

Aus dem Zentrum der Physiologie
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Institut für Physiologie II
Direktor: Prof. Dr. Rainer Klinke

**Der Einfluß von Amilorid und Diazoxid
auf die Innenohrfunktion der Taube (Columba livia)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von

Sven Heynert
aus Gräfelting

Frankfurt am Main, 2001

Für meine Eltern

Danksagung

Ich danke ganz herzlich Herrn Prof. Dr. R. Klinke, mir die Chance gegeben zu haben, an seinem Institut mitzuarbeiten und für die Überlassung dieses Themas, sowie die freundliche Unterstützung während des gesamten Verlaufs dieser Arbeit.

Ganz besonderen Dank gilt Herrn PD Dr. Claus-Peter Richter, der mir zu jeder Zeit mit seinem Wissen und seinem Rat zur Seite stand und für die mit viel Mühe erfolgte Durchsicht dieser Arbeit. Die Betreuung durch ihn war nicht nur fachlich, sondern auch menschlich eine sehr positive Erfahrung.

Lieben Dank gilt auch meiner Frau Michaela, die mich auf den langen Weg dieser Arbeit begleitet und unterstützt hat.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Klinke für ihre Unterstützung.

Sven Heynert

Frankfurt, Juli 2001

Inhalt

- 1 Zusammenfassung**

- 2 Versuchsidee und Zielsetzung der Untersuchung**

- 3 Anatomie und Funktion des Innenohrs der Taube**
 - 3.1. Anatomie
 - 3.1.1. Äußeres Ohr und Mittelohr
 - 3.1.2. Innenohr
 - 3.1.3. Basilarmembran und Haarzelle
 - 3.1.4. Innervation der Haarzelle
 - 3.2. Physiologie
 - 3.2.1. Potentiale und elektrisches Modell der Haarzelle
 - 3.2.2. Energieübertragung vom Trommelfell auf das Innenohr und Wanderwelle
 - 3.2.3. Transduktion durch die Haarzelle
 - 3.2.4. Ionenkanäle der Haarzelle
 - 3.2.4.1. Transduktionskanal
 - 3.2.4.2. Spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal
 - 3.2.4.3. Ca^{2+} -abhängige K^{+} -Ionkanäle
 - 3.2.4.4. Sonstige K^{+} -Kanäle der Haarzelle
 - 3.2.5. Frequenzselektivität und elektrische Eigenschaften der Haarzelle
 - 3.2.6. Primäre afferente Fasern
 - 3.2.6.1. Transmitterfreisetzung auf den afferenten Nerven
 - 3.2.6.2. Spontanaktivität primärer afferenter Neurone
 - 3.2.6.3. Akustisch evozierte Aktivität und Abstimmung primärer afferenter Neurone
 - 3.2.6.4. Aktivitätsmuster der evozierten Entladungsrate
 - 3.2.7. Eigenschaften efferenter Innervation
 - 3.3. Amilorid
 - 3.3.1. Chemische und pharmakologische Eigenschaften
 - 3.3.2. Wirkung von Amilorid auf isolierte Haarzellen
 - 3.3.2.1. Spannungsabhängige Blockierung des Transduktionskanals durch Amilorid
 - 3.3.2.2. Konzentrationsabhängige Blockierung des Transduktionskanals durch Amilorid
 - 3.3.3. Wirkung von Amilorid auf andere Ionenkanäle
 - 3.4. Diazoxid
 - 3.4.1. Chemische und pharmakologische Eigenschaften

- 3.4.2. Wirkung von Diazoxid auf die Haarzelle
- 3.4.3. Wirkung von Diazoxid auf andere Gewebe bzw. Ionkanäle

4. Methode

- 4.1. Tiere
 - 4.1.1. Narkose und Beatmung
 - 4.1.2. Präparation
- 4.2. Versuchsaufbau
 - 4.2.1. Akustisches Reizsystem
 - 4.2.2. Datenaufnahme
 - 4.2.2.1. Endocochleäres Potential
 - 4.2.2.2. Summenaktionspotential (CAP)
 - 4.2.2.3. Einzelfaserableitung
 - 4.2.3. Applikation der Substanzen
 - 4.2.3.1. Applikation in die Scala media
 - 4.2.3.2. Applikation in die Scala tympani
 - 4.2.3.3. Applikationslösungen
- 4.3. Erhebung der Daten (Versuchsablauf)
 - 4.3.1. Versuchsablauf bei Applikation in die Scala media
 - 4.3.2. Versuchsablauf bei Applikation in die Scala tympani
- 4.4. Statistik
 - 4.4.1. t-Test für verbundene Stichproben
 - 4.4.2. Kolmogoroff-Smirnow-Test
- 4.5. Tierhaltung

5. Ergebnisse

- 5.1. Umfang der erhobenen Daten
- 5.2. Amilorid
 - 5.2.1. Applikation in die Scala media
 - 5.2.1.1. Endocochleäres Potential
 - 5.2.1.2. Summenaktionspotential (CAP)
 - 5.2.1.3. Einzelfaserableitung
 - 5.2.1.3.1. Spontane Entladungsrate
 - 5.2.1.3.2. Akustisch evozierte Entladungsrate
 - 5.2.2. Applikation in die Scala tympani
- 5.3. Diazoxid
 - 5.3.1. Applikation in die Scala media
 - 5.3.1.1. Endocochleäres Potential
 - 5.3.1.2. Summenaktionspotential (CAP)
 - 5.3.1.3. Einzelfaserableitung
 - 5.3.1.3.1. Spontane Entladungsrate
 - 5.3.1.3.2. Akustisch evozierte Entladungsrate
 - 5.3.2. Applikation in die Scala tympani

- 6. Diskussion**
- 6.1. Allgemeine Vorbemerkungen zu den Ergebnissen und der Methode
 - 6.1.1. Verteilung der Substanzen und Konzentrationsabschätzung nach Applikation in die Scala media
 - 6.1.2. kurzfristige Effekte durch Applikation in die Scala media
 - 6.1.3. Frequenzabhängigkeit der Ergebnisse
- 6.2. Wirkung von Amilorid auf die Innenohrfunktion
 - 6.2.1. Wirkung von Amilorid auf das EP
 - 6.2.2. Wirkung von Amilorid auf das CAP
 - 6.2.3. Wirkung von Amilorid auf Einzelfaserableitungen
 - 6.2.4. Weitere mögliche Wirkung von Amilorid im Innenohr
 - 6.2.4.1. Amilorid-sensitive Ion-Kanäle an der apikalen Membran der Haarzelle
 - 6.2.4.2. Ciliensteifigkeit und Innenohr-Mechanik
 - 6.2.4.3. Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration
 - 6.2.4.4. Sonstige Strukturen im Innenohr
- 6.3. Wirkung von Diazoxid auf die Innenohrfunktion
 - 6.3.1. Wirkung von Diazoxid auf das EP
 - 6.3.2. Wirkung von Diazoxid auf das CAP
 - 6.3.3. Wirkung von Diazoxid auf Einzelfaserableitungen

7. Tabellenanhang

8. Literatur

1. Zusammenfassung

1. Die Arbeit soll den Beitrag von Ionenleitfähigkeiten an der Funktionsweise der Vogelhaarzelle weiter aufklären.
2. Dazu werden zwei Ionenkanalmodulatoren sowohl in die Scala media, wie auch in Scala tympani appliziert. Amilorid ist ein Blocker v.a. von Natrium-abhängigen Ionenleitfähigkeiten; Diazoxid ist ein Öffner ATP-abhängiger Kaliumleitfähigkeiten.
3. Amilorid hat bei Applikation in die Scala media keinen Effekt auf das endocochleäre Potential. Diazoxid senkt das endocochleäre Potential nach Applikation in die Scala media signifikant um $2,42\text{mV} \pm 2,31$.
Da Diazoxid auf die Aktivität auditorischer Neurone keinerlei Einfluß hat, muß davon ausgegangen werden, daß Diazoxid das EP durch Beeinflussung anderer Ionkanäle unabhängig von der Haarzelle absenkt. Mögliche Kandidaten sind Ionkanäle im Bereich des Tegmentum vasculosum, das für die Generation des EP mit verantwortlich ist.
4. Eine endolymphatische Amilorid-Applikation erhöht frequenzabhängig und dosisabhängig die CAP-Schwelle, wobei die Schwellenanhebung mit Anstieg der Frequenz steigt (gemessener Bereich 125-2000Hz). Bis zu einer Frequenz von 400Hz hat Amilorid kaum einen Effekt auf das CAP, oberhalb 400Hz steigt die Schwelle mit einem Gradienten von 11 dB/Okt an.
5. Diazoxid hat bei Applikation in die Scala media keinen Einfluß auf das CAP.
6. Die endolymphatische Applikation von Amilorid erniedrigt die akustisch evozierte Entladungsrate und erhöht die spontane Entladungsrate afferenter Neurone aus dem Ganglion cochleare. Diese Veränderungen sind abhängig von der charakteristischen Frequenz und der applizierten Menge, wobei der Frequenzbereich der charakteristischen Frequenz der nicht reagierenden

Einzelfaserableitungen. zwischen 126-632 Hz lag, der der reagierenden zwischen 704 und 1200 Hz.

7. Bei den afferenten Neuronen, bei der die akustisch evozierte Aktivität nach endolymphatischer Applikation von Amilorid ansteigt, kommt es auch zu einer Veränderung der von der evozierten Aktivität abhängigen Parameter Q_{10dB} , Tief- und Hochfrequenzflanke und charakteristischer Frequenz. Die endolymphatische Amilorid-Konzentration bei diesen Einzelfaserableitungen lag zwischen $91\mu\text{M}$ und $269\mu\text{M}$.

8. Die charakteristische Frequenz wird durch Amilorid erniedrigt, allerdings kommt dies durch eine stärkere Abnahme der evozierten Rate oberhalb der charakteristischen Frequenz zustande.

9. Die Gruppeneinteilung ist bis auf ein Neuron bei Veränderungen spontaner und akustisch evozierter Entladungsrate gleich. Bei einem kam es zu einem Anstieg der spontanen Entladungsrate, aber nicht zu einer Abnahme der akustisch evozierten Entladungsrate. Dies legt nahe, daß 1. die Veränderungen auf Beeinflussung unterschiedlicher Ionleitfähigkeiten beruht, und 2. die Ionleitfähigkeit, welche für die Veränderung der spontanen Entladungsrate verantwortlich ist, etwas sensibler für Amilorid ist, als jene, welche für die Veränderung der evozierten Entladungsrate verantwortlich ist.

10. Der Anstieg der evozierten Rate steht in guten Einklang mit den Ergebnissen von Jørgensen und Ohmori (1988), die zeigen konnten, daß Amilorid den mechano-elektrischen Transduktionskanal von Vogelhaarzellen mit einem IC_{50} von $50\mu\text{M}$ blockiert. Der Anstieg der spontanen Entladungsrate kann mit einem Block des Transduktionskanals nicht erklärt werden. Es muß also noch eine andere Leitfähigkeit in dem Innenohr der Taube durch Amilorid blockiert werden.

11. Zusammen mit den Ergebnissen anderer Studien legen die Ergebnisse nahe, daß es sich hierbei um eine Ionleitfähigkeit im Bereich der apikalen Membran handeln

muß. Mögliche Kandidaten wären Ca^{2+} -Kanäle, welche an Ca^{2+} -abhängigen Prozessen zur Regulierung der Ciliensteifigkeit bzw. Cilienmotilität beteiligt sind.

12. Diazoxid hat bei Applikation in die Scala media keinen Einfluß auf die Aktivität auditorischer Neurone.

13. Bei Applikation in die Scala tympani hat weder Amilorid noch Diazoxid Einfluß auf das CAP.

2. Versuchsidee und Zielsetzung der Untersuchung

Einführung:

Ein am Trommelfell ankommender akustischer Reiz versetzt den im Mittelohr befindlichen knöchernen Apparat in mechanische Schwingungen, die auf das Innenohr übertragen werden. Die akustische Energie wird in Form einer Wanderwelle entlang der Basilarmembran weitergeleitet. Dabei schwingt die Basilarmembran, frequenzabhängig, an unterschiedlichen Stellen maximal und führt zu einer tonotopen "Verteilung" der Frequenzen entlang der Cochlea. Dabei werden hohe Frequenzen basal und tiefe Frequenzen apikal in der Cochlea repräsentiert.

Die Schwingungen der Basilarmembran werden dann durch die Sinneszellen des Innenohrs, die sich auf der Basilarmembran befinden, in elektrische Größen, in Nervenaktionspotentiale umgewandelt. Mit anderen Worten, es erfolgt eine mechano-elektrische Umsetzung (mechano-elektrische Transduktion). Die Sinneszellen des Innenohrs werden wegen ihrer Villi auf ihrer der Scala media zugewandten Seite (apikalen Membran) als Haarzellen benannt. Der adäquate Reiz für die Haarzelle ist die mechanische Abscherung der Stereovilli durch die Auslenkung der Basilarmembran. Das Bewegen der Villi bewirkt eine Änderung des Rezeptorpotentials in der Haarzelle. Im Falle einer Depolarisation erfolgt eine Transmitterausschüttung an der basolateralen Membran der Haarzelle. Die die Haarzelle kontaktierende Synapse wird erregt und ein Aktionspotential wird generiert.

Dabei gibt es für jede Haarzelle eine optimale Frequenz (CF=charakteristische Frequenz) bei der mit minimaler Schallintensität des akustischen Reizes ein Rezeptorpotential generiert wird.

Dies ergibt sich zum einen aus der Frequenzkodierung durch das Ortsprinzip, d.h. der oben beschriebenen Tonotopie durch die frequenzabhängige Ausbildung eines Maximums der Schwingungsamplitude der Wanderwelle auf der Basilarmembran.

Zum anderen ist die Güte der Abstimmung der neuronalen Aktivität von auditorischen Nervenfasern bei der Taube besser als die der Basilmembran durch die Wanderwelle (Gummer et al., 1987; Klinke, 1993), was nahe legt, daß es noch andere Abstimmmechanismen geben muß, die die Frequenzselektivität des Innenohrs von Vögeln verbessern.

Es wird diskutiert, daß die verschiedene Länge der Stereovilli einzelner Haarzellen zur Frequenzselektivität der Haarzellen beitragen (Tilney et al., 1983; Gleich und Manley, 1988).

Ein anderer möglicher Mechanismus, die Frequenzabstimmung zu verbessern, ist ein elektrisches Filter, das den Eigenschaften der Membran der Haarzellen zugeschrieben wird. Tatsächlich beobachtet man mit der Ganzzell-Meßtechnik bei Haarzellen von Submammaliern (Vögeln, Fröschen und Schildkröten) nach pulsartigen mechanischen oder elektrischen Reizungen ein Oszillieren des Membranpotentials (Crawford und Fettilplace, 1980, Crawford et al., 1981; Art et al., 1987; Hudspeth et al., 1988; Fuchs et al., 1988; Wu et al., 1995).

Als Erklärung dieser Beobachtungen nimmt man eine Interaktion verschiedener Ionleitfähigkeiten der Haarzellmembran an, die in der Haarzelle eine elektrische Resonanz erzeugt (Crawford et al., 1981; Lewis und Hudspeth, 1983; Art et al., 1987; Hudspeth et al., 1988, Wu et al., 1995).

Es wird daher die Existenz eines elektrischen Filters postuliert, das auf dem Zusammenspiel dieser Ionleitfähigkeiten basiert und möglicherweise zu einer Abstimmung der Haarzelle führt (Hudspeth, 1986; Art et al., 1987; Hudspeth et al., 1988, Wu et al., 1995).

Auch die Beobachtung von Periodizitäten im Entladungsmuster der spontanen Aktivität afferenter Neurone sprechen für ein elektrisches Filter der Haarzelle. Hierbei zeigte sich bei einem Teil der afferenten Fasern eine bevorzugte Intervalllänge zwischen zwei spontanen Aktionspotentialen, welche etwa dem Kehrwert der Charakteristischen Frequenz dieses Neurons entspricht (Temchin, 1988; Manley, 1990; Klinke 1994; genaueres s. allg. Vorbem. z. Physiologie, Kap. 3.2.).

Ziel der Studie:

In der vorliegenden Arbeit sollen Mechanismen untersucht werden, die zur Frequenzselektivität des Hörorgans der Vögel beitragen. Wie beschrieben, wird vermutet, daß die Frequenzselektivität des Innenohrs der Vögel zu einem erheblichen Umfang von den Filtereigenschaften einzelner Haarzellen abhängt. Dabei wird das Filter durch die Eigenschaften von Ionenkanälen in der Membran der Haarzellen bestimmt. Untersuchungen an isolierten Haarzellen zeigen, daß diese Ionenkanäle u.a. wahrscheinlich schnelle kalziumgesteuerte Kaliumkanäle sind. Die Hypothese für die vorliegende Arbeit ist es daher zu testen, in wieweit das postulierte elektrische Filter in der Membran der Haarzellen zur Kodierung von Schallinformation im Innenohr beiträgt. In den Versuchen sollen daher Substanzen, die die Leitfähigkeiten von Ionenkanälen selektiv verändern, in das Innenohr von Tauben injiziert werden. Durch gleichzeitige Aufzeichnung von Einzelfaseraktivität auditorischer Neurone läßt sich dann bestimmen, ob und in wieweit Ionenkanäle im Innenohr von Vögeln zur Verbesserung der Frequenzabstimmung beitragen.

3. Anatomie und Funktion des Innenohrs der Taube

3.1. Anatomie

3.1.1. Äußeres Ohr und Mittelohr

Beim Vogel unterscheidet man zwischen einem äußerem, einem Mittel- und einem Innenohr. Der Gehörgang ist nach außen mit Deckfedern bedeckt und daher nicht sichtbar. Der Schall gelangt über einen etwa 4,5 cm langen äußeren Gehörgang an das Trommelfell, der Grenze zwischen äußerem Ohr und Mittelohr (Necker, 1983).

Im Mittelohr wird die Schallenergie mittels einer knöchernen Struktur auf die flüssigkeitsgefüllten Räume des Innenohrs übertragen. Die Strukturen heißen die Extracolumella und die Columella. Die Extracolumella besteht aus drei Untereinheiten: Extra-stapedius, Infra-stapedius und Supra-stapedius, welche fast orthogonal zueinander stehen. Das freie Ende des Extra-stapedius spannt das Trommelfell nach außen auf, wodurch dieses eine konische Spitze nach außen ausbildet (Saunders, 1985; Gummer et al., 1989a). Die Columella ist über eine Synchronrose mit der Extracolumella verbunden und endet an der dem Innenohr zugewandten Seite mit der Columella-Fußplatte, welche direkt dem ovalem Fenster der Cochlea aufliegt. Die beiden Mittelohren stehen über luftgefüllte spongiöse Räume untereinander in Verbindung. Über die Tubae eustachii stehen sie mit der Mundhöhle und damit mit der Außenwelt in Verbindung (Necker, 1983).

3.1.2. Innenohr

Das Innenohr setzt sich aus 2 Untereinheiten zusammen: dem Vestibularorgan und dem Hörorgan, der Cochlea. Der Begriff Cochlea (Schnecke) wurde von den Säugern übernommen, bei welchen das Hörorgan tatsächlich die Form einer Schnecke hat. Dies trifft bei Vögeln nicht zu, vielmehr hat das Organ eine längliche, in sich gedrehte, leicht gebogene Form und im Falle der Taube (Columba) eine Länge von ca. 4,4 mm und eine mittlere Breite von ca. 0,23 mm (Schwartzkopff u. Winter, 1960). Das Innenohr liegt in der Knochenspongiosa des occipital-ventralen Schädelteils. Das apikale Ende der Cochlea bildet die Lagena.

Sie liegt der Unterseite des Schädels an, wo sie sich hinter der Hypophyse der Mediane nähert (Schwartzkopff u. Winter, 1960).

Die Cochlea kann grundsätzlich in drei Räume unterteilt werden: Scala vestibuli und Scala tympani, die beide mit Perilymphe gefüllt sind, und die dazwischen liegende Scala media, die mit Endolymphe gefüllt ist. Endolymphe und Perilymphe unterscheiden sich in der Zusammensetzung, insbesondere der Konzentration der einzelnen Ionen.

Perilymphe ist reich an Na^+ -Ionen und gleicht der extrazellulären Flüssigkeit. Endolymphe dagegen ist reich an K^+ -Ionen und ist daher mit intrazellulärer Flüssigkeit vergleichbar (Sauer, 1995; Richter et al., 1996, Sauer et al., 1999).

Ionenzusammensetzung von Endolymphe und Perilymphe von Tauben (*Columba livia*, Sauer et al., 1999):

	Na^+	K^+	Cl^-	Ca^{2+}
Perilymphe:	150,0mM	4,2mM	117,0mM	1,4mM
Endolymphe	/	140,6mM	142,1mM	0,23mM

Die Scala tympani befindet sich unter der Basilarmembran. Ihr apikales Ende spaltet sich in das Cavum scalae tympani und den Ductus scalae tympani auf. Das Cavum scalae tympani begleitet die Basilarmembran und endet blind. Der Ductus scalae tympani folgt der Vena cochlearis und steht mit Teilen der Scala vestibuli in Verbindung (Schwartzkopff u. Winter, 1960).

Bei der Scala vestibuli handelt es sich im Gegensatz zur Scala tympani nicht um einen durchgängigen Perilymphschlauch, sondern um einen spaltförmigen Raum der teilweise nur 0,1 mm hoch ist. Am apikalem sowie am basalem Ende erweitert er sich und bildet apikal die Fossa scalae vestibuli und basal die Cisterna scalae vestibuli (Schwartzkopff u. Winter, 1960). Die Fossa scalae vestibuli stellt eine Fortsetzung des Helicotremas dar. Die spaltförmige Verbindung zwischen diesen beiden Erweiterungen, ist mit einem Maschenwerk von Fasern durchsetzt, so daß der Austausch von Perilymphe in der Scala vestibuli nur auf bestimmten engen Bahnen erfolgen kann. Nach apikal grenzt die Scala vestibuli an die Lagena, nach oben wird sie durch das Endost der knöchernen Cochlea begrenzt (Schwartzkopff u. Winter, 1960).

Scala vestibuli und Scala tympani sind im basalen Teil über den Ductus brevis und im apikalen Teil über das Helikotrema miteinander verbunden (de Burlet, 1929; Schwartzkopff u. Winter, 1960; Kohllöffel, 1984). Ein zweiter Kurzschluß

zwischen beiden Perilymphräumen stellt der Ductus brevis dar. Er beginnt am basalen Drittel am inneren Knorpelschenkel, verläuft zwischen Knorpel und Knochen, und mündet in der Cisterna scalae vestibuli, einer Erweiterung des Perilymphraumes der Scala vestibuli zwischen Tegmentum vasculosum und ovalem Fenster (Columella Fußplatte). Weiterhin ist der Perilymphraum über den Aquäduktus (Canaliculus) cochleae mit dem Subduralraum verbunden (Schwartzkopff u. Winter, 1960).

Die Scala media befindet sich zwischen Scala vestibuli und Scala tympani. Von der Scala vestibuli wird sie durch das Tegmentum vasculosum abgetrennt, von Scala tympani durch die Papilla basilaris und die Basilarmembran. Basal steht sie über den Ductus reuniens mit den übrigen Innenräumen des Labyrinths in Verbindung und endet apikal blind in der Lagena (Schwartzkopff und Winter, 1960).

Das Tegmentum vasculosum besteht aus hellen und dunklen Zellen. In der Membran der dunklen Zellen konnte Na^+ - K^+ -ATPase nachgewiesen werden. Weiter Experimente zeigten, daß das Tegmentum aktiv zum Bestandpotential des Innenohrs beiträgt (Kuijpers et al., 1970; Yoshihara, 1987; Schneider et al., 1987). Zur Scala media besitzt das Tegmentum vasculosum eine in Falten gelegte Oberfläche, während es zur Scala vestibuli glatt begrenzt ist (Cotanche et al., 1987). Somit wird auch die Scala media zu einem großen Anteil von den Zotten des Tegmentum vasculosum ausgefüllt.

3.1.3. Basilarmembran und Haarzelle

Die Basilarmembran ist zwischen zwei Faserknorpelspangen aufgespannt, dem Cartilago anterior und posterior, welche beide direkt mit der knöchernen Cochlea verbunden sind. Medial der Basilarmembran befindet sich das Ganglion cochleare. In dem lateral gelegenen Knorpelschenkel verläuft die Arteria cochlearis, welche das Tegmentum vasculosum versorgt (Schwartzkopff und Winter, 1960; Takasaka und Smith, 1971). Auf der Basilarmembran befindet sich die Papilla basilaris, das Sinnesepithel. Es besteht aus in Stützzellen eingebettete Haarzellen. Nur die Stützzellen haben Kontakt zur Basilarmembran. Das Sinnesepithel umfaßt 6000-11000 Haarzellen (Gleich und Manley, 1988; Manley, 1990; Fischer, 1994). Auf der Seite des Cartilago anterior setzt ein Teil des

Sinnesepithels der Knorpelspange auf, der Rest ist frei über der Scala tympani aufgespannt.

Am basalem Ende der Basilarmembran befinden sich quer zum Verlauf (d.h. von Cartilago anterior zu Cartilago posterior) etwa 10, nahe dem apikalem Ende etwa 50 Haarzellen (Takasaka und Smith, 1971).

Bedeckt werden die Haarzellen durch die Tektorialmembran, einer extrazellulären Matrix, die an Epithelzellen des Cartilago anterior ansetzt und sich in Richtung Cartilago posterior verjüngt (Tanaka and Smith, 1975). Nur das jeweils längste Stereovilli einer Haarzelle hat Kontakt zu Tektorialmembran (Rosenhall, 1971; Takasaka und Smith, 1971). Die Relativbewegung der Basilarmembran zur Tektorialmembran bewirkt vermutlich das Abscheren der Microvilli.

Zwischen Haarzellen gibt es direkte Zell-zu-Zell Verbindungen, die aufgrund morphologischer Kriterien in 4 Gruppen eingeteilt werden (Takasaka et al., 1971; Fischer et al., 1991).

Protrusionskontakte, bei denen die Zellmembranen an der Kontaktstelle dicht beieinander liegen und sich eine Verdichtungen, ähnlich der “tight-junction” zeigen, *Berührungskontakte*, bei denen der Abstand zwischen den Zellen nicht vermindert ist und keine Membranveränderungen nachweisbar sind und *Fusionskontakte*, bei denen es zu einer Fusion der Haarzellen kommt und keine Zellmembran an der Kontaktstelle mehr nachzuweisen ist. Bei der 4. Gruppe lassen sich multiple der oben genannten Kontakte nachweisen.

Sogenannte “gap-junctions” wurden nicht nachgewiesen (Fischer et al., 1991). Im Star und dem Huhn gibt es eine typische Verteilung dieser Zellkontakte: Nur Haarzellen über dem Limbus (also die neurale Seite/Cartilago anterior) zeigen Zell-zu-Zell Kontakte, über der freien Basilarmembran sind keine nachweisbar. Sie sind vor allem apikal auf der Papilla vorhanden, während basal keine nachgewiesen wurden (Takasaka et al., 1971; Fischer et al., 1991).

Haarzellen sind nach den Stereovilli benannt, die sie auf ihrer apikalen, der Scala media zugewandten, Membran tragen. Diese Stereovilli bestehen aus in dichte Parakristalin gepackte Aktinfilamente, welche ihnen vermutlich ihre Steifigkeit verleiht (Pickles und Corey, 1992). Die Stereovilli sind hexagonal auf der Oberfläche der Haarzellen angeordnet. Dabei steht auf der einen Seite das größte, das Kinocilium, während sie zur anderen Seite (Richtung Cartilago posterior) der Größe nach abnehmen (Takasaka und Smith, 1971). Im Gegensatz zu Säugern und vielen anderen Vertebraten persistiert dieses Kinocilium im Laufe der

Ontogenese (Klinke und Smolders, 1993). Die Cilien sind an ihrer Spitze durch Proteinfäden (tip-links) mit einander verbunden, wobei die Verbindung zwischen verschieden großen Cilien bestehen (Pickles und Corey, 1992; Pickles et al., 1989).

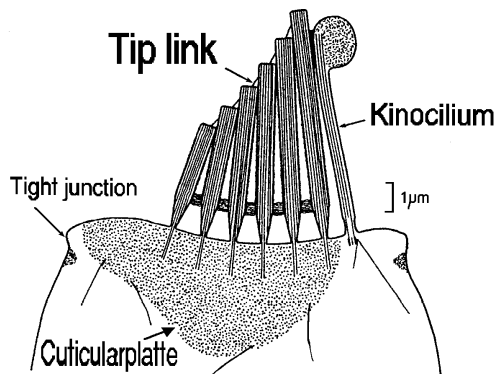


Abb. 3.2.: Es ist schematisch die Anordnung der Stereocilien auf der apikalen Membran der Haarzelle dargestellt. Gewebsbrücken ("tip-links") verbinden jeweils verschieden große Haarzellen. Über die "tight junction" ist die Haarzelle mit jeweils der Nachbar-Haarzelle verbunden. (Haarzelle aus dem Sacculus des Ochsenfrosch. Aus Howard et al., 1988).

Die Stereovilli inserieren an der apikalen Membran der Haarzelle an der sich nach unten trichterförmig verjüngende Cuticularplatte. Die Cuticularplatte besteht aus dem selben fibrillären Material, aus dem auch die Stereovilli zusammengesetzt sind (Takasaka und Smith, 1971).

Bei den Haarzellen des Vogels unterscheidet man zwischen kurzen ("Short Hair Cells"=SHC) und langen ("Tall Hair Cells"=THC) und einem Typ von Haarzellen der praktisch eine Übergangsstufe zwischen beiden darstellt, den "Intermediate Hair Cells"(ImHC) (Takasaka und Smith, 1971). Die Unterscheidung basiert hier auf der Morphologie, dem Verhältnis von Zellhöhe zum Durchmesser der Haarzelle und dem Verhältnis der Tiefe der Cuticularplatte zum Durchmesser der Haarzelle. Bei der THC ist die Zellhöhe und die Tiefe der Cuticularplatte größer als der Durchmesser der Haarzelle. Bei der SHC verhält es sich umgekehrt, die Zellhöhe ist im Vergleich zum Durchmesser kleiner und Tiefe der Cuticularplatte im Vergleich zum Durchmesser der Haarzelle ebenfalls kleiner. Bei der ImHC ist die Zellhöhe der Haarzelle im Vergleich zum Durchmesser größer aber die Tiefe der Cuticularplatte im Vergleich zum Durchmesser der Haarzelle kleiner.

3.1.4. Innervation der Haarzelle

Haarzellen sind sekundäre Sinneszellen und besitzen daher keine eigenen Nervenfortsätze. Sie werden von Bipolarzellen aus dem Ganglion spirale innerviert (Held, 1926; Boord, 1961; zur Übersicht: Manley, 1990). Haarzellen sind sowohl afferent wie auch efferent innerviert (Boord et al., 1961; Takasaka et al., 1971; Fischer, 1991; v.Düring et al., 1985; Fischer, 1994; Keppler et al., 1994; Klinke und Smolders, 1994).

Die meisten Afferenzen aus Ganglion cochleare ziehen durch kleine Öffnungen im Faserknorpel des Cartilago anterior (habenula perforata) zur Papilla basilaris und innervieren dort alle drei Haarzelltypen, aber vorwiegend THCs Die Fasern sind myelisiert (Takasaka et al., 1971). Am dichtesten innerviert sind die Haarzellen in der Nähe des neuronalen Limbus der Papilla basilaris (0-30% Entfernung vom neuronalen Limbus) und 30 bis 70 % entfernt vom Apex der Papilla basilaris (Smolders et al., 1995).

Von einer afferenten Nervenfasern werden 1-2 THCs innerviert. Bei den SHCs divergiert die Innervation deutlich stärker, hier werden von einer afferenten Nervenfasern bis zu 10 SHCs innerviert (Whitehead und Morest, 1985; Düring et al., 1985; Klinke und Smolders, 1993; Fischer, 1994; Fischer, 1992).

Efferent sind in der Papilla basilaris alle Haarzellen sowie auch Hyalinzellen innerviert. Man unterscheidet zwischen dicken Nervenfasern mit transversalem Verlauf über die Basilarmembran, welche SHC und ImHC über der freien Basilarmembran und abneural von den SHCs liegende Hyalinzellen innervieren, und dünnen Nervenfasern, welche ebenfalls SHC und ImHC über der freien Basilarmembran und zusätzlich THC über dem neuralem Limbus innervieren (Takasaka und Smith, 1971; Keppler et al., 1994). Die dicken Fasern, die die Haarzellen über der freien Basilarmembran und die Hyalinzellen innervieren, sind weit verzweigt. Im apikalen Teil der Papilla innervieren efferente Fasern durchschnittlich ca. 7, im basalen Teil der Papilla durchschnittlich ca. 13 Zellen. Die SHCs sind insgesamt stärker efferent innerviert als die THCs (Keppler et al., 1994).

3.2. Physiologie

3.2.1. Potentiale und elektrisches Modell des Innenohrs

elektrisches Modell des Innenohres:

Davis konzipierte 1958 für den Säuger ein elektrisches Modell des Innenohres, welches von anderen Autoren später modifiziert wurde (Leng, 1980; Dallos, 1983; Voßieck, 1991).

Diesem Modell liegen verschiedene Widerstände und zwei Spannungsquellen zugrunde. Morphologische Korrelate der Widerstände sind die apikale Membran der Haarzelle, und die basolaterale Membran. Dabei wird der Widerstand der apikalen Membran überwiegend durch die Offenwahrscheinlichkeit der Transduktionskanäle bestimmt und ist damit ein veränderlicher Widerstand. Das morphologische Korrelat der ersten Spannungsquelle ist die Stria vascularis, ein aktiv Ionen transportierendes Gewebe, das dadurch ein positives Potential erzeugt. Das in der Scala media meßbare Bestandpotential wird endocochleäres Potential (EP) genannt (Tasaki et al., 1954). Die zweite Batterie bestimmen wahrscheinlich aktive Ionentransportprozesse in der basolateralen Membran der Haarzellen. Das sich durch die ungleiche Verteilung der Ionen ergebende elektrochemische Potential kann zwischen Scala tympani und dem inneren der Haarzelle gemessen werden und beträgt etwa -40 bis -80mV (Patuzzi und Bull, 1991).

Die Summe aus dem endocochleären Potential und dem Haarzellmembranpotential ergibt die treibende elektrische Kraft für Kationen über die apikale Membran der Haarzelle. Diese Potentialdifferenz verursacht den Transduktionsstrom durch den Transduktionskanal der Haarzelle.

Zusammenfassend läßt sich dieses elektrische Modell des Innenohres des Säugers als ein Spannungsteiler mit zwei Batterien beschreiben.

Für den Vogel muß dieses elektrische Modell insbesondere für die basolaterale Membran modifiziert werden (Voßieck, 1992). Bei Untersuchungen an isolierten Haarzellen von Submammaliern mit der Ganzzell-Meßtechnik ließen sich nach pulsartiger mechanischer oder elektrischer Reizung Oszillationen des

Membranpotentials nachweisen. Als Ursache wird eine Interaktion verschiedener Ionenkanäle der basolateralen Membran diskutiert (Lewis und Hudspeth, 1983). Dem entsprechend wird in dem nach Voßieck modifizierten Modell die basolaterale Membran der Haarzelle des Vogels durch eine Kapazität und eine Induktivität dargestellt. Das resultierende elektrische Netzwerk zeigt frequenzspezifisches Verhalten (Voßieck).

Abb. 3.4. stellt das von Davis (1958) für den Säuger konzipierte elektrische Modell des Innenohrs Modell, übertragen auf die Verhältnisse beim Vogel, dar (Voßieck, 1991):

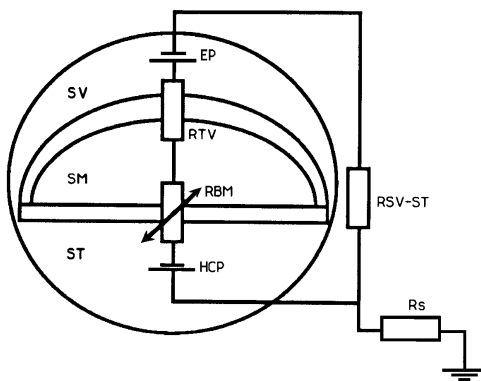


Abb.3.4.: Die Abbildung zeigt das Davismodell der Cochlea, übertragen auf die Verhältnisse des Vogelohres. Die treibende Kraft für den Transduktionsstrom wird durch das endocochleäre Potential und das Gleichgewichtspotential der Haarzellen bewirkt. Über diesen Kreis fließt ständig, auch ohne akustische Reizung, ein Ruhestrom. Durch mechanische Stimulation der Cilien wird der Widerstand der Haarzellen verändert und es kommt zu einer Veränderung des Transduktionsstroms.

EP: endocochleäres Potential, HCP: Haarzellpotential, Rtv: Widerstand des Tegmentum vasculosum, Rbm: Widerstand der Basilarmembran, Rsv-st: Widerstand zwischen Scala vestibuli und Scala tympani, Widerstand gegenüber einem weit entfernten Ort im Körper (nach Voßieck, 1991).

Endocochleäres Potential:

Das endocochleäre Potential der Taube beträgt ca. +10 mV (Jørgensen, 1977; Voßieck und Klinke, 1990). Als Quelle des EPs wird das Tegmentum vasculosum angesehen. Hinweis für diese Aussage ist, daß ab einem Tag vor dem Schlüpfen von Vögeln (Küken) es zur Einfaltung und Volumenzunahme der dunklen Zellen des Tegmentum vasculosum kommt und eine Aktivitätszunahme Ouabain-

hemmbarer Na^+ - K^+ -ATPase nachweisbar ist (Cotanche et al., 1987; Kuijpers et al. 1970). Gleichzeitig ist ein EP meßbar.

Das EP von Vögeln ist unter anderen durch folgende Manipulationen veränderbar: Unter Anoxie fällt das EP auf ca. -20 mV ab (Necker, 1970). Weiterhin führt Applikation von Na^+ -Ionen in die Scala media zur Abnahme des EP (Richter und Klinke, 1991). Furosemid, dagegen hat, wenn es intravenös appliziert wird, bei der Taube keinen Einfluß auf das EP (Schermuly et al., 1983; Schermuly et al., 1990; Voßieck, 1991).

Summenpotentiale der Cochlea:

Am runden Fenster der Cochlea der Taube lassen sich Summenpotentiale der Cochlea messen, die zur Beurteilung des Ohres dienen. Im folgenden sollen das Mikrofonpotential (CM, cochlear microphonics) und das Summenaktionspotential (CAP, compound actionpotential) erklärt werden:

Mikrofonpotentiale entsprechen der Wechselkomponente des akustischen Reiz, folgen diesen praktisch ohne Latenz und sind nicht ermüdbar (zur Übersicht Klinke, 1990 und Dallos, 1996). Die Amplitude ist in der Nähe der Basilarmembran, und hier in der Nähe der apikalen Haarzellmembran, am höchsten und kann einige hundert Mikrovolt erreichen. Daher wurde für den Säuger gefolgert, daß die Mikrofonpotentiale wahrscheinlich durch die Summe der Rezeptorpotentiale der Haarzellen generiert wird (Tasaki et al., 1954; Davis, 1958; Davis, 1965; Dallos und Cheatham, 1976), wobei grundsätzlich gleiches auch für den Vogel gilt (Pierson und Dallos, 1976; Jørgensen, 1977). Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung, daß die Mikrofonpotentiale bereits in der Scala tympani gemessen werden können, im Bereich der apikalen Haarzellmembran maximal sind und es bei der Veränderung des Meßpunktes der Potentiale von Scala tympani zur Scala media zu einer Phasen-Umkehr von 180 Grad kommt, und daher der Ort der Generation dazwischen liegen muß (zur Übersicht Dallos, 1996).

