytokine entgegen (Dinh

et al. 2008, Maeda et al. 2005). Ein weiterer protektiver Effekt der Glukokortikoide nach akustischem Trauma scheint mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) zusammenzuhängen. Eine Inhibition von NFkB führt somit in der Cochlea zu einem größeren Zellschaden nach akustischem Trauma oder durch pro – Inflammatorische Zytokine (Haake et al. 2009; Lang et al. 2006). Desweiteren konnten erhöhte Hörschwellen nach der Gabe von Glucocorticoid - Antagonisten mit einer Abnahme des Transports von NfKB in den Zellkern in Zusammenhang gebracht werden (Meltser und Canlon 2011). Die Interaktion von Glukokortikoid - Rezeptoren und die weiteren intrazellulären Signalwegen wie zum Beispiel mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPKs) sind weitere denkbare Mechanismen, wie Glukokortikoide schützend auf das auditorische System wirken könnten (Meltser et al. 2009, Murai et al. 2008, Selivanova et. al. 2007, Wang et al. 2007).

Zum Abschluss der Experimente wurde den Tieren bei der Präparation der Cochlea Blut entnommen und dieses auf die Cortisol und Östradiol – Spiegel hin untersucht, wobei bei den Cortisol– Blutplasmaspiegeln keine Korrelation mit den Haltungsbedingungen und dem Hörvermögen der einzelnen Tiere gefunden werden konnte. Es zeigte sich aber eine Abnahme der Cortisol – Spiegel mit dem Alter der Tiere.

Eine Erklärung für die stark abweichenden Testergebnisse in dieser Studie könnte der Stresseinfluss auf den Tierorganismus vor und während der Präparation sein, bei der auch das Blut gewonnen wurde obwohl darauf geachtet wurde, durch behutsamen Umgang mit den Tieren vor der Präparation den Stresseinfluss so weit wie möglich zu minimieren. In einer Studie von Pham und Ickes et al. (1999) konnten keine signifikanten Unterschiede in den Blutplasmaspiegeln von Corticosteron in unterschiedlichen Haltungsbedingungen

gehaltenen Ratte beobachtet werden, wenn auch die Ratten aus dem Environmental Enrichment eine Tendenz zu niedrigeren Corticosteronspiegeln zeigten. Die Tatsache, dass die Tiere aus dem Environmental Enrichment in der hier vorliegenden Studie ähnliche Cortisolspiegel hatten wie die Tiere aus der deprivierten Umgebung bzw. dass kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte zeigt, dass zumindest in dieser Studie die Umgebungsbedingungen des Environmental Enrichments mit ständig neuen Objekten und der verstärkte Kontakt der Tiere mit dem Experimentator keinen unmittelbaren störenden Effekt auf das Stresssystem und die hypothalamische - pituitäre – adrenale Achse hatten.

4.4.2. Östradiol

Zusammen mit den Cortikosteron Blutplasma Spiegeln wurde auch der Blutplasmaspiegel von Östradiol bestimmt. Östradiol ist ein Sexualhormon welches als Hormon direkt und über Interaktion mit neuroprotektiven Faktoren einen Einfluss auf das Hörsystem hat. Klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass Östradiol eine wichtige Rolle in der Physiologie des auditorischen Systems spielt. Hörschwellen variieren während des Menstruationszyklus und postmenopausale Frauen haben höhere Hörschwellen in ABR – Messungen als junge Frauen und Männer (Jerger und Johnson 1998, Wharton und Church 1990). Experimentell konnte man bei ovariectomierten Ratten höhere Hörschwellen als bei normalen Ratten messen (Coleman et al. 1994). Östradiol wirkt über Östrogen Rezeptoren (ER, estrogen receptors) welche Ligand - abhängige Transkriptionsfaktoren sind. Bekannt sind die beiden Östrogen Rezeptoren ER α und ER β (Green et al. 1986, Kuiper et al. 1996). Das vor allem der Rezeptor ER β eine wichtige Rolle im Hörsystem spielt konnte die Arbeitsgruppe um Barbara Canlon zeigen. Mäuse die mit einem ER β Antagonisten behandelt wurden,

hatten nach einer akustischen Traumatisierung signifikant höhere Hörschwellen als die Wildtyp - Mäuse, wohingegen man bei Mäusen die mit einem ER α Antagonisten behandelt wurden keine Unterschiede in den Hörschwellen im Vergleich mit unbehandelten Tieren ausmachen konnte. Interessanterweise konnte diese Studie auch zeigen, dass die BDNF - Spiegel bei den mit ER β - Antagonisten behandelten Mäusen niedriger waren als bei den Wildtyp - Mäusen, was darauf hindeuten könnte, dass Östrogen vor allem über ER β und Einbezug von BDNF neuroprotektiv auf das auditorische System wirkt. (Meltser und Canlon et al. 2008).

Leider konnte in dieser Studie bei den Östradiol Blusplasma – Spiegeln, wie auch bei den Cortikosteron Spiegeln, keine Korrelation mit dem Hörvermögen gefunden werden.

4.5. Ausblick

Ob sich die Hörschwellen von Gerbils verschiedener Alterstufen durch ein Environmental Enrichment positiv verändern lassen, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Studie nicht herausfinden. Ebenfalls nicht sicher ist, ob sich die leicht verbesserten Hörschwellen und das gute Abschneiden im Labyrinth Test bei einigen jungen Tieren aus dem Environmental Enrichment ein Effekt der Haltungsbedingungen ist.

Eine histologische und molekularbiologische Auswertung der in dieser Studie gewonnenen Gewebe steht noch aus. Erst wenn diese Auswertungen abgeschlossen sind wird sich zeigen, ob durch das Environmental Enrichment tatsächlich Veränderungen von Neurotrophinen wie BDNF induziert wurden.

Um aber auf längere Sicht Präventionsstrategien gegen Presbyakusis bei Nagetieren zu entwickeln, die dann eventuell später auch klinische Anwendbarkeit finden, bedarf es weiterer Forschung. Eine ebenfalls offene Frage ist, ob durch ein modifiziertes Studiendesign mit einem anders modifiziertem Environmental Enrichment zu einheitlicheren Ergebnissen führen würde.

5. Literatur

- Amaral OB et al (2007)
Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice.
Physiol Behav 10: 1016.
- Bai Lu (2003)
BDNF and Activity-Dependent Synaptic Modulation.
Learn Mem 10: 86-98.
- Barnes PJ, Adcock I (1993)
Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms
Trends Pharmacol Sci 14:436-441.
- Bennett EL, Diamond MC, Krech D and Rosenzweig MR (1964)
Chemical and anatomical plasticity of the brain.
Science 164: 610-619.
- Békésy G, von. (1960)
Experiments in hearing
McGraw Hill, New York
- Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C (2005)
New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment.
Eur J Neurosci 21: 513–521.
- Brugge JF (1985).
Patterns of organization in auditory cortex.
J Acoust Soc Am 78(1 Pt 2): 353-9.
- Budinger E, Heil P, Scheich H (2001)
Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I-IV
Wiley Online Library.
- Canlon B, Borg E, Flock A (1988)
Protection against noise trauma by preexposure to a low level acoustic stimulus.
Hear Res 34: 197–200.
- Canlon B, Tahera Y, Johansson P, Meltser I (2006)
Restraint stress modulates glucocorticoid receptors and NFκB in the cochlea.
Neuroreport 17:879–882.
- Castren E, Pitkanen M, Sirvio J, Parsadanian A, Lindholm D, Thoenen H, and Riekkinen JP (1993)
The induction of LTP increases BDNF and NGF mRNA but decreases NT-3 mRNA in the dentate gyrus.
Neuroreport 4: 895–898.