Mit einer kurzen Latenz (0,5 ms) folgt ein Summenaktionspotential (Compound action potential = CAP). Es entsteht durch synchron auftretende Aktionspotentiale einzelner auditorischer Nervenfasern, welche sich summieren (Derbyshire und Davis; 1935; Dallos et al., 1976).

3.2.2. Energieübertragung vom Trommelfell auf das Innenohr und Wanderwelle

Die am Trommelfell ankommende Schallenergie wird durch das Mittelohr auf das ovale Fenster des Innenohres übertragen. Verluste durch Reflexion am Übergang zwischen den verschieden dichten Medien Luft und flüssiger Perilymphe werden durch die Hebelfunktion von Extracolumella/Columella und durch das Flächenverhältnis von Trommelfell zu Columellafußplatte von 17/1 vermindert (Saunders, 1985; Gummer et al., 1989). Das Mittelohr führt am Übergang zur Scala vestibuli zu einer Schalldruckverstärkung von ca. 35 dB (Saunders, 1985; Gummer et al., 1989). Die Übertragungsfunktion des Mittelohres beeinflusst daß Frequenzspektrum des Hörens der Taube, das auf Frequenzen unter ca. 10 kHz begrenzt ist (Saunders, 1985; Gummer et al., 1989; Manley, 1990). Bei der Übertragung von der Columella-Fußplatte auf die Basilarmembran muß der Schall das Tegmentum unter der Cisterna scalae vestibuli passieren. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Gewebe des Tegmentums den selben akustischen Widerstand hat wie die Perilymphe (Schwartzkopff und Winter, 1960).

Der auf das Innenohr übertragene Schall generiert beim Vogel eine Wanderwelle entlang der Basilarmembran mit frequenzabhängiger Lokalisation des Amplitudenmaximums auf der Basilarmembran (tonotope Frequenzabbildung; Gummer et al., 1987). Das Amplitudenmaximum nähert sich mit steigender Frequenz der Basis, die tiefen Frequenzen bilden sich in Richtung Apex ab. In der Taube beträgt die Frequenzauflösung entlang des Innenohrs 0,63 mm/Oktaven (Gummer et al., 1987).

3.2.3. Transduktion durch die Haarzelle

Die durch den Schall verursachten Auslenkungen der Basilmembran führen zu einer Abscherung der Cilien der auf der Basilmembran befindlichen Haarzellen und öffnet somit zugaktivierte Ionenkanäle. Der Mechanismus ist wie folgt: Die Cilien sind an ihrer Spitze durch Gewebsbrücken ("tip-links") mit einander verbunden (Pickles, 1992; Pickles et al., 1989). Dabei verbinden die Tip-links jeweils verschieden große Cilien, so daß es beim Abscheren der Cilien zur Seite des größeren Ciliums zu einer Dehnung und zur Seite des kleineren zu einer Erschlaffung dieser Tip-links kommt. An der Spitze der Cilien befindet sich vermutlich auch der Transduktionskanal (Hudspeth 1982; Hackney et al., 1992, 1994; Kachar, 1999), so daß man davon ausgeht, daß der Transduktionskanal mit den Tip-links assoziiert ist und dieser im Sinne eines Dehnungs-aktivierten Ionenkanals ("stretch-activated channel") durch Dehnung der tip-links geöffnet und bei Erschlaffung geschlossen wird (Howard et al., 1988; Hudspeth, 1994).

Howard et al. (1988) beschreiben den Transduktionskanal durch ein Modell, bei dem sich der Transduktionskanal aus dem Kanalmolekül und einem elastischen Element, im Sinne einer Feder, zusammensetzt. Diese Feder wird durch Auslenkung des Haarbündels in Richtung größere Cilien gespannt. Mit Zunahme der Auslenkung nimmt die Spannung der Feder zu. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, daß der Kanal im Offenstadium vorliegt (siehe Abb.3.5.) von in Ruhe ca. 15% auf wahrscheinlich bis zu 100%. Entsprechend kommt es beim Abscheren der Cilien zur Seite der kleineren Cilien zu einer Erschlaffung der tip-links und damit zu einer Abnahme der Offenwahrscheinlichkeit des Transduktionskanals (Ohmori, 1988; Hudspeth, 1994).

Jede Haarzelle besitzt ca. 100-200 Transduktionskanäle (Hudspeth, 1986; Ohmori, 1985), wobei auf das einzelne Cilium ein einziger oder nur wenige Transduktionskanäle kommen (Hudspeth, 1982).

Wie oben beschrieben, ist der Transduktionsstrom zum einen von den oben beschriebenen Spannungsquellen und damit von der Differenz zwischen EP und Gleichgewichtspotentiale der Haarzelle abhängig, zum anderen vom Widerstand

der apikalen Membran. Der Widerstand der apikalen Membran wiederum hängt von den Offen-Zuständen der Transduktionskanäle ab. Abscheren der Cilien zur Seite der größeren Cilien bewirken eine Öffnung und damit eine Erhöhung der Leitfähigkeit der Transduktionskanäle. Der Ionenstrom durch den Transduktionskanal (Transduktionsstrom) in die Haarzelle wird vermutlich von Kaliumionen getragen, welche in der Scala media den größten Anteil an Ionen stellen (Hudspeth und Corey, 1977; Ohmori, 1985; Hackney und Furness, 1995). Die Kaliumionen-Konzentration in der Scala media beträgt ca. 140 mmol/l, während die Konzentration der Natriumionen <10 mmol/l und die Konzentration anderer Kationen <1 mmol/l beträgt (Sauer et al., 1995; Sauer, 1995). Der Einstrom von Kationen bewirkt eine Depolarisation der Haarzelle. Umgekehrt wird bei Abscheren der Cilien hin zur Seite der kürzeren Cilien die Offenwahrscheinlichkeit der Transduktionskanäle reduziert und die Haarzelle hyperpolarisiert. Die Höhe des Transduktionsstroms ist bis zu $0,6\mu\text{m}$ in Richtung größeres Cilium von der Auslenkung abhängig, darüber hinaus kommt der Transduktionsstrom in die Sättigung (Ohmori, 1986).

Über den oben ausgeführten Mechanismus werden also mechanische Schwingungen, die auf das Innenohr übertragen werden, in Änderungen des Haarzellpotential umgewandelt.

Durch die Depolarisation des Haarzellpotentials werden außerdem Spannungs-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle aktiviert, was zu einer weiteren Depolarisation der Haarzelle führt. Die Depolarisation der Haarzelle bewirkt, vermittelt über Ca^{2+} -Ionen als sekundären Botenstoff, eine Freisetzung eines Transmitters auf die der Haarzelle nachgeschalteten Nervenfasern (genauer s.u., Kapitel 3.2.6. "Primäre afferente Fasern").

Die einströmenden Ca^{2+} -Ionen aktivieren ihrerseits einen Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanal. Die darauf einströmenden K^{+} -Ionen führen zu einer Repolarisation der Haarzelle

Zusammenfassend kommt also es beim Transduktionsprozess durch die Haarzelle mittels Auslenkung der Basilarmembran durch einen akustischen Stimuli zu einer Depolarisation bzw. Hyperpolarisation der Haarzelle. Depolarisation der

Haarzelle bewirkt über Ausschüttung eines Transmitters an der afferenten Synapse ein Aktionspotential des nachgeschalteten afferenten Neurons (Klinke und Evans, 1977; Klinke und Oertel, 1977a-c; Klinke 1981; Klinke 1986; Guth et al., 1991; Ashmore, 1991; Kataoka, 1994, Sewell, 1996). Somit bewirkt die Haarzelle über die Kaskade *Wanderwelle/Auslenkung der Basilarmembran* → *Abscheren der Cilien der Haarzelle* → *Depolarisation der Haarzelle* → *Transmitterausschüttung auf das afferente Neuron* → *Aktionspotential des afferenten Neurons* eine Transduktion von Schallenergie in neuronale Aktivität.

3.2.4. Ionenkanäle der Haarzelle

3.2.4.1 Transduktionskanal

Die Leitfähigkeit des Transduktionskanals für Haarzellen aus dem Sacculus des Ochsenfrosches (bei maximaler Deflektion der Cilien) beträgt 17 pS bei Raumtemperatur (20°C) und 25 pS bei Körpertemperatur (37°C) (Hudspeth, 1986). Für Haarzellen des Huhns ist ein Wert von 50 pS für den einzelnen Transduktionskanal publiziert, und für die gesamte Haarzelle wurde ein Wert von 0,2 nS in Ruhe und ca. 2 nS bei maximaler Cilienauslenkung gemessen (Ohmori, 1987; Ohmori, 1988). Der Transduktionsstrom durch den einzelnen Transduktionskanal hat eine Stärke von 1-3 pA (Ohmori, 1985).

Untersuchungen an isolierten Haarzellen des Küken zeigten, daß der Transduktionskanal ein Spannungs-unabhängiger, nicht-selektiver Kationen-Kanal ist. Für viele Kationen wie Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ und größere positiv geladene Moleküle wie Cholin oder TEA (Tetraethylammonium) ist er durchgängig (Ohmori, 1985; Howard et al., 1988). TEA ist im unhydratisierten Zustand mit einem Durchmesser von ca. 0,7 nm (Molgewicht: 130) das größte Molekül das die Öffnung des Transduktionskanals noch passieren kann. Die Größe der Kanalöffnung läßt sich auf diese Weise abschätzen (Howard et al., 1988). Im intakten Innenohr wird der Transduktionsstrom wahrscheinlich vorwiegend durch Kaliumionen getragen, da Kalium das vorherrschende Ion in

der Endolymphe ist. Obwohl die restlichen Ionen nur ca. 1% des Transduktionsstromes ausmachen, ist ein Minimum an Ca^{2+} von $10\mu\text{M}$ für die Transduktion notwendig (Howard et al., 1988; Ohmori, 1985).

Man geht davon aus, daß der Kanal nur zwei Stadien annehmen kann: ein Offen- und ein Geschlossen-Stadium (Howard et al., 1988).

Die relativ kurze Latenzzeit zwischen Reiz (Abscheren des Haarbündels) und Einsetzen des Transduktionsstromes (Haarzellen aus dem Sacculus des Ochsenfrosches: $25\mu\text{s}$ bei 28°C) ist ein Indiz dafür, daß das Öffnen des Kanalproteins direkt über die Auslenkung reguliert wird und keine Enzyme oder "second-messenger" wie z.B. Ca^{2+} oder Nukleotide zwischengeschaltet sind (Howard, 1988). Sicher ausgeschlossen kann letzteres nach heutigem Wissenstand aber nicht.

3.2.4.2. spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanal

Der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal wird ab Potentialen niedriger als -60 mV aktiviert und ist somit im Bereich des Membranruhepotentials (ca. -57 mV) partiell aktiviert. Da im physiologischen Bereich keine Inaktivierung erfolgt, kommt es zu einem permanenten Influx von Ca^{2+} -Ionen. Dies ist eventuell für die spontane Entladungsrate afferenter Neurone verantwortlich (Hudspeth, 1986). Die Haarzelle des Huhns hat eine relativ geringe Dichte an Ca^{2+} -Kanälen (ca. 200-500 pro Zelle) (Ohmori, 1984). Die meisten Ca^{2+} -Kanäle sitzen überwiegend an der basolateralen Membran, wahrscheinlich in der Nähe der Synapsen (Ohmori, 1984; Hudspeth, 1986). Es befinden sich aber auch Ca^{2+} -Kanäle an der apikalen Membran (Guth et al., 1991). Es handelt sich um spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ. Die Zeitkonstante für die Aktivierungskinetik beträgt für die Haarzelle des Huhns $3,5\text{ ms}$ (Ohmori, 1984). Die Anzahl der Ca^{2+} -Kanäle nimmt mit steigender charakteristischen Frequenz zu, was eine Rolle für die Abstimmsschärfe spielen kann. Die Kinetik des Ca^{2+} -Kanals scheint keine Beziehung zur CF zu haben. Die durch diese Kanäle einströmenden Ca^{2+} -Ionen scheinen auch über eine Beeinflussung der Cilienbündel-Mechanik die Haarzell-

Abstimmung zu beeinflussen (Art und Fettiplace, 1987; Wu et al., 1995; Fettiplace und Fuchs, 1999; Ricci et al., 2000).

3.2.4.3. Ca^{2+} -abhängige K^+ -Ionenkanäle

Durch steigende Ca^{2+} -Konzentration in der Haarzelle wird der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal aktiviert, die Leitfähigkeit für K^+ -Ionen über die Haarzellmembran steigt.

Es gibt mindestens zwei Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle, die sich vor allem in der Größe des K^+ -Stromes unterscheiden. Der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal mit der größeren Leitfähigkeit ist der sogenannte BK-Kanal. Er trägt praktisch den gesamten Auswärtsstrom (Art et al., 1984; Fuchs et al., 1988; Wu et al., 1995).

Es gibt einen Gradienten für die Stromstärke und die Kanalkinetik (d.h. die Schnelligkeit mit der verschiedene Offen-Zustände erreicht werden) dieser Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle in Abhängigkeit von der Lage der Haarzelle auf der Basalmembran (Art und Fettiplace; 1987; Fuchs et al., 1988; Wu et al., 1995; Art et al., 1995, Fettiplace and Fuchs 1999).

So ist der durch diese Ionkanäle getragene Auswärtsstrom der nahe der Basis der Basalmembran gelegenen cochleären Haarzellen von Hühnern dreimal so groß und die Kanalkinetik durchschnittlich 20mal schneller im Vergleich zu auf der Basalmembran apikal gelegenen Haarzellen. Erstere kodieren aufgrund der Tonotopie hohe Frequenzen, letztere kodieren niedrige Frequenzen. Die Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanäle sind über die gesamte basolaterale Membran verteilt, aber weniger im Bereich des Haarzell-Bündels. Bei der Schildkröte liegt die durchschnittliche Dichte bei 0,33 Kanäle/ μm^2 für Haarzellen mit Frequenzen zwischen 200-300Hz und 0,12 Kanäle/ μm^2 für Haarzellen mit Frequenzen bei 50-100Hz (Art et al., 1995). Der Kanal hat ein komplexes Kinetik-Schema, es scheint 5 Geschlossen-Stadien und drei Offen-Stadien zu geben, wobei 4 Ca^{2+} -Ionen binden können (Art et al., 1995; Wu et al., 1995). Der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal läßt sich durch Tetraethylammonium (TEA) blockieren (Hudspeth und Lewis, 1988).

Von den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen mit großer Leitfähigkeit (BK-Kanal), lassen sich die kleinen ("sk"-Typ) Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Leitfähigkeiten unterscheiden (Art et al., 1984; Art et al., 1995; Yuhas und Fuchs, 1999). Diese Ionenkanäle sind mit der efferenten Synapse assoziiert und wahrscheinlich nur in diesem Bereich exprimiert. Sie haben nur geringen Anteil am gesamten K^+ -Ausstrom aus der Haarzelle. Bei der Schildkröte beträgt die Stromstärke dieser Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Leitfähigkeiten vom "sk"-Typ etwa nur ein Zehntel der des BK-Kanals (s.o.), dafür ist er 5mal sensibler für Ca^{2+} -Ionen (bei einem Membranpotential von 50 mV; Art et al., 1995). Sie sind nicht Spannungsabhängig und weniger sensibel für TEA (Art et al., 1984; Yuhas und Fuchs, 1999).

Durch einen muscarinergen Rezeptor der efferenten Synapse und einer Kaskade von Protein G aktivierter Phospholipase C (PLC), welche über IP_3 Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Reservoirs mobilisiert, kommt es zu einer Aktivierung dieser Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanäle, wodurch die Haarzelle hyperpolarisiert wird (Shigemoto et al., 1990+1991).

3.2.4.4. Sonstige K^+ -Kanäle der Haarzelle

Neben der großen (BK-Kanal) und kleinen ("sk"-Typ) Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Leitfähigkeit existiert in der Haarzelle ein spannungsabhängiger K^+ -Kanal aus der Familie der "delayed rectifier", der I_A -Kaliumkanal. Es handelt sich um ein Einwärts-Gleichrichter K^+ -Kanal. Weiterhin kann man eine sogenannte Leck-Leitfähigkeit von o.g. Ionleitfähigkeiten abgrenzen (Hudspeth, 1986; Art und Fettiplace, 1987; Murrow und Fuchs, 1990; Murrow, 1994; Art et al., 1995, Wu et al., 1995; Goodman und Art, 1996).

Die Ionenkanäle im einzelnen:

"Delayed rectifier"

Bei der Schildkröte kommt er eigentlich nur in Zellen mit einer CF unter 50Hz vor, wo es den Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Strom ersetzt als größter Auswärtsstrom (Art et al., 1993; Goodman und Art, 1995).

A-Leitfähigkeit für K^+

An isolierten Haarzellen des Innenohrs des Küken konnte ein für Kaliumionen selektiver Kanal nachgewiesen werden. In der Literatur ist er als der I_A -Kaliumkanal beschrieben (Murrow und Fuchs, 1990; Murrow, 1994). Bei einem Membranpotential von -24mV wird der Ionenkanal innerhalb 7ms aktiviert. Der Kaliumkanal inaktiviert dann innerhalb 73ms (Murrow, 1994). Durch 4-Aminopyridin läßt sich der Kaliumkanal blockieren (Murrow und Fuchs, 1990; Murrow, 1994).

Der $-I_A$ -Kaliumkanal ist nicht in der Membran aller Haarzellen zu finden. Er ist vor allem in Haarzellen des basalen Teil der Papilla basilaris exprimiert. In Haarzellen der apikalen Cochlea kommt er dagegen nicht vor. Außerdem gibt es einen Gradienten quer über die Basilarmembran von neural nach abneural. Während bei den am weitesten neural gelegenen THC dieser Ionenkanal nicht vorkommt, nimmt seine Dichte in der Membran der Haarzellen zur abneural gelegenen Seite zu, wo sich die SHC befinden zu (Murrow und Fuchs, 1990; Murrow, 1994).

Es wird vermutet, daß der I_A -Kaliumkanal mit zur Frequenzselektivität der einzelnen Haarzelle beiträgt, indem er die Zeitkonstanten reduziert.

Einwärts-Gleichrichter Ionenkanal für K^+ -Ionen (K_{IR})

Dieser Ionenkanal für K^+ -Ionen wird bei normaler Na^+ -Konzentration außerhalb der Zelle erst bei Potentialen kleiner als -90 mV aktiviert. Es resultiert ein Einstrom von Ionen in die Zelle. Die Leitfähigkeit nimmt bei Anstieg der extrazellulären Na^+ -Konzentration zu. In der Membran isolierter Haarzellen des Küken wurde der Ionenkanal ebenfalls nachgewiesen. Seine Leitfähigkeit beträgt $50,2\text{ pS}$, wenn die Kaliumkonzentration der extrazellulären Lösung 160 mM beträgt (Ohmori, 1984). Vor allem kommt der Ionenkanal in der Membran der THC vor (Murrow, 1994). Es gibt auch eine Abhängigkeit von der CF der Haarzellen, mit zunehmender Frequenz nimmt er ab und scheint bei Haarzellen mit CFs über 200Hz nicht mehr vorzukommen (Goodman und Art, 1993). Diese Leitfähigkeit verschärft die Abstimmung der Haarzelle (Wu et al., 1995).

Leck-Leitfähigkeit ("leakage conductance")

Dies ist der verbleibende meßbare Strom über die Zellmembran nachdem alle gängigen Ionenkanäle geblockt sind. Sein Wert beträgt etwa 1 nS. Das Umkehrpotential liegt bei etwa -30 mV (Hudspeth, 1986).

3.2.5. Frequenzselektivität und elektrische Eigenschaften der Haarzelle

Wie in Kapitel 3.2.1. dargestellt, wird der auf das Ohr einfallende Schall auf die Basilarmembran übertragen. Entlang der Basilarmembran wird die Energie als eine Wanderwelle weitergeleitet und bildet somit ein frequenzabhängiges Amplitudenmaximum aus. Aufgrund dieser Tonotopie gibt die Haarzelle durch ihre bestimmte Lage auf der Basilarmembran die Frequenzselektivität der Basilarmembran wieder und zeigt somit frequenzabhängiges Verhalten. Vergleicht man die Güte der Abstimmung bzw. die Frequenzselektivität der Basilarmembran mit der der auditorischen Neurone, so sind letztere deutlich schärfer abgestimmt (Gummer et al., 1987). Auditorische Neurone geben die Abstimmungsschärfe der Haarzelle wieder (Crawford und Fettiplace, 1980). Es muß folglich einen Mechanismus geben, der die Frequenzselektivität der Mechanik des Innenohrs signifikant verbessert. Kandidaten für ein solchen Mechanismus sind z.B. die Mechanik der Stereocilienbündel. Es gibt einen Gradienten der Höhe des Cilienbündels entlang der Basilarmembran, so reicht beim Huhn die maximale Höhe des Bündels von 1,5 bis 5,5µm (von Basis bis Apex zunehmend), und die Anzahl der Stereocilien nimmt von 300 bis 50 ab (Tilney and Saunders, 1983). Zum einen ist aufgrund der unterschiedlichen Länge ist ein unterschiedliches Resonanzverhalten und damit ein Einfluß auf die Abstimmung denkbar, zum anderen gibt mit dem Cilienbündel assoziierte Mechanismen, welche sowohl Einfluß auf Frequenzselektivität haben, aber auch die Sensitivität der Haarzelle erhöhen (Hudspeth et al., 2000). Einer dieser Mechanismen ist die sog. *gating compliance*. Mit diesem Mechanismus wird die Tatsache bezeichnet, daß bei Abscherung der Cilien durch einen akustischen Reiz und die darauf folgende Öffnung des Transduktionskanals eine weitere Auslenkung der Cilien ermöglicht und somit der Prozeß der Cilien-Abscherung

verstärkt wird. Dieser Mechanismus ist insbesondere im Bereich der CF und bei Reizen nahe der Ratenschwelle wirksam. Der andere Prozeß ist ein aktiver Adaptions-Mechanismus auf starke Schallreize. Dabei induzieren in den Transduktionskanal einströmende Ca^{2+} -Ionen eine Veränderung der Ansatzpunkte der Gewebsbrücken ("tip-links") zwischen den Cilien. Dadurch erschlaffen diese Gewebsbrücken, wodurch der mit diesen assoziierte Transduktionskanal wieder schließt (Hudspeth et al., 2000). Sofern diese Mechanismen für die Interpretation der eigenen Ergebnisse relevant sind, werden sie im Kap. "Diskussion" entsprechend weiter ausgeführt.

Auch nimmt die Anzahl der Transduktionskanäle und folglich der induzierte Transduktionsstrom ab, da davon ausgegangen wird, das jedes Cilium eine fixe Anzahl von Transduktionskanälen besitzt (Hudspeth, 1989). Auch dies kann die Abstimmung beeinflussen.

Bedeutsamer und auch schon weit erforscht sind aber die elektrochemischen Eigenschaften der Haarzelle, insbesondere der basolateralen Membran.

Bereits 1981 konnten Crawford und Fettiplace zeigen, daß das Membranpotential einer Haarzelle (Schildkröte) eine gedämpfte elektrische Oszillation (sog. "ringing response") zeigt, wenn man die Haarzelle mit einem kurzen Rechteck-Stromimpuls in die Zelle anregt. Diese Oszillation des Membranpotential zeigt sich direkt nach Beginn und nach Abschalten des Impulses. Diese ist unabhängig von der Polarität des Stromimpulses und ihre Frequenz liegt typischerweise im Bereich der charakteristischen Frequenz der Haarzelle (siehe auch Abb. 3.8.a.) (Crawford und Fettiplace, 1981; Fuchs et al., 1988; Art et al., 1986; Lewis und Hudspeth, 1983).

Als Erklärung für diese Phänomene geht man von der Theorie aus, daß die Haarzelle die Eigenschaften eines elektrischen Resonators hat. Dem Modell für diesen auf Haarzell-Ebene liegenden Filtermechanismus liegt das elektronische LRC-Modell zugrunde (L=Induktion, R=Widerstand, C=Kapazität), bei dem in einem einfachen Schaltkreis eine Induktion, ein ohmscher Widerstand, und eine Kapazität (Kondensator) in Reihe geschaltet sind. Diese Anordnung stellt einen elektrischen Schwingkreis dar (siehe Abb. 3.7.). Speist man dem Schwingkreis einmalig Strompulse ein, kommt es zu einer gedämpften Schwingung des

Potentials ,wobei die Frequenz der Schwingung der Resonanzfrequenz des Schwingkreises entspricht (siehe auch Abb. 3.8.a+b).

Diese Eigenschaft eines elektrischen Filters beruhen auf dem Zusammenspiel dreier der oben beschriebenen Ionenkanäle der Haarzelle, nämlich dem Transduktionskanal, dem spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal und dem Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal (Hudspeth, 1986; Hudspeth und Lewis, 1988; Wu et al., 1995; Fettiplace und Fuchs, 1999; Jones et al., 1999).

Wenn der Transduktionskanal sich durch Abscheren der Cilien öffnet, depolarisieren die einströmenden K^+ -Ionen die Zelle. Dadurch wird der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal geöffnet und Ca^{2+} -Ionen strömen in die Zelle und depolarisiert sie weiter. Die steigende Ca^{2+} -Konzentration aktiviert den Ca^{2+} -

Abb. 3.6.:

Abb.3.6. Schematische Darstellung des Resonanzmodells der Haarzelle: Wenn der Transduktionskanal der Haarzelle sich durch Abscheren der Cilien öffnet, strömen K^+ -Ionen ein. Aufgrund der Depolarisation öffnen sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und einströmende Ca^{2+} -Ionen aktivieren ihrerseits einen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal. Dies führt zu einer Repolarisation der Zelle.

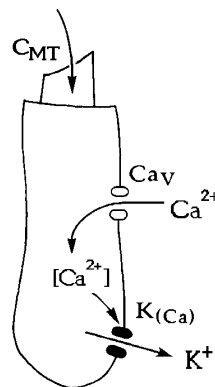


Abb. 3.7.:

R entspricht dem Widerstand über die apikale Membran, L der Leitfähigkeit des Transduktionskanals und C die Kapazität, die sich aus dem endocochleären Potential und dem Gleichgewichtspotential der Haarzellen ergibt. Es gelten folgende Formeln:

$$\ddot{V} + \gamma \dot{V} + \omega_0^2 V = \frac{\gamma I}{C} + \frac{I}{C}, \quad \gamma = R/L, \quad \omega_0^2 = 1/LC, \quad Q = \frac{\omega_0}{\gamma}$$

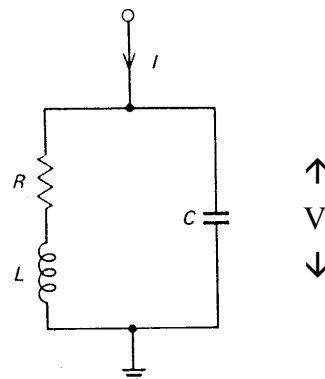


Abb.3.8.:

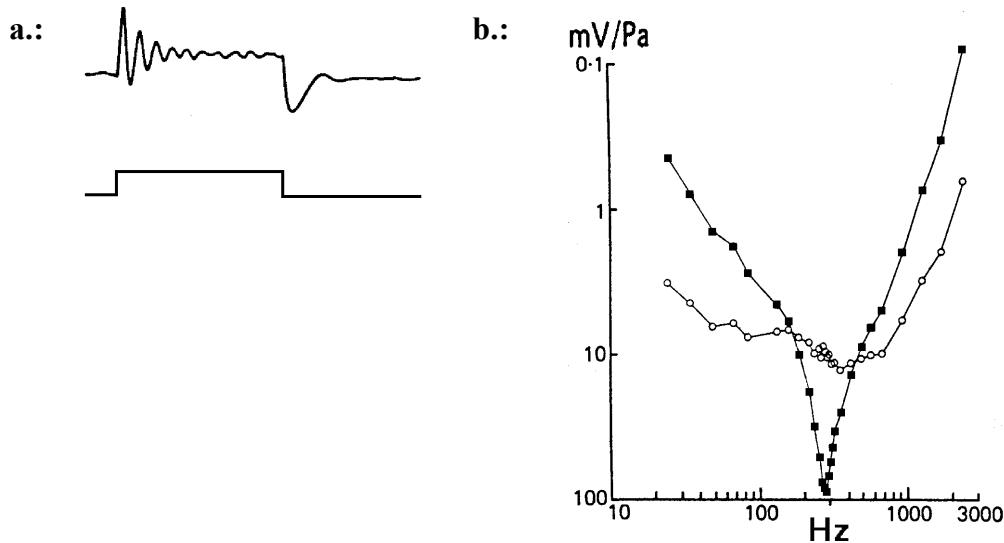


Abb.3.8.a.: Nach Stromeinspeisung mit Rechteckimpulsen in die Haarzelle lässt sich nach Beginn, wie nach Ende des Impulses eine gedämpfte Schwingung des transmembranen Potentials ableiten. Die Frequenz dieser Schwingung liegt im Bereich der charakteristischen Frequenz der Haarzelle (Crawford und Fettiplace, 1981; Hudspeth und Lewis, 1987). Die untere Spur zeigt den eingespeisten Strom, die obere Spur das resultierende Haarzellpotential (nach Hudspeth und Lewis, 1987).

Abb.3.8.b.: Mit diesen Meßergebnissen aus Potentialableitungen bei Strominjektion in die Haarzelle lassen sich theoretische Resonanzkurven der Haarzellen ermitteln (Crawford et al., 1981). Erstellt man nun Abstimmkurven der Haarzellen durch mechanische Stimulation der Cilien bei gleichzeitiger Ableitung des intrazellulären Potentials (■) und subtrahiert die theoretisch ermittelte Resonanzkurve, erhält man die verbleibende Filtereigenschaft dieser Zelle, hätte sie nicht die Eigenschaft eines elektrischen Resonators (○). Bestimmt man diese Restabstimmung mehrerer Haarzellen, zeigt sich für alle etwa der selbe Frequenzgang. Während sich also die Feinabstimmung im Bereich der charakteristischen Frequenz ausreichend durch die Resonanz-Eigenschaften auf Haarzell-Ebene erklären läßt, scheint die Restabstimmung auf Filtermechanismen zu beruhen, die der Transduktion vorgeschaltet sind. Dieser allen Haarzellen vorgeschaltete Filter hat die Eigenschaften eines Bandpassfilter, dessen Ursache wahrscheinlich in der Mechanik von Mittel- und Innenohr und der tonotopen Verteilung der Haarzellen auf der Basilarmembran liegt. Der Hochfrequenzteil läßt sich durch die Übertragungsfunktion des Mittelohres erklären (Crawford et al., 1981).

abhängigen K^+ -Kanal und K^+ strömt aus der Haarzelle, wodurch es zur Repolarisation kommt (siehe Abb. 3.6.). Dabei befinden sich jeweils zwei spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in unmittelbarer Nachbarschaft eines Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanals, wobei das gemeinsame Areal in Haarzellen mit höheren

CFs größer ist als bei Haarzellen mit tieferen CFs (Wu et al., 1995; Ricci et al., 2000). Ca^{2+} wird wahrscheinlich in der Zelle abgepuffert und direkt oder über ein submembranes Kompartiment schnell wieder aus der Zelle ausgeschleust (Hudspeth, 1986; Wu et al., 1995).

Wichtigster Faktor für die Frequenzselektivität ist der Gradient der Deaktivierungskinetik und Verteilung des Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal (BK-Kanal) entlang der Papilla basilaris (siehe auch Kap. 3.2.4.3.) (Crawford und Fettiplace, 1981; Art und Fettiplace, 1987; Hudspeth und Lewis, 1988; Wu et al., 1995; Fettiplace und Fuchs, 1999). Dies wird durch eine variierende Zeitkonstante der Deaktivierung erreicht, welche mit dem Quadrat der CF abnimmt und von 0,5ms bei höchsten Frequenzen bis zu 100ms bei niedrigsten Frequenzen variiert (Art und Fettiplace, 1987; Fuchs et al., 1988; Wu et al., 1995). Erreicht werden die Unterschiede in der Öffnungskinetik durch Variationen verschiedener Untereinheiten des Kanalmoleküls, insbesondere der sogenannten alpha- und beta-Untereinheiten. In der Schildkröte gibt es 7 exprimierte Unterformen der alpha-Untereinheit des BK-Kanals. Koexpression mit beta-Untereinheiten erhöht die Ca^{2+} -Sensitivität des Kanals, verlangsamt aber deutlich die Öffnungs- bzw. Schließkinetik. Die Frequenzabstimmung scheint mittels eines Gradienten der Alpha-Untereinheiten bewerkstelligt zu werden, diese wiederum werden durch Koexpression mit verschiedenen und verschieden vielen beta-Untereinheiten wiederum in ihrer Kinetik variiert (Jones et al., 1998+1999). Die mit beta-Untereinheiten kombinierten Kanäle liegen im apikalen Teil der Papilla basilaris wo sich die Haarzellen mit niedriger CF befinden (Ramanathan et al., 2000). Alterationen der Anzahl der BK-Kanäle und seiner Kinetik und des zeitlichen Verlaufs der Ca^{2+} -Verteilung (Diffusion und Abpufferung) erklären bei der Schildkröte hinreichend das Phänomen der Resonanz und Frequenzselektivität im Frequenzbereich von 16-600 Hz. Ein Anstieg der Kanal-Dichte, sowie das Ausmaß der Ca^{2+} -Leitfähigkeit, scheint für die Schärfe der Abstimmung verantwortlich zu sein (Wu et al., 1995). Die Dämpfung wird in erster Linie von der Leck-Leitfähigkeit ("leakage conductance", siehe Kap. 3.2.4.4.) verursacht (Hudspeth, 1986).

3.2.6. Primäre afferente Fasern

3.2.6.1. Transmitterfreisetzung auf den afferenten Nerven:

Jede Haarzelle ist an der basolateralen Membran über eine Synapse mit einer afferenten Faser des auditorischen Nervens verbunden.

Depolarisation der Haarzelle bewirkt eine Transmitterfreisetzung aus der präsynaptischen Membran. Der Neurotransmitter diffundiert dann über den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran der afferenten Faser und bewirkt dort eine Depolarisation der Nervenfasern und, wenn diese überschwellig ist, ein Aktionspotential. Als Neurotransmitter wird Glutamat angesehen (Guth et al., 1991; Ashmore, 1991; Kataoka, 1994, Sewell, 1996). Afferente Fasern sind selbst nicht aktiv. So zeigen afferente Fasern keine spontane Entladungsrate mehr wenn sie von der Haarzelle losgelöst werden oder die Haarzelle z.B. durch Stromeinspeisung genügend stark hyperpolarisiert wird (Durham et al., 1989; Precht, 1976). Die Entladungsrate der primären afferenten auditorischen Fasern hängt direkt von Potentialschwankungen und der daraus folgenden Transmitterausschüttung der Haarzelle ab. Obwohl beide, die spontane wie auch die evozierte Entladungsrate, von der Transmitterfreisetzung abhängen, scheint es in der Genese beider biochemische Unterschiede zu geben. So reagieren beide unterschiedlich auf Manipulationen des cAMP-Spiegels, Effekte von Glutamat und Glutamat-Antagonisten und Modifizierungen der Ca^{2+} -Homöostase (Guth et al., 1991). Als Quelle der spontanen Entladungsrate der afferenten Faser wird eine permanente basale Transmitterausschüttung aufgrund einer Depolarisation durch einen auch in Ruhe bestehenden Ruhestroms durch den Transduktionskanal angenommen. An dieser auch ohne akustische Stimulation bestehende Depolarisation ist auch die Ca^{2+} -Leitfähigkeit beteiligt (Hudspeth, 1986; Ohmori, 1988; Guth et al., 1991).

Primäre afferente Fasern zeigen eine spontane Entladungsrate (Sachs et al., 1974; Manley et al., 1985; Temchin, 1988; Gummer, 1991; Klinke et al., 1994).

Depolarisation der Haarzelle führt über Transmitterausschüttung über die Synapse zwischen Haarzelle und afferenter Faser zu einer Erhöhung der Entladungsrate der

afferenten Faser (Sachs et al., 1974; Manley et al., 1985; Klinke et al., 1994). Dementsprechend wird die Entladungsrate der primären auditorischen Fasern durch mechanische Manipulationen an den Cilien der Haarzellen durch Schallwellen moduliert. Somit läßt sich eine spontane Entladungsrate, also die Entladungsrate ohne akustische Reizung der Haarzelle, von einer akustisch evozierten Entladungsrate abgrenzen (Sachs et al., 1974; Temchin, 1988; Gummer, 1991).

3.2.6.2. Spontanaktivität primärer afferenter Neurone

Die primären afferenten Fasern der Taube sind spontan aktiv. Dabei liegt die Spontanaktivität zwischen 10 und 200 Impulse/sec mit einer monomodalen Verteilung. Die Werte der mittleren neuronalen Aktivität schwanken je nach Untersuchung zwischen 35 und 115 Aktionspotentialen/Sekunde (Imp./s) (Sachs et al., 1974; Temchin, 1988; Schermuli und Klinke, 1990a+b; Gummer 1991a+b; Klinke, 1994; Smolders et al., 1995). Es gibt eine systematische Beziehung zwischen spontaner Entladungsrate und der CF, wobei die spontane Entladungsrate bei Neuronen mit höherer CF niedriger ist als bei Neuronen mit niedriger CF (Klinke et al., 1993; Smolders et al., 1995).

Neben Fasern mit Poisson-artiger Verteilung des spontanen Entladungsmusters existieren auch Afferenzen, deren spontanes Entladungsmuster ein quasiperiodisches Verhalten zeigen (Manley, 1979; Manley und Gleich, 1984; Manley et al., 1985; Temchin, 1988; Gummer, 1991; Klinke et al., 1994). Bei diesen Fasern treten sogenannte bevorzugte Intervalle zwischen den Aktionspotentialen auf. Trägt man die Häufigkeit der Intervalllängen zwischen sukzessiven Aktionspotentialen auf (sogenannte Intervallhistogramme), so zeigen viele Fasern eine Häufung der Intervalllängen von 0,6-1,1ms. Dies ist am ehesten auf die Refraktärzeit der Fasern zurückzuführen. Darüber hinaus findet sich bei 11,4% aller Fasern bevorzugte Intervalle im Bereich des Kehrwertes der charakteristischen Frequenz. Diese Fasern sind meist sehr sensitiv und haben niedrige Ratenschwellen (Klinke et al., 1994). Sie treten bei Afferenzen mit charakteristischen Frequenzen bis ca. 2 kHz auf (Temchin, 1988; Manley, 1990).