- Chao MV (1992)
Neurotrophin receptors: A window into neuronal differentiation.
Neuron 9: 583–593.
- Coleman JR, Campbell D, Cooper WA, Welsh MG, and Moyer J (1994)
Auditory brainstem responses after ovariectomy and estrogen replacement in rat.
Hear. Res. 80:209–215.
- Dalvi A, Rodgers RJ (1999).
Behavioral effects of diazepam in the murine plus-maze: flumazenil antagonism of enhanced head dipping but not the disinhibition of openarm avoidance.
Pharmacol Biochem Behav 62: 727–734.
- Darwin C (1871)
The descent of man
John Murray, London
- Diamond MC (1988).
Enriching heredity.
The Free Press, NewYork.
- Diamond MC, Johnson RE, Protti AM, Ott C, Kajisa L (1985)
Plasticity in the 904-day-old male rat cerebral cortex
Exp Neurol 87: 309-317
- Diamond MC, Krech D and Rosenzweig MR (1964).
The effects of an enriched environment on the rat cerebral cortex.
J Comp Neurol 123: 111-119.
- Dinh CT, Haake S, Chen S, Hoang K, Nong E, Eshraghi AA, Balkany TJ, Van De Water TR (2008)
Dexamethasone protects organ of corti explants against tumor necrosis factor-alpha-induced loss of auditory hair cells and alters the expression levels of apoptosis-related genes.
Neuroscience 157: 405-413.
- Draguno M, Beilharz E, Mason B, Lawlor P, Abraham W, and Gluckman P (1993)
Brain-derived neurotrophic factor expression after long-term potentiation
Neurosci Lett 160: 232–236.
- Dugich-Djordjevic MM, Tocco G, Willoughby DA, Najm I, Pasinetti G, Thompson R, Baudry M, and Hefti F (1992)
BDNF mRNA expression in the developing rat brain following kainic acid-induced seizure activity.
Neuron 8: 1127–1138.
- Eggermont JJ, Roberts LE (2004).
The neuroscience of tinnitus.
Trends Neurosci 27: 676-682.
- Engineer ND, Percaccio CR, Pandya PK, Moucha R, Rathbun DL, Kilgard MP (2004).
Environmental enrichment improves response strength, threshold, selectivity, and latency of auditory cortex neurons.
J. Neurophysiol 92: 73–82.

- Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, and Lindvall O (1991)
Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis.
Neuron 7: 165–176.
- Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B. and Lindefors N (1992)
Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment.
Neurosci Lett 138:153–156.
- File SE and Pellow S (1985).
The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard.
Br J Pharmac 86: 729-735.
- Forgays DG, Read JM (1962)
Crucial periods for free-environmental experience in the rat.
Jour of Com and Phys Psych 55 :816-818.
- Frick KM, Fernandez SM (2003)
Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice.
Neurobiol Aging 24: 615–626.
- Gates GA, Cooper JC Jr, Kannel WB, Miller NJ (1990).
Hearing in the elderly: the Framingham cohort, 1983–1985, part I—basic audiometric test results.
Ear Hear 11: 247–56.
- Gelfo F, Cutuli D, Foti F, Laricchiuta D, De Bartolo P, Caltagirone C, Petrosini L, Angelucci F (2011)
Enriched environment improves motor function and increases neurotrophins in hemicerebellar lesioned rats.
Neurorehabil Neural Repair 25: 243-252.
- Green S, et al. (1986)
Cloning of the human oestrogen receptor cDNA.
J. Steroid Biochem 24:77–83.
- Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ (1997).
Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test.
Pharmacol Biochem Behav 57: 817–827.
- Haake SM, inh CT, Chen S, Eshraghi AA, Van De Water TR (2009)
Dexamethasone protects auditory hair cells against TNFalpha-initiated apoptosis via activation of PI3K/Akt and NFkappaB signaling.
Hear Res 255: 22-32.
- Hall CS (1934).
Emotional behaviour in the rat. I Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.
J Comp Psychol 22: 345–352
- Hebb D (1949) .
The Organization of Behavior.
Wiley, New York.

- Hoffmeister K (1988)
Verhaltensmedizinische Untersuchungen zum Hörsturz [The behavioral medicine of sudden hearing loss].
Frankfurt am Main: Peter Lang (Internat. Academ. Publishers)
- Hubel DH and Wiesel TN (1965).
Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint.
J Neurophysiol 28: 1041-1059.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, and Granholm AC (2000)
Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain.
Exp Neurol 164: 45–52.
- James R, Connor Jr, Diamond MC, Ruth EJ (1980)
Occipital cortical morphology of the rat: Alterations with age and environment
Exp. Neurol. 68: 158-170.
- Jerger J, and Johnson K (1988)
Interactions of age, gender, and sensorineural hearing loss on ABR latency.
Ear Hear 9: 168–176.
- Jewett DL, Williston JS (1971)
Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans.
Brain 94: 681-696.
- Johnson H, Höckfeld T, Ulhafke B (1996)
Decreased expression of trkB and trkC mRNAs in spinal motoneurons of aged rats.
Eur J Neurosci 8: 494-499.
- Katz LC and Shatz CJ (1996)
Synaptic activity and the construction of cortical circuits.
Science 274: 1133–1138.
- Kessler JP, So V, Choi J, Cotman CW, and Gomez-Pinilla F (1998)
Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: A mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance?
Behav Neurosci 112: 1012–1019.
- Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S (2002)
Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task.
J Neurosci Res 70: 340-346.
- Kochkin S, MarkeTrak IV: what is the viable market for hearing / Popelka MM, Cruickshanks KJ, Wiley TL, Tweed TS, Klein BE, Klein R. (1998)
Low prevalence of hearing aid use among older adults with hearing loss: the Epidemiology of Hearing Loss Study.
J Am Geriatr Soc 46: 1075–1078.
- Kohl Z, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kempermann G (2002)
Prenatal enrichment has no lasting effects on adult hippocampal neurogenesis in four-month-old mice.
Genes Brain Behav 1: 46–54.

- Kröner – Herwig B, Schmitt C, Patak M (2000).
Stress and the Onset of Sudden Hearing Loss and Tinnitus.
International Tinnitus Journal 6: 41-49.
- Kulper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, and Gustafsson JA (1996)
Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.
Proc Natl Acad Sci U. S. A. 93: 5925–5930.
- Kiyono S, Seo ML, Shibagaki M; Inouye M (1985)
Facilitative effects of maternal environmental enrichment on maze learning in rat offspring.
Physiol and Behav 34: 431-435.
- Landi S, Sale A, Berardi N, Viegi A, Maffei L et al. (2007).
Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: A role for BDNF.
FASEB J 21: 130–139.
- Lang H, Schulte BA, Zhou D, Smythe N, Spicer SS, Schmiedt RA, (2006)
Nuclear factor kappaB deficiency is associated with auditory nerve degeneration and increased noise-induced hearing loss.
J Neurosci 26: 3541-3550.
- Lenarz T, Schönermark M (1995).
Die progrediente Hörminderung – Pathophysiologie, Differentialdiagnostik, Therapie.
Laryngo-Rhino-Otol 74: 1–6.
- Lieberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (2002)
Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier.
Nature 419: 300-330.
- Lieberman MC, Dodds LW (1987)
Acute ultrastructural changes in acoustic
trauma: serial section reconstruction of stereocilia and cuticular plates.
Hear Res 26: 45– 64.
- Lieberman MC, Kiang NY (1978)
Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory nerve activity.
Acta Otolaryngol Suppl 358: 1– 63.
- Lister, RG (1987).
The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.
Psychopharmacology 92: 180-185.
- Maeda K, Yoshida K, Ichimiya I, Suzuki M (2005)
Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced cytokine secretion from spiral ligament fibrocytes.
Hear Res 202: 154-160.
- Meltser I, Canlon B (2011)
Protecting the auditory system with glucocorticoids.
Hear Res 281: 47-55.
- Meltser I, Tahera Y, Canlon B (2009)
Differential activation of mitogen-activated protein kinases and brain-derived neurotrophic factor after temporary or permanent damage to a sensory system.
Neuroscience 165: 1439-1446