Bevorzugte Intervalle findet man nicht nur in der Intervallverteilung zwischen sukzessiven Aktionspotentialen bei spontan aktiven Neuronen, sondern sie lassen sich ebenfalls durch einen breitbandigen Rausch-Reiz evozieren. Der Schalldruckpegel des Reizes entspricht in etwa der Ratenschwelle des Neurons. Das Intervallhistogramm erinnert an die sinusförmige Antwort von Bandfiltern, welche mit geringer Energie angeregt werden. Die bevorzugten Intervalle dürften daher als generelle Filterantwort sensitiver Neurone auf das Innenohr einwirkende Geräuschquellen interpretiert werden (Gummer, 1991; Klinke et al., 1994). Als Geräuschquellen kommen zum einen minimale Geräusch-Entwicklungen innerhalb der Versuchskammer, zum anderen auch innerhalb des Versuchstieres selbst entstehende Geräusche, wie z.B. Geräusche durch die künstliche Beatmung, Herzgeräusche oder Geräusche durch Blutfluß.

3.2.6.3. akustisch evozierte Aktivität und Abstimmung primärer afferenter Neurone

Auditorische Nervenfasern des Vogels reagieren auf einen akustischen Reiz in Abhängigkeit von Frequenz und Intensität mit einer Erhöhung der Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit.

Bei auditorischen Neuronen von Vögeln mit einer Bestfrequenz kleiner als 4 kHz kommt es zu Phasen-gekoppelten Entladungen (Sachs et al., 1974; Klinke et al., 1994). Eine Ausnahme bilden die Eulen, bei denen Phasen-gekoppeltes Auftreten der Aktionspotentiale bei Reizfrequenzen von bis zu 10 kHz gefunden wird (Köppel et al., 1997). Die Phasenkopplung wird zum Beispiel durch die Modulationsstärke quantifiziert (z.B. Schermuly and Klinke, 1990). Bereits bei Schalldruckpegeln, die 10-30 dB geringer sind als die für die Ratenschwelle ermittelten Schalldruckpegel, findet man bei den Neuronen eine Modulationsstärke von 25% (Klinke et al., 1994)

Als **Ratenschwelle** bezeichnet man den Schalldruckpegel, ab welchen die Entladungsrate über die Spontanaktivität hinaus ansteigt (Sachs et al., 1974; Manley et al., 1985; Klinke et al., 1994; siehe auch "Methode" Kapitel 4.2.2.3.). Ratenschwelle variiert zwischen 11 bis 77dB SPL (Sachs et al., 1974; Sachs,

1980; Klinke et al., 1993). Die Höhe der Ratenschwelle ist u.a. abhängig vom endocochleären Potential, denn Versuche mit Stromeinspeisung in die Scala media bei gleichzeitiger Einzelfaserableitungen haben gezeigt, daß bei künstlicher Erhöhung des EP, die Schwelle sinkt und die Abstimmung schärfer wird. Die Höhe des EPs hat allerdings weder Einfluß auf die spontane Entladungsrate noch auf die charakteristische Frequenz (Voßieck, 1991).

Trägt man die Ratenschwellen für ein Neuron in Abhängigkeit von der Frequenz auf, erhält man eine Abstimmkurve der Faser. Die Abstimmkurve hat ein Minimum bei einer für die Faser **charakteristischen Frequenz (CF)**. Bei Tauben findet man CFs zwischen 30Hz und 6kHz (Klinke et al., 1993).

Es gibt aber bei der Taube auch afferente Neurone, welche nicht abgestimmt sind, dafür aber auf Infraschall (<20Hz) reagieren. Dabei wird die bereits spontan relativ hohe spontane Entladungsrate durch den akustischen Reiz lediglich moduliert im Sinne einer Phasenkoppelung, aber nicht wesentlich erhöht (Schermyly und Klinke, 1990a).

Die durchschnittliche Ratenschwelle ist für Töne zwischen 1 und 2 kHz am niedrigsten (0-20 dB SPL) und steigt mit sinkender CF (Sachs et al., 1974; Klinke et al., 1993; Richter et al., 1995). Die maximale evozierbare Entladungsrate liegt zwischen 119-525 Aktionspotentialen/s (Richter et al., 1995).

Die **Güte der Abstimmung** der afferenten Fasern wird als Bandbreite 10 dB über der Entladungsschwelle (Q_{10dB}) beschrieben. Des weiteren kann der Anstieg der Entladungsschwelle pro Oktave unter bzw. oberhalb der CF bestimmt werden. Der Bereich der Q_{10dB} reicht bei der Taube (für den CF-Bereich 200-1100Hz) etwa von 0,1 bis 8,8 (Smolders et al., 1995). Die Abstimmung der Faser beruht auf der Abstimmung der Haarzelle, welche die Faser innerviert. Die Abstimmung der afferenten Faser ist bei niederen Vertebraten vergleichbar mit Abstimmung des Haarzellpotentials (Crawford und Fetplace, 1980).

Die Güte der Abstimmung ist von der CF abhängig und wird hin zu den niedrigeren Frequenzen schlechter (Klinke et al., 1993; Smolders et al., 1995). Der Anstieg der Entladungsschwelle pro Oktave unter bzw. oberhalb der CF hat in meisten Abstimmkurven die selbe Steilheit, d.h. die Abstimmkurven sind etwa

Achsen-symmetrisch zur CF. Die Güte der Abstimmung ist für THCs in der Regel besser als für SHCs, die Ratenschwellen beider sind aber etwa vergleichbar (Klinke und Smolders, 1993; Smolders et al., 1995).

Modulationsschwelle und Q_{10dB} zeigen eine systematische Abhängigkeit von der CF, wobei mit steigender CF die Ratenschwelle tendenziell sinkt und die Güte der Abstimmung steigt (Klinke und Smolders, 1993; Smolders et al., 1995).

Weiterhin gibt es für die Ratenschwelle und Abstimmung eine Abhängigkeit von der Lage der Haarzellen auf der Basilarmembran. So haben die Haarzellen in der Nähe des neuronalen Limbus, welche auch am dichtesten innerviert sind, eine geringere Ratenschwelle und bessere Abstimmung. Etwa im Bereich 23% entfernt vom neuronalen Limbus ist die Modulationsschwelle am niedrigsten und die Abstimmsschärfe (Q_{10dB}) am höchsten (Smolders et al., 1995).

Die charakteristische Frequenz der primären afferenten Fasern der Vögel läßt sich durch verschiedene Manipulationen des Innenohrs verändern. So führt die Applikation von Na^+ oder TEA (Tetraethylammonium) in die Scala media (Richter und Klinke, 1991; Richter, nicht publ.) oder Absenken der Temperatur (Schermuly und Klinke, 1985) zu einer Verschiebung der CF hin zu niedrigeren Frequenzen. Bei Absenken der Temperatur der Cochlea läßt sich eine Verschiebung von 1 Okt./ $10^{\circ}C$ feststellen (Schermuly und Klinke, 1985). Dieses Phänomen läßt sich auch bei den phylogenetisch älteren Reptilien, nicht aber bei Säugern beobachten (Smolders und Klinke, 1984).

3.2.6.4. Aktivitätsmuster der evozierten Entladungsrate

a.) Ratensuppression durch einzelne Töne:

Normalerweise erhöht ein akustischer Reiz die spontane Entladungsrate (exitatorischer Reiz, Ausnahme: Infraschall-sensitive Fasern, s.o.). Es gibt aber auch Phänomene in der Entladungsrate afferenter Fasern des Innenohrs der Taube, bei der durch akustische Reizung mit Tönen bestimmter Frequenz und Intensität zu einem Absenken der Anzahl der Aktionspotentiale pro Zeiteinheit kommt (Gummer, 1991). Bei dieser Ratensuppression durch einzelne Töne wird die

mittlere Anzahl der Aktionspotentiale durch einen entsprechenden Ton bis unter die bei Ruhe (ohne akustische Reizung) meßbare Rate vermindert (supprimierender Reiz). Die Frequenzen supprimierender Töne liegen ober- und unterhalb der charakteristischen Frequenz (Temchin, 1988; Gummer, 1991). Ein-Ton-Hemmung tritt bei 53% der Afferenzen auf, welche auch bevorzugte Intervalle haben (Gummer, 1991,; s.o.).

b.) Raten-Intensitäts-Funktion

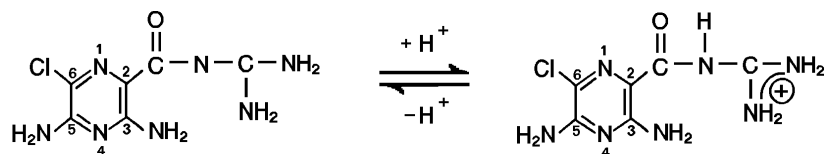
Mit Raten-Intensitäts-Funktion (*rate-intensity-function, RI-function*) wird das Verhalten der akustisch-evozierten Entladungsrate auditorischer Nervenfasern in Abhängigkeit vom Schalldruckpegel des Reizes beschrieben. Liegt die Frequenz des Reizes im Bereich der CF der Faser, steigt bei 37% der Fasern die Entladungsrate sigmoidal an und kommt in die Sättigung (*saturating RI-function*). Bei 50% der Fasern steigt die Entladungsrate kontinuierlich bis etwa 20dB über die Ratenschwelle des Neurons an und ändert danach seine Steigung. Bis zu Schallintensität von max. 115dB SPL zeigen die Fasern keine Sättigung (*sloping RI-function*). Bei 13% der Fasern steigt die Entladungsrate monoton an, ohne in die Sättigung zu kommen (*straight RI-function*) (Richter et al., 1995). Die auditorischen Afferenzen kodieren damit über einen weiten Intensitätsbereich die Intensität des akustischen Reizes. Die Fasern der drei verschiedenen Gruppen unterscheiden sich nicht wesentlich bzgl. ihrer Ratenschwellen, der spontanen und der maximal evozierbaren Entladungsrate (Richter et al., 1995). Durchschnittlich sind die Fasern mit *straight RI-function* besser abgestimmt als Fasern mit *sloping RI-function*, und diese wiederum besser als Fasern mit *saturating RI-function*. (Die gemachten Angaben beziehen sich auf Afferenzen mit CFs zwischen 68Hz und 1414Hz, Richter et al., 1995).

3.2.7. Eigenschaften efferenter Innervation

Efferente Nervenfasern innervieren im Vogel sowohl Haarzellen wie auch die abneural gelegenen Hyalinzellen (Keppler et al., 1994). Cotanche et al. (1992) und Oesterle et al. (1992) zeigten, daß besonders die Hyalinzellen im basalen Anteil

der Papilla basilaris kontraktile Proteine besitzen. Es ist daher denkbar, daß die efferente Innervation der Hyalinzellen über Kontraktion dieser Proteine die Querspannung der Basilarmembran und somit die Mechanik des Innenohrs beeinflussen kann (Klinke und Smolders, 1993; Keppler, 1994). Bei Haarzellen bewirkt die efferente Stimulation eine Hyperpolarisation mittels einer Erhöhung der K^+ -Leitfähigkeit der basolateralen postsynaptischen Membran im Sinne eines IPSP (Art et al., 1984; Keppler et al., 1994). Efferente Fasern haben oft eine große Ausweitung des Versorgungsgebietes, so daß von einer Faser mehrere Haarzellen wie auch Hyalinzellen innerviert werden (Keppler et al., 1994). Diese Beobachtungen legen nahe, daß die efferente Innervation beim Vogel durch den wenig selektiven Einfluß auf die Abstimmung der Basilarmembran wie auch der Haarzelle wahrscheinlich die Funktion einer übergeordneten, unselektiven Sensitivitätskontrolle hat (Keppler et al., 1994). Transmitter ist Acetylcholin (Churchill et al., 1956; Dohmann et al., 1958; Iurato et al., 1971; Ashmore, 1991; Ohmori, 1993).

3.3. Amilorid



3.3.1. Chemische und pharmakologische Eigenschaften

Amilorid ist ein Pyrazinamid mit einer Guanidinogruppe an der Amidgruppe und Aminogruppen in Position 3 und 5 und einem Chlor in Position 6 der Ringstruktur. Mit einem pK_a von 8,8 (in H_2O) ist es eine schwache Base (Benos et al., 1992); das Molgewicht beträgt 266g. Amilorid liegt im physiologischen pH-Bereich als monovalentes Kation vor, seine Ladung trägt es an der

Guanidinogruppe. Diese Säure/Base-Eigenschaften erlauben es Amilorid biologische Membranen zu durchdringen (Benos et al., 1992).

Amilorid hemmt verschiedene, insbesondere Natrium-abhängige Ionenkanäle von Zellen und Zellkompartimenten mit unterschiedlichem IC_{50} (Inhibiting concentration 50: Konzentration des Pharmakons, welche nötig ist um 50% der blockierenden Wirkung hervorzurufen. Zur Übersicht: Kleyman u. Cragoe, 1988).

3.3.2. Wirkung von Amilorid auf isolierte Haarzellen

Amilorid blockiert den Transduktionskanal von isolierten Haarzellen des Vestibularorgans von Küken (Jørgensen und Ohmori, 1988) sowie von äußeren Haarzellen der Cochlea von Mäusen (Rüsch et al., 1994). Die Blockierung erfolgt Dosis- und Spannungs-abhängig, wenn Amilorid an die apikale Membran der Haarzelle infundiert wird.

3.3.2.1. Spannungsabhängige Blockierung des Transduktionskanals durch Amilorid

Im Bereich des negativen Membranpotentials (-50 bis 0mV) bleibt die Beziehung zwischen Membranpotential und Transduktionsstrom nach Blockierung des Transduktionskanals mit Amilorid linear, d.h. der Transduktionsstrom ist im ohm'schen Sinne direkt proportional. Für positive Membranpotentiale (von 0 bis +50mV) zeigt sich aber eine nicht-lineare Beziehung zwischen Anstieg des Membranpotentials und dem resultierenden Transduktionsstrom. Mit anderen Worten, die blockierende Wirkung von Amilorid auf den Transduktionskanal nimmt mit zunehmender Depolarisierung ab. Daher ist bei zunehmende Depolarisation eine überproportional höhere Dosis Amilorid notwendig, um dieselbe Blockierung zu bewirken. Der maximal induzierbare Transduktionsstrom durch entsprechend starke Depolarisation wird durch Amilorid aber nicht beeinflusst (Jørgensen et al., 1988, siehe auch Abb.3.9.a).

3.3.2.2. Konzentrations-abhängige Blockierung des Transduktionskanals durch Amilorid

Neben der Abhängigkeit vom Membranpotential, ist der Block des Transduktionskanals auch von der Konzentration des Amilorids abhängig (siehe

Abb.3.9.a+b). Blockiert man mit verschiedenen Konzentrationen Amilorid, läßt sich aus der Steigung der Transduktionsstrom-Membranpotential-Beziehung für negative Potentiale die verbliebene Leitfähigkeit des Transduktionskanals bestimmen. 0,7 mM Amilorid blockieren den Transduktionskanal fast komplett, für geringere Konzentrationen nimmt die Leitfähigkeit lediglich ab (Jørgensen et al., 1988). Die blockierende Wirkung von Amilorid setzt sofort ein (Jørgensen et al., 1988).

Nach der Michaelis-Menten-Theorie beträgt die Dissoziationskonstante für den Kanalmolekül-Amiloridmolekül-Komplex (K_D , entspricht der IC_{50}) beim Huhn $50\mu M$ (Jørgensen et al., 1988) und für die äußere Haarzelle der Maus liegt der K_D bei $53\mu M$, wobei 2 Amiloridmoleküle an das Kanalmolekül binden (Jørgensen et al., 1988; Rüsç et al., 1994).

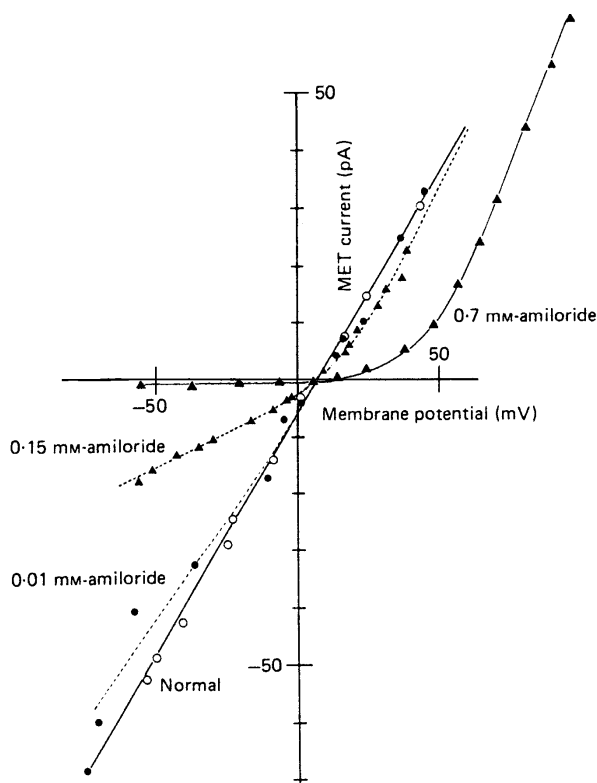
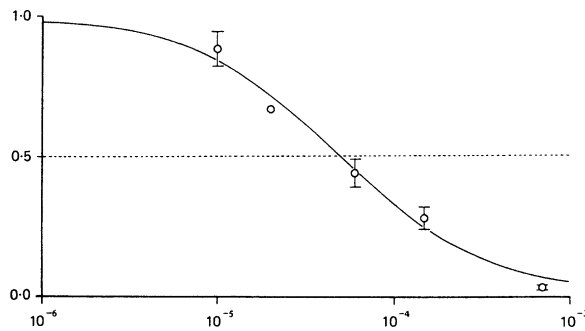


Abb.3.9.a.: Es ist die Beziehung zwischen Membranpotential und Transduktionsstrom dargestellt. Amilorid blockt den Transduktionsstrom in Dosis- und Membranpotential-abhängiger Weise. Die Abbildung zeigt den verbleibenden Transduktionsstrom bei Zusatz von Amilorid in verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit vom Membranpotential (nach Jørgensen und Ohmori, 1988).

Abb.3.9.b.: gibt die verbleibende relative Leitfähigkeit des



Transduktionskanals bei einem Membranpotential von -50mV nach Zusatz von Amilorid in verschiedenen Konzentrationen wider (relativ zur Leitfähigkeit ohne Zusatz von Amilorid). Daraus ergibt sich ein $K_D = 5 \times 10^{-5}$ Mol und ein Hill-Koeffizient von 1 (nach Jørgensen et al., 1988).

3.3.3. Wirkung von Amilorid auf andere Ionenkanäle

Weitere Ionenkanäle, die von Amilorid blockiert werden, sind der Dehnungs-aktivierte mechano-sensitive Kanal, der epitheliale Na^+ -Kanal, der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal, der Na^+/H^+ -Austauscher und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher.

Angaben zur Blockierung der einzelnen Ion-Kanäle:

Amilorid blockt den **Dehnungs-aktivierten mechano-sensitiven Kanal** in den Oocyten von *Xenopus laevis* mit einem IC_{50} von $500 \mu\text{M}$ (gemessen bei einem transmembranen Potential von -100mV, Lane et al., 1991; Lane et al., 1992). Die Kinetik der Blockierung dieses Ionkanals zeigt Ähnlichkeiten zu der des Transduktionskanals der äußeren Haarzelle der Maus (Lane et al., 1992; Rüscher et al., 1994). Das Kanal-molekül unterliegt einer spannungsabhängigen Konformationsänderung (Lane et al., 1991; Lane et al., 1992). Dehnungs-aktivierte mechano-sensitive Kanäle kommen ubiquitär in prokaryoten und eukaryoten Zellen vor und sind in sensorischen Zellen in die mechano-sensitive Transduktion involviert (Hamill et al., 1992).

Der **epitheliale Na^+ -Kanal**, welcher in der apikalen Membran sogenannter "tight epithelia" vorkommt, wird von Amilorid mit einem IC_{50} unter $1 \mu\text{M}$ gehemmt und ist damit der für Amilorid sensibelste Kanal (Benos et al., 1992). Solche Epithelien befinden sich z.B. im distalen Tubulus und den corticalen Sammelrohren der Niere. Durch die Blockierung dieser Ionenkanäle wird die Wiederaufnahme des Na^+ und die passive K^+ -Sekretion gehemmt. Daraus ergibt sich der Einsatz von Amilorid als Kalium-sparendes Diuretikum in der Klinik (Heidenreich und Füllgraff, 1992).

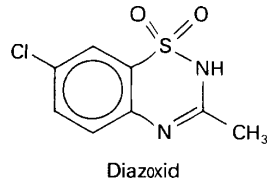
Beim **spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal**. unterscheidet man in Bezug auf Potentialschwelle, ab welcher sie aktiviert werden und der Latenz bis zur Inaktivierung, einen L-, T- und N-Typ (Tang et al., 1988; Garcia et al., 1990). In Neuroblastomazellen der Maus wird der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal vom T-Typ von Amilorid mit einer IC_{50} von $30\mu M$ gehemmt (Tang et al., 1988). Der L-Typ Kanal dieser Zelle wird auch bei Amilorid-Konzentrationen über $500\mu M$ nur zu 20% geblockt (Tang et al., 1988). In Zellen aus der Adenohypophyse der Ratte wird der Ca^{2+} -Influx durch L-Typ Kanäle mit einem IC_{50} von 1,7 mM gehemmt (Garcia et al., 1990). Amilorid blockiert den Kanal von der Außenseite (Tang et al., 1988).

Der in vielen biologischen Prozessen, wie z.B. intrazellulärer pH-Regulation, Regulation des Zellvolumens, involvierte **Na^+/H^+ -Austauscher** wird von Amilorid in einer Konzentration von $4\mu M$ bis $100\mu M$ gehemmt (Johnson et al., 1976; Siebiens et al., 1978; Kleyman und Cragoe, 1988; L'Allemain et al., 1984). Den **Na^+/Ca^{2+} -Austauscher** in Plasmamembran-Vesikel aus der Adenohypophyse von Ratten hemmt Amilorid mit einem IC_{50} von 1-2 mM. Es handelt sich um einen elektrogenen Austausch von 1 Ca^{2+} -Ion gegen 3 Na^+ -Ionen (Kaczorowski et al., 1985; Kleyman und Cragoe, 1988).

Für die Blockierung aller Kanäle gilt folgendes:

Es reduziert sich die mittlere Offenzeit der Kanäle insgesamt, die Leitfähigkeit eines einzelnen Kanals wird aber nicht beeinflusst. Der Block tritt schnell ein und ist reversibel. Aktiv ist Amilorid nur in der protonierten Form, weshalb es im saurem Medium wirksamer ist (Kleyman und Cragoe; 1988). Es liegt dann als monovalentes Kation vor (Benos et al., 1992). Bei pH-Werten ab 11 und höher ist Amilorid vollkommen inaktiv. Amilorid hat die Eigenschaft in Zellen zu akkumulieren. Amilorid diffundiert dabei wahrscheinlich in unprotonierter Form durch die Zellmembran; $t_{1/2}$ für die Amilorid-Aufnahme wird mit 5-10min angegeben (Kleyman und Cragoe, 1988). Für von Na^+ -Ionen abhängige Kanäle ist die Aktivität von Amilorid von der extrazellulären Na^+ -Konzentration abhängig (Kleyman, Cragoe, 1988). Beim epithelialen Na^+ -Kanal ist der IC_{50} außerdem vom extrazellulären pH-Wert und dem apikalen transmembranen Potential abhängig. Die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen scheint notwendig zu sein (Benos und Dale, 1982).

3.4. Diazoxid



3.4.1. Chemische und pharmakologische Eigenschaften

Diazoxid gehört zur Gruppe der Sulfonamide und hat im physiologischen pH-Bereich von pH= 7,4 einen Öl/Wasser-Verteilungskoeffizient von 0,13 und einen Säureexponenten von $pK_s = 8,5$. Die Substanz ist also sehr lipophil und liegt unter physiologischen Bedingungen zu etwa 90% in undissozierter Form vor. Eine Aufnahme in die Zellmembran ist daher wahrscheinlich (Trube et al., 1986).

Diazoxid ist ein Kaliumkanalöffner. Es erhöht die Offenwahrscheinlichkeit des ATP-abhängigen K^+ -Kanals in glatter Muskulatur und β -Zellen des Pankreas und anderen Geweben (Trube et al., 1986; Ashcroft, 1988; Newgreen et al., 1990; Pratz et al., 1991; Anderson, 1992).

3.4.2. Wirkung von Diazoxid auf die Haarzelle

Diazoxid hyperpolarisiert die isolierte äußere Haarzellen des Meerschweinchens (Preyer et al., 1991). Dabei hat Diazoxid bei einer Konzentration bis 50 μ M keine Wirkung auf das Rezeptorpotential, hyperpolarisiert die Haarzelle aber insgesamt. Diazoxid scheint daher bis zu einer Konzentration von 50 μ M keinen Einfluß auf den Transduktionskanal zu haben, beeinflusst wahrscheinlich aber andere ATP-abhängige Kanäle.

3.4.3. Wirkung von Diazoxid auf andere Gewebe bzw. Ionenkanäle

Der Wirkung von Diazoxid liegt auch in anderen Geweben eine Wechselwirkung mit dem ATP-abhängigen Kaliumkanal zugrunde. ATP-abhängige K^+ -Kanäle in verschiedenen Geweben unterscheiden sich in Bezug auf Kanalkinetik und Verhalten gegenüber Kanalmodulatoren (Pratz et al., 1991). Allen gemeinsam ist,

daß sie eine Einzelleitfähigkeit von 50-80pS haben und von Adenosin-tri-Phosphat im Millimolarbereich gehemmt werden (Trube et al., 1986; Ashcroft, 1988). Der Kanal ist hochselektiv für Kalium (Permeabilitätsverhältnis Na^+/K^+ für die β -Zelle des Pankreas: 0,07) und besitzt 1 Offen-Stadium und mindestens 2 Geschlossen-Zustand (Ashcroft, 1988). Der Kanal wird durch Sulphonylharnstoffe wie Tolbutamid oder Glibenclamid geblockt ($\text{IC}_{50} = 7\mu\text{M}$, Hillkoeffizient ≈ 1) (Ashcroft, 1988). Im Folgenden sind zwei Beispiele aufgeführt:

Bei **Myocyten** glatter Muskulatur von Blutgefäßen führt die Öffnung des ATP-abhängigen K^+ -Kanal zur Hyperpolarisation der Myocyten (Anderson, 1992). Die resultierende Tonusabnahme der glatten Muskulatur der Gefäße ist der Grund für die klinische Indikation von Diazoxid bei arterieller Hypertonie / hypertensiven Krisen (Newgreen et al., 1990; Pratz et al., 1991).

An den **β -Zellen des Pankreas** öffnet Diazoxid den ATP-abhängigen K^+ -Kanal ab einer Konzentration von 0,4 mM. Die Öffnung des Kanals führt auch hier zu einer Hyperpolarisation der Zelle und es kommt zu einer Abnahme der Insulin-Ausschüttung aus der Zelle und damit zur Hyperglycämie (Trube et al., 1986). Tolbutamid hat am ATP-sensitiven K^+ -Kanal der β -Zelle des Pankreas einen genau antagonistischen Effekt zu Diazoxid und blockiert ihn mit einem IC_{50} von $7\mu\text{M}$ (Trube et al., 1986).

4. Methode

4.1. Tiere

Versuchstiere waren Brieftauben (*Columba livia*) beiderlei Geschlechts. Das Alter lag zwischen 0,5 und 1,5 Jahren, und das Körpergewicht zwischen 300 und 500 g.

4.1.1. Narkose und Beatmung

Für die *Narkose* wurde Natrium-Pentobarbital ("Nembutal") in den M. pectoralis injiziert. Die Initialdosis zur Einleitung der Narkose waren 50 mg/kg Körpergewicht (KG) und als Erhaltungsdosis wurden stündlich weitere 6-9 mg/kgKG intramuskulär (i.m.) injiziert. Zusätzlich erfolgten weitere Injektionen des Narkotikums, wenn die Herzfrequenz über 180/min anstieg. Zur *Beatmung* der Tiere wurde eine Tracheotomie durchgeführt und ein Trachealtubus eingeführt. Nach Eröffnen der im Bauchraum zugängigen Luftsäcke konnte mit einem wasserdampfgesättigten Gemisch von 96% O₂ und 4% CO₂ kontinuierlich mit einem Volumen von (250-350 ml/min) beatmet werden. Der Zusatz von 4% CO₂ verhinderte das Auftreten einer Alkalose (Schermuly und Klinke, 1985).

Mittels einer rektalen Temperatursonde und einer elektrischen Heizdecke wurde die Körpertemperatur des Versuchstieres konstant auf 40°C gehalten. Die Herzrate wurde während des ganzen Versuchs registriert.

4.1.2. Präparation

Der Kopf des Versuchstieres wurde mit Zahnzement an einen Kopfhalter fixiert. Danach wurde die Nackenmuskulatur von der Schädelkalotte entfernt und der

Schädel dorsolateral eröffnet (Manley et al., 1977; Schermuly und Klinke, 1990; Voßieck et al., 1990). Nach dem Entfernen eines Teils der Schädelkalotte und der darunter liegenden Spongiosa zeigte sich der Recessus tympani und die Columellar-Fußplatte. Am Rand der Columella Fußplatte wurde der Knochen über der Scala vestibuli entfernt und das Tegmentum vasculosum dargestellt. In der Tiefe des eröffneten Recessus scalae tympani wurde das Ganglion cochleare sichtbar (Manley et al., 1977; Schermuly et al., 1985; Voßieck et al., 1990).

4.2. Versuchsaufbau

4.2.1. akustisches Reizsystem

Als akustischer Reiz für die Ermittlung des CAPs wurden von einem Sinusgenerator ("arbitrary wave form generator" Model 75, Wavetek) kurze Tonsignale (Tonpips) generiert. Die Länge der Tonpips betrug 6 Perioden des Tons, die Amplitude zeigte einen gaußförmigen Verlauf.

Zur Bestimmung der akustisch evozierten Aktivität von auditorischen Neuronen im Ganglion cochleare diente ein von einem Frequenz-Synthesizer (Wavetek 5100) generierter Ton mit einer Dauer von 100 ms. Die Amplitude des Tonsignals war durch einem 10ms langen rampenförmigen Anstieg und durch einen ebenso langen rampenförmigen Abfall charakterisiert. Zwischen den Reiztönen lagen 100ms Pause.

Die dem Reiz zugrundeliegende Frequenz des Stimulus wird durch ein Programm zur Erstellung von Abstimmkurven vorgegeben. Der Frequenzbereich erstreckte sich von 16 Hz bis 3 kHz.

Die elektrischen Signale wurden in einen selbstgefertigten Abschwächer geleitet und dann durch einen Cyrus-Endverstärker verstärkt. Auf das Taubenohr übertragen wurde der Reiz mittels eines modifizierten Beyer DT-48 Ohrhörer (siehe Abb. 4.1.).

Abb. 4.1.:

Technischer Aufbau zur Generierung des akustischen Reizes:

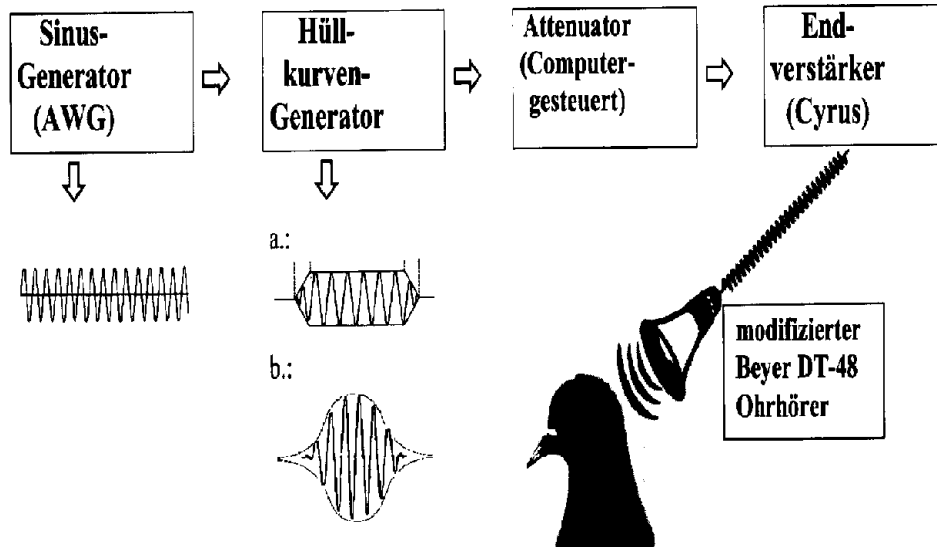


Abb.4.1. zeigt schematisch den technischen Aufbau zur Generierung der akustischen Reize während der Experimente. Ein "arbitrary wave form generator" Model 75 (Wavetek) generiert einen reinen Sinuston, welcher zur Ermittlung der akustisch evozierten Entladungsrate auditorischer Einzelfaser-Ableitungen in die Hüllkurve eines 100ms langen akustische Reizes mit rampenförmigen Anstieg von 10ms und ebensolangen rampenförmigen Abfall eingebettet wird (a), zur Ermittlung des Summen-Aktions-Potentials (CAP) in eine Gauss-förmige Hüllkurven von $\frac{1}{3}$ Oktave Länge (b). Gesteuert durch Computer-Software werden mittels eines Attenuators Frequenz-Intensitäts-Kurven der Einzelfaser-Aktivität bzw. des CAP im Frequenzbereich von 16Hz bis 3kHz erstellt. Auf das Taubenohr übertragen wird der akustische Reiz (verstärkt durch einen Endverstärkers) mittels eines modifizierten Beyer DT-48 Ohrhörers.

Der Schalldruckpegel für verschiedene Frequenzen (0.01Hz-2kHz) wurde mit einem KE4-211 Sondenmikrophon (Senheiser) und einem Heterodyne Analyzer Typ 1020 (Brühl & Kjaer) im Gehörgang gemessenen (siehe Abb. 4.2.). Das Senheiser Mikrophon wurde zuvor mittels eines Brühl & Kjaer Kondensatormikrophons (Typ 4134) geeicht .

Abb. 4.2.

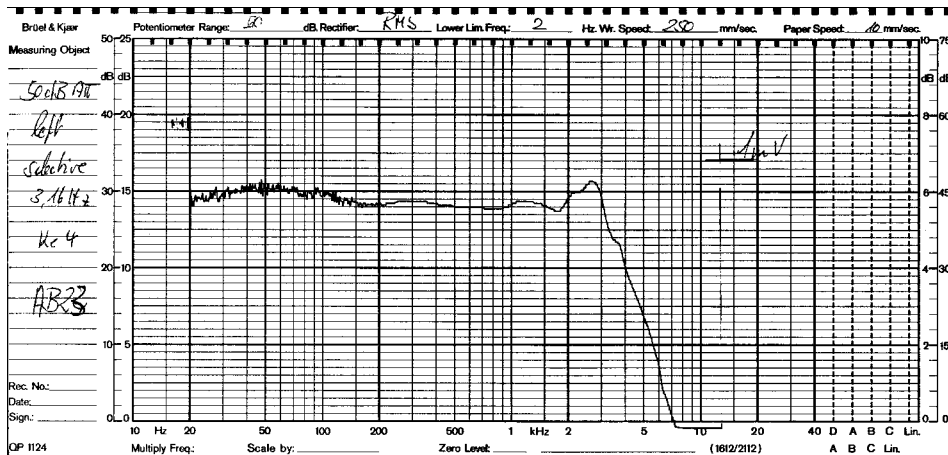


Abb.4.2.: Dargestellt ist gemessene Verlauf der Amplitude des Schallsystems in Abhängigkeit von der Frequenz im geschlossenen Zustand am Ohr der Taube. Der Schalldruck wurde etwa 1 mm vor dem Trommelfell gemessen. Zur Orientierung ist mit dem Eintrag "1mV" der Schalldruckpegel von 124 dB SPL markiert. Die Skalierung entspricht 1/dB SPL. Im Frequenzbereich von 20 - 2000Hz liegen die Schwankungen des Schalldruckpegels unter ± 2 dB.

4.2.2. Datenaufnahme

In den Versuchen wurde das Endocochleäre Potential (EP), das Summen-Aktions-Potential (CAP) und die Aktivität einzelner auditorischer Neurone bestimmt.

4.2.2.1. endocochleäres Potential (EP)

Das EP wurde mit konventionellen Glas-Mikropipetten mit einem Spitzendurchmesser von ca. 15 μ m gemessen. Mittels eines Oriel-Motorantrieb und eines Piezos (PZL007, Burleigh) wurde die Glas-Pipette durch das Tegmentum vasculosum in die Scala media vorgeschoben. Das an der Elektrodenspitze gemessene Potential wurde mit einem List-Medical Vorverstärker (L/M- VCL 3) vorverstärkt und kontinuierlich mit einem CED 1401+/PC System mit einer Rate von 100 Meßpunkten pro Sekunde aufgenommen. Zusätzlich wurde das Potential mit einem Gouldverstärker/schreiber aufgezeichnet. Die Referenzelektrode war in den Nackenmuskeln plaziert.

Der Anstieg des Potentials bei Eindringen in die Scala media (d.h. die Potentialdifferenz zwischen Scala vestibuli und Scala media) entspricht dem endocochleären Potential (siehe Abb. 4.3. und Kap. 3.2.1.). Das EP wurde zu Beginn und am Ende des Experiments bestimmt und aus der Differenz wurde die Veränderung des EPs während des Experiments errechnet. Es wurde also zum einen der Verlauf des EPs direkt während und nach Applikation bewertet, zum anderen die Veränderung des EPs während des gesamten Experiments durch Vergleich eines Ausgangswertes des EPs mit einem Wert am Ende des Experiments.

Abb. 4.3.:

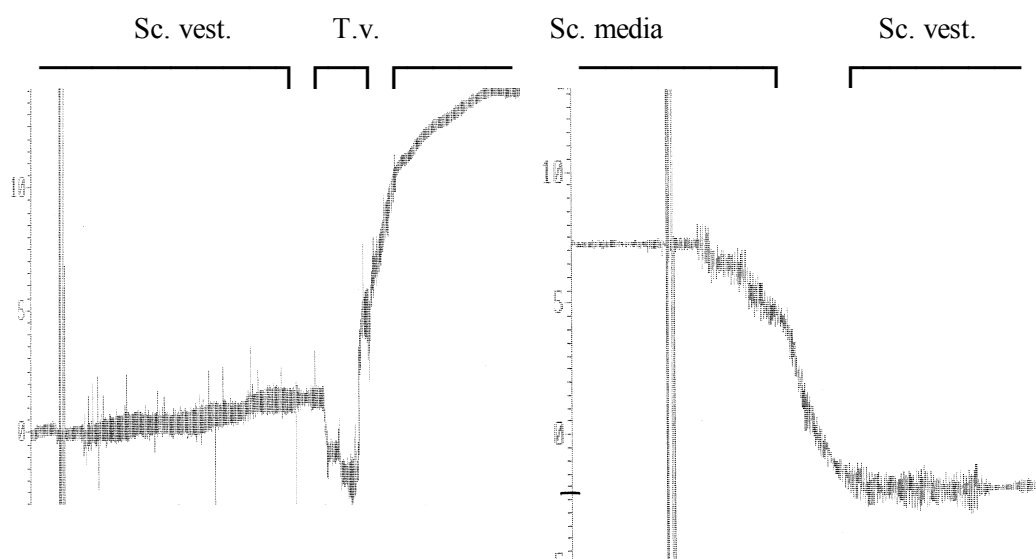


Abb.4.3. zeigt das EP bei (a) Vorschub der Scala-media-Elektrode durch die Scala vestibuli und das Tegmentum vasculosum (T.v.) hindurch in die Scala media vor Applikation und (b) wieder aus der Scala media am Ende des Versuchs. Aus der Differenz zwischen EP-Anstieg und EP-Abfall wurde die Veränderung des EPs durch die Applikation bestimmt.

Mit der Elektrode, mit der das endocochleäre Potential registriert wurde, konnte auch Amilorid und Diazoxid in die Scala media appliziert werden.

4.2.2.2. Summenaktionspotential (CAP)

Das Summenaktionspotential des VIII Hirnnerven wurde am runden Fensters mit einem Silberdraht ($\varnothing = 0,3\text{mm}$) gemessen. Als Referenzelektrode diente ein Ag/AgCl-Elektrode. Sie wurde in ein in Ringerlösung getränktes Wattebausch eingebettet, und unter die Haut des Nackens plaziert.

Die zwischen den beiden Elektroden gemessene Spannung wurde mit einem 5A22N Differential-Verstärker (Tektronix) vorverstärkt, mit einem Hochpaß- und Tiefpaßfilter (Bessel-Filter zweiter Ordnung, Flankensteilheit: 12dB/Oktave) mit den Eckfrequenzen (0,3-3 kHz) gefiltert und schließlich mit einem Preston-Verstärker (8300 XBW Amplifier) verstärkt. Störende Überlagerungen (Kontaminationen) des CAPs durch Mikrofonpotentiale konnten durch die Mittelung der Antwort eines Tonpips und die eines invertierten Tonpips vermindert werden, Eine Invertierung des Schallreizes invertiert das Mikrofonpotential, nicht aber das CAP.

Das CAP wurde auch analog als der Mittelwert von 100 Einzelmessungen bei Reizung mit Tonpips mit einer Reizfrequenz von 1500 Hz aufgezeichnet. Die untersuchten Charakteristika des Potentialverlaufs des CAPs waren die Amplituden des ersten Minimums (N1-Amplitude) und des ersten Maximums (P1-Amplitude) (s. Abb. 4.4.). Außerdem wurden die Differenz zwischen N1- und P1-Amplitude und die Zeitintervalle zwischen Reizdarbietung und Auftreten von N1 und P1 errechnet. Anhand Veränderungen dieser Parameter wurde die Funktion des Ohres bei Versuchen mit Applikation in die Scala tympani beurteilt.

Abb.: 4.4.

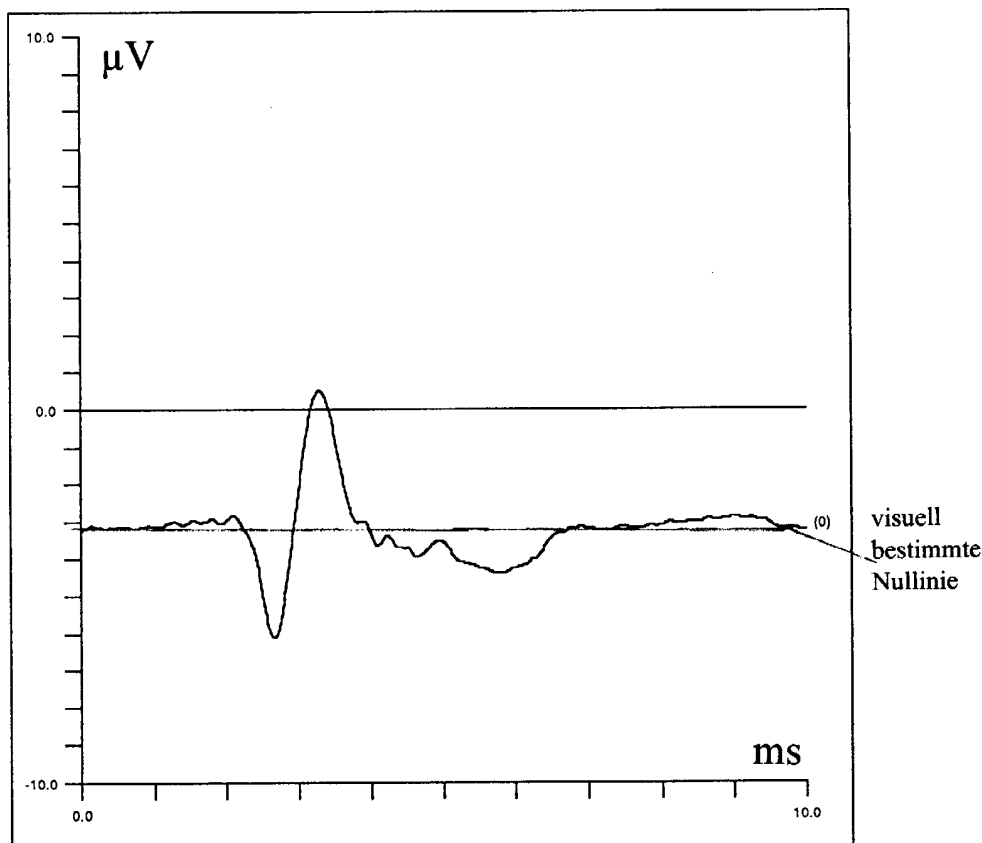


Abb.4.4.: Die Registrierung zeigt das Summenaktionspotential (CAP) nach Reizung mit Gauß-förmigen Tonsignal von 1/3 Oktave Länge. Der erste Peak ist die N-Amplitude, der zweite die P-Amplitude. Visuell wurde die Nulllinie, und von ihr ausgehend die Höhe der Amplituden bestimmt.

Zum anderen wurde die CAP-Schwelle für Frequenzen zwischen 50 und 2500 Hz mit Hilfe eines Computers (*Apple Macintosh II*) ermittelt und CAP-Frequenz-Schwellen-Kurven erstellt. Die CAP-Schwelle ist der Schalldruckpegel, der gerade ein CAP generiert. Diese wurden sowohl bei Versuchen mit Applikation in die Scala tympani wie auch bei Applikation in die Scala media vor und nach Applikation erstellt, um Veränderungen der Funktion des Innenohres zu beurteilen.

Die Schwelle des CAP wurde nach dem von Gummer et al. (1987) publizierten Verfahren bestimmt:

Es wurden die maximale Amplituden zweier 6 ms langer Zeitintervalle verglichen. Das eine Zeitintervall beinhaltet das CAP und beginnt 2 ms nach dem

Start des Tonpips (s). Das Referenzintervall beginnt 9 ms nach Start des Tonpips und enthält kein CAP (n). Verglichen wurden die maximalen Amplituden in s und n . Die CAP Schwelle ist erreicht, wenn die Amplituden der beiden Intervalle gleich groß sind. Dabei wird mit dem Wald-Test (Wald, 1947) überprüft ob mit einer gegebenen Wahrscheinlichkeit die Schwelle erreicht ist. Mit anderen Worten: die Wahrscheinlichkeit P für $s > n$ wurde mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit P' verglichen. Für $P > P'$ wird angenommen, daß $s > n$. Für den Wahrscheinlichkeitsbereich $0,5757 < P' < 0,9243$ kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob die Schwelle erreicht wurde und die Messung muß wiederholt werden. Wenn $s > n$ ist, wird der Schalldruckpegel initial um 8dB erhöht und für $s < n$ um 8 dB erniedrigt, wobei bei jeder Umkehr die Schrittweite für zwei Durchgänge halbiert wurde. Erfolgte jedoch kein Wechsel zwischen Erhöhung und Erniedrigung des Schalldruckpegels, wurde die Schrittweite jeweils nach zwei Schritten verdoppelt. Dabei betrug die kleinste Schrittweite 1 dB, die größte Schrittweite 20 dB. Es wurde zunächst mit hohen Schallintensitäten (100 dB SPL) des Testsignals (Tonpip) gereizt und dann der Schalldruckpegel zunehmend nach unten verändert, bis die CAP-Schwelle erreicht war.

4.2.2.3. Einzelfaserableitung

Eine mit 3 molarer KCl-Lösung gefüllte konventionelle Glas-Mikroelektrode (Widerstand in situ: 10-80 M Ω) wurde mit einem Nanostepper in das Ganglion cochleare vorgetrieben und die Aktivität spontan aktiver afferenter Nervenfasern bestimmt. Die gemessene Spannung der Elektrode wurde mit einem Dagan 800 (Minneapolis, USA) vorverstärkt und in einen Fensterdiskriminator eingespeist. Nervenaktionspotentiale wurden in technische Spikes mit einer Länge von 220 μ s umgewandelt und mit einer Zeitauflösung von 10 μ s von einem CED 1401+/PC System gespeichert.

Datenerhebung bei Einzelfaserableitung:

Die Entladungsrate (Aktivität) der Nervenfasern, d.h. die Anzahl der Nervenaktionspotentiale pro Zeiteinheit, wurde zum einen ohne beabsichtigte akustische Reizung des Innenohres (*spontane Entladungsrate* [Imp./s]), zum

anderen während akustischer Reizung (*akustisch evozierte Entladungsrate* [Imp./s]), bestimmt.

Die Spontanaktivität wurde während eines 10s langen Intervall vor Erhebung der akustisch evozierten Aktivität gemittelt. Die akustisch evozierte Entladungsrate wurde mit einem selbst erstellten Aufnahmeprogramm aufgezeichnet. Dafür wurde die akustisch evozierte Entladungsrate sowohl als Funktion der Frequenz (Schrittweite: 6 bis 8 Schritte pro Oktave) als auch der Schallintensität (Schrittweite: 5 dB SPL) aufgetragen.

Für jede Frequenz gibt es einen Schalldruckpegel des akustischen Reizes, ab welchen es zu einer Erhöhung der akustisch evozierten Aktivität der Nervenfasern über die spontane Aktivität kommt. Der Schalldruckpegel in dB SPL, bei dem es zu einem Anstieg der akustisch evozierten Entladungsrate um 25% über die spontane Entladungsrate kommt, ist als die Ratenschwelle einer Nervenfasern definiert. Die Ratenschwelle in Abhängigkeit von der Reizfrequenz aufgetragen, ergibt eine V-förmige Abstimmkurve.

Zieht man jeweils von der akustisch evozierten Aktivität die spontane Aktivität der Nervenfasern ab, erhält man die oberhalb der Abstimmkurve liegende Antwortfläche des Neurons, wie es als Beispiel in Abb. 4.5. dargestellt ist.

Die nach unten gewandte Spitze der V-förmigen Abstimmkurve gibt die *charakteristische Frequenz* (CF) der untersuchten Nervenfasern an, d.h. die Frequenz des akustischen Reizes, bei der die Ratenschwelle am niedrigsten ist. Die Abstimmcharakteristik kann durch die drei Größen Q_{10dB} , *Hochfrequenzflanke der Abstimmung* (HFF) und *Tieffrequenzflanke der Abstimmung* (TFF) beschrieben werden

Q_{10dB} ist die Bandbreite 10dB über der Ratenschwelle der Faser, d.h. der Quotient aus CF des Neurons dividiert durch die Breite der Antwortfläche des Neurons 10dB oberhalb der CF. Hoch- und Tieffrequenzflanke dagegen stellen die Erhöhung der Entladungsschwelle eine Oktave höher als CF bzw. eine Oktave tiefer als CF dar.

Der Unterschied zwischen Q_{10dB} und Hoch- und Tieffrequenzflanke liegt in der Weite des Frequenzbereiches, über welchen sie eine Aussage treffen: Während Q_{10dB} etwas über die Feinabstimmung im engen Bereich um die charakteristische Frequenz aussagt, läßt die hoch- und die tieffrequente Flanke eine Aussage über den gesamten Bereich der Abstimmung zu.

CF, Ratenschwelle, Q_{10dB} , Hoch- und Tieffrequenzflanke wurden visuell anhand der Abstimmkurven bestimmt.

Als weiterer Parameter wurde die *maximale akustisch evozierte Aktivität*

(maximale Entladungsrate) bestimmt. Sie wurde jeweils bei CF und für Amilorid bei einem Schalldruckpegel von 88 ± 13 dB, für Diazoxid von 85 ± 9 dB bestimmt. Damit liegt der Schalldruckpegel für Amilorid 42 ± 7 dB oberhalb der Entladungsschwelle des jeweiligen Neurons, für Diazoxid 36 ± 16 dB über der Entladungsschwelle des Neurons.

Alle Versuche wurden in einer doppelwandigen schallreduzierten Kammer des Typs IAC 400A; IAC, Staines, UK durchgeführt.

4.2.3. Applikation der Substanzen

4.2.3.1. Applikation in die Scala media

Mit einer in die Scala media vorgeschobenen Mikropipette wird Amilorid bzw. Diazoxid-haltige künstliche Endolymphe mit Hilfe einer Pumpe in die Scala media appliziert (siehe auch Abb. 4.5.).

Die mit der künstlichen Endolymphe gefüllte Mikropipette ist über einen sehr dünnen Schlauch (innerer Durchmesser = 0,26mm; Länge ca. 200mm) mit dieser Pumpe verbunden. Die Pumpe besteht aus einer Hamilton Mikroliterspritze welche über einen Oriol Motor zur Austreibung gebracht werden kann. In diesen Schlauch zwischengeschaltet ist eine Mikrogaskapillare welche ein definiertes Volumen von $1 \mu\text{l}$ ($\pm 5\%$) Volumen faßt und eine Länge von 32,45mm hat. Indem man nun das System von der Spritze bis zur Glaskapillare mit einer farbigen Flüssigkeit füllt, kann man anhand der Wanderung des Übergangs farbig /nichtfarbig innerhalb der Glaskapillare das ausgetriebene Volumen bestimmen. Dieses entspricht dem in die Scala media infundierte Menge Lösung. In dem restlichen Schlauch bis zur Elektrode und in der Elektrode selbst (ca. $31 \mu\text{l}$) befindet sich die künstliche Endolymphe. Die Antriebsgeschwindigkeit des Motorantriebs der Spritze betrug $2-5 \mu\text{m/s}$. 2-4 Minuten nach starten der Applikation war 80% der auszutreibenden Flüssigkeit ausgestoßen (Richter et al., 1994).

Abb. 4. 5. :

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

bei Applikation in die Scala media

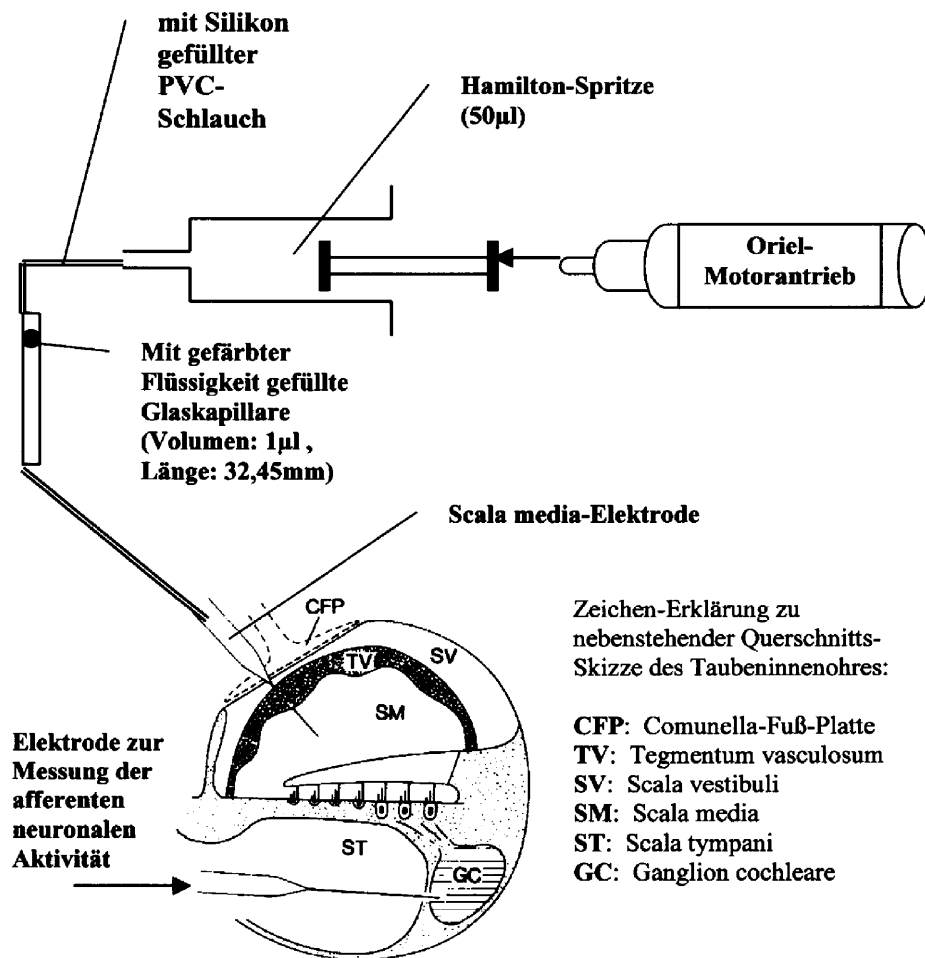


Abb. 4.5. zeigt schematisch den Versuchsaufbau bei Einzelfaserableitung aus dem Ganglion cochleare während Applikation (Amilorid- bzw. Diazoxidhaltiger) künstlicher Endolymphe in die Scala media. Mittels eines Oriel-Motorantriebes wird der Kolben einer Hamilton-Spritze vorgeschoben. Die Spritze ist über ein Schlauchsystem mit der Scala media-Elektrode verbunden. In dieses Schlauchsystem integriert ist eine Glaskapillare mit definierter Länge und Volumen (L.: 32,45mm; Vol.: 1µl). In der Glaskapillare kommt es zu einem Farbübergang (symbolisch dargestellt durch den schwarzen Punkt) zwischen verschiedenen gefärbten Flüssigkeiten. Anhand der Verschiebung dieses Farbübergangs durch die Applikation läßt sich der exakte Flüssigkeitsauswurf in die Scala media ermitteln. In der Scala media-Elektrode befindet sich die künstliche Endolymphe, welche in die Scala media freigesetzt wird. Simultan zur Applikation kann mit einer konventionellen (mit 3 molarer KCL-Lösung gefüllten) Mikroelektrode die Aktivität der Einzelfasern des Ganglion cochleare registriert werden.

4.2.3.2. Applikation in die Scala tympani

Zur Applikation in die Scala tympani wurde ein Teil der Perilymphe (ca. 2µl) an der eröffneten Stelle des Recessus scalae tympani mittels eines kleinen Tupfers abgesaugt. Anschließend wurde mit einer Hamilton-Spritze (10 µl) künstliche (Amilorid bzw. Diazoxid-haltige) Perilymphe mit einer Flußgeschwindigkeit von 1,5-2 µl/min in die Scala tympani appliziert.

4.2.3.3. Applikationslösungen

Die beiden Substanzen, deren Wirkung auf die Innenohrfunktion der Taube untersucht werden soll, wurden hierzu in definierter Konzentration in künstlicher Endolymphe (für Applikation in die Scala) bzw. Perilymphe (für Applikation in die Scala tympani) gelöst. Bei Applikation in die Scala media lag der Konzentrationsbereich für Amilorid bei 1mM, für Diazoxid lag er bei 1-2mM.

Die Zusammensetzung der Amilorid bzw. Diazoxid-haltigen *künstlichen Endolymphe* für Applikation in Scala media bestand aus 24 mM KHCO₃; 10 mM HEPES und 1mM Amilorid bzw. 1-2mM Diazoxid.

Der pH-Wert lag bei 7,4. Die Gesamtosmolarität wurde mit KCl auf 330±5 mM eingestellt.

Die Zusammensetzung der Amilorid bzw. Diazoxid-haltigen *künstlichen Perilymphe* für Applikation in Scala tympani bestand aus 24 mM NaHCO₃; 10 mM HEPES und 1-2 mM Amilorid bzw. Diazoxid

Auch hier lag der pH-Wert bei 7,4. Die Gesamtosmolarität wurde mit NaCl auf 325±5 mM eingestellt.

Bei Applikation in die Scala tympani wurde für die Erhebung von Kontrollergebnissen nach Applikation die Scala tympani anschließend mit künstlicher Perilymphe ohne Zusatz von Amilorid oder Diazoxid gespült. Der Anteil von Amilorid bzw. Diazoxid wurde dabei durch weiteres NaCl ersetzt.

4.3. Erhebung der Daten (Versuchsablauf)

4.3.1. Versuchsablauf bei Applikation in die Scala media

Nach der Präparation des Zugangs zum Innenohr der Taube plazierten wir die CAP-Elektrode in der Nähe des runden Fensters. Zur Kontrolle des Zustands des Ohrs erfolgte die Aufzeichnung von 5 CAP-Frequenz-Schwellen-Kurven (CAP-FSK). Anschließend, nach Eröffnen der Scala tympani und Scala vestibuli, wurden die Elektrode für die Einzelfaserableitungen in das Ganglion cochleare vorgeschoben. Zur Kontrolle des Ohres wurden anschließend weitere 5 CAP-FSK ermittelt. Diese CAP Schwellenkurven dienten als Referenz vor Applikation der Substanzen in das Innenohr dienten. Es folgt das Setzen der Scala media-Elektrode durch welche später auch die Applikation des Pharmakons erfolgt. Vor und nach der Applikation werden jeweils weitere 5 CAP-FSK ermittelt. Die Funktion des Ohres sollte durch die Veränderung von Einzelfaseraktivität auditorischer Nervenfasern bestimmt werden. Hierfür wurden zwei Gruppen von 10-20 Einzelfaserableitungen, die vor und nach Applikation der Substanz in das Innenohr aufgezeichnet wurden, miteinander verglichen (Gruppenvergleich). Weiterhin erfolgte die Aufzeichnung der neuronalen Aktivität einer einzelnen, stabilen Nervenfasern vor, während und nach der Applikation der Substanz.

Nach Ermittlung von 1-2 Abstimmkurven von diesem Neuron (sog. "Applikationsneuron") begann die Infusion der Substanz in die Scala media als Bolusinjektion. Nach der Applikation wurden so lange Abstimmkurven registriert bis das Neuron verloren ging. Danach wurden erneut 5 CAP-FSK ermittelt und die neuronale Aktivität auditorischer Nervenfasern einer Vergleichsgruppe von 10-20 Neuronen für einen Gruppenvergleich erhoben. Abschließend wurden weitere 5 CAP-FSK ermittelt. Das EP wurde während dieses ganzen Applikationvorganges registriert.

Zeigte sich nach der ersten Applikation keine Veränderungen aller erhobenen Parameter, wurde in manchen Fällen ein zweites Mal appliziert. Das Neuron bzw. die erhobenen Parameter (spontane und akustisch evozierte Aktivität, CF und Abstimmstärke) wurden dann ab den Zeitpunkt der zweiten Applikation gewertet (d.h. als Ausgangswerte von spontaner und akustisch evozierter Entladungsrates wurde bei diesen Neuronen der letzte Wert vor der 2. Applikation als

Ausgangswert festgelegt). Als applizierte Wirkstoffdosis wurde jedoch die Gesamtdosis beider Applikationen gewertet. Denn wurde bei jeweils zwei direkt nacheinander abgeleiteten Neuronen appliziert (weil z.B. das zuerst abgeleitete Neuron während der Applikation verloren ging) und war der Zeitabstand dabei weniger als 10 Minuten, mußte davon ausgegangen werden, daß die gesamte Menge Wirkstoff der ersten Applikation sich während der Ableitzeit des zweiten Neurons noch in der Scala media befand. Daher wurde zur applizierten Dosis des zweiten Neurons die Dosis des ersten dazu addiert.

Kontrollexperimente zeigten, daß eine Applikation von künstlicher Endolymphe größer als 0,5 µl bereits das CAP irreversibel erhöhte (Richter et al., 1994). Folglich wurden 0,5 µl als maximales Applikationsvolumen festgesetzt.

4.3.2. Versuchsablauf bei Applikation in die Scala tympani

Auch hier beginnt der Versuch nach Eröffnen der Schädelkalotte mit dem Platzieren der CAP-Elektrode. Während des gesamten Versuchs das CAP registriert, das bei Applikation in die Scala tympani als einzige Meßgröße zur Beurteilung der Funktion des Innenohrs diente. Zu Beginn, als auch nach jeder Infusion von Substanzen ins Innenohr wurden eine CAP-FSK ermittelt. Außerdem wurde der Potentialverlauf des CAPs während akustischer Reizung mit einem Tonreiz von 1500Hz ermittelt. (jeweils eine Mittlung aus 100 Registrierungen). Zur Auswertung herangezogen wurden die N- und die P-Potentiale (s.o.).

Dafür wird die Nulllinie bestimmt und von dieser ausgehend Latenz und Amplitude des N- bzw. P-Potentials ausgemessen. N- und P-Amplitude wurden als Zeitverlaufskurve aufgetragen.

4.4. Statistik

4.4.1. t-Test für verbundene Stichproben

Bei den Verlaufsbeobachtungen einzelner Parameter wurde der t-Test für verbundene (abhängige) Stichproben (sog. gepaarter t-Test) angewendet. Dieser stellt einen Spezialfall des t-Test für unverbundene (unabhängige) Stichproben dar, bei dem 2 Stichproben mit Umfang n_1 und n_2 darauf untersucht werden, ob sie aus von einander unabhängigen Grundgesamtheiten stammen. Dabei wird beurteilt, ob deren Mittelwerte μ_1 und μ_2 gleich sind oder nicht. Die Null-Hypothese lautet also: $H_0: \mu_1 = \mu_2$. Die Alternativ-Hypothese H_1 lautet $\mu_1 \neq \mu_2$.

Wenn die Differenz der Stichprobenmittelwerte (=der ermittelte t-Wert) größer als ein kritischer t-Wert ist, wird H_0 verworfen, beide Stichproben entstammen dann nicht der selben Grundgesamtheit. Der kritische t-Wert ist von einem zuvor festgelegten Signifikanz-Niveau α abhängig (5%=signifikant, 1%=hochsignifikant, 0,1%=höchst signifikant).

Voraussetzung sind für kleine Stichproben (≤ 30) Normalverteilung und gleiche Varianz der Grundgesamtheiten (Varianzhomogenität), wobei die Stichproben dann t-verteilt sind mit $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden.

Der t-Test für verbundene (abhängige) Stichproben (gepaarter t-Test) wird angewendet wenn die Elemente der zwei Stichproben paarweise einander zugeordnet werden können, z.B. wenn an einer Stichprobe zwei Messungen durchgeführt werden, wie es bei den Verlaufsbeobachtungen der einzelnen Parameter nach Applikation von Amilorid bzw. Diazoxid der Fall ist. Im Unterschied zum t-Test für unverbundene Stichproben wird nun die Verteilung der Mittelwerte der Differenzen untersucht.

Es wird eine Stichprobe von Wertepaaren erstellt, und die Differenz dieser Wertepaare (in unseren Fall Differenz zwischen Ausgangswert und Endwert) ermittelt, wobei n die Anzahl der Wertepaare ist.

Es wird nun geprüft, inwiefern sich der Mittelwert der Differenzen von Null unterscheidet. Die Null-Hypothese lautet: Es besteht kein Unterschied der Mittelwerte zu Beginn des Experiments im Vergleich zu einem späteren Zeitpunkt des Experimentes: $H_0: \mu_1 = \mu_2$, die Alternativ-Hypothese lautet entsprechend: $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ bzw. $\mu_1 < \mu_2$ oder $\mu_1 > \mu_2$.

Voraussetzung ist auch hier eine Normalverteilung der Differenzen der Wertepaare, welche mit dem Test auf Normalverteilung nach David, Pearson und Stephens überprüft wurden (Bortz, 1988; Clauß et al., 1985; Nachtigall, 1998). Mit dem t-Test für verbundene (abhängige) Stichproben wurden Veränderungen des EPs und der CAP-Schwelle, die Veränderung der Gesamtamplitude des CAP(N-Amplitude + P-Amplitude) sowie die einzelnen Parameter bei Einzelfaserableitung im zeitlichen Verlauf vor/nach Applikation statistisch auf Gleichheit untersucht ($p = 0,05$).

Bei den Parametern der Einzelfaserableitung werden der zeitliche Verlauf der durchschnittlichen absoluten Abweichung vom Ausgangswert mit ihrer Standardabweichung aufgezeigt

4.4.2. Kolmogoroff-Smirnow-Test

Der Kolmogoroff-Smirnow-Test vergleicht zwei unabhängige Stichproben unbekannter Varianz und unbekannter Verteilung auf Entkommen der selben Grundgesamtheit.

Die Hypothesen sind:

- H0: Beide Stichproben entstammen der selben Grundgesamtheit, d.h. Die Variable hat in beiden Grundgesamtheiten dieselbe Verteilung.
- H1: Beide Stichproben entstammen nicht der selben Grundgesamtheit, d.h. die Verteilungen in beiden Grundgesamtheiten sind verschieden.

Er basiert nicht auf Annahmen über die Verteilungsform der Variablen, sondern setzt nur voraus, daß die Variable, die in zwei unabhängigen Stichproben gemessen wird, stetig ist.

Hierfür werden die Elemente der beiden Stichproben (bei uns: Gruppe von Meßwerten vor und nach Applikation) in Klassen gleichen Abstandes gruppiert und die Häufigkeit in den jeweiligen Klassen bestimmt ($f_1(x)$, $f_2(x)$). Dabei muß beachtet werden, daß bei klassifizierten Daten die Anwendung dieses Tests nur Näherungscharakter trägt. Dann werden die kumulativen relativen Häufigkeiten

(Summenhäufigkeit) $F_1(x)$ und $F_2(x)$ bis einschließlich zu den jeweiligen Klassen und der Absolutbetrag der Differenz $F_1(x) - F_2(x)$ berechnet.

Prüfgröße ist das Maximum D_x des absoluten Betrags der Differenz $F_1(x)/n_1 - F_2(x)/n_2$.

n_1 und n_2 sind jeweiliger Umfang der Stichprobe. Dieser Wert wird mit einem kritischen Wert D_0 verglichen, wobei D_0 das Produkt aus dem Koeffizienten K und der Wurzel aus $(n_1+n_2)/n_1n_2$ ist. K ist direkt von dem Signifikanz-Niveau α abhängig und liegt für $\alpha=0,05$ bei 1,36 und für $\alpha=0,01$ bei 1,63.

Für den Fall, daß $D_x > D_0$ wird die Hypothese H_0 abgelehnt, d.h. beide Stichproben entstammen nicht der selben Grundgesamtheit.

Mit dem Kolmogoroff-Smirnow-Test wurden Stichproben von erhobenen Parametern wie spontane und akustisch evozierte Aktivität, Ratenschwelle und Güte der Abstimmung vor Applikation von Amilorid bzw. Diazoxid mit Stichproben nach Applikation auf Gleichheit der Verteilung untersucht.

Auf graphische Darstellungen der Gruppenvergleiche wurde verzichtet und nur signifikante Veränderungen nach Applikation angegeben. Nicht berücksichtigt wurden bei dieser statistischen Bearbeitung Einzelfaserableitungen, bei denen keine Veränderung der neuronalen Aktivität akustisch evoziert werden konnte.

4.5. Tierhaltung

Die Tauben wurden artgerecht in Volieren bis zu 25 Individuen gehalten.

Die Versuche wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Darmstadt durchgeführt

5. Ergebnisse

5.1. Umfang der erhobenen Daten

Die Wirkung von Amilorid auf die Funktion des Innenohrs nach Applikation in die Scala media oder Scala tympani wurde an 14 Tauben untersucht, die von Diazoxid an weiteren 7 Tauben. Dabei erfolgte in 12 Versuchen die Infusion der Substanz in die Scala media (in 7 Experimenten Amilorid, in 5 Diazoxid) und in 7 Versuchen in die Scala tympani (in 4 Experimenten Amilorid, in 3 Diazoxid).

5.2. Amilorid

5.2.1. Applikation in Scala media

5.2.1.1. endocochleäres Potential

In 7 Fällen wurde das endocochleäre Potential vor Applikation und nach Applikation verglichen und auf Gleichheit untersucht (es wird jeweils Durchschnitt \pm Standardabweichung angegeben).

In den Versuchen wurde das Tegmentum vasculosum, wie in Methoden beschrieben, mit einer Glaselektrode penetriert. Die Penetration der Elektrode in die Scala media konnte durch das positive Bestandpotential bestimmt werden (Abbildung 5.1). Im Mittel betrug das EP $8,71\text{mV} \pm 3,86$. Während der Applikation von Amilorid in die Scala media stieg das EP initial um $2,58\text{mV} \pm 0,86$. Diese Veränderung bildete sich in allen Fällen nach spätestens 4min fast

vollständig auf den Ausgangswert vor der Applikation zurück (Abbildung 5.1, Tab 7.1).

Abb.: 5.1.

Endocochleäres Potential und Entladungsrate bei Applikation von Amilorid in die Scala media

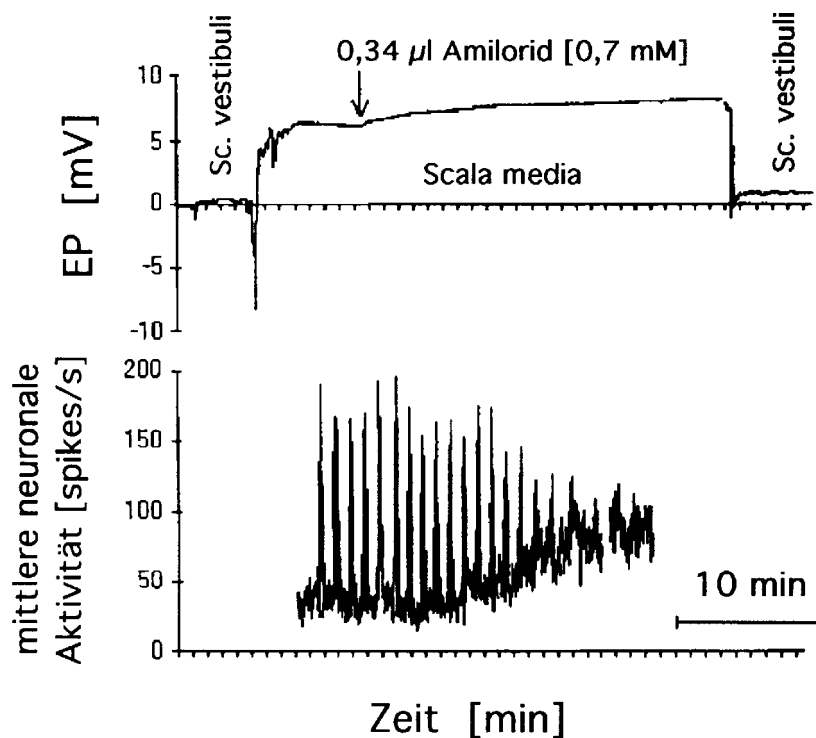


Abb.5.1. Dargestellt ist oben der Verlauf des EP und der Entladungsrate nach Applikation von 0,34µl Amilorid-haltiger künstlicher Endolymphe ($c=0,7$, RT29N6). Beim Verlauf des EP kommt es beim Durchschub durch das Tegmentum vasculosum initial zu einem negativen Ausschlag, dann steigt es auf ca. 6mV an, was den Eintritt in die Scala media anzeigt. Nach der Applikation kommt es zu einem initialen Anstieg des EP um ca. 2mV. Bei Ausschub aus der Scala media sinkt das EP aber nur um 11mV, was anzeigt daß der initiale Anstieg z.T. reversibel war. Unten ist die Entladungsrate nach Applikation zu sehen. Die Spitzen kommen durch das Schreiben von Abstimmkurven zustande und entsprechen damit der maximalen akustisch evozierten Entladungsrate, während die basale Entladungsrate der spontanen Entladungsrate entspricht. Es ist deutlich zu

erkennen, wie die evozierte Rate sinkt, aber die spontane ansteigt, bis beide ineinander übergehen.

Am Ende der Versuchen wurde ebenfalls das endocochleäre Potential bestimmt, das sich durch die Potentialänderung bei zurückziehen der Elektrode aus der Scala media ergab. Für das EP nach Applikation wurden im Mittel Werte von $9,43\text{mV} \pm 3,10$ gemessen.

Damit ergibt sich ein durchschnittlicher Anstieg des EP nach Applikation von Amilorid von $0,71\text{mV}$ (Standartabweichung: $1,70$). Die Werte sind normal verteilt und die Veränderung ist nicht signifikant (gepaarter t-Test, $p=0,05$). Die Zeitdifferenz zwischen Ein- und Ausschub lag zwischen 54 und 196 Minuten, die applizierte Dosis von Amilorid zwischen $2,16 - 6,5 \times 10^{-10}\text{Mol}$.

5.2.1.2. Summenaktionspotential (CAP)

Der Vergleich von CAP-Schwellenkurven vor und nach Applikation von Amilorid in die Scala media wurde in 7 Versuchen durchgeführt.

Die CAP-Schwelle stieg nach Applikation von Amilorid an. Abbildung 5.2. zeigt die durchschnittliche Differenz zwischen der CAP-Schwelle vor und nach Applikation von Amilorid in die Scala media in Abhängigkeit von der Frequenz. Die Veränderung der Schwelle war für Frequenzen oberhalb 400Hz größer als für Frequenzen kleiner als 400Hz . Signifikant ist die Erhöhung der CAP-Schwelle für 198Hz und für Frequenzen größer als 500Hz (gepaarter t-Test, $p = 0,05$).

Abb.: 5.2.

Veränderung der CAP-Schwelle in Abhängigkeit von der Frequenz
nach Applikation von Amilorid in die Scala media

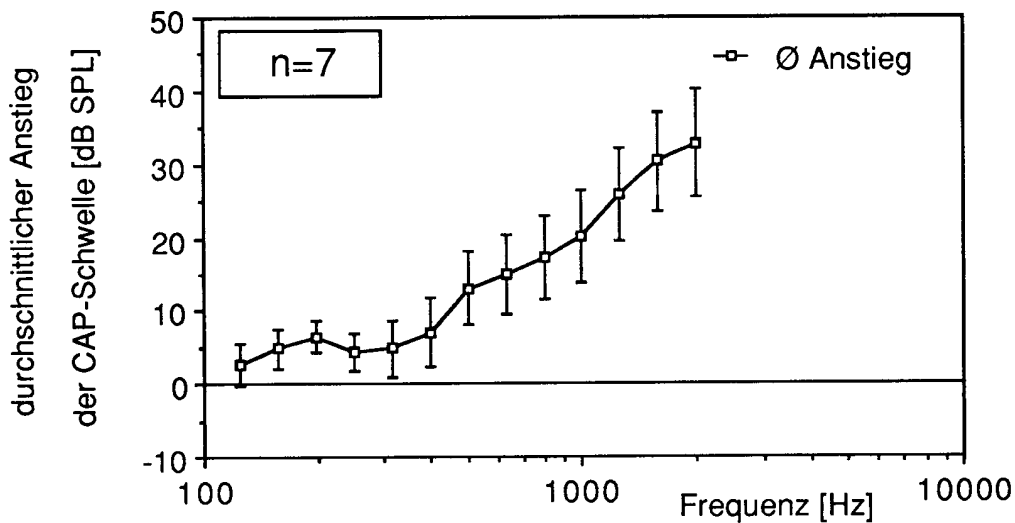


Abb. 5.2.: dargestellt ist die durchschnittliche Differenz zwischen der CAP-Schwelle vor und der CAP-Schwelle nach Applikation von Amilorid in die Scala media in Abhängigkeit von der Frequenz (n = 7). Die applizierte Menge Amilorid lag zwischen $2,16$ und $6,5 \times 10^{-10}$ Mol. Die Erhöhung der CAP-Schwelle ist für die Frequenz von $198,4$ Hz und Frequenzen größer 500 Hz signifikant (gepaarter t-Test, $p = 0,05$).