- Mohammed AH, Winblad B, Ebendal T, and Larkfors L (1990)
Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain.
Brain Res 528:62–72.
- Montgomery, K.C. (1958)
The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.
J Comp Physiol Psychol 48: 254-260.
- Mori T, Fujimura K, Yoshida M, Suzuki H, (2004)
Effects of glucocorticoid receptor antagonists on CAPs threshold shift due to short – term sound exposure to guinea pigs.
Auris Nasus Larynx 31: 395-399.
- Morimoto K, Sato K, Sato S, Yamada N, and Hayabara T (1998)
Time-dependent changes in neurotrophic factor mRNA expression after kindling and long-term potentiation in rats.
Brain Res Bull 45: 599–605.
- Murai N, Kirkegaard M, Jarlebark L, Risling M, Suneson A, Ulfendahl M (2008)
Activation of JNK in the inner ear following impulse noise exposure.
J Neurotrauma 25: 72-77.
- Nadol JB Jr., Burgess BJ, Reißer C (1990).
Morphometric analysis of normal human spiral ganglion cells.
Ann Otol Rhinol Laryngol 99: 340-348.
- Niu X, Shao R, Canlon B (2003)
Suppression of apoptosis occurs in the cochlea by sound conditioning.
Neuro Report 14: 1025–1029.
- Niu X, Canlon B (2002)
Protective mechanisms of sound conditioning.
Adv Otorhinolaryngol 59: 96 –105.
- Noren AJ and Eggermont J (2005)
Enriched Acoustic Environment after Noise Trauma Reduces Hearing Loss and Prevents Cortical Map Reorganization.
J Neurosci 25: 699 –705
- Patterson S, Grover LM, Schwartzkroin PA, and Bothwell M (1992)
Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: A stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs.
Neuron 9: 1081–1088.
- Pellow S, Chopin P, File SE and Briley M (1985).
Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.
J Neurosci Meth 14: 149-67.
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed (1999)
AH. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year.
Neuroscience 94: 279–86.

- Phillips DP, Irvine DR (1982).
Properties of single neurons in the anterior auditory field of cat cerebral cortex.
Brain Res 248: 237-244.
- Puel JL (1995)
Chemical synaptic transmission in the cochlea.
Prog Neurobiol 47: 449-476.
- Puel JL, Ruel J, Gervais d'Aldin C, Pujol R (1998)
Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss.
Neuro Report 22: 2109-2114
- Pujol R, Puel JL (1999)
Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings.
Ann NY Acad Sci 884: 249-254.
- Raphael Y, Altschuler RA (2003).
Structure and innervation of the cochlea.
Brain Res Bull 60: 397-422.
- Rarey KE, Gerhardt KJ, Curtis LM, ten Cate WJ (1995)
Effect of stress on cochlear glucocorticoid protein: acoustic stress.
Hear. Res. 82: 135-138.
- Renner MJ and Rosenzweig MR (1986)
Object interactions in juvenile rats (*Ratus norvegicus*): effects of different experiential histories.
J comp Psychol 100: 229-236.
- Rubel EW, Fritsch B (2002).
Auditory system development: primary auditory neurons and their targets.
Annu Rev Neurosci 25: 51-101.
- Rüttiger L, Panford-Walsh R, Schimmang T, Tan J, Zimmermann U, Rohbock K, Köpschall I, Limberger A, Müller M, Fraenzer JT, Cimerman J, Knipper M (2006).
BDNF mRNA expression and protein localization are changed in age-related hearing loss.
Neurobiol Aging 28: 586-601.
- Sally SL, Kelly JB (1988).
Organization of auditory cortex in the albino rat: sound frequency.
J. Neurophysiol 59: 1627-1638.
- Sando I (1965).
The anatomical interrelationship of the cochlear nerve fibers.
Acta Otolaryngol 59: 417-436.
- Schmidt RF, Lang F & Thews G (2005).
Physiologie des Menschen.
Springer Medizin Verlag Heidelberg, 29. Auflage.
- Schuknecht HF (1964).
Further observations on the pathology of presbycusis.
Arch Otolaryngol 80: 369-382.