5.2.1.3. Einzelfaserableitung

In 9 Experimenten erfolgte die Applikation von Amilorid in die Scala media, während gleichzeitig die Aktivität einer einzelnen auditorischen Nervenfasers (im weiteren mit "AN" abgekürzt) aufgezeichnet wurde. Veränderungen des Hörvermögens wurde mittels Vergleich der neuronalen Aktivität von Neuronen vor und nach Applikation von Amilorid in die Scala media dokumentiert. Nachfolgend sind die Veränderungen der erhobenen Parameter dargestellt. In Tabelle 7.3. (siehe Tabellenanhang, Kap. 7) sind die Ausgangswerte der Neuronen vor Applikation und die applizierte Dosis Amilorid zusammengestellt.

5.2.1.3.1. Spontane Entladungsrates

Bei 6 von 9 Neuronen kam es 12min nach Applikation von Amilorid in die Scala media zu einem Anstieg der spontanen Entladungsrate der afferenten Neurone von ursprünglich durchschnittlich 55,5 APs/s (St.abw.: 29,1) auf durchschnittlich 83,58 APs/s (St.abw.: 41,3) und nach 20min auf durchschnittlich 85,6 APs/s (St.abw.: 33,5). In 3 von 9 Neurone veränderte die Applikation von Amilorid die spontane Entladungsrate nicht (Abb. 5.3).

Innerhalb der Gruppe der Neurone, welche eine Veränderung der spontanen Aktivität zeigen, lassen sich zwei charakteristische zeitliche Verläufe der Veränderungen erkennen, welche als Untergruppen in Abb. 5.3 dargestellt werden:

1.Untergruppe: der Anstieg der spontanen Entladungsrate setzt früh (nach ca. 5min) ein und steigt in den ersten 12 min um 66,4% rasch (von durchschnittlich 67 APs/s auf 111,5 APs/s) an und es kommt partiell (in 2 von 3 Fällen) wieder zu einem Absinken auf den Ausgangswert, so daß nach 20 min der durchschnittliche Anstieg bei dieser Untergruppe nur noch 28,8% über den Ausgangswerten liegt (Abb.5.3.a).

2.Untergruppe: Nach einem initialem Absinken der spontanen Entladungsrate in den ersten 5 min um 44,3% kam es ca. ab der 8. Minute zu einem kontinuierlichen Anstieg mit im Vergleich zur ersten Untergruppe langsameren Zeitverlauf. Nach 12 min liegen die Werte dieser Untergruppe durchschnittlich erst 26,5% über den Ausgangswerten, nach 20 min aber 93% über den Ausgangswerten (von initial durchschnittlich 44,0 APs/s auf 84,9 APs/s). Eine Rückbildung des Effekts ist nicht klar erkenntlich (Abb.5.3.b.).

Abb.: 5.3.

Veränderung der spontanen Entladungsrate
nach Applikation von Amilorid in die Scala media

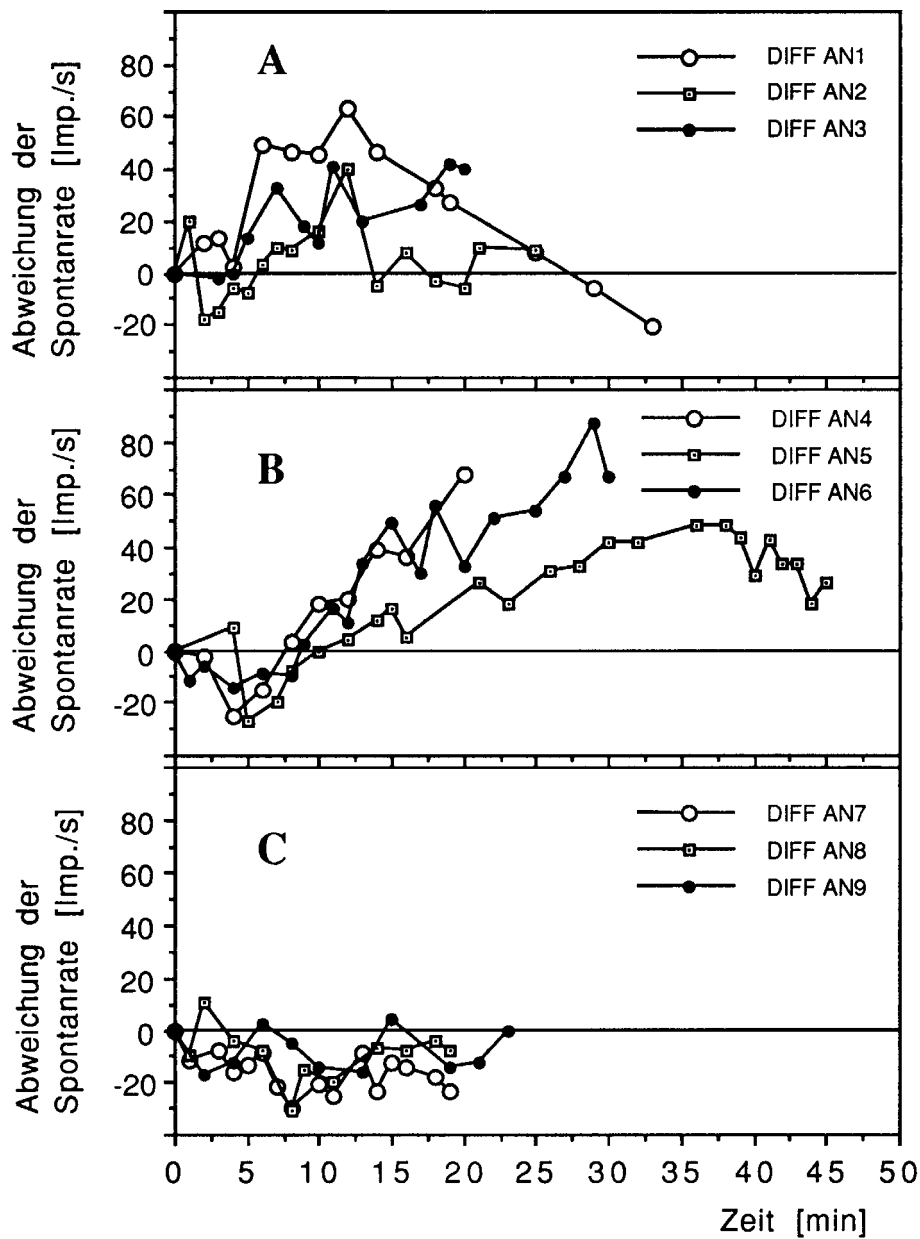


Abb. 5.3. zeigt die Veränderung der spontanen Entladungsrate nach Applikation von Amilorid in die Scala media, wobei die absolute Abweichung vom Ausgangswert aufgetragen wurde. Die Neurone sind in drei Gruppen unterschiedlichen Verhaltens aufgeteilt. In Gruppe A kommt es zu einem initialen Anstieg, nach 5 Minuten schwanken die Werte um ein Plateau-Wert oder sinken wieder. In Gruppe B kommt es in den ersten 3 Minuten initial zu einem Abfall, dann kontinuierlich zu einem Anstieg. Neurone der Gruppe C zeigen keine Veränderung. Nähere Angaben zur applizierten Menge, CF und Ausgangswerte sind in Tab. 5.3. zusammengestellt.

AN5 bietet wegen seiner relativ langen Registrierung von 56 Minuten die Gelegenheit den Verlauf der Spontanrate über den Zeitraum von 30 Minuten hinaus zu untersuchen (Abb. 5.3.b): Nach 32 Minuten erreichte die Spontanrate ein Maximum von etwa dem Doppeltem des Ausgangswertes. Danach sinkt sie wieder langsam und scheint nach etwa einer Stunde nach der letzten Applikation sich wieder dem Ausgangswert anzunähern.

Bei 3 von 9 Neuronen kam es initial zu einer leichten Abnahme der Spontanrate, über den gesamten Verlauf betrachtet aber zu keiner wesentlichen Veränderung (Abb. 5.3.c).

Gruppenvergleiche:

Keiner der 6 Vergleiche der spontanen Aktivität der Neurone die vor und nach Applikation von Amilorid aufgezeichnet wurden zeigt einen signifikanten Unterschied in der Höhe der spontanen Entladungsrate (Kolmogoroff-Smirnow-Test, $p = 0,05$). Die applizierte Menge lag zwischen 1,85 und $12,48 \times 10^{-10}$ Mol Amilorid. Es muß aber beachtet werden, daß bei Gruppenvergleich 3 und 5 die mittlere CF der Gruppe vor Applikation deutlich von der nach Applikation abweicht. Die spontane Entladungsrate ist von der CF abhängig, wobei die spontane Entladungsrate bei Neuronen mit höherer CF niedriger ist als bei Neuronen mit niedriger CF (Klinke et al., 1993; Smolders et al., 1995). Dies muß bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Angaben zur applizierten Dosis Amilorid, der Zeitdifferenz zwischen Applikation und Erhebung der Gruppe nach Applikation sowie die Gruppenstärke der Gruppenvergleiche und Verteilung der CF sind in Tabelle 5.1. zusammengestellt.

Tab. 5.1.:

Gruppen-Vergleich	Versuch	appl. Menge [10^{-10} Mol]	Zeit-differenz*	Neurone vor/ nach App.**	Ø CF vor/nach App. [Hz]±Stand.abw.
G1	RT51 li	3	17 min	19 / 12	240±203/299±168
G2	RT54 re	1,85	19,5 min	10 / 7	779±386/927±155
G3	RT77 li	12,48	84 min	15 / 15	588±198/283±77

G4	RT78 li	3,1	44 min	19 / 20	501±161/485±294
G5	RT79 li	2,79	65,5 min	16 / 16	725±421/334±185
G6	RT80 li	2,79	118,5 min	19 / 12	568±170/424±117

Tab. 5.1. gibt die Versuchsbezeichnung laut Versuchsprotokoll, die applizierte Menge Amilorid zwischen Erhebung beider Gruppen, die Zeitdifferenz zwischen Applikation und Erhebung der Gruppe nach Applikation (*) und die Verteilung beider Gruppen für die Versuche mit Applikation von Amilorid in die Scala media an (**). In der letzten Spalte sind die durchschnittliche charakteristische Frequenz (CF) der Gruppe vor Applikation der durchschnittlichen CF der Gruppe nach Applikation gegenübergestellt mit Angabe der Standardabweichung.

5.2.1.3.2. Akustisch evozierte Entladungsrate

Die akustisch evozierte Aktivität veränderte sich nach Applikation von Amilorid in die Scala media wie folgt:

Bei den Neuronen AN1, AN2, AN3, AN4, AN5 (*Gruppe A*) kam es zu einer Abnahme der maximalen akustisch evozierten Aktivität (bei durchschnittlich 88 ± 13 dB SPL und damit durchschnittlich 42 ± 7 dB über der Entladungsschwelle) einer Erhöhung der Ratenschwelle, einer Abnahme der Güte der Abstimmung und zu einer Erniedrigung der charakteristischen Frequenz.

Die restlichen untersuchten Neurone AN6, AN7, AN8, AN9 (*Gruppe B*) zeigten nach Injektion von Amilorid in die Scala media keine signifikante Veränderung der akustisch evozierten Entladungsrate und keine Veränderung der von ihr abgeleiteten Parameter wie die CF und/oder die Güte der Abstimmung. Anhand dieser Gruppeneinteilung in Neurone mit bzw. ohne Effekt von Amilorid auf die akustisch evozierte Aktivität sollen die Ergebnisse dargestellt werden.

Abb. 5.4. zeigt die Abstimmkurve mit Angabe der spontanen Entladungsrate jeweils eines Neurons aus beiden Gruppen vor und 6, 12 bzw. 20 Minuten nach Applikation. Bei AN4 aus Gruppe A war schon nach 6 Minuten eine deutliche Erhöhung der Ratenschwelle und Verschlechterung der Abstimmung zu erkennen, nach 20 Minuten ist anhand der Abstimmkurve keine Abstimmung mehr erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei AN7 aus Gruppe B keine Veränderung der Abstimmkurve.

Abb. 5.4.:

Wirkung von Amilorid auf die Abstimmkurven afferenter Neurone bei Applikation in die Scala media

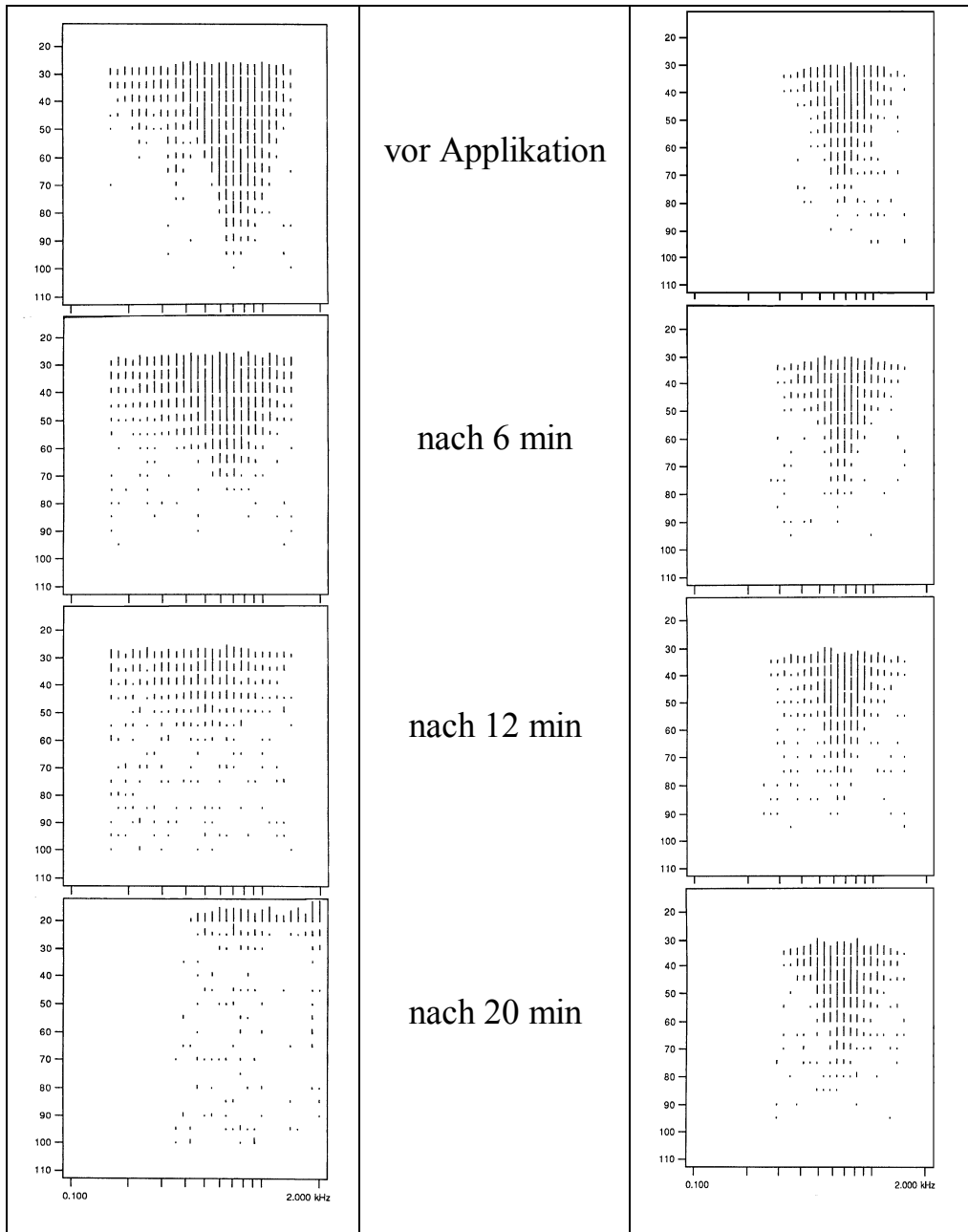


Abb. 5.4. zeigt Abstimmkurven jeweils eines Neurons aus Gruppe A und B vor, 6 min nach, 12 min nach und 20 min nach Applikation von Amilorid in die Scala media, mit Angabe der spontanen Entladungsrate. Links ist AN4 (RT50N14) aus Gruppe A dargestellt, rechts AN7 (RT78N47) aus Gruppe B. Angaben zu den Neuronen und applizierter Menge Amilorid, siehe Tab.5.3..

Die Parameter im einzelnen:

In Abbildung 5.5. und Abbildung.5.6. sind der Verlauf der evozierten Rate und der von ihr abhängigen Parameter (maximale akustisch evozierbare Aktivität, Ratenschwelle, Güte der Abstimmung und charakteristische Frequenz) dargestellt. Es ist die durchschnittliche Veränderung mit Angabe der Standardabweichung und signifikanter Veränderungen angegeben (gepaarter t-Test, $p = 0,05$).

Abb.: 5.5.

Einfluß von Amilorid auf die akustisch evozierte Entladungsrateschwellen nach Applikation in die Scala media

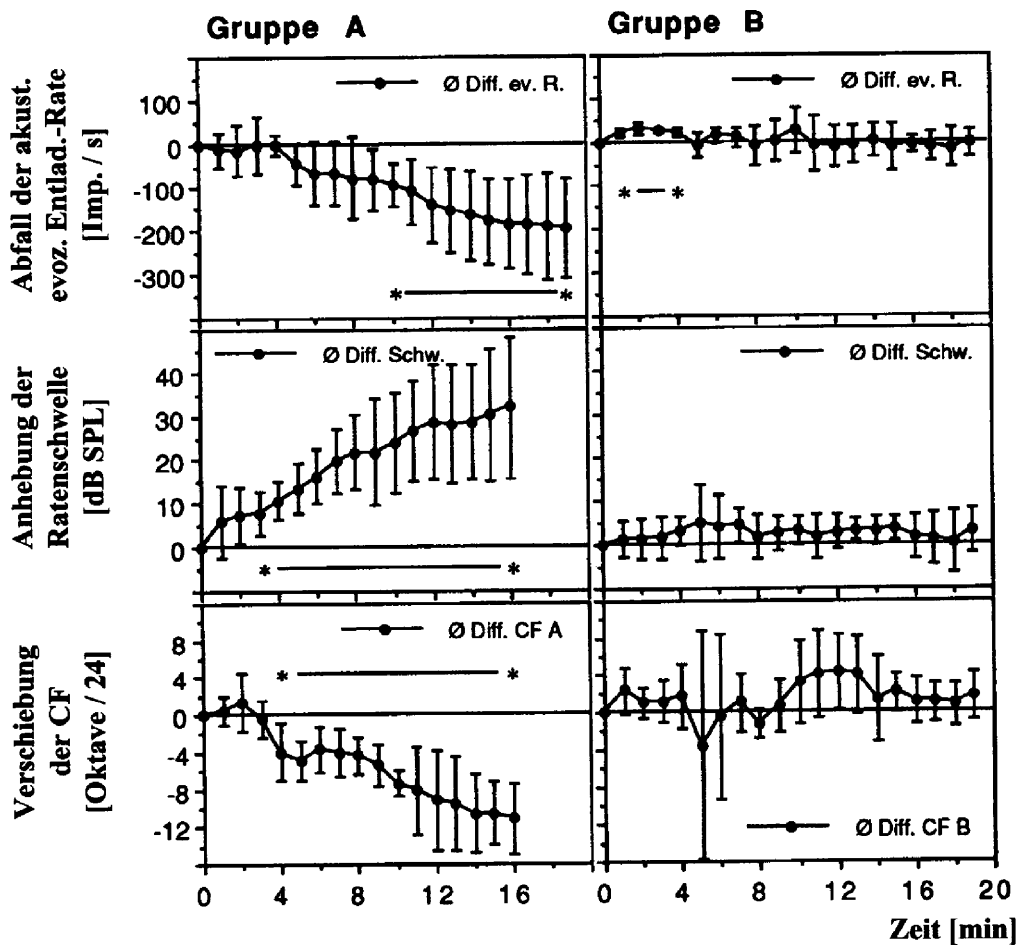


Abb. 5.5. zeigt die Veränderung der akustisch evozierten Entladungsrate und der von ihr abgeleiteten Parameter Ratenschwelle und charakteristische Frequenz nach Applikation von Amilorid in die Scala media. Die Querbalken geben die Standardabweichung an. Die Neurone sind in zwei Gruppen unterschiedlichen Verhaltens aufgeteilt, wobei es in Gruppe A (AN1, AN2, AN3, AN4, AN5) zu einem Abfall Entladungsrate, Anstieg der Ratenschwelle und Verschiebung der CF hin zu niedrigeren Frequenzen kommt. Die Neurone der Gruppe B (AN6, AN7, AN8, AN9) zeigten keine Veränderung der genannten Parameter nach Amilorid-Applikation. Nähere Angaben zur applizierten Menge, CF und Ausgangswerte sind in Tab. 5.3. zusammengestellt. Mit * — * sind signifikante Veränderungen markiert (gepaarter t-Test , $p = 0,05$).

akustisch evozierte Aktivität:

In Gruppe A kam es ab der 10ten Minute zu einer signifikanten Abnahme der maximalen akustisch evozierten Entladungsrate, bei Gruppe B zeigt sich keine wesentliche Veränderung. Im Mittel betrug die maximal akustisch evozierbare Entladungsrate für Gruppe A $342 \text{ Imp./s} \pm 64,96$ und für Gruppe B $320,5 \text{ Imp./s} \pm 92,83$.

Ratenschwelle:

Die Ratenschwelle stieg bei den Neuronen der Gruppe A nach Applikation stetig bis zur 7. Minute nach Applikation um 20 dB SPL und dann bis zur 16. Minute um weitere 12 dB SPL. Die gemessene Schwellenerhöhung ist ab der 3. Minute nach Applikation signifikant. Vor Applikation ergaben sich für die Ratenschwellen der 5 Neurone aus Gruppe A Werte zwischen 30 dB und 60 dB mit einem Mittelwert von $40,6 \pm 14,6$ (Durchschnitt \pm Stand.abw.). Bei den Neuronen der Gruppe B zeigte sich hingegen keine Veränderung der Ratenschwelle. Die Ausgangswerte lagen hier bei 28-65 ($\emptyset \pm$ Stand.abw.: $47,7 \pm 15,3$).

charakteristischen Frequenz:

Nach Applikation von Amilorid kam es bei den Neuronen der Gruppe A zu einer Verschiebung der CF zu niedrigeren Frequenzen. Abb. 5.5. zeigt diese Veränderung, dabei ist die Veränderung der charakteristischen Frequenz als absolute Abweichung vom Ausgangswert in 1/24 Oktave angegeben. Die beobachteten Veränderungen waren vier Minuten nach Applikation von Amilorid signifikant. Die 5 Neurone der Gruppe A hatten vor Applikation charakteristische Frequenzen (CF) im Bereich von 700 Hz bis 1200 Hz.

Vergleicht man die Antwortflächen des Neurons zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von Amilorid, erkennt man, daß vor allem die akustisch evozierten Entladungsraten bei Reizfrequenzen größer als die charakteristische Frequenz des Neurons reduziert sind. Mit anderen Worten, die Effekte von Amilorid auf die akustisch evozierbare Aktivität eines einzelnen Neurons sind frequenzspezifisch. In Abb. 5.6. wird diese Veränderung beispielhaft an der Abstimmkurve eines Neurons nach Applikation von 0,155µl Amilorid (Konzentration: 1mM) dargestellt.

Für Gruppe B zeigte sich keine signifikante Veränderung der CF, Ausgangswerte waren hier zwischen 120 Hz und 632 Hz.

Abb.: 5.6.

Veränderung der Entladungsrate in Abhängigkeit von der Frequenz nach Applikation von 0,155µl Amilorid (c=1mM) bei einem Schalldruckpegel von 85 dB SPL

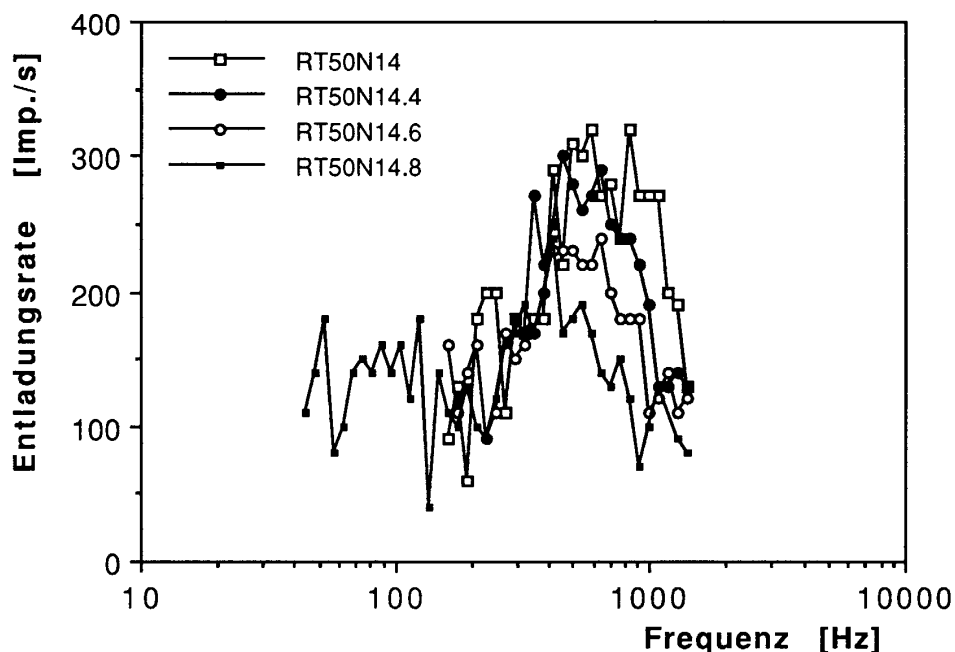


Abb. 5.6. zeigt die Veränderung der akustisch evozierten Entladungsrate in Abhängigkeit von der Frequenz nach Applikation von 0,155µl Amilorid (c=1mM) in die Scala media. □ gibt die Entladungsrate vor Applikation, ● nach 8 min,

○ nach 12 min und ■ nach 16 min an. Es zeigt sich, daß die Entladungsrate vor allem im Bereich der hohen Frequenzen abnimmt. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der charakteristischen Frequenz (von 704Hz nach 458Hz), wobei jede Kurve annähernd innerhalb der Ausgangskurve liegt. Die spontane Entladungsrate lag bei = 73 Imp./s, ● = 76 Imp./s, ○ = 93 Imp./s und ■ = 109 Imp./s.

Abb.: 5.7.

Einfluß von Amilorid auf die Güte der Abstimmung nach Applikation in die Scala media

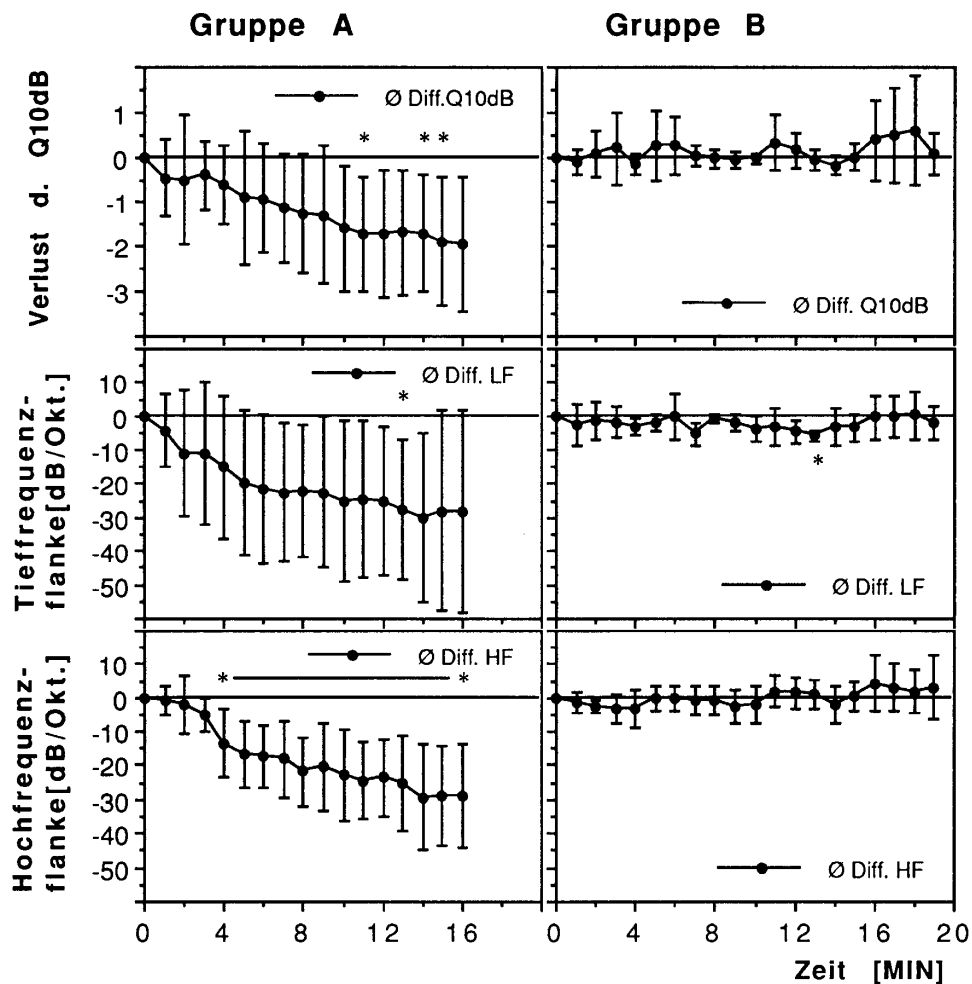


Abb. 5.7. zeigt die Veränderung der drei Parameter der Güte der Abstimmung, Q_{10dB} , Tief- und Hochfrequenzflanke nach Applikation von Amilorid in die Scala media. Die Querbalken geben die Standardabweichung an. Die Neurone sind wie bei der akustisch evozierten Entladungsrate in zwei Gruppen unterschiedlichen Verhaltens aufgeteilt,

wobei es in Gruppe A (AN1, AN2, AN3, AN4, AN5) zu einem Abfall aller drei Parameter kommt, wobei der Abfall der Hochfrequenzflanke am deutlichsten ist (ab der 4. Min. signifikant). Die Neurone der Gruppe B (AN6, AN7, AN8, AN9) zeigten keine Veränderung der genannten Parameter nach Amilorid-Applikation. Nähere Angaben zur applizierten Menge, CF und Ausgangswerte sind in Tab. 5.3. zusammengestellt. Mit * bzw. * — * sind signifikante Veränderungen markiert (gepaarter t-Test , $p = 0,05$).

Güte der Abstimmung:

Die Werte der drei Parameter der Abstimmung (Q_{10dB} , Tieffrequenzflanke (TFF) und Hochfrequenzflanke (HFF)) nahmen in der Gruppe A nach Applikation kontinuierlich ab. Q_{10dB} sank in den ersten 9 Minuten um 1,7 und veränderte sich dann nur noch geringfügig. TFF und HFF nahmen v.a. in den ersten 5 Minuten ab (TFF um 20dB/Okt. und HFF um 17 dB/Okt.) und fielen danach beide bis zur 14. Minute auf Werte von durchschnittlich 30 dB/Okt. unterhalb des Ausgangswertes. Unterschiedlich bei beiden war der initiale Beginn der Veränderung, der bei der TFF früher einsetzte, und zum anderen die Standardabweichung. Diese war bei der TFF zu allen Zeitpunkten deutlich höher als bei der HFF, d.h. das Verhalten der HFF ist bei allen Neuronen einheitlicher. Der zeitliche Verlauf des Q_{10dB} hat größere Ähnlichkeit mit dem der TFF als der HFF. Auch haben beide große Standardabweichungen, weshalb TFF nur in der 13. und Q_{10dB} in 11., 14. und 15. Minute signifikant erniedrigt waren, während der Abfall der HFF ab der 4. Minute signifikant ist.

Die Ausgangswerte der Gruppe A lagen für Q_{10dB} zwischen 1,69-4,57 ($2,98 \pm 1,26$), für TFF bei 20-80 ($44,5 \pm 22,8$) und für HFF bei 20-60 ($43,5 \pm 14,5$). Für Gruppe B lagen sie für Q_{10dB} bei 0,38-3,27 ($1,30 \pm 1,33$) für TFF bei 10-40 ($20 \pm 13,5$) und für HFF bei 10-37,5 ($16,9 \pm 13,8$) (in Klammern jew. $\emptyset \pm$ Stand.abw.).

Gruppenvergleich bei Applikation von Amilorid in die Scala media

4 von 6 Gruppenvergleiche zeigen signifikante Veränderung der Ratenschwelle nach Applikation von Amilorid in die Scala media. Für Q_{10dB} sind es 2 von 6, für TFF 2 von 4 und für HFF 1 von 4.

Somit gilt für den Gruppenvergleich dasselbe, wie für die Registrierung einzelner Neurone während der Applikation von Amilorid: Bei einem Teil der Gruppenvergleiche führte die Applikation von Amilorid zu einem Anstieg der Ratenschwelle und einer Verschlechterung der Abstimmung (G3 - G6), bei einem anderen Teil nicht (G1 und G2). Bei den Gruppenvergleichen G1 und G2 lag die applizierte Menge Amilorid bei 3 bzw. $1,9 \times 10^{-10}$ Mol, bei G5 und G6 bei $2,8 \times 10^{-10}$ Mol und im Falle von G4 bei $3,1 \times 10^{-10}$ Mol. Die höchste Dosis wurde bei G3 appliziert: $12,5 \times 10^{-10}$ Mol (vergleiche auch Tab.5.1., Kap. 5.2.1.3.1.). Dies legt eine Abhängigkeit der Wirkung von der Konzentration nahe, doch gibt es Überschneidungen bei Applikationen im Bereich von 3×10^{-10} Mol Amilorid. Die Gruppenvergleiche unterscheiden sich auch bzgl. der Zeitspanne zwischen Applikation und Erhebung der Gruppe von Neuronen nach Applikation. Für G1 und G2 lag diese Zeitdifferenz unter 20 Minuten, für G3 - G6 zwischen 44 und 118,5 Minuten.

Weiterhin muß ähnlich wie für die spontane Entladungsrate berücksichtigt werden, daß für Gruppenvergleich G3 und G5 die Bereiche der CF voneinander abweichen. Da sowohl die Modulationsschwelle wie auch die Güte der Abstimmung (Q_{10dB}) eine systematische Abhängigkeit von der CF zeigen, muß dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die Modulationsschwelle sinkt tendenziell hin zu höheren Frequenzen, die Güte der Abstimmung wird hin zu den niedrigeren Frequenzen schlechter (Klinke et al., 1993; Smolders et al., 1995).

In Tabelle 5.2. sind die Ergebnisse des Gruppenvergleichs der akustisch evozierten Entladungsrate und von ihr abgeleitete Parameter zusammengestellt. Angaben zur applizierten Dosis Amilorid, der Zeitdifferenz zwischen Applikation und Erhebung der Gruppe nach Applikation sowie die Gruppenstärke der Gruppenvergleiche und Verteilung der CF sind in Tabelle 5.1. zusammengestellt.

Tab. 5.2.:

Gruppen-Vergleich	Raten-schwelle	Q _{10dB}	Tieffrequ.-flanke	Hochfrequ.-flanke
G1	-	-	-	-
G2	-	-	-	-
G3	++	++	+	+
G4	++	-	*	*
G5	++	++	*	*
G6	++	-	+	-

- ⇒ keine sign. Veränderung

+ ⇒ sign. Veränd., p = 0,05

++ ⇒ sehr sign. Veränd., p = 0,01

Tab. 5.2. markiert signifikante Veränderung der Ratschwelle, Q_{10dB}, Hoch- und Tieffrequenzflanke beim Vergleich einer Gruppe von Neuronen vor Applikation mit einer Gruppe von Neuronen danach. Test auf Signifikanz: Kolmogoroff-Smirnow-Test.

*nach Applikation war es nicht mehr möglich den gegebenen Parameter zu bestimmen

5.2.2. Applikation in die Scala tympani

Es wurde in 4 Versuchen 6 mal Amilorid (2-4 µl, c = 1mM) in die Scala tympani appliziert. Abb. 5.8. zeigt den zeitlichen Verlauf der N1-Amplitude und der P1-Amplitude des CAPs bei Applikation von Amilorid in die Scala tympani. Es kam in 4 von 6 Fällen zu einem kurzzeitigen Absinken beider Amplituden. In allen Fällen hatten sich nach spätestens 3 Minuten die Veränderungen zurückgebildet.

Abb.: 5.8.

Verlauf der CAP-Amplitude
bei Applikation von Amilorid in die Scala tympani

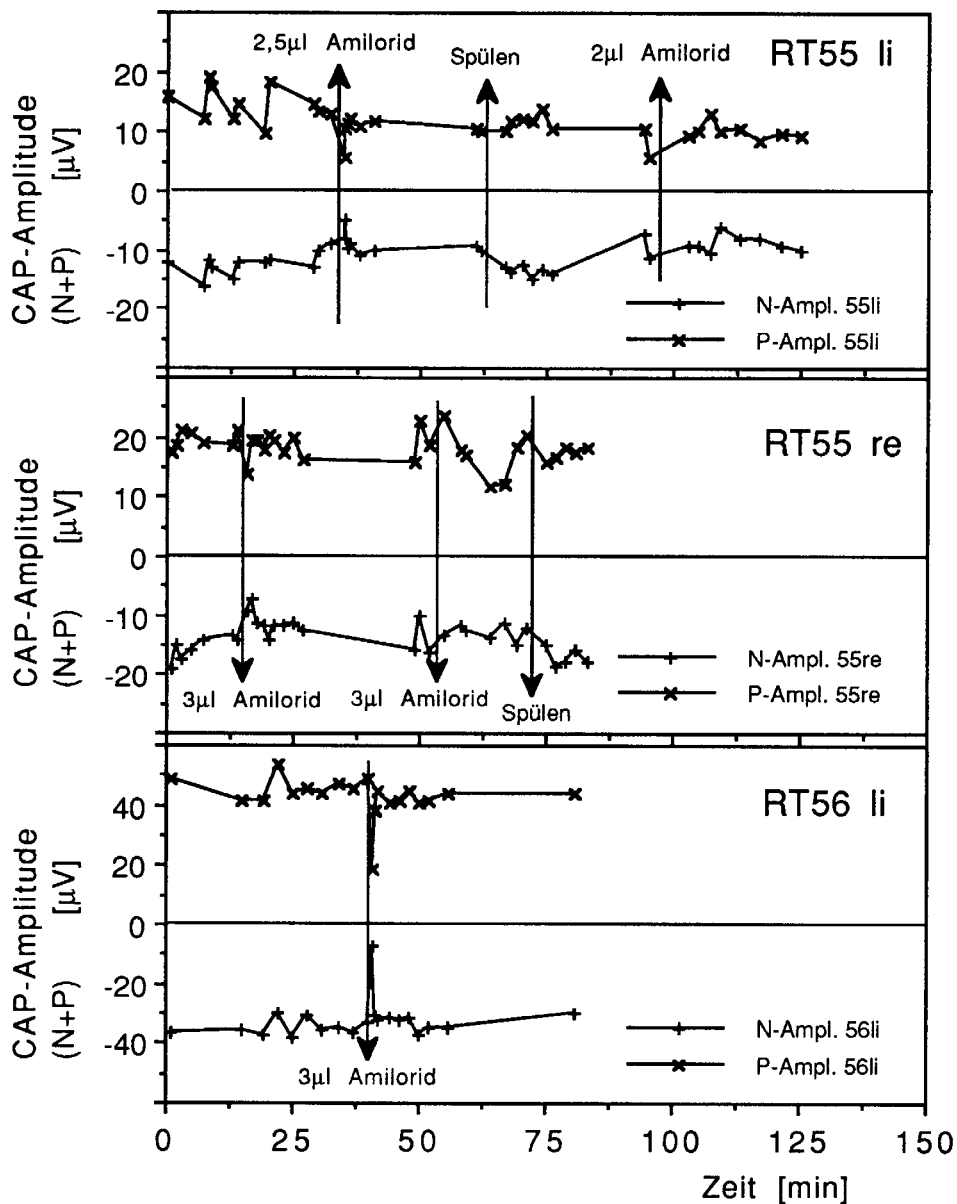


Abb. 5.8. zeigt den Verlauf der N- und P-Amplitude des CAP, während Amilorid-haltige künstliche Perilymphe ($c = 1\text{mM}$) appliziert wird (\downarrow). Nach den Applikationen wird teilweise mit künstlicher Perilymphe gespült. Außer durch die Applikation selbst verursachte, kurz dauernde, Veränderungen, kommt es zu keiner Veränderung beider Amplituden durch Amilorid. Die durchschnittliche Veränderung der Gesamtamplitude ($N + P$ -Amplitude) nach Applikation ist in Abb. 5.9.a dargestellt.

Die Gesamtamplitude wurde vor und nach Applikation statistisch auf Gleichheit getestet. In Abb.5.9.a. ist der Verlauf der durchschnittlichen Gesamtamplitude aller 6 Applikationen von Amilorid in die Scala tympani mit der Standardabweichung aufgetragen. Nach Applikation sank die CAP-Amplitude für

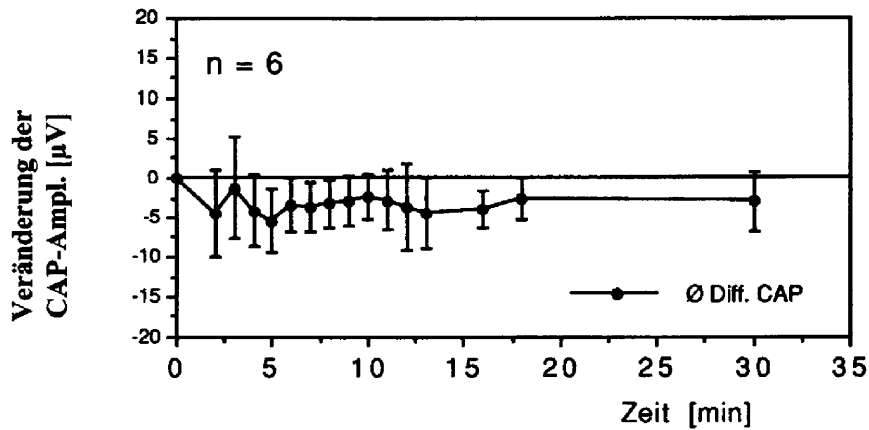
die gesamte registrierte Zeit von 30 Minuten um durchschnittlich 3 mV. dieser Abfall des CAP ist lediglich für 4 Zeitpunkte signifikant (für $t = 5, 7, 8$ und 16 , gepaarter t-Test, $p = 0,05$).

Abb. 5.9.b. zeigt die durchschnittliche Anhebung der CAP-Schwelle nach Applikation ($n = 3$). Nur bei $F = 2,5$ kHz ist die CAP-Schwelle signifikant erhöht (gepaarter t-Test, $p = 0,05$).

Abb.: 5.9.

Veränderung der CAP-Schwellenkurve und der CAP-Amplitude
nach Applikation von Amilorid in die Scala tympani

a. Veränderung der CAP-Amplitude:



b. Veränderung der CAP-Schwelle:

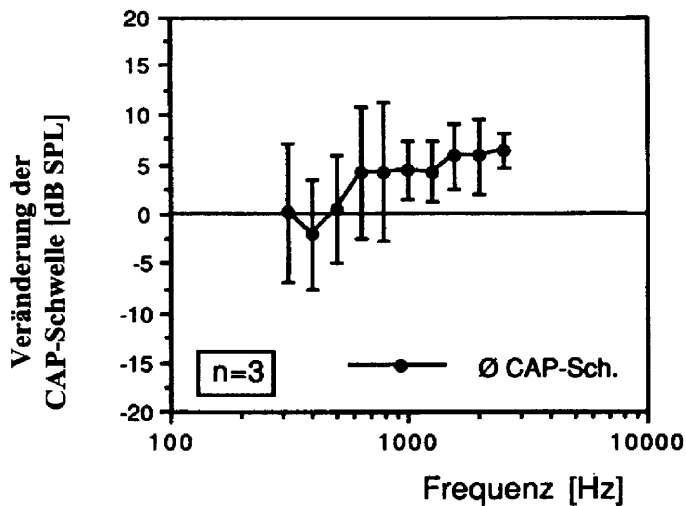


Abb. 5.9.a zeigt den durchschnittlichen Verlauf der Gesamtamplitude (N- + P-Amplitude) des CAP nach Applikation Amilorid-haltiger künstliche Perilymphe (2-3µl, c = 1mM, n = 6). Die Querbalken geben die Standardabweichung an.

Abb. 5.9.b zeigt die durchschnittliche Veränderung der CAP-Schwellenkurve nach Applikation von Amilorid in die Scala tympani (2,5-3µl, c = 1mM, n = 3).

5.3. Diazoxid

5.3.1. Applikation in die Scala media

5.3.1.1. endocochleäres Potential

In 5 Fällen wurde das endocochleäre Potential vor Applikation mit dem nach Applikation verglichen und statistisch auf Gleichheit untersucht (es wird jeweils der Durchschnitt und die Standardabweichung angegeben).

Nach Penetration des Tegmentum vasculosum wurde in 6 Experimenten ein durchschnittliches EP von $9,0\text{mV} \pm 2,07$ gemessen. Vergleichbar mit den Ergebnissen nach Applikation von Amilorid in die Scala media, zeigte sich auch bei Diazoxid in 3 von 6 Fällen ein initialer Anstieg des EPs um bis zu 8 mV (durchschnittlich um $2,0 \pm 3,85\text{mV}$, siehe auch Tab.7.4.). In einem Fall kam es zu einem initialen Abfall des EPs. Die beobachteten Veränderungen hatten sich in 5 von 6 Fällen nach 6min (durchschnittlich nach $3,83\text{min} \pm 3,92$) vollständig zurückgebildet. Nur in einem Fall, bei dem ein Volumen von $0,77\mu\text{l}$ appliziert wurde, erreichte das EP erst nach 10 min wieder sein Ausgangswert. In Tabelle 7.4. sind der initiale Anstieg nach Applikation, die applizierte Menge Diazoxid und die Zeitspanne, bis das EP wieder den Ausgangswert erreichte, angegeben.

Die Differenz zwischen Potentialanstieg bei Vorschub der Elektrode in die Scala media und dem Potentialabfall bei wieder Verlassen der Scala media nach Applikation lagen zwischen $-5,5\text{mV}$ bis $+0,5\text{mV}$. Die durchschnittliche Differenz betrug $-2,42\text{mV} \pm 2,31$. Die Ergebnisse waren normal verteilt ($a=2,60$) und die Veränderungen waren signifikant (t-Test, $p = 0,1$). Damit zeigte sich ein signifikanter Abfall des EP durch Applikation von Diazoxid in die Scala media. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.5. (siehe Tabellenanhang, Kap. 7) wiedergegeben.

5.3.1.2. Summenaktionspotential (CAP)

Der Vergleich von CAP-Schwellenkurven vor und nach Applikation in die Scala media wurde in 10 Versuchen durchgeführt.

Abbildung 5.10. zeigt die durchschnittliche Differenz der CAP-Schwellen vor und nach Applikation von Diazoxid in die Scala media in Abhängigkeit von der Frequenz. Die applizierte Menge Diazoxid reichte von $0,93$ bis $10,5 \times 10^{-10}$ Mol. Die Zeitdifferenz zwischen Applikation und Registrierung der CAP-Schwellenkurve nach Applikation betrug 71 ± 26 Minuten. Die Applikation von Diazoxid in die Scala media bis zu einer Dosis von $10,5 \times 10^{-10}$ Mol verursachte keine signifikante Anhebung der CAP-Schwellen.

Abb.5.10.: Veränderung der CAP-Schwelle in Abhängigkeit von der Frequenz nach Applikation von Diazoxid in die Scala media

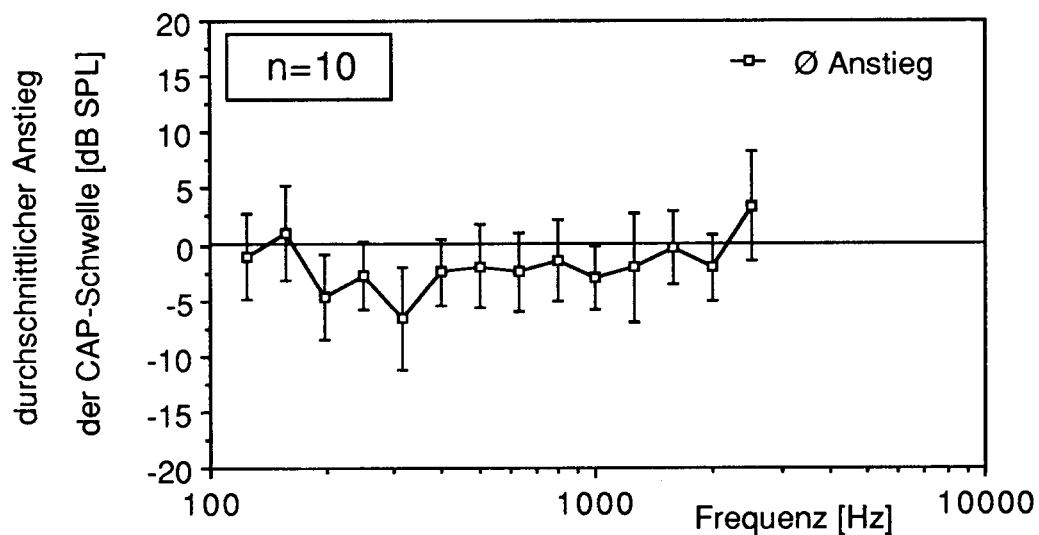


Abb. 5.10. zeigt die durchschnittliche Differenz zwischen der CAP-Schwelle vor und der CAP-Schwelle nach Applikation von Diazoxid in die Scala media in Abhängigkeit von der Frequenz ($n = 10$). Die applizierte Menge Diazoxid lag zwischen $0,93$ und $10,5 \times 10^{-10}$ Mol. Es kommt zu keiner signifikanten Veränderung der CAP-Schwelle nach Applikation (gepaarter t-Test, $p = 0,05$).

5.3.1.3. Einzelfaserableitung

Bei 6 Einzelfaserableitungen wurde Diazoxid in die Scala media appliziert.

5.3.1.3.1. Spontane Entladungsrate:

Die in Abb. 5.12. dargestellte durchschnittliche Abweichung der spontanen Entladungsrate sinkt in den ersten 4 Minuten nach Applikation, steigt dann aber wieder bis knapp über die Ausgangswerte. In der 4. Minute liegt sie durchschnittlich um 16,9 Imp./s unter den Ausgangswerten, und diese Veränderung ist statistisch signifikant (gepaarter t-Test, $p = 0,05$). Für den Rest der Beobachtungszeit kommt es zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der spontanen Entladungsrate.

5.3.1.3.2. Akustisch evozierte Entladungsrate:

Abb. 5.11.a. zeigt die Abstimmkurven eines Neurons, bei dem 1,24nM Diazoxid (0,4µl künstliche Endolymphe mit Diazoxid, $c = 2\text{mM}$) appliziert wurden (AB23N57). Abb.5.11.b. zeigt die dazugehörigen CAP-Schwellenkurven. Die durchschnittliche akustisch evozierte Entladungsrate aller Neuronen liegt ab der 6. Minute durchschnittlich ca. 30 Imp./s unter den Ausgangswerten. Signifikant ist dieses Absinken allerdings nur in der 11. Minute (Abb.5.12.). Im Verlauf der von der evozierten Rate abgeleiteten Parameter Ratenschwelle, CF und Güte der Abstimmung zeigen sich keinerlei signifikante Veränderungen (Abb. 5.12. und 5.13.). In Tabelle 7.6. (Tabellenanhang) sind die Ausgangswerte der Neuronen vor Applikation und die applizierte Dosis Amilorid zusammengestellt.

Abb.: 5.11.

Wirkung von Diazoxid auf die afferente neuronale Aktivität und die CAP-Schwelle nach Applikation in die Scala media

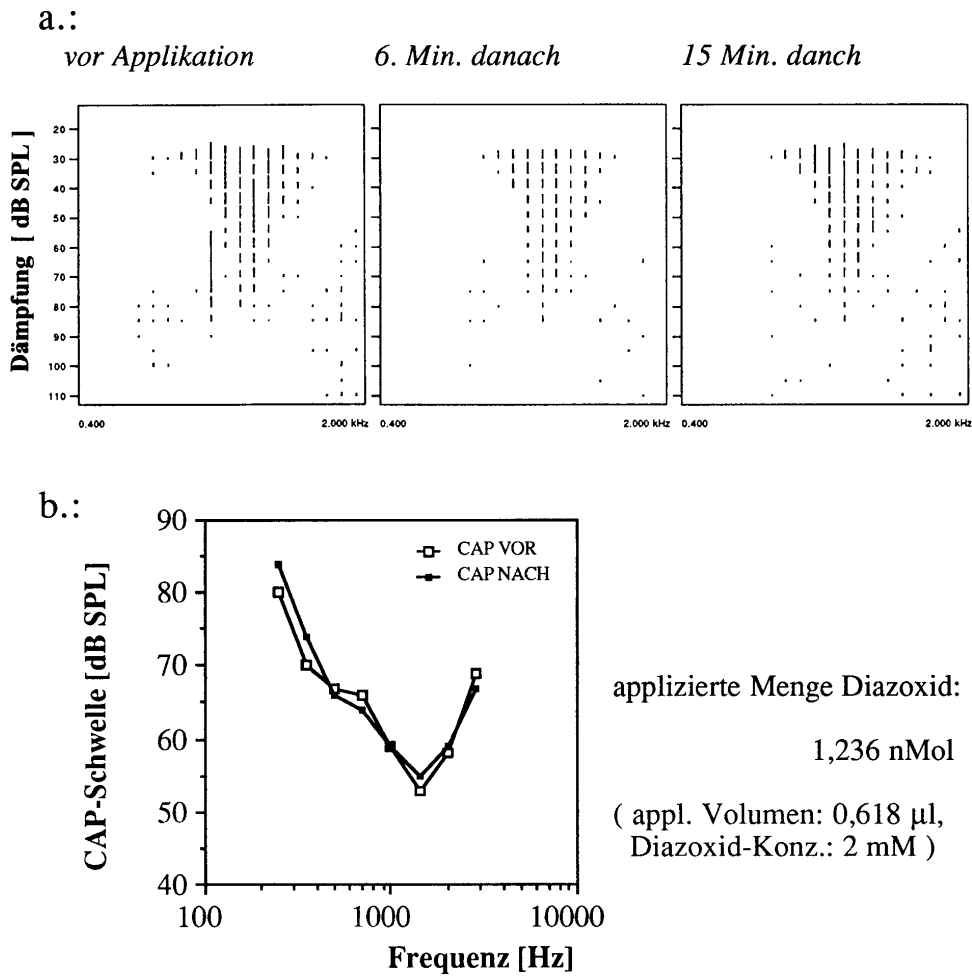


Abb. 5.11.a zeigt die Abstimmkurven eines Neurons (AB23N57) vor Applikation von Diazoxid in die Scala media und 6 min und 15 min danach. Von der evozierten wurde die spontane Entladungsrate subtrahiert (vor Appl.: 80 Imp./s, nach 6 min: 87 Imp./s, nach 15 min: 90 Imp./s). Es wurden 0,618µl Diazoxid appliziert (c = 2mM, näheres zu den Ausgangswerten siehe auch Tab. 5.7.)

Abb. 5.11.b zeigt die CAP-Schwellenkurven vor und nach der selben Applikation von Diazoxid wie in Abb. 5.11.a.

Abb.: 5.12.

Einfluß von Diazoxid auf die spontane und die akustisch evozierte Entladungsrate nach Applikation in die Scala media

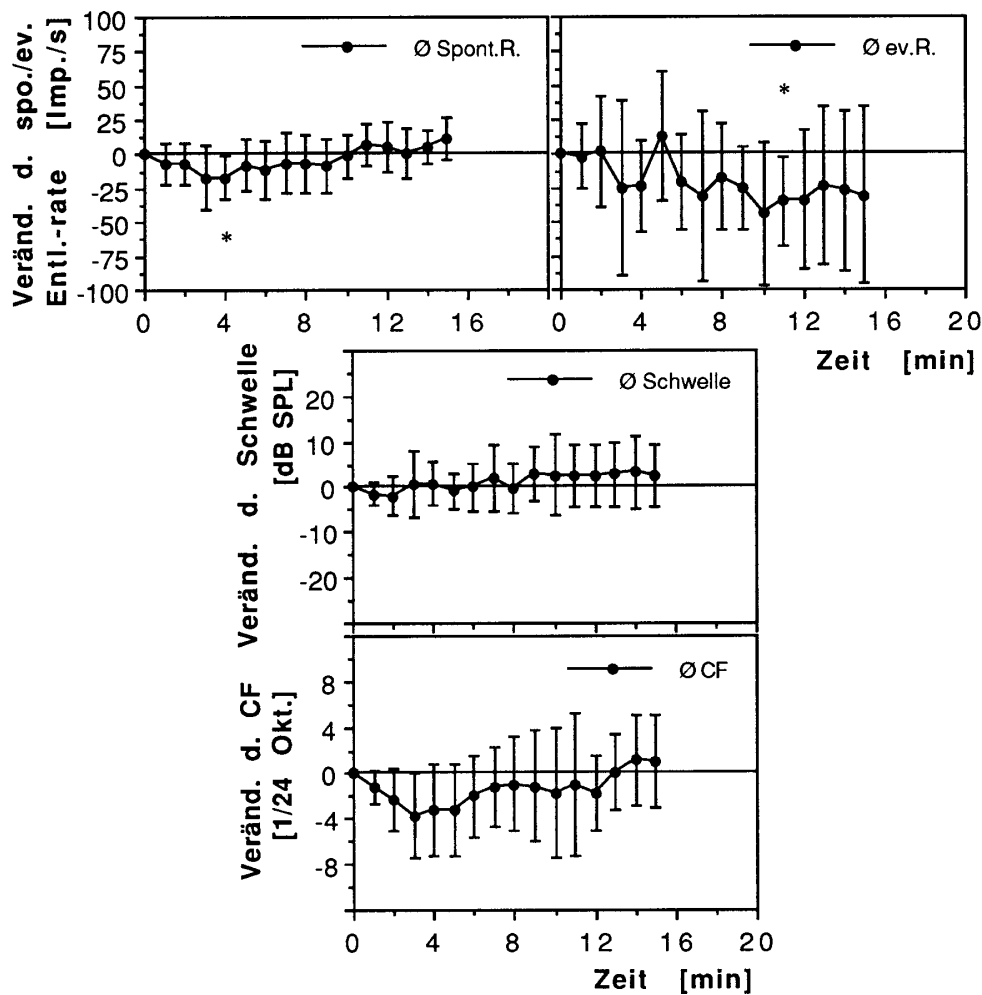


Abb. 5.12. zeigt die Veränderung der spontanen und der akustisch evozierten Entladungsrates und der von ihr abgeleiteten Parameter Ratenschwelle und charakteristische Frequenz nach Applikation von Diazoxid in die Scala media (n = 6, die applizierte Menge lag zwischen 3 und $12,4 \times 10^{-10}$ Mol Diazoxid). Die Querbalken geben die Standardabweichung an. Die spontane und die evozierte Entladungsrates sind jeweils für einen Zeitpunkt signifikant erniedrigt (Spo: t = 4. min, ev.R.: 11. min). Darüber hinaus zeigten die Neurone keine Veränderung der genannten Parameter nach Diazoxid-Applikation. Nähere Angaben zur applizierten Menge, CF und Ausgangswerte sind in Tab. 5.7. zusammengestellt. Mit * sind die signifikanten Veränderungen markiert (gepaarter t-Test, $p = 0,05$).

Gruppenvergleich:

Es wurden 6 Gruppenvergleiche von Einzelfaserableitungen vor und nach Applikation von Diazoxid in die Scala media erstellt.

In 3 von 6 Gruppenvergleichen steigt die Ratenschwelle, in 1 von 6 sinkt die Q_{10dB} und in 2 von 6 wird die Tief- und Hochfrequenzflanke signifikant abgeflacht. Bei einem Gruppenvergleich kommt es bei allen Parametern zu einer signifikanten Veränderung. Die Angaben zu signifikanten Veränderungen sind in Tab.5.4. zusammengefaßt.

Angaben zur applizierten Dosis Diazoxid, der Zeitdifferenz zwischen Applikation und Erhebung der Gruppe nach Applikation, der durchschnittlichen CF vor und nach Applikation und die Gruppenstärke der Gruppenvergleiche sind in Tabelle 5.3. zusammengestellt.

Bei G7-G9 muß berücksichtigt werden, daß Volumina appliziert wurden, die deutlich über den Volumina lagen ($0.5\mu l$), bei denen keine Veränderungen des Hörvermögens auf Grund des applizierten Volumens beobachtet wurden (Richter and Klinke, 1994). D.h. die Veränderungen können auch Effekt des applizierten Volumens an sich sein, unabhängig vom Diazoxid. Ähnlich wie für die Ergebnisse für Amilorid, muß auch für den Gruppenvergleich vor und nach Applikation von Diazoxid darauf hingewiesen werden, daß die Bereiche der CF sich nicht bei allen Gruppenvergleichen decken. Insbesondere bei G11 zeigt sich eine deutliche Diskrepanz, aber auch bei G7, G8 und G9 liegt sie nach Applikation durchschnittlich ca. 200Hz niedriger als vor Applikation. Bei G12 liegt sie nach Applikation 219Hz niedriger, bei G10 ist sie in etwa gleich. Dies muß bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden, da die erhobenen Parameter von der CF abhängig sind (siehe auch Kapitel 3.2.6. und 5.2.1.3.).

Tab. 5.3.

Gruppen-Vergleich	Versuch	appl. Menge [10^{-10} Mol]	Zeit-Diff. (*)	Neurone vor/nach App.	appl. Volumen	Ø CF vor / nach App [Hz] ± Stand.-Abw.
G7	AB19 li	16,2	80 min	19/16	0,81 μl	682±144 / 489±201
G8	AB20 li	10	95 min	16/25	1 μl	809±193 / 618±312
G9	AB22 li	21	45 min	21/19	1,05 μl	504±283 / 337±151
G10	AB23 li	9,2	38 min	19/15	0,46 μl	410±431 / 487±130
G11	AB23 re	12,4	60 min	18/14	0,62 μl	830±520 / 350±308

G12	RT101 li	8	90 min	16/16	0,4 µl	487±131 / 668±180
------------	----------	---	--------	-------	--------	-------------------

Tab. 5.3. gibt die Versuchsbezeichnung laut Prüfprotokoll, die applizierte Menge Diazoxid zwischen Erhebung beider Gruppen, die Zeitspanne zwischen der letzten Applikation und dem Mittelwert zwischen dem Zeitpunkt der Aufnahme des ersten und dem Zeitpunkt des letzten Neurons der Gruppe nach Applikation von Diazoxid (*) und die Verteilung beider Gruppen.

Tab. 5.4.

Gruppen-Vergleich	spontane Entl.-Rate	Raten-schwelle	Q _{10dB}	Tieffrequ.-flanke	Hochfrequ.-flanke
G7	-	++	-	+	++
G8	++	++	++	+	++
G9	-	++	-	-	-
G10	-	-	-	-	-
G11	-	-	-	-	-
G12	-	-	-	-	-

- ⇒ keine signifikante Veränderung

+ ⇒ signifikante Veränderung, $p = 0,05$

++ ⇒ sehr signifikante Veränderung, $p = 0,01$

Tab. 5.4. markiert signifikante Veränderung der Raten-schwelle, Q_{10dB}, Hoch- und Tieffrequenzflanke beim Vergleich einer Gruppe von Neuronen vor Applikation von Diazoxid in die Scala media mit einer Gruppe von Neuronen danach. Test auf Signifikanz: Kolmogoroff-Smirnow-Test.

5.3.2. Applikation in die Scala tympani

Es wurden bei 3 Experimenten die CAP-Verläufe bei Applikation von Diazoxid in die Scala tympani erstellt.

Abb. 5.14. zeigt den Verlauf der N-Amplitude und der P-Amplitude des CAP bei Applikation von Diazoxid in die Scala tympani. In 2 Versuchen wurde jeweils einmal (4,5 µl, 4µl, $c = 2$ mM) und in einem Versuch zweimal (jew. 3 µl, $c = 1/2$ mM) Diazoxid appliziert. In 2 von 4 Fällen (AB20 und 1.Appl. bei AB21) zeigte sich ein leichter initialer Anstieg der P1-Amplitude, der sich aber innerhalb 2 Minuten vollständig zurück bildete . Die anderen 2 der 4 Applikationen verändern

das CAP nicht, so daß der durchschnittliche Verlauf der Gesamtamplitude aller 4 Applikationen (Abb.15. a.) keine signifikanten Veränderungen zeigt (gepaarter t-Test, $p = 0,05$). Bei Vergleich der CAP-Schwellenkurve vor und nach zweimaliger Applikation von Diazoxid in Scala tympani (Versuch AB21) ergibt sich keine wesentliche Veränderung (Abb. 15.b.).

Abb.: 5.14.

Verlauf der CAP-Amplitude bei Applikation von Diazoxid in die Scala tympani

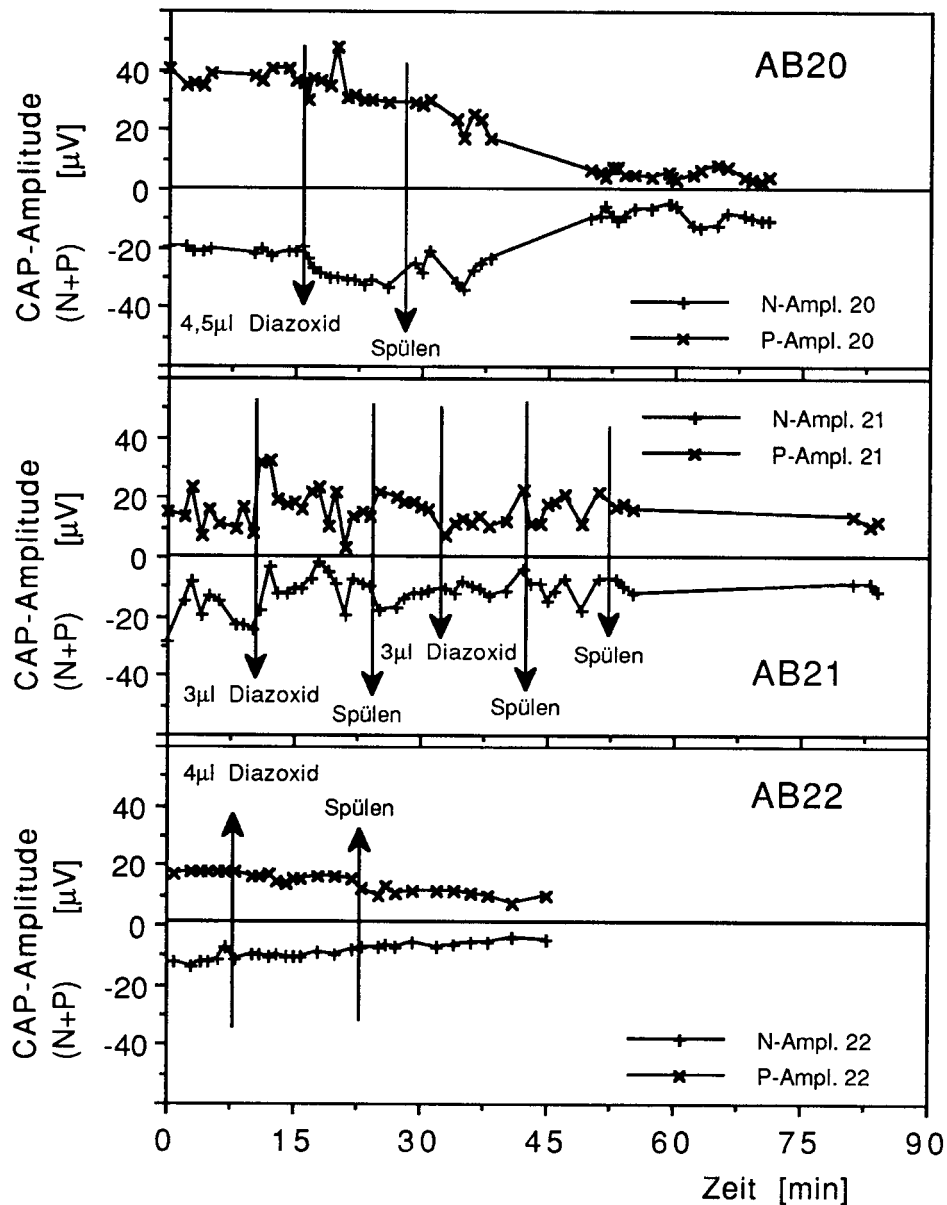
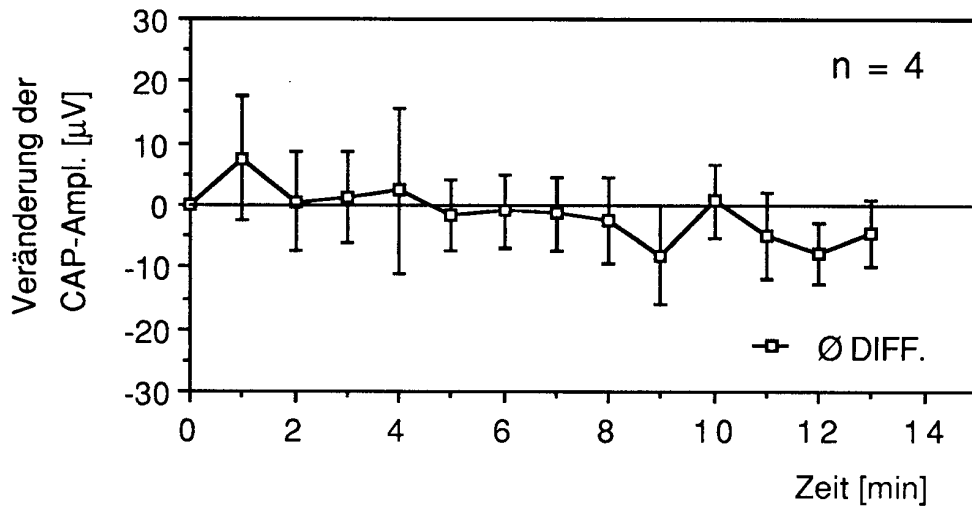


Abb. 5.14. zeigt den Verlauf der N- und P-Amplitude des CAP, während Diazoxid-haltige künstliche Perilymphe (AB20, AB22: $c = 2\text{mM}$; AB 21: $0,5\text{mM}$) appliziert wird (\downarrow). Nach den Applikationen wird teilweise mit künstlicher Perilymphe gespült. Außer durch die Applikation selbst verursachte, kurz dauernde, Veränderungen, kommt es zu keiner Veränderung beider Amplituden durch Diazoxid. Der Abfall der Amplituden in Versuch AB20 nach Spülen ist auf Versuchs-technische Artefakte zurück zuführen. Die durchschnittliche Veränderung der Gesamt-Amplitude (N- + P-Amplitude) nach Applikation ist in Abb. 5.15.a dargestellt.

Abb.: 5.15.

Veränderung der CAP-Schwellenkurve und der CAP-Amplitude
nach Applikation von Diazoxid in die Scala tympani

a. Veränderung der CAP-Amplitude:



b. Veränderung der CAP-Schwelle:

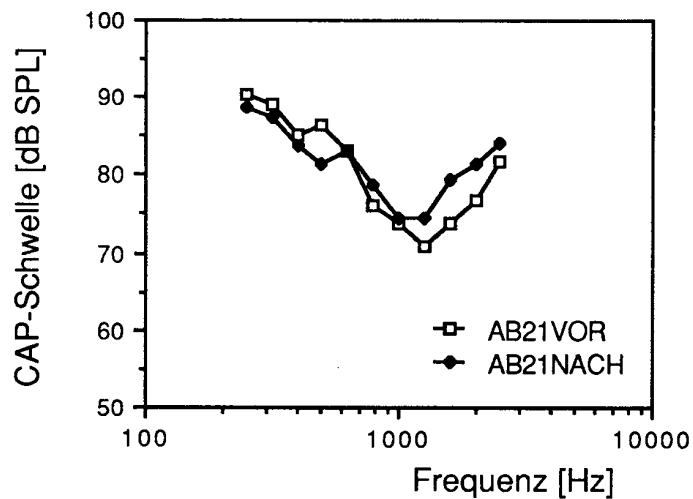


Abb. 5.15.a zeigt den durchschnittlichen Verlauf der Gesamtamplitude (N- + P-Amplitude) des CAP nach Applikation Diazoxid-haltiger künstliche Perilymphe (3-4,5µl, c = 1,5-2mM) in die Scala tympani (n = 4). Die Querbalken geben die Standardabweichung an. Es kam zu keiner signifikanten Veränderung nach Applikation (gepaarter t-Test).

Abb. 5.15.b zeigt die Veränderung der CAP-Schwellen-kurve nach Applikation von Diazoxid in die Scala tympani an dem Beispiel von AB21 (2 x 3µl, c = 1,5mM).

6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von Ionenkanälen des Innenohrgewebes bei der Kodierung von Schallreizen zu bestimmen. Insbesondere sollte die Frage untersucht werden, ob die Ergebnisse von Experimenten an isolierten Haarzellen und die daraus resultierenden Modelle der Innenohrfunktion durch die eigenen *in vivo* durchgeführten Ergebnisse bestätigt werden können. In den durchgeführten Experimenten wurden verschiedene Modulatoren von Ionenkanälen in das Innenohr von Tauben injiziert. Als Kanalmodulatoren wurden Amilorid und Diazoxid gewählt. Amilorid blockiert überwiegend Natrium-abhängige Ionleitfähigkeiten; Diazoxid erhöht ATP-abhängige Kaliumleitfähigkeiten. Die genannten Substanzen wurde in die Scala media und in die Scala tympani injiziert und die Funktion des Innenohrs wurde anhand des EP, des CAP und Einzelfaseraufzeichnungen auditorischer Nervenfasern getestet.

Davis stellte 1958 ein *elektrisches Modell des Innenohres* des Säugers vor. Von anderen Autoren wurde dieses Modell als Grundlage verwendet und weiter modifiziert (Leng, 1980; Dallos, 1983; Voßieck, 1991).

Dem Modell von Davis liegen verschiedene Widerstände und zwei Spannungsquellen zugrunde. Die Widerstände repräsentieren die apikalen Membran der Haarzelle (sie trennt das Cytosol von der Scala media) und die basolaterale Membran (sie trennt das Cytosol von der Scala tympani) der Haarzelle und das Tegmentum vasculosum. Ihre Größe bestimmt die Ion-Permeabilität über die Membranen. Zusammenfassend läßt sich dieses elektrische Modell des Innenohres des Säugers als ein Spannungsteiler mit zwei Batterien beschreiben (siehe auch Kap. 3.2.1.).

Die eine Batterie ist das Tegmentum vasculosum und erzeugt ein Bestandpotential (das EP) von +10mV zwischen der Scala media und der Scala vestibuli. Das EP besteht aus einem elektrogenen Potential und einem passiven Diffusionsanteil (Kuijpers und Bonting, 1970a,b; Necker, 1970; Sellick und Bock, 1974; Voßieck und Klinke, 1990; Sauer et al., 1999). Das elektrogene Potential wird durch aktiven Ionentransport mittels Ouabain-sensibler $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPasen im Tegmentum vasculosum generiert. Die zweite Batterie wird aktiven Ion-Transportprozessen in der basolateralen Membran der Haarzellen zugeordnet, welche einen

Konzentrationsgradienten für Ionen einer Art über die basolaterale Membran der Haarzelle erzeugen (Kuijpers und Bonting, 1970a, b; Necker, 1970; Voßieck, 1991).

Für den Vogel wurde dieses elektrische Modell insbesondere für die basolaterale Membran modifiziert, die durch eine Kapazität und eine Induktivität dargestellt wird (Voßieck, 1992). Dadurch kommt es zu einem Resonanzverhalten der Haarzelle, bzw. die Haarzelle hat die Eigenschaften eines elektrischen Filters (siehe auch Kap. 3.2.5.).

Das EP ist die treibende Kraft des Transduktionsprozesses und ist von Ionleitfähigkeiten zwischen Endolymphe und Perilymphe und dem dazwischen liegenden Intrazellulärraum der Haarzelle abhängig.

Eine Beeinflussung dieser Ionleitfähigkeiten müßte den Transduktionsprozeß beeinflussen, und insbesondere auch zu Veränderungen des EP führen. Dies wiederum hätte Veränderungen der Aktivität afferenter Neurone und der Abstimmung der Haarzelle zur Folge. Als Meßparameter dieser Veränderungen wurden das EP, das CAP und die spontane und akustisch evozierte Aktivität afferenter Neurone bestimmt.

Die Experimente zeigen, daß Amilorid das EP nicht signifikant verändert. Die Applikation von Diazoxid in die Scala media führt hingegen zu einem signifikanten Anstieg des EP. Das CAP und die Einzelfaseraktivität auditorischer Fasern im intakten Innenohr der Taube werden durch Applikation von Amilorid in die Scala media beeinflusst. Applikation von Diazoxid in die Scala media hat dagegen keinen Effekt auf das CAP oder die Einzelfaseraktivität auditorischer Neurone.

Bei Applikation in die Scala tympani hat keiner der beiden Substanzen einen Einfluß auf das CAP.

6.1. Allgemeine Vorbemerkungen zu den Ergebnissen und der Methode

6.1.1. Verteilung der Substanzen und Konzentrationsabschätzung nach Applikation in Scala media

In den Experimenten wurden 0,09 bis 0,55 μ l künstliche Endolymphe mit Zusatz von Amilorid bzw. Diazoxid in die Scala media appliziert. Das Volumen wurde als Bolus in die Scala media infundiert. Diese Methode wurde gewählt, da eine kontinuierliche Perfusion der Scala media zwei Zugänge erfordert hätte (einen Einlaß und einen Auslaß). Das ließ sich präparationstechnisch nicht realisieren.