- Selivanova O, Brieger J, Heinrich UR, Mann W (2007)
Akt and c-Jun N-Terminal kinase are regulated in response to moderate noise exposure in the cochlea of guinea pigs.
ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 69: 277-282.
- Silva RC, Brandao ML (2000).
Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis.
Pharmacol Biochem Behav 65: 209–216
- Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ (2001)
Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice.
Neuropharmacology 41: 779–790.
- ten Cate WJ, Curtis LM, Small GM, Rarey KE (1993)
Lokalizacija of glucocorticoid receptors and glucocorticoid mRNAs in the rat cochlea
Laryngoscope 103: 865-871.
- Uhlmann RF, Larson EB, Rees TS, Koepsell TD, Duckert LG (1989).
Relationship of hearing impairment to dementia and cognitive dysfunction in older adults.
JAMA 261: 1916–1919.
- Van Praag et al. (1999)
Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus
Nat. Neurosci. Mar;2: 266-270
- Walsh RN, and Rk Cummins (1976)
The open-field test A critical review.
Psychol Bull 83: 482-504.
- Wallhäusser-Franke E, Langner G (2001).
Phantom sounds: mechanism of tinnitus in the central nervous system.
Neuroreport 1/10: 21-27.
- Wang Y, Liberman MC (2002)
Restraint stress and protection from acoustic injury in mice.
Hear Res 165:96–102
- Wang J, Ruel J, Ladrech S, Bonny C, van deWater TR, Puel JL (2007)
Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase-mediated mitochondrial cell death pathway restores auditory function in sound-exposed animals.
Mol. Pharmacol 71: 654-666.
- Warr WB (1980).
Efferent components of the auditory system.
Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 89: 114-120.
- Warren JM, Zerweck C, Anthony A (1982)
Effects of environmental enrichment on old mice.
Dev Psychobiol 1: 13-18.
- Webster DB (1971).
Projection of the cochlea to cochlear nuclei in Merriam's kangaroo rat.
J Comp Neurol 143: 323-340.

- Wharton JA, and Church GT (1990)
Influence of menopause on the auditory brainstem response.
Audiology 29: 196–201.
- Willot JF, Chisolm TH, Lister JJ (2001).
Modulation of Presbycusis: current status and future directions.
Audiol Neurootol 6: 231–249.
- Workman JL, DeWitt SJ, Fonken LK, Nelson RJ. (2010)
Environmental enrichment enhances delayed-type hypersensitivity in both short- and long-day
Siberian hamsters.
Physiol Behav 99: 638-643.
- Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, and During MJ (1999)
Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective.
Nature Med 5: 448–453.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, and Lindholm D (1990)
Activity-dependent regulation of BDNF and NGF mRNA in the rat hippocampus is mediated by non-
NMDA glutamate receptors.
EMBO J 9: 3545–3550.
- Zhao LR, Risedal A, Wojcik A, Hejzlar J, Johansson BB, and Kokaia Z (2001)
Enriched environment influences brain-derived neurotrophic factor levels in rat forebrain after focal
stroke.
Neurosci Lett 305: 169–172.
- Zuo J, Curtis LM, Yao X, ten Cate WJ, Bagger-Sjoberg D, Hultcrantz M, Rarey KE (1995)
Glucocorticoid receptor expression in the postnatal rat cochlea.
Hear Res 87:220–227
- US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Institute on
Deafness and Other Communication Disorders. National Strategic Research Plan. National Institutes of
Health: Bethesda, MD, 1993.
- Bureau of the Census, US Department of Commerce, Economics and Statistics Administration.
Statistical Abstract of the United
States (114th edn). US Government Printing Office: Washington, DC, 1994.