Direkt nach Applikation eines Bolus kommt es zu einer inhomogenen Verteilung der Substanzen in der Endolymphe und die Konzentration der Kanalmodulatoren dürfte sich in der Nähe der Applikationselektrode nicht wesentlich von der Konzentration der Substanz in der applizierten künstlichen Endolymphe unterscheiden haben (1 mmol/l für Amilorid, 1-2 mmol/l für Diazoxid). Die Spitze der Applikationselektrode wurde in der Nähe von Haarzellen mit einer Bestfrequenz von 1-3 kHz plaziert. Daher sind bei Haarzellen, die auf diesen Frequenzbereich abgestimmt sind, initial die höchsten Konzentrationen der applizierten Substanzen zu erwarten. In weiterer Entfernung von der Applikationselektrode wird die initiale Konzentration der applizierten Substanz 0 mmol/l betragen haben. Dieser initiale Konzentrationsgradient muß bei der Interpretation von Ergebnissen, welche Frequenz-abhängige Veränderungen zeigen, bedacht werden.

Im weiteren Zeitverlauf wird sich die Substanz in der Scala media durch Diffusion verteilt haben. Für den Fall einer homogenen Verteilung der Substanz in der Scala media nach einer gewissen Zeit liegt die geschätzte Konzentration von Amilorid zwischen 0,06 und 0,27 mmol/l und von Diazoxid zwischen 0,06 und 0,54 mmol/l. Diesen Schätzungen liegt ein totales Volumen der Scala media von 1,5 μ l zugrunde, das anhand von Serien-Querschnitten der Scala media abgeschätzt wurde (Richter et al., 1994). Eine exakte Konzentrationsangabe zu jeder Zeit und an jeden Ort der Scala media ist daher nicht möglich.

6.1.2. kurzfristige Effekte durch Applikation in Scala media

Initial nach Applikation der gewählten Lösungen (Amilorid-haltiger, Diazoxid-haltiger oder künstlicher Endolymphe ohne Zusatz) kommt es zu einem Anstieg des EPs. Der Meßwert stieg zunächst rapide an und fiel während der weiteren Austreibung der Flüssigkeit wieder ab. Bereits mit Beendigung der Austreibung der Flüssigkeit hatte sich der initiale Anstieg des EPs

fast vollständig zurückgebildet. Mögliche Erklärung für die beobachtete Veränderung ist ein Druckanstieg in der Scala media durch das erhöhte Volumen. Eine mögliche Folge kann eine Verschiebung der Basilarmembran in Richtung Scala tympani sein. Auslenkung der Basilarmembran in Richtung der Scala tympani verursacht möglicherweise einen mechanischen Verschluss der noch in Ruhe offenen Transduktionskanäle (ca. 12% nach Ohmori, 1987). Ein Verschluss weiterer Transduktionskanäle hätte einen reduzierten Ionenfluß und folglich einen höheren Widerstand der apikalen Membran der Haarzelle zur Folge. Dies hätte gemäß dem elektrischen Modell der Cochlea einen Anstieg des EP zur Folge.

6.1.3. Frequenzabhängigkeit der Ergebnisse

Wie im Kapitel 6.1.1. diskutiert, führt die Bolus-Applikation initial zu einem Konzentrationsgradienten der applizierten Substanz.

Dies muß einen Wirkungsgradienten des Pharmakons auf das CAP zur Folge haben. Es ist zu erwarten, daß der Effekt auf das CAP in dem Frequenzbereich 1-3 kHz am größten ist, da an dieser Stelle appliziert wurde. Auf anderer Seite, haben die auditorischen Neurone (das CAP ist Ausdruck der summierten neuronalen Aktivität) in diesen Frequenzbereich tendenziell niedrigere Ratschwellen als Neurone mit tieferen CFs, sind somit empfindlicher für Schallreize (Klinke et al., 1993; Smolders et al., 1995). Eventuell sind sie damit empfindlicher für pharmakologische Einflüsse. Somit kann eine stärkere Anhebung der CAP-Schwelle im Frequenzbereich um 1-3kHz auch Ausdruck einer stärkeren Beeinflussbarkeit durch Amilorid sein. Solange man keine gleichmäßige Verteilung des Pharmakons in der Endolymphe voraussetzen kann, ist es schwierig anhand des CAPs zu entscheiden, was die wesentliche Ursache für die frequenzabhängige Schwellenanhebung ist, ein Konzentrationsgradient oder ein Unterschied in der Empfindlichkeit.

Anders stellt sich die Situation bei der Einzelfaserableitung dar. Denn während die CAP-Schwelle von den Antworteigenschaften einer Population von Haarzellen verschiedenen Ursprungs abhängt, stellt die Einzelfaserableitung die Antwort einer individuellen Haarzelle, bzw. einer sehr kleinen Population von Haarzellen dar (eine Nervenfasern kann bis zu drei THCs und auch bis zu 10 SHC kontaktieren; Whitehead und Morest, 1985; Düring et al., 1985; Klinke und Smolders, 1993; Fischer, 1992; Fischer, 1994). Der räumliche Gradient ist

daher bei Einzelfaserableitungen wesentlich kleiner ist als bei CAPs und daher hat der Konzentrationsgradient, wenn vorhanden, einen wesentlich geringeren Einfluß auf die beobachteten Größen. Für die einzelne Haarzelle selbst existiert, im Gegensatz zu einer Population von Haarzellen, kein Konzentrationsgradient. Daher stellen, im Gegensatz zu den Veränderungen bei CAP-Schwellen, frequenzabhängige Effekte bei Einzelfaserableitungen den Effekt des Pharmakons auf die einzelne Haarzelle dar. Eine frequenz-abhängige Anhebung der Ratenschwelle bei Einzelfaserableitungen stellt daher eine Änderung der Abstimmung der Haarzelle dar. Die Frequenzselektivität des Innenohrs wurde daher auch anhand der neuronalen Aktivität einzelner auditorischer Afferenzen bestimmt.

6.2. Wirkung von Amilorid auf die Innenohrfunktion

Amilorid ist ein Natrium-Kanal-Blocker (Palmer 1984; Kleyman et al. 1988; Benos et al., 1992). Außerdem blockiert es $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, Na^+/H^+ -Austauscher und spannungsabhängige Kalzium-Kanäle vom L- und T-Typ (Kaczorowski et al., 1985; Kleyman und Cragoe, 1988; Tang et al., 1988). Experimente an isolierten auditorischen Haarzellen *in vitro* zeigten eine Abnahme des Transduktionsstromes nach Zugabe von Amilorid in die umspülende Flüssigkeit (Jørgensen und Ohmori, 1988; Rüscher et al. 1994). Die Pharmakonkonzentration, die zu einem 50%igen Block führt (IC_{50}), betrug $50\ \mu\text{mol/l}$. Bei den eigenen Experimenten lag die Amiloridkonzentration nahe der Spitze der Applikationselektrode direkt nach Applikation bei etwa $1\text{-}2\ \text{mmol/l}$. Setzt man eine vollständige Verteilung des Amilorids in der gesamten Scala media voraus, errechnet sich eine Konzentration zwischen $0,06$ und $0,27\ \text{mmol/l}$. Dies ist oberhalb der IC_{50} , wie sie für die Blockierung des Transduktionskanals bei Experimenten an isolierten Haarzellen angegeben wird (Jørgensen et al., 1988; Rüscher et al. 1994).

Wie entsprechend dem elektrischen Modell des Innenohres ausgeführt, müßte eine Blockierung des Transduktionskanals zum einen zu einer Erhöhung des Widerstandes der Basilarmembran führen. Dies müßte ein Anstieg des EP zur Folge haben. Zum anderen müßte ein Block des Transduktionskanals eine Abnahme der akustisch evozierten Entladungsrates und ein Anstieg

der CAP-Schwelle zur Folge haben. Geht man davon aus, daß die spontane Aktivität der Nervenfasern durch konstante Transmitterfreisetzung der Haarzelle generiert wird, ist zu erwarten, daß auch die spontane Aktivität von der Leitfähigkeit der Transduktionskanäle abhängt. Insbesondere wenn Amilorid auch die in Ruhe noch offenen Transduktionskanäle (ca. 12% nach Ohmori, 1987) blockiert, wäre daher auch eine Abnahme der spontanen Aktivität afferenter Neurone nach Applikation von Amilorid in die Scala media zu erwarten.

Die Applikation von Amilorid in die Scala media *in vivo* führt zu keiner längerfristigen Veränderung des EP, zu einer Anhebung der CAP-Schwelle und bei Einzelfaserableitung afferenter auditorischer Neurone zu einer Abnahme der akustisch evozierten Aktivität aber einem Anstieg der spontanen Aktivität und zu einem Absinken der CF.

Ein initialer, aber reversibler Anstieg des EP in den ersten 4 Minuten, sowie die Frequenzabhängigkeit des Anstiegs der CAP-Schwelle scheinen methodisch bedingt sein.

In Bezug auf Veränderungen des CAP und dem Verhalten der akustisch evozierte Aktivität afferenter Neurone bestätigen daher die eigenen *in vivo* Versuche das oben dargestellte elektrische Modell der Innenohrfunktion. Nicht mit dem Modell erklärbar ist hingegen die fehlende Veränderung des EP. Ebenfalls entgegen den oben getroffenen Hypothesen und Erwartungen, stieg die spontane Aktivität nach Applikation von Amilorid in die Scala media in den Grenzen des dynamischen Bereichs zwischen spontaner und akustisch evozierter Aktivität an. Dieser Effekt ist mit dem Block des Transduktionskanals nicht erklärbar. Weiterhin mit dem Block des Transduktionskanals nicht erklärbar, ist das Sinken der CF der afferenten Neurone bzw. asymmetrische Veränderung der Iso-Intensitätskurven der Neurone mit stärkerer Reduktion der akustisch evozierten Entladungsraten im Bereich der höheren Frequenzen.

Amilorid scheint demnach noch andere Ionleitfähigkeiten zu beeinflussen, welche sowohl an der Generierung der spontanen Aktivität, wie auch an der Frequenzkodierung beteiligt sind.

Im Folgenden wird die Wirkung von Amilorid auf die einzelnen Parameter, insbesondere Unterschiede der eigenen Ergebnisse im Vergleich mit dem elektrischen Modell des Innenohres, diskutiert.

6.2.1. Wirkung von Amilorid auf das EP

Wie bei isolierten Haarzellen gezeigt werden konnte, blockiert Amilorid den Transduktionskanal (Jørgensen et al., 1988; Rüsç et al. 1994). Folglich müßte nach Applikation von Amilorid in die Scala media durch die Blockierung der an der apikalen Membran lokalisierten Transduktionskanäle der Widerstand der apikalen Membran der Haarzelle steigen. Durch Abnahme des Ausgleichs der Ionenkonzentration zwischen Scala media und Haarzelle durch die Abnahme des Influx von K^+ -Ionen durch den Transduktionskanal in die Haarzelle käme es auch zu einer Veränderung des Diffusionspotentials. Insgesamt hätte dies einen Anstieg des EPs zur Folge.

Tatsächlich zeigt sich nach Applikation von Amilorid ein Anstieg des EP in den ersten 4 Minuten, darüber hinaus hat es aber keinen Einfluß auf das endocochleäre Potential. Wie aber bereits im Kapitel 6.1.2. diskutiert, ist ein initialer reversibler Anstieg des EP schon durch die Volumenbelastung durch die Bolus-Applikation zu erklären. Inwiefern der initiale Anstieg zusätzlich durch einen Block der Transduktionskanäle verursacht wurde, läßt sich nicht abgrenzen.

Zu einem längerfristigen Anstieg des EP nach Applikation des Amilorid in die Scala media kam es nicht, was den oben ausgeführten Erwartungen widerspricht. Eine mögliche Erklärung wäre die zumindest initiale inhomogene Verteilung des Amilorids in der Scala media, wie es bereits im Kapitel 6.1.1. diskutiert wurde. Demnach werden zwar im Bereich der Haarzellen, welche auf Frequenzen um 1-3kHz abgestimmt sind, der größte Teil der Transduktionskanäle blockiert sein. Im Bereich der weiter apikal gelegenen Haarzellen, die auf niedrigere Frequenzen abgestimmt sind, ist die Amiloridkonzentration aber niedriger und damit eventuell ein größerer Anteil der Transduktionskanäle dieser Haarzellen noch offen. Betrachtet man also die Papilla basilaris in ihrer Gesamtheit, ist sicherlich nur ein Teil der Transduktionskanäle geschlossen. Daher ist es denkbar, daß bei einzelnen Haarzellen es zu einer deutlichen Erhöhung des Widerstandes der apikalen Membran kommt, der Gesamtwiderstand der Papilla basilaris aber nicht wesentlich zunimmt.

6.2.2. Wirkung von Amilorid auf das CAP

Amilorid hebt die CAP-Schwelle an. In den CAP-Abstimmkurven zeigt sich, daß dieser Anstieg der CAP-Schwelle frequenzabhängig ist (siehe Abb. 5.2.). Die CAP-Abstimmkurven werden vor allem im Bereich von 0,7kHz bis 2,0kHz durch Amilorid beeinflusst. Wie in Kap.6.1.3. diskutiert, muß davon ausgegangen werden, daß dieser frequenz-abhängige Anstieg wahrscheinlich methodisch bedingt ist, da Amilorid in der Scala media direkt nach Applikation einen Konzentrationsgradienten ausbildet und der Effekt des Amilorids daher frequenzabhängig unterschiedlich stark ist (siehe Kap. 6.1.1.). Erklärt werden kann der Anstieg der CAP-Schwelle nach Applikation von Amilorid durch den Block des Transduktionskanal. Dadurch kann die Haarzelle nicht mehr durch Abscheren der Cilien depolarisiert werden, eine Abnahme der akustisch evozierten Aktivität des nachgeschalteten afferenten Neurons ist die Folge. Da das CAP die Summe der akustisch evozierten Aktivität widerspiegelt (Derbyshire und Davis; 1935; Dallos et al., 1976; siehe auch Kap.3.2.1.), ergibt sich ein Anstieg der CAP-Schwelle.

6.2.3. Wirkung von Amilorid auf Einzelfaserableitungen

Amilorid beeinflusst bei nur einem Teil der untersuchten Neurone sowohl die spontane wie auch die akustisch evozierte Entladungsrate. Bei den Neuronen, bei den Amilorid eine Veränderung bewirkt, stieg die spontane Aktivität, sank aber die akustisch evozierte Aktivität, die Abstimmung verschlechterte sich und die charakteristischen Frequenz verschob sich zu niedrigeren Frequenzen.

Betrachtet man die Unterschiede zwischen der Gruppe von Neuronen welche eine Veränderung der spontanen und akustisch evozierten Aktivität zeigt und der Gruppe von Neuronen ohne Veränderung der Aktivität, so zeigen sich Unterschiede in der CF der Neurone und der applizierten Dosis Amilorid.

Nur bei Neuronen mit einer charakteristischen Frequenz oberhalb von 700 Hz zeigte sich oben genannte Veränderung. Erklärt werden können die frequenzabhängigen Veränderungen durch den Konzentrationsgradient in der Scala media direkt nach Applikation (siehe auch Kap. 6.1.1.), wonach die Konzentration im Bereich von 1-2kHz am höchsten ist, und in Richtung niedriger Frequenzen abnimmt (d.h. in Richtung des Apex der Papilla basilaris).

Ein weiterer Unterschied liegt in der applizierten Menge. In Gruppe der Neurone welche Veränderung der evozierten Entladungsrate zeigte, wurden zum Teil höhere Dosen Amilorid

gegeben. Die Amiloridkonzentration lag bei dieser Gruppe zwischen 15,5 - 40,3nM, bei der Gruppe von Neuronen welche keine Veränderung zeigten, lag sie zwischen 12,4 - 27,9nM. Beide Effekte überlagern sich synergistisch und führen dazu, daß im untersuchten unteren Frequenzbereich die Amilorid-Konzentration niedriger war als im untersuchten höheren Frequenzbereich.

Zusammenfassend ergibt sich daher eine höhere Konzentration des Amilorids für die Gruppe von Neuronen, bei denen Amilorid einen Effekt auf die neuronale Aktivität hat.

Bezüglich des Anstiegs der spontanen Aktivität der Neurone als Folge der Amilorid-Applikation gibt es eine Ausnahme der oben gefaßten Gruppeneinteilung: abweichend ist das Neuron AN6. Es hat eine charakteristische Frequenz von 502Hz. Dennoch kam es zu einem Anstieg der spontanen Entladungsrate aber zu keiner Veränderung der akustisch evozierten Entladungsrate. Die applizierte Menge Amilorid bei diesen Neuron lag bei 27,9nM.

Die beobachtete Abnahme der akustisch evozierten Entladungsrate, die Anhebung der Entladungsschwelle und der Verlust der Abstimmstärke läßt sich hinreichend mit dem Block des Transduktionskanal durch Amilorid erklären.

Ein Block des Transduktionskanals verhindert eine mechanisch induzierte Depolarisation der Haarzelle und schließt außerdem die beim Vogel auch in Ruhe (d.h. ohne mechanische Stimulation der Cilien) offenen Transduktionskanäle (ca. 12% nach Ohmori, 1987) und damit auch den in Ruhe meßbaren depolarisierenden Strom über die apikale Membran.

Es kommt zu einer Erhöhung des Widerstandes der apikalen Membran und zu einer Hyperpolarisation der Haarzelle. Folglich wäre eine Abnahme sowohl der spontanen wie auch der akustisch evozierten Entladungsrate zu erwarten. In Bezug auf die akustisch evozierte Aktivität traf dies so in den eigenen Experimenten auch zu. Geht man davon aus, daß auch die spontane Aktivität der Nervenfasern durch konstante Transmitterfreisetzung der Haarzelle generiert wird, wäre daher zu erwarten, daß auch die spontane Aktivität von der Leitfähigkeit der Transduktionskanäle abhängt.

Im Gegensatz zu dieser Überlegung, kam es aber in den eigenen Experimenten zu einem Anstieg der spontanen Entladungsrate, was sich, wie gesagt, nicht mit dem Block des Transduktionskanals erklären läßt.

Somit ist zu vermuten, daß zum einen die Spontanaktivität nicht allein durch den Transduktionskanal reguliert wird und zum anderen Amilorid noch weitere Ionleitfähigkeiten

im Innenohr beeinflusst. Es stellt sich also die Frage, welche weiteren Leitfähigkeiten möglicherweise von Amilorid beeinflusst wurden und wo diese lokalisiert sein könnten.

Das zweite Ergebnis, daß nicht allein durch ein Block des Transduktionskanals erklärt werden kann, ist die Verschiebung der charakteristischen Frequenz hin zu niedrigeren Frequenzen nach Applikation von Amilorid in die Scala media. Genau betrachtet, zeigte sich die Verschiebung der charakteristischen Frequenz durch asymmetrische Veränderung der Iso-Intensitätskonturen der auditorischen Nervenfasern, d.h. die akustisch evozierte Entladungsrate wurde bei Reizung mit Frequenzen oberhalb der CF mehr reduziert als bei Reizung mit Frequenzen unterhalb CF (siehe auch Abb. 5.6.). Wie bereits im Kapitel 6.1.3. diskutiert, kann dies kein Effekt des Konzentrationsgradienten des Amilorids in der Scala media sein. Man muß also davon ausgehen, daß Amilorid direkt über Beeinflussung von Ionkanälen die Charakteristik der elektrischen Abstimmung der Haarzelle beeinflusst.

Eine Möglichkeit ist, daß die Bindekinetik von Amilorid mit den Transduktionskanal die Kanalkinetik v.a. für die schnellen Prozesse beeinflusst. Wie genau die Bindekinetik des Amilorids die Frequenzselektivität der Haarzelle beeinflussen kann, wäre durch weitere *in vitro* Experimente zu klären.

6.2.4. Weitere mögliche Wirkungen von Amilorid im Innenohr

Wie oben dargelegt, scheint Amilorid neben dem Block des Transduktionskanals noch weitere Wirkungen im Innenohr zu entfalten und somit die Abstimmung zu beeinflussen und die spontane Entladungsrate anzuheben. In der Kaskade des Transduktionsprozesses (Schallübertragung auf das Innenohr, mechanische Auslenkung der Basilarmembran, Abscheren der Cilien und Depolarisation der Haarzelle durch Öffnen der Transduktionskanäle, elektrisches Filter und Transmitterausschüttung auf das afferente Neuron) sind verschiedene Ansatzpunkte des Amilorid denkbar.

Man kann grundsätzlich zwischen einer Veränderungen im Bereich der Haarzelle selbst (z.B. weitere Ionleitfähigkeiten, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration oder Ciliensteifigkeit) oder der Beeinflussung anderer Strukturen des Innenohrs (z.B. des Tegmentum vasculosum) unterscheiden.

Wie Amilorid den Transduktionsprozeß über die Blockierung des Transduktionskanals hinaus beeinflussen könnte, soll im weiteren diskutiert werden. Insbesondere soll die Frage erörtert werden, ob weitere Amilorid-sensitive Ion-Kanäle im Bereich der apikalen Membran der Haarzelle vorkommen, sowie der mögliche Einfluß von Amilorid auf andere Funktionen bzw. Strukturen der Haarzelle.

6.2.4.1. Amilorid-sensitive Ion-Kanäle an der apikalen Membran der Haarzelle

In der Literatur gibt es Hinweise, daß neben dem Transduktionsprozeß weitere Ionleitfähigkeiten im Bereich der apikalen Membran existieren (Ohmori, 1988; Ohmori, 1989; Guth et al., 1991; Yamoah et al., 1998; Hudspeth, 2000; Boyer et al., 2001).

Im Bereich der apikalen Membran der Haarzelle kommt es zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen, dieser nimmt bei akustischer Reizung der Haarzelle zu (Ohmori, 1988; Hackney und Furness, 1995; Hudspeth et al., 2000). Nachgewiesen ist der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch den Transduktionskanal (Hudspeth, 1986; Ohmori, 1987; Wu et al., 1995; Hudspeth et al., 2000). Es gibt aber auch Hinweise, daß Ca^{2+} -Ionen im Bereich der apikalen Membran nicht nur in der Nähe der vermutenden Lokalisation des Transduktionskanals an der Spitze der Cilien (Hudspeth, 1982; Hackney et al., 1992+1994; Kachar, 1999; Hudspeth et al., 2000), sondern auch nahe der Insertion des Haarbündels in der Cuticularplatte in die Haarzelle einströmt (Ohmori, 1988). Die Ionenkanäle in diesen Bereich konnten bisher nicht identifiziert werden. Aufgrund des Verhaltens von Mangan-Ionen (Mn^{2+}) schloß Ohmori (1988), daß es sich nicht um einen Ca^{2+} -Kanal, sondern um den mechano-elektrischen Transduktionskanal handelt, durch den es zum Ca^{2+} -Influx kommt. Bei diesen Experimenten führten Mn^{2+} -Ionen zu einer Reduktion der Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in die Haarzelle, als Hinweis, daß die untersuchten Ionenkanäle für Mn^{2+} -Ionen durchlässig sind. Da Ca^{2+} -Kanäle nicht für Mn^{2+} -Ionen permeabel sind, schloß man, daß es sich nicht um Ca^{2+} -Kanäle, sondern um Transduktionskanäle handelte (Ohmori, 1988). Einschränkend muß zu dieser Aussage aber angemerkt werden, daß in der Literatur sehr wohl Ca^{2+} -Kanäle beschrieben sind, die für Mn^{2+} -Ionen durchlässig sind (Ochi, 1975; Fukuda et al., 1977; Anderson, 1979; Almers et al., 1981).

In einer anderen Arbeit wurden Amilorid-sensitive Kanäle im Bereich der apikalen Membran nachgewiesen (Hackney et al., 1992). Nach Applikation von markierten Antikörpern gegen

Amilorid-sensitive Ion-Kanäle, zeigte sich eine maximale Anreicherung knapp unterhalb der Spitzen der Stereocilien, und zwar an einer Stelle, an der sich zwei benachbarte Cilien berühren, aber nicht direkt in der Nähe der Gewebsbrücken der Cilien (Hackney et al., 1992). Es zeigte sich aber zusätzlich auch eine geringe Anreicherung in der apikalen Membran und entlang des Ciliums. Da bekannt ist, daß der Transduktionskanal mit Amilorid interagiert, schloß man, diesen in den Experimenten nach gewiesen zu haben. Weiterhin nahm man an, daß sich der Transduktionskanal in der Nähe der Spitze der Cilien befindet. Der Widerspruch zwischen der Untersuchung von Ohmori (1988) und Hackney et al. (1992) liegt in der gefolgerten Lokalisation des Transduktionskanals. Möglicherweise wurde aber gar nicht der Transduktionskanal, sondern ein anderer Amilorid-sensitiver Ionkanal untersucht.

6.2.4.2. Ciliensteifigkeit und Innenohr-Mechanik

Wie im letzten Absatz diskutiert, legen die Versuche mit Antikörpern gegen Amilorid-sensitive Ion-Kanäle nahe, daß es im Bereich der apikalen Membran weitere, d.h. vom Transduktion unabhängige, Ion-Kanäle gibt, die sich durch Amilorid beeinflussen lassen. Diese sind sowohl im Bereich der Cuticularplatte, aber auch im Bereich der Cilien lokalisiert (Ohmori 1988; Hackney et al., 1992). Möglicherweise handelt es sich hierbei um in neueren Studien nachgewiesene Ca^{2+} -Kanäle, welche an Ca^{2+} -abhängigen Prozessen zur Regulierung der Ciliensteifigkeit beteiligt sind (Lumpkin et al., 1998; Yamoah et al., 1998). Aus diesen Grund sollen diese Eigenschaften des Cilienbündels kurz dargestellt werden:

Untersuchungen zu Eigenschaften des Cilienbündels haben ergeben, daß dieses nicht nur ein passiv auf Schallreize reagierendes Konstrukt ist, sondern das Abscheren der Cilien durch aktive Prozesse unterstützt wird. Diese aktiven Eigenschaften des Cilienbündels sind für Prozesse wie Verstärkung von Schallreize, aber auch Adaption, verantwortlich (Übersichtsartikel: Hudspeth et al., 2000). Dabei ist es so, daß auch in Ruhe die einzelnen Cilien unter leichter Spannung durch die sie untereinander verbindenden Gewebsbrücken (“tip-links”) an der Spitze des Cilienbündels zueinander gezogen werden. Werden die Cilien durch einen akustischen Reiz in Richtung größeres Cilium ausgelenkt, öffnet sich der Transduktionskanal (siehe auch Kap. 3.2.2.). Aufgrund der räumlichen Ausdehnung des

Transduktionskanals durch das Öffnen, erschlafft die Gewebsbrücke, was es den Cilien ermöglicht, noch weiter auszulenken. Somit hat das Öffnen des Transduktionskanal einen synergistischen bzw. verstärkenden Effekt auf die Cilienauslenkung (Hudspeth et al., 2000). Durch den nun geöffneten Transduktionskanal strömen neben Na^+ -Ionen auch Ca^{2+} -Ionen in die Haarzelle, bzw. in die Cilien der Haarzelle. Durch Binden eines Ca^{2+} -Ions im Bereich des Transduktionskanals (wahrscheinlich an der cytoplasmatischen Seite), wird das Schließen des Transduktionskanals unterstützt (Howard et al., 1988, Hudspeth et al., 2000). Durch das Schließen des Transduktionskanal erhöht sich wieder die Spannung der Gewebsbrücke und die Cilien werden in ihre Ausgangsposition zurückgestellt. Aus dieser komplexen Interaktion zwischen Transduktionskanal-Kinetik, Länge der Gewebsbrücke und Cilienabscherung ergibt sich zum einen ein aktiver Verstärkerprozess der Cilienauslenkung, zum anderen erhöht dieser Mechanismus die Sensitivität der Haarzelle (Hudspeth et al., 2000).

Ein weiterer aktiver Mechanismus im Bereich des Cilienbündels dient der Adaption auf Schallreize. Dabei ist es so, daß nach einem Schallreiz die Insertionsstelle der Gewebsbrücke sich entlang des Ciliums nach unten verschiebt (Hudspeth, 1994; Hudspeth und Gillespie, 1994; Eatock, 2000; Hudspeth et al., 2000).

Es ist schon länger bekannt, daß die Cilien der Haarzellen viele Komponenten enthalten, welche auch bei motorischen Prozessen eine Rolle spielen, u.a. Calmodulin, Calbindin, Aktin, Tubulin und Fimbrin (für den Ochsenfrosch: Gillespie et al., 1991). Zunächst ging man davon aus, daß die Funktion dieser Proteine nur darin besteht, dem Cilienbündel eine gewisse Steifheit zu verleihen (Ashmore, 1984; Crawford et al., 1985).

Neuere Untersuchungen legen aber nahe, daß eine wesentliche Funktion dieser Proteine der oben beschriebene Mechanismus der Verschiebung der Ansatzpunkte der Gewebsbrücken ist (Hudspeth 2000). Dieser Mechanismus wird wahrscheinlich v.a. durch Calmodulin und Myosin vermittelt wird. Das Zusammenspiel dieser beiden Komponenten spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Kontraktion des Muskels (Übersicht: Rüegg, 1990). Dabei binden Ca^{2+} -Ionen wahrscheinlich an Calmodulin. Calmodulin konnte in hoher Konzentration im Bereich der Cilienspitze nachgewiesen werden (Walker et al., 1996). Die Cilien enthalten insbesondere im Bereich des Ansatzpunktes der Gewebsbrücken zwischen den Cilien, neben drei anderen Isoformen von Myosin, v.a. Myosin I β . Vorstellen muß man sich den daraus resultierenden Mechanismus so, daß durch den Transduktionskanal eindringende Ca^{2+} -Ionen mittels Calmodulin und Myosin die Insertionsstelle der Gewebsbrücke nach unten verschieben und damit die Spannung der Gewebsbrücke reduziert. Dadurch schließt der Transduktionskanal

und es wird dadurch eine Adaption eines Schallreizes erreicht (Hudspeth, 1994; Hudspeth und Gillespie, 1994; Eatock, 2000; Hudspeth et al., 2000).

Durch diese Koppelung des Schließmechanismus des Transduktionskanals mit einem Motor-Mechanismus (Myosin / Calmodulin / Ca^{2+} -Ionen) haben Haarzellen einen zusätzlichen Mechanismus entwickelt, sowohl die Sensitivität, aber auch die Frequenzselektivität zu erhöhen (Hudspeth et al., 2000). Diese elektro-mechanischen Eigenschaften des Cilienbündels führen z.B. beim Huhn aber auch der Schildkröten (es besteht eine enge phylogenetische Verwandtschaft zum Vogel) zu mechanisch evozierten Oszillationen des Cilienbündels (Crawford et al., 1985; Fettiplace und Fuchs, 1999; Manley, 2000).

Wie oben ausgeführt, sind beide aktive Prozesse des Cilienbündels, Verstärkung der Cilienauslenkung (gating compliance) und Adaption, von dem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch den Transduktionskanal in die Haarzelle abhängig (Hudspeth et al., 2000). Daher muß es auch Prozesse geben, welche diese Ca^{2+} -Ionen wieder aus der Haarzelle heraus schleusen.

Daher wird postuliert, daß im Bereich der Cilien Iontransportmechanismen existieren, welche Ca^{2+} -Ionen wieder aktiv aus der Haarzelle heraus transportieren. Ein möglicher Kandidat wäre die Ca^{2+} -ATPase (Yamoah et al., 1998). Diese haben Einfluß auf Ciliensteifigkeit aber auch auf die Spannung der Gewebsbrücken zwischen den Cilien (Yamoah et al., 1998; Hudspeth et al., 2000).

Amilorid hat neben den in Kapitel 3.3.3. beschriebenen Effekten auf Ionkanäle auch eine blockierende Wirkung auf diverse ATP-abhängige Prozesse und Protein-Kinasen, z.B. blockiert Amilorid die Adenylat-Cyclase (welche ATP in cAMP umwandelt) der Erythrozyten des Fisches mit einer IC_{50} von nur $60\mu\text{M}$ (Kleyman et al., 1988; Mahe et al., 1985). Daher ist eine Wirkung von Amilorid auf die Ca^{2+} -ATPase durchaus denkbar. Leider liegen hierzu keine genaueren Untersuchungen vor.

Die Frage ist nun, welche Wirkung Amilorid in den eigenen *in vivo* Versuchen haben könnte, wenn es jene Ca^{2+} -ATPase blockieren würde, und ist dies mit den eigenen Ergebnissen vereinbar.

Da Cilien wahrscheinlich keine Kompartimente hat, welche Ca^{2+} -Ionen aufnehmen, kommen aktiven Prozessen, welche Ca^{2+} -Ionen aus der Haarzelle ausschleusen, eine entscheidende Bedeutung bei der Regulierung der Ca^{2+} -Homöostase zu (Yamoah et al., 1998). Eine Blockierung der Prozesse, welche Ca^{2+} -Ionen wieder aus der Haarzelle ausschleusen (z.B. o.g. Ca^{2+} -ATPase), hätte daher eine Akkumulation von Ca^{2+} -Ionen in den Cilien der Haarzelle zur

Folge. Dies dürfte Einfluß die oben beschriebenen aktiven Prozesse der Adaption und der *gating compliance* haben, mit der Folge, daß es u.a. eventuell zu keiner Rückstellung des Ansatzpunktes der Gewebsbrücke, und damit zu einer dauerhaften Tonusminderung der Gewebsbrücke kommt. Tatsächlich führt eine Anhebung der Ca^{2+} -Konzentration im Bereich der Stereocilien zu einer Abnahme der Ciliensteifigkeit (Pae et al., 1994). Da auch die Kinetik des wieder Schließens des Transduktionskanal durch Ca^{2+} -Ionen beeinflusst wird (Howard et al., 1988; Hudspeth et al., 2000), ist auch eine Veränderung der Schließkinetik des Transduktionskanals denkbar. Insbesondere dies wäre eine mögliche Erklärung, warum nach Gabe von Amilorid die spontane Entladungsrates ansteigt.

Wie genau eine Blockierung der aktiven Prozesse durch Amilorid, welche Ca^{2+} -Ionen wieder aus der Haarzelle ausschleusen, die o.g. Prozesse der Adaption und der *gating compliance* beeinflussen könnte, ist schwer abzuschätzen. Denn noch komplizierter wird der ganze Sachverhalt dadurch, daß Amilorid gleichzeitig auch den Transduktionskanal selbst blockiert und dadurch auch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch den Transduktionskanal in die Haarzelle verhindert.

Insgesamt wird man aber davon ausgehen können, daß diese Prozesse, welche von einer sehr feinen Regulierung des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes abhängen, nachhaltig gestört werden. Da diese Prozesse sowohl die Sensitivität, aber auch die Frequenzselektivität der Haarzelle erhöhen (Hudspeth et al., 2000), wird eine Abnahme der Güte der Abstimmung aber auch eine Anhebung der Ratschwelle die Folge sein.

Weiterhin wäre zu diskutieren, inwieweit eine veränderte Ciliensteifigkeit bzw. veränderte Spannung der Gewebsbrücken einen Einfluß auf die Mechanik zwischen Tektorialmembran (TM) und Basilarmembran (BM) hat. Bei akustischer Reizung des Innenohres kommt es aufgrund unterschiedlicher Befestigungspunkte an der knöchernen Cochlea und damit unterschiedlicher Drehpunkte zu Scherbewegungen zwischen Basilarmembran und Tektorialmembran (Held, 1936; Schwartzkopff und Winter, 1960). Die in der Papilla basilaris eingebetteten Haarzellen haben mit ihren Stereocilien Kontakt zur Tektorialmembran, dadurch kommt es bei akustischer Reizung des Innenohres zum Abscheren der Cilien (Cotanche et al., 1987; siehe auch Kap. 3.2.2).

Dadurch hängt die Abstimmung zum einen von der Cilienlänge ab (Tilney et al., 1983; Gleich und Manley, 1988; Fuchs et al., 1988), aber auch von der Mechanik des Innenohres und die

wiederum unter anderen von der Steifigkeit der Cilien. Eine veränderte Mechanik zwischen Tektorialmembran und Basilarmembran könnte daher auch Einfluß auf die Abstimmung der Haarzelle haben. Neben einer Abnahme der Güte der Abstimmung der Haarzelle, könnte eine veränderte Mechanik auch der Grund dafür sein, daß die akustisch evozierten Aktivität der Haarzelle einseitig oberhalb der CF abnimmt, wodurch der Eindruck einer CF-Verschiebung entsteht. Denn wie im Kapitel 5.2.1.3.2. ("Ergebnisse") ausgeführt, handelt es sich bei der in den eigenen Experimenten festgestellten CF-Verschiebung nicht um eine echte Verschiebung der gesamten Antwortfläche des auditorischen Neurons, sondern vielmehr um eine einseitige Abnahme der akustisch evozierten Aktivität oberhalb der CF.

6.2.4.3. Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Neben der oben beschriebenen Möglichkeit, daß Amilorid in den eigenen Versuchen die Haarzellfunktion über Beeinflussung von Ca^{2+} -Leitfähigkeiten im Bereich der apikalen Membran manipuliert, ist grundsätzlich auch eine Manipulation intrazellulärer Ca^{2+} -abhängiger Prozesse denkbar. Da Amilorid biologische Membranen durchdringen kann (Kleyman und Cragoe, 1988; Benos et al., 1992), ist es denkbar, daß es auch intrazellulär eine Wirkung entfaltet.

Wie in anderen Zellen auch, werden in der Haarzelle viele Prozesse über lokale intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen gesteuert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird über Ca^{2+} -Influx in die Zelle von außerhalb und über intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher kontrolliert. Mindestens an dem Influx in die Zelle, möglicherweise aber auch bei der Freisetzung aus intrazellulären Speichern, sind spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle beteiligt (Ohmori, 1984; Hudspeth, 1986; Shigemoto, 1990+1991; Guth et al., 1991; Nilles, 1994, Wu, 1995).

Sowohl bei der Generierung spontaner wie auch der akustisch evozierten Aktivität der nachgeschalteten auditorischen Neurone sind Ca^{2+} -abhängige Prozesse unter Beteiligung verschiedener Ionen-Leitfähigkeiten beschrieben (Guth et al., 1991). Auch im Bereich der afferente und efferente Synapse sind Ca^{2+} -abhängige Prozesse involviert, bei beiden führt eine Aktivierung zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Guth et al., 1991; Shigemoto et al., 1990; Ashmore et al., 1990).

Da Amilorid Einfluß auf viele Ca^{2+} -abhängige Ionleitfähigkeiten hat (Kaczorowski et al., 1985; Kleyman und Cragoe, 1988; Tang et al., 1988; Garcia et al., 1990) ist theoretisch auch eine

Beeinflussung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase denkbar. Da über die genaue Verteilung der intrazellulären Ca^{2+} -Depots und der an ihrer Regulation beteiligten Ionkanäle bis heute keine ausreichende Kenntnisse vorliegen, soll die hier auf eine weitere Ausführung der Möglichkeit einer Beeinflussung intrazellulärer Ca^{2+} -abhängiger Prozesse durch Amilorid verzichtet werden.

Grundsätzlich muß für die Idee, daß Amilorid intrazelluläre Prozesse beeinflussen kann, einschränkend angemerkt werden, daß Amilorid bei Applikation in Scala tympani keinen Einfluß auf die Haarzellfunktion hat. Würde Amilorid nach Durchdringen der Haarzellmembran eine intrazelluläre Wirkung in der Haarzelle verursachen, wäre zu erwarten, daß Amilorid auch bei Applikation in die Scala tympani durch die basolaterale Membran in die Haarzelle eindringt und eine intrazelluläre Wirkung entfaltet.

Eine Möglichkeit gäbe es, wie man einen unterschiedlichen Effekt von Amilorid auf intrazelluläre Prozesse zum einen bei Applikation in Scala media, zum anderen in Scala tympani erklären könnte: Amilorid diffundiert wahrscheinlich in unprotonierter Form durch die Zellmembran und geht in der Zelle in die wirksame protonierte Form über. Dadurch hat Amilorid die Eigenschaft, in Zellen zu akkumulieren (Kleyman und Cragoe, 1988). Die Haarzellen werden eng anliegend von sogenannten Stützzellen umgeben, welche im Gegensatz zu den Haarzellen Kontakt zur Basalmembran haben (Takasaki und Smith, 1971; Klinke und Smolders, 1993). Bei Applikation in Scala tympani könnte daher Amilorid in den die Haarzellen eng umgebenden Stützzellen akkumulieren und so nicht mehr die Haarzelle erreichen.

6.2.4.4. sonstige Strukturen im Innenohr

Bei der Überlegung, welche Ionen-Leitfähigkeiten Amilorid beeinflusst und damit seine Effekte bei Applikation in die Scala media hervorruft, muß bedacht werden, daß Amilorid neben der Papilla basilaris auch andere Strukturen erreicht. Dies ist in erster Linie das die Scala media von der Scala vestibuli abgrenzende Tegmentum vasculosum (Schwartzkopff et al., 1960; Takasaka et al., 1971). Die Oberfläche besteht aus hellen und dunklen Zellen (Schneider et al., 1987). Sie sind an der basolateralen Membran mit einer Ouabain-sensiblen Na^+/K^+ -ATPase ausgestattet und sind an der Entstehung des endocochleären Potentials beteiligt (Cotanche et al., 1987; Kuijpers et al., 1970).

Tatsächlich wurden vor allem an der apikalen (luminalen) Seite von Marginalzellen der Stria vascularis des Säugers (Meerschweinchen) Amilorid-sensitive Ionenkanäle nachgewiesen (Iwasa et al., 1994). Es soll sich dabei um Na^+ -Kanäle handeln, die vergleichbar mit den epithelialen Na^+ -Kanäle der Niere sind (siehe auch Kap.3.3.). Auch die Sensibilität ist bei einem IC_{50} von ca. $1\mu\text{M}$ mit der des renalen Na^+ -Kanals vergleichbar (Benos et al., 1992; Iwasa et al., 1994). Die Funktion soll darin bestehen, daß durch diesen in der Scala media befindliche Na^+ -Ionen in die Marginalzelle, und von dort via Na^+/K^+ -ATPase an der basolateralen Membran in die Scala vestibuli gelangen (Iwasa et al., 1994).

Die sogenannten dunklen Zellen im Tegmentum vasculosum sind mit den Marginalzellen der Stria vascularis des Säugers vergleichbar (Schneider et al., 1987). Daher wäre es denkbar, daß auch diese mit Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanälen an der luminalen Membran ausgestattet sind. Es ist aber Vorsicht geboten, die Verhältnisse des Säugerinnenohres ohne weiteres auf das Vogelinnenohr übertragen zu wollen. Denn auch wenn sowohl Stria vascularis wie auch Tegmentum vasculosum an der Generation des EP beteiligt sind (Cotanche et al., 1987; Kuijpers et al., 1970), so bestehen Unterschiede zwischen Säuger und Vogel, z.B. in der Höhe des EP (Säuger: $\sim +80\text{mV}$, Vogel: $\sim +10\text{mV}$, Voßieck, 1991; Klinke, 1993; Iwasa et al., 1994).

Doch selbst wenn ein solcher Amilorid-sensitiver Na^+ -Kanal auch in den Zellen des Tegmentum vasculosum des Vogel-Innenohrs vorhanden ist, und er in unseren Experimenten bei Applikation von Amilorid in die Scala media blockiert wurde, ist eine wesentliche Beeinflussung der dunklen Zellen in ihrer Funktion, Na^+ -Ionen aus der Scala media aufzunehmen, nicht zu erwarten. Denn, wie Iwasa et al. (1994) in ihrem Modell darstellen, wird ein Großteil der Na^+ -Ionen über nicht-selektive Ionenkanäle an der luminalen Membran der Marginalzellen in die Zelle aufgenommen. Der Amilorid-sensitive Na^+ -Kanal hat lediglich einen optimierenden Effekt auf die Aufnahme in die Zelle, sein quantitativer Beitrag wird gering sein.

Tatsächlich kam es in unseren Experimenten nach Applikation von Amilorid in die Scala media zu keiner Veränderung des EPs.

Eine direkte Beteiligung des Tegmentum vasculosum an der Generation der spontanen Entladungsrate oder der Abstimmung affärenter Nerven ist in der Literatur nicht beschrieben und aufgrund der örtlichen Distanz zu den Haarzellen, wenn, nur über eine Veränderung des EP denkbar. Doch dazu kam es in unseren Experimenten nicht. Deshalb kann die Zunahme der

spontanen Entladungsrate und die selektive Abnahme der evozierten Entladungsrate oberhalb der CF nicht mit einer Beeinflussung der Zellen des Tegmentum vasculosum erklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß sich viele der Ergebnisse der eigenen *in vivo* Versuche durch die Wirkung von Amilorid auf den Transduktionskanal selbst erklären lassen. Durch den Verschuß des Transduktionskanal erklärt sich eine Abnahme der akustisch evozierten Aktivität der afferenten auditorischen Neurone und auch die Anhebung der Ratenschwelle sowie die Abnahme der Güte der Abstimmung. Eine Erhöhung der spontanen Entladungsrate der afferenten auditorischen Neurone läßt sich mit dem Block des Transduktionskanals nicht erklären. Auch die Verschiebung der CF durch einseitige Abnahme der akustisch evozierten Aktivität oberhalb der CF läßt sich mit der Blockierung der CF nicht erklären. Diese Phänomene lassen sich auch nicht mit einer Beeinflussung des für die Haarzelle postulierten elektrischen Filters erklären, das auf dem Zusammenspiel des Transduktionskanal mit dem Spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanal und dem Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal beruht. Es wird angenommen, das insbesondere diese elektrische Eigenschaft der Haarzelle für eine höhere Frequenzselektivität der Haarzelle verantwortlich ist (Hudspeth, 1986; Hudspeth und Lewis, 1988; Wu et al., 1995; Fettiplace und Fuchs, 1999; Jones et al., 1999). Daher muß Amilorid noch andere Ionkanäle beeinflussen, insbesondere Ionkanäle im Bereich der apikalen Membran. Ein möglicher Kandidat sind membranständige Iontransporter im Bereich der Cilien, welche Ca^{2+} -Ionen wieder aus der Haarzelle herausschleusen (z.B. die Ca^{2+} -ATPase). In neueren Untersuchungen an vestibulärer Haarzellen des Meerschweinchens wurden auch Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ im Bereich des Kinociliums nachgewiesen (Boyer et al., 2001). Sollten auch beim Vogel solche Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ im Bereich der Cilien vorliegen (hierzu gibt es noch keine Untersuchungen) wäre auch dies ein möglicher Angriffspunkt für Amilorid. Denn eine Wirkung von Amilorid auf solche Kanäle ist beschrieben (Tang et al., 1988). Ein solcher Angriffspunkt für Amilorid bietet tatsächlich Erklärungsansätze für die durch den Block des Transduktionskanals nicht zu erklärenden Phänomene wie Anstieg der spontanen Entladungsrate oder Frequenz-abhängige Abnahme der akustisch evozierten Entladungsrate.

6.3. Wirkung von Diazoxid auf die Innenohrfunktion

Diazoxid ist ein Öffner ATP(Adenosin-tri-Phosphat)-abhängiger K^+ -Kanäle (Trube et al., 1986; Ashcroft, 1988; Newgreen et al., 1990; Pratz et al., 1991; Anderson, 1992).

Die Substanz hyperpolarisiert isolierte äußere Haarzellen des Meerschweinchens, ohne das Rezeptorpotential der Haarzelle zu beeinflussen (Preyer et al., 1991).

Untersuchungen zur Wirkung von Diazoxid auf isolierte Haarzellen des Vogels wurden bisher nicht veröffentlicht.

Die eigenen Experimente zeigten, daß Diazoxid bei Applikation in die Scala media das EP signifikant um durchschnittlich 2,4mV senkt. Auf das CAP oder die Einzelfaseraktivität afferenter Nervenfasern hat Diazoxid bei Applikation in die Scala media keinen Einfluß. Bei Applikation in Scala tympani hat Diazoxid insgesamt keinen Einfluß auf die Innenohrfunktion. Die Konzentration des Diazoxid lag bei unseren Experimenten bei Applikation in die Scala media nahe der Spitze der Applikationselektrode direkt nach Applikation schätzungsweise bei 1 bzw. 2 mmol/l. Setzt man auch hier eine vollständige Verteilung des Diazoxids in der gesamten Scala media voraus, so liegt die Konzentration zwischen 0,06 und 0,54mmol/l. Bei Applikation in die Scala tympani lag die Konzentration zwischen 0,5 und 2mmol/l. Dies liegt oberhalb der Diazoxid-Konzentration, welche in den *in vitro* Versuchen von Preyer et al. (1991) zu einer Hyperpolarisation der Haarzelle führte (50µmol/l).

Im weiteren soll die Wirkung von Diazoxid auf die einzelnen erhobenen Parameter diskutiert werden.

6.3.1. Wirkung von Diazoxid auf das EP

Wie bereits oben diskutiert (siehe Kap. 3.2.1.) läßt sich das Innenohr als elektrisches Ersatzschaltbild darstellen. Dabei ist das EP das zu messende Potential zwischen Scala media und Scala vestibuli (v. Békésy, 1952). Das EP ist unter anderen von dem elektrischen Widerstand der Endolymph/Perilymph-Barriere (d.h. apikale und basolaterale Membran) abhängig (Voßieck et al., 1991).

Diazoxid senkt das EP signifikant um durchschnittlich 2,4mV, ein initialer Anstieg nach Applikation ist methodisch bedingt (siehe auch Diskussion für Amilorid). Es stellt sich daher die Frage, über die Beeinflussung welcher Ionleitfähigkeiten Diazoxid das EP absenkt. Eine Überlegung wäre, daß Diazoxid ATP-abhängige K^+ -Kanäle im Bereich der apikalen Membran öffnet. Dadurch würde der elektrische Widerstand der apikalen Membran sinken, was gemäß dem elektrischen Ersatzschaltbild das Potential zwischen Scala media und Scala vestibuli (= EP) senken würde. Gegen diese Überlegung spricht aber die Tatsache, daß Diazoxid bei Applikation in die Scala media keinerlei Effekt auf die Einzelfaseraktivität hat. Sollte Diazoxid tatsächlich K^+ -Kanäle im Bereich der apikalen Membran öffnen, hätte dies eine Depolarisation der Haarzelle zur Folge, dies wiederum würde sich in einer Veränderung der Einzelfaseraktivität zeigen. Diazoxid hatte aber bei Applikation in die Scala media keinerlei Effekt auf die Einzelfaseraktivität.

Daher ist eine Beeinflussung von Ionenkanälen auf der apikalen Membran sehr unwahrscheinlich.

Die basolaterale Membran der Haarzelle wird Diazoxid bei Applikation die Scala media nicht erreichen, so daß Diazoxid hier keine Wirkung entfalten kann. Daher muß davon ausgegangen werden, daß Diazoxid das EP durch Beeinflussung anderer Ionkanäle unabhängig von der Haarzelle absenkt. Möglicher Kandidat ist das Tegmentum vasculosum, das für die Generation des EP mit verantwortlich ist (siehe auch Kap. 3.2.1.).

6.3.2. Wirkung von Diazoxid auf das CAP

Diazoxid hat weder bei Applikation in die Scala media noch bei Applikation in die Scala tympani einen Einfluß auf das CAP. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß Diazoxid im Innenohr der Taube keine Ion-Leitfähigkeit beeinflusst, welche direkt am Transduktionsprozeß der Haarzelle beteiligt ist.

6.3.3. Wirkung von Diazoxid auf die Einzelfaseraktivität

Diazoxid hatte bei Applikation in die Scala media keinen Einfluß auf spontane oder akustisch evozierte Aktivität, Güte der Abstimmung oder charakteristische Frequenz auditorischer Neurone.

In der Literatur ist aber zumindest für den Säuger ein Einfluß von Diazoxid auf isolierte Haarzellen beschrieben. Die isolierte äußere Haarzellen des Meerschweinchens wird durch Zugabe von Diazoxid in die umgebende Flüssigkeit hyperpolarisiert (Preyer et al., 1991). Bei einer Konzentration bis 50µM hat Diazoxid jedoch keinen Einfluß auf das Rezeptorpotential der Haarzelle (Preyer et al., 1991). Ein Ausbleiben einer Veränderung des Rezeptorpotentials legt nahe, daß eine vom Transduktionskanal unabhängige und von diesem entfernt (und damit am ehesten im Bereich der basolateralen Membran) lokalisierte Leitfähigkeit beeinflusst wird.

Tatsächlich sind sowohl für den Säuger (Ashmore et al., 1990; Kakehata et al., 1993; Nilles et al., 1994), aber auch für den Vogel (Shigemoto et al., 1990+1991) ATP-abhängige K⁺-Leitfähigkeiten der Haarzelle beschrieben.

Diese sind Bestandteil der efferenten Synapse (Vogel: Shigemoto et al., 1991; Säuger: Kakehata et al., 1993; Nilles et al., 1994). Dabei führt präsynaptisch freigesetztes ATP (und auch Acetylcholin) zu einer intrazellulären Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration (Shigemoto et al., 1990+1991). ATP als extrazellulärer Transmitter aktiviert dann postsynaptisch eine Botenstoff-Kaskade, welche Bestandteil der efferenten Synapse ist (Vogel: Shigemoto et al., 1991; Säuger: Kakehata et al., 1993; Nilles et al., 1994).

Dabei wird durch Anlagerung des Agonisten ATP an einen purinergeren Rezeptor (P₂R) ein Guanin-Nucleotid-bindenden Protein (G-Protein) aktiviert. Dieses aktiviert seinerseits eine Phosphodiesterase, welche Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) in Inositol-tri-Phosphat (InsP₃ bzw. IP₃) umwandelt. IP₃ setzt Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern frei (Cockcroft et al., 1985). Diese Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aktiviert eine Ca²⁺-abhängige K⁺-Leitfähigkeit, und die Zelle wird hyperpolarisiert (Vogel: Shigemoto et al., 1990+1991; Säuger: Ashmore et al., 1990; Kakehata et al., 1993; Nilles et al., 1994). Die in den Vogel-, wie auch der Säuger-Haarzellen nachgewiesenen ATP-abhängige K⁺-Leitfähigkeiten gehören daher zu der Gruppe, welche durch extrazelluläres ATP beeinflusst werden (Gorden, 1986; El-Moatassim et al., 1992).

Es muß aber beachtet werden, daß diese nicht identisch ist mit der Gruppe von ATP-abhängigen K⁺-Leitfähigkeiten, für die eine Beeinflussung durch Diazoxid nachgewiesen ist

(Trube et al., 1986; Ashcroft, 1988; Pratz et al., 1991). Bei diesen ist die ATP-Wirkung intrazellulär vermittelt und öffnet die K^+ -Leitfähigkeiten direkt durch Anlagerung an der nach intrazellulär gewandten Rezeptorseite. Diese K^+ -Leitfähigkeiten kommen vor allem bei Zellen vor, die an der Regulation metabolischer Prozesse beteiligt sind, wie z.B. β -Zellen des Pankreas (Trube et al., 1986; Ashcroft, 1988; Pratz et al., 1991). Diazoxid wirkt an diesen K^+ -Leitfähigkeiten agonistisch und öffnet sie.

Tatsächlich ließe sich die bei isolierten Haarzellen durch Diazoxid verursachte Hyperpolarisation durch eine Beeinflussung der oben beschriebenen ATP-abhängige K^+ -Leitfähigkeit möglicherweise erklären. Eine Öffnung dieser mit der efferenten Synapse assoziierten K^+ -Leitfähigkeiten hätte eine Hyperpolarisation der Haarzelle im Sinne eines IPSP (inhibitorisches postsynaptisches Potential) zur Folge (Art et al., 1984; Keppler et al., 1994). Wäre dies tatsächlich der Grund, warum Diazoxid das Haarzellpotential isolierter Haarzellen des Säugers (Meerschweinchen) hyperpolarisiert, stellt sich die Frage, warum Diazoxid bei den eigenen Untersuchungen kein Effekt auf die Einzelfaseraktivität (und damit auch kein Effekt auf das Haarzellpotential) hatte.

Hierbei müssen zunächst grundsätzliche methodische Unterschiede der beiden Untersuchungen beachtet werden: Bei den Versuchen an isolierten Haarzellen gelangt Diazoxid gleichzeitig an die apikale, wie auch die basolaterale Membran. Damit kann nicht zwischen ein Effekt auf die apikale oder die basolaterale Membran differenziert werden. In den eigenen Untersuchungen wird Diazoxid bei Applikation in die Scala media nur im Bereich der apikalen Membran präsent sein. Mindestens hier entwickelt Diazoxid keine Wirkung, weshalb man davon ausgehen kann, daß im Bereich der apikalen Membran keine Diazoxid-sensiblen Ionkanäle sind. Aber auch bei Applikation in die Scala tympani zeigt sich anhand des unveränderten CAP kein Effekt von Diazoxid auf die Innenohrfunktion der Taube.

Hier wäre zum einen (ähnlich wie bei der Diskussion für Amilorid bereits ausgeführt) ein eventuelles methodisches Problem zu bedenken, was das Anfluten von Diazoxid im Bereich der basolateralen Membran betrifft. Die Haarzellen sind eng von sog. Stützzellen umgeben, was eventuell das Anfluten der künstlichen Perilymphe behindert.

Zum anderen sind unterschiedliche Eigenschaften der efferenten Synapse des Säugers und des Vogels beschrieben. So führt bei der Säugerhaarzelle lediglich die Exposition von ATP zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, Acetylcholin hat eher einen modulierenden Effekt und führt zusammen mit ATP sogar zu einer Reduktion der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Bei der Vogelhaarzelle dagegen erhöht sowohl ATP wie auch Acetylcholin die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Shigemoto et al., 1990+1991; Ashmore et al., 1990). Auch in der dem P_2 Rezeptor der efferenten Synapse nachgeschalteten Kaskade von Botenstoffen (G-Protein / IP_3 / intrazelluläre Ca^{2+} -Speichern) gibt es pharmakologische Unterschiede (Nakagawa et al., 1990; Kakehata et al. 1993). So wird der Ach-Rezeptor beim Säuger im Gegensatz zum Vogel nicht als ein muscarinenger klassifiziert, sondern hat sowohl muscarinerge wie auch nicotinerge Eigenschaften (Kakehata et al., 1993).

Somit ist es denkbar, daß eine unterschiedliche Beeinflußbarkeit von Vogel- und Säuger-Haarzelle durch Kanalmodulatoren wie Diazoxid eventuell auf Unterschiede der an der efferenten Synapse beteiligten Ionkanäle bzw. der nachgeschalteten Kaskade von Botenstoffen beruht. Dies wäre dann ein Hinweis dafür, daß es nicht nur zu einer phylogenetisch unterschiedlichen Entwicklung der Morphologie des Innenohrs zwischen Vogel- und Säuger-Innenohr kam (zur Übersicht: Manley, 2000), sondern auch zu unterschiedlichen Ausdifferenzierungen der an der Haarzellfunktion beteiligten Ionkanäle und deren pharmakologischen Eigenschaften.

7. Tabellenanhang

Tab.7.1.:

**initialer EP-Anstieg bei Applikation von Amilorid
in die Scala media**

Neuron	appl.Dosis [10 ⁻¹⁰ Mol]	EP-Anstieg	Ausgangswert nach X min	appl. Volumen [μl]
RT78N20	3,09	2 mV	4 min	0,31
RT78N47	1,24	1,5 mV	1 min	0,12
RT78N52	4,02	3 mV	2 min	0,4
RT79N17	2,78	3,5 mV	1,2 min	0,28
RT80N18	2,78	3,5 mV	2,3 min	0,28
RT80N40	2,16	2 mV	4 min	0,22

Tab 7.1: Es sind der initiale Anstieg des EP nach Applikation von Amilorid in die Scala media, der Zeitpunkt bei welchen der Ausgangswert wieder erreicht wurde, die applizierte Menge Amilorid und zusätzlich das appl. Volumen angegeben.

Tab.7.2.:

**Langfristige Veränderung des EP nach Applikation von Amilorid
in die Scala media**

Versuch	Einschub in die Scala media	Ausschub aus der Scala media	Potential- Differenz	appl. Dosis [10 ⁻¹⁰ Mol]
RT78 li	15 mV	14 mV	-1 mV	3,09
RT79 li	10 mV	8 mV	-2 mV	2,78
RT80 li	6 mV	9 mV	+3 mV	2,78
RT80 re	8 mV	9 mV	+1 mV	2,16
RT121 re	6mV	8mV	+2mV	6,5
RT122 li	12 mV	13 mV	+1 mV	6,0
RT122 re	4 mV	5 mV	+1 mV	5,5

Tab. 7.2. gibt die gemessenen Werte mit Angabe der applizierten Menge Amilorid an. Differenz: $\bar{D} = 0,714$; Stand.Abw.= 1,704 normal verteilt ($n=2,933$); nicht signifikant ($\alpha=0,05$).

Tab. 7.3.:

**Zusammenstellung der Ausgangswerte der Applikationsneurone
bei Applikation von Amilorid in die Scala media**

Neuron	Bezeichnung im Versuch	appl. Menge [10 ⁻¹⁰ Mol]	CF [Hz]	Spontan-rate [Imp./s]	Ratenschwelle [dB SPL]	Q _{10dB}
AN1	RT79N17	2,79	1200	40	30,5	3,2
AN2	RT78N52	4,03	890	104	43	4,57
AN3	RT122N7	5,5	704	57	64,5	1,72
AN4	RT50N14	1,55	704	73	37	3,7
AN5	RT80N40	2,17	1000	32	28	1,69
AN6	RT80N18	2,79	502	30	57,5	0,9
AN7	RT78N47	1,24	632	111,5	39	3,27
AN8	RT121N2	1,5	250	98	65	0,66
AN9	RT121N3	1,55	126	112	65	0,38

Tab.7.3. gibt die in die Scala media applizierte Menge Amilorid (in 10⁻¹⁰ Mol) und die Ausgangswerte der CF, der spontanen Entladungsrate, der Ratenschwelle und der Abstimmsschärfe (Q_{10dB}) der Neurone vor Applikation an. Außerdem ist die Bezeichnung der Neurone laut Versuchsprotokoll angegeben, benannt nach der Bezeichnung des Versuchstieres. Die Austreibungsgeschwindigkeit aus der Sc.media-Elektrode betrug bei AN1, AN2, AN5, AN6, und AN7 2µm/s, bei AN3, AN8 und bei AN9 5µm/s, und bei AN4 10 µm/s.

Tab. 7.4.:

**initiale EP-Veränderung nach Applikation von Diazoxid
in die Scala media**

Neuron	appl.Dosis [10 ⁻¹⁰ Mol]	EP-Anstieg	Ausgangswert nach X min	appl. Volumen [µl]
AB18N24	7,7	8 mV	10 min	0,77
AB22N24	4,94	3 mV	2 min	0,25
AB22N26	12,36	-3 mV	5 min	0,62
AB23N57	12,36	0	0	0,62
RT101N24	3	0	0	0,15
RT101N44	9,2	4 mV	6 min	0,46

Tab. 7.4.: Es sind der initiale Anstieg des EP nach Applikation von Diazoxid in die Scala media, der Zeitpunkt bei welchen der Ausgangswert wieder erreicht wurde, die applizierte Menge Amilorid und zusätzlich das appl. Volumen angegeben.

Tab. 7.5.:**langfristige Veränderung des EP durch Applikation von Diazoxid
in die Scala media**

Versuch	Einschub in die Scala media	Ausschub aus der Scala media	Potential- Differenz	appl. Dosis [10^{-10} Mol]
AB18 li	7,5 mV	5 mV	-2,5 mV	9,58
AB19 li	9 mV	3,5 mV	-5,5 mV	8,2
AB22 li	7,5 mV	3,5 mV	-4 mV	21,01
AB23 li	7 mV	7,5 mV	+0,5 mV	9,27
RT101 li	12 mV	9 mV	-3 mV	8
RT101 re	11 mV	11 mV	0 mV	9,2

Tab. 7.5. gibt die gemessenen Werte mit Angabe der applizierten Menge Diazoxid an. Differenz: $\bar{\Delta} = -2,417$; Differenz σ : Stand.Abw. = 2,3112; normal verteilt ($\alpha = 2,596$); signifikante Erhöhung ($\alpha = 0,1$)

Tab. 7.6.:**Zusammenstellung der Ausgangswerte der Applikationsneurone
bei Applikation von Diazoxid in die Scala media**

Neuron	Bezeichnung im Versuch	appl. Menge [10^{-10} Mol]	CF [Hz]	Spontan- rate [Imp./sec]	Raten- schwelle [dB SPL]	Q_{10dB}
AN10	AB18N24	7,7	419	41	64	1,62
AN12	AB22N24	4,96	353	74	72	1,87
AN13	AB22N26	12,4	325	87	67	1,62
AN14	AB23N57	12,4	999	80	41	7,18
AN15	RT101N24	3	460	112	40	0,82
AN16	RT101N44	9,2	457	80	25	1,23

Tab.7.6. gibt die in die Scala media applizierte Menge Diazoxid (in 10^{-10} Mol) und die Ausgangswerte der CF, der spontanen Entladungsrates, der Ratschwelle und der Abstimmbarkeit (Q_{10dB}) der Neurone vor Applikation an. Außerdem ist die Bezeichnung der Neurone laut Versuchsprotokoll angegeben, benannt nach der Bezeichnung des Versuchstieres. CF, Ratschwelle und Q_{10dB} wurden visuell anhand von Abstimmkurven bestimmt. Die Austreibungsgeschwindigkeit aus der Sc.media-Elektrode betrug $10 \mu\text{m/s}$.

8. Literatur

- Aickin, C. C. und Thomas, R.C. (1977) An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fibres. *J. Physiol. Lond.* 273, 295-216.
- Almers, W. und Palade, P.T. (1981) Slow calcium and potassium currents across frog muscle membrane: measurements with a vaseline-gap technique. *J. Physiol.* 213, 158-176.
- Andersson, K.-E. (1992) Clinical Pharmacology of Potassium-channel openers. *Pharmacol. and Toxicol.* 76, 244-254.
- Anderson, M. (1979) Mn^{2+} -ions pass through Ca^{2+} -channels in myoepithelial cells. *J. Exp. Biol.* 82, 227-238.
- Art, J.J. und Fettiplace, R. (1984a) Efferent desensitization of auditory nerve fibre responses in the cochlea of the turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Physiol.* 356, 507-523.
- Art, J.J., Fettiplace, R. und Fuchs, P.A. (1984b) Synaptic hyperpolarization and inhibition of turtle cochlear hair cells. *J. Physiol.* 356, 525-550.
- Art, J.J., Crawford, A.C., Fettiplace, R. und Fuchs, P.A. (1985) Efferent modulation of hair cell tuning in the cochlea of the turtle. *J. Physiol.* 360, 397-421.
- Art, J.J. und Fettiplace, R. (1987) Variation of membrane properties in hair cells isolated from the turtle cochlea. *J. Physiol.* 385, 207-242.
- Art, J.J., Wu, Y.C. und Fettiplace, R. (1995) The calcium-activated potassium channels of turtle hair cells. *J. Gen. Physiol.* 105 (1) S.49-72.
- Ashcroft, F.M. (1988) Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels *Ann. Rev. Neurosci.* 11, 97-118.
- Ashmore, J.F. und Meech, R.W. (1986) Ionic basis of membrane potentials in outer hair cells of guinea pig cochlea. *Nature* 322, 368-371.
- Ashmore, J.F. (1987) A fast motile response in guinea pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J. Physiol. (Lond.)* 388, 323-347.
- Ashmore, J.F. (1988) Ionic mechanisms in hair cells of the mammalian cochlea. *Progress in brain research* 74, 3-9.
- Ashmore, J.F. und Ohmori, H. (1990) Control of intracellular calcium by ATP in isolated outer hair cells of the guinea-pig cochlea. *J. Physiol.* 428, 109-131.
- Ashmore, J.F. (1991) The electrophysiology of hair cells. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 465-476.

Beier, W. (1987) Physik für das Studium der Medizin, Biowissenschaften, Vet.medizin. Hrgb.: Beier/Pliquett, 4. Aufl., Leipzig: J.A. Barth, 1987, S 167.

Békésy, von G. (1944) Über die mechanische Frequenzanalyse in der Schnecke verschiedener Tiere. Akust. Zeitschr. 9, 3-11.

Békésy, von G. (1952) DC resting potentials inside the cochlear partition. J. Acoust. Soc. Am. 24, 72-76.

Bennet, M.K., Calakos, N. und Scheller, R.H. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. Science 257, 255-259.

Benos, D. J.(1982) Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. Am. J. Physiol. 242 (Cell Physiol.11), C131-C145.

Benos, D.J., Cunningham, S., Baker, R.R., Beason, K.B., Oh, Y.und Smith, P.R.(1992) Molecular Characteristics of Amiloride-Sensitive Sodium Channels. Rev. Physiol. Pharmacol. 120, 31-113.

Benos, D.J., Mandel, L.J. und Balaban, R.S. (1979) On the Mechanism of the Amiloride-Sodium Entry site Interaction in Anuran Skin Epithelia. J. Gen. Physiol. 73, 307-326.

Benos, D.J., Sorscher, E.J. (1992) Transport Proteins-Ion Channels. The kidney: Physiology and Pathophysiology, 2nd Ed. 587-623.

Bentley, P.J. (1968) Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. J. Physiol. 195, 317-330.

Berridge, M.J. und Irvine, R.F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature 312, 315-321.j

Boyer, C., Art, J.J., Dechesne, C.J., Lehouelleur, J., Vautrin, J. und Sans, A. (2001) Contribution of the plasmalemma to Ca²⁺ homeostasis in hair cells. J. Neuroscience 21, 2640-2650.

Bredberg, G. (1977) Ultrastructural features of small nerve endings high up on outer hair cells. In : Psychophysics and Physiology of Hearing, S. 12-13. Academic. Press. London.

Brownell, W:E., Bader, C.R., Bertrand, D. und Ribaupierre, Y. (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. Science 227, 194-196.

Brundin, L., Flock, A. und Canlon, B. (1989) Sound-induced motility of isolated cochlear outer hair cells is frequency-specific. Nature 342, 814-816.

Buono, R.A., Venanzi, T.J., Zauhar, R.J., Luzhkov, V.B. und Venanzi, C.A. (1994) Molecular Dynamics and Static Solvation Studies of Amiloride. J. Am. Chem. Soc. 116, 1502-1513.

Burnstock, G. (1981) Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system. J.Physiol. 313, 1-35.

- Cheatham, M.A. und Dallos, P. (1984) Summating potential (SP) tuning curves. *Hear. Res.* 16, 189-200.
- Churchill, J.A., Schuknecht, H.F. und Doran, R. (1956) Acetylcholinesterase activity in the cochlea. *Laryngoscope* 66, 1-15.
- Cockcroft, S. und Gomperts, B.D. (1985) Role of guanine nucleotide binding protein in the activation of polyphosphoinositide phosphodiesterase. *Nature* 314, 534-536.
- Corwin, J.T. und Warchol, M.E. (1991) Auditory hair cells: Structure, Function, Development and Regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 301-333.
- Cotanche, D.A., Cotton, C.U., Gatzky, J.T. und Sulik, K.K. (1987) Ultrastructural and electrophysiological maturation of the chick tegmentum vasculosum. *Hear. Res.* 25, 125-139.
- Cotanche, D.A., Henson, M.M. und Henson, O.W. (1992) Contractile proteins in the hyaline cells of the chicken cochlea. *J. Comp. Neurol.* 324, 353-364.
- Cousillas, H., Cole, K.S., Johnstone, B.M. (1988) Effects of spider venom on cochlear nerve activity consistent with glutamatergic transmission at hair cell-afferent dendrite synapse. *Hear.Res.* 36, 213-220.
- Crawford, A.C. und Fettiplace, R. (1980) The frequency selectivity of the auditory nerve fibres and hair cells in the cochlea of the turtle. *J.Physiol.* 306, 79-125.
- Crawford, A.C. und Fettiplace, R. (1981) An electrical tuning mechanism in the turtle cochlear hair cells. *J. Physiol.* 312, 377-412.
- Crawford, A.C. und Fettiplace, R. (1985) The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *J. Physiol.* 364, 359-379.
- Crawford, A.C. und Kros, C.J. (1990) A fast Calcium current with a rapidly inactivating component in isolated inner hair cells of the guinea pig. *J. Physiol.* 420, 90P. bzw. *J.Physiol.* (London) 312, 377-412.
- Crawford, A.C. Evans, M.G. und Fettiplace, R. (1991) The action of Calcium on the mechano-electrical transducer current of turtle hair cells. *J. Physiol.* 434, 369-398.
- Dallos, P. und Cheatham, M.A. (1976 a) Compound action potential (AP) tuning curves. *J. Acoust. Soc.Am.* 59, 591-597.
- Dallos, P. und Cheatham, M.A. (1976 b) Production of cochlear potentials by inner and outer hair cells. *J. Acoust. Soc.Am.* 60,510.
- Dallos, P. (1983) Some electrical properties of the organ of corti. I. Analyses without reactive elements. *Hearing Research* 12, 89-119.
- Dallos, P. (1984) Some electrical properties of the organ of corti. II. Analyses including reactive elements. *Hearing Research* 14, 281-291.

Dallos, P. (1986) Neurobiology of cochlear inner and outer hair cells: intracellular recordings. *Hearing Research* 22, 185-198.

Dallos, P. (1986) Overview: Cochlear Neurobiology. In: *The Cochlea*, editors P. Dallos, A.N. Popper und R.R. Fay, Springer Verlag, 1-43.

Daubitz, E., Richter, C.-P., Shehata-Dieler, W.E. und Voßieck, T. (1992) Effects of 4-aminopyridin and caesium (Cs) applied into the Scala media on single fibre activities in the pigeon cochlear ganglion. *Neurobiolog. Tag. Göttingen*, 247.

Davis, H. (1958) Transmission and transduction in the cochlea. *Laryngoscope* 68, 359-382.

Davis, H. (1965) A model for transducer action in the cochlea. *Cold Spring Harb. Symp. quand. Biol.* 30, 181-189.

De Burlet, H.M. (1929) Zur vergleichenden Anatomie und Physiologie des perilymphatischen Raumes. *Acta otolaryngol.* 13, 153-187.

Derbyshire, A.J. and Davis, H. (1935) The action potential on the auditory nerve. *Am. J. Physiol.* 113, 476-504.

Dieler, R., Shehata-Dieler, W.E., Richter, C.-P. und Klinke, R. (1994) Effects of endolymphatic and perilymphatic application of salicylate in the pigeon. II. Fine structure of auditory hair cell. *Hear. Res.* 74, 85-98.

Ding-Pfennighoff, D. (1993) Farbstoffmarkierungen identifizierter Neurone aus der Vogelcochlea. Dissertation Fachbereich Biologie, J.W. Goethe Universität Frankfurt/Main.

Discala, F., Hulin, P, Belachgar, F., Planelles, G. Edelman, A. Anagnostopoulos (1992) Millimolar amiloride concentrations block K conductance in proximal tubular cells. *Br. J. Pharmacol.* 107, 532-538.

Dohlman, G., Farkashidy, J. und Salonna, F. (1958) Centrifugal nerve-fibres to the sensory epithelium of the vestibular labyrinth. *J. of Laryngology and Otology* 72, 984-991.

Dulon, D., Zajic, G., Aran, J.M. und Schacht, J. (1989) Aminoglycoside antibiotics impair calcium entry but not viability and motility in isolated outer hair cells. *J. Neurosci. Res.* 24, 338-346.

Durham, D., Rubel, E.W. und Steel, K.P. (1989) Cochlear ablation in deafness mutant mice: 2-desoxyglucose analysis suggests no sponaneous activity of cochlear origin. *Hear. Res.* 43, 39-46.

Eatock, R.A., Manley, G.A. and Pawson, L. (1981) Auditory nerve fibre activity in the Tokay Gecko. I. Implications for cochlear processing. *J. Comp. Physiol.* 142, 203-218.

Eatock, R.A. (2000) Adaption in hair cells. *Annu. Rev. Neuroscience* 23, 285-314.

Eigler, J., Kelter, J. und Renner, E. (1967) Wirkungscharakteristika eines neuen acylguanidins-Amiloride-HCl (MK-870)-an der isolierten Haut von Amphibien. *Klin. Wochenschrift* 45, 737-738.

El-Moatassim, C., Dornand, J. und Mani, J.-C. (1992) Extracellular ATP and cell signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1134, 31-45.

Eriksson, H. und Heilbronn, E (1989) Extracellularly applied ATP alters the calcium flux through dihydropyridine-sensitive channels in cultured chick myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Communic.* 159.3, 878-885.

Eróstegui, C., Sugawara, M. und Dulon, D. (1995) Aminoglycoside antibiotics reversibly block acetylcholine induced currents in guinea pig outer hair cells. *Assoc. Res. Otolaryngol.* 18, 323.

Evans, E.F. und Klinke, R. (1982) The effects of intracochlear and systemic furosemide on properties of single cochlear nerve fibres in the cat. *J. Physiol.* 331, 409-427.

Evans, R.J., Derkach, V. und Surprenant, A. (1992) ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357, 503-505.

Eybalin, M. (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 73, 309-373.

Ferrary, E., Tran, P., Huy, BA, Roinel, N., Bernand, C. und Amiel, C. (1988) Calcium and inner ear fluids. *Acta Otolaryngol (Stockholm)* 460, 13-17.

Fettiplace, R. und Fuchs, P.A. (1999) Mechanisms of hair cell tuning. *Ann. Rev. Physiol.* 61, S.809-834.

Fischer, F.P., Brix, J., Singer, I. und Miltz, C. (1991) Contacts between hair cells in the avian cochlea. *Hear. Res.* 53, 281-292.

Fischer, F.P. (1994) Quantitative TEM analysis of the barn owl basilar papilla. *Hear. Res.* 73, 1-15.

Flock, A., Flock, B. und Uhlendahl, M. (1986) Mechanismen of movement in outer hair cells and a possible structural basis. *Archives of Otolaryngology* 243, 82-90.

Fu, W.-M. (1994) Potentiation by ATP of the postsynaptic acetylcholine response at developing neuromuscular synapses in *Xenopus* cell cultures. *J. Physiol.* 477, 449-458.

Fuchs, P.A., Nagai, T. und Evans, M.G. (1988) Electrical tuning in hair cells isolated from the chick cochlea. *J. Neuroscience* 8, 2460-2467.

Fukuda, J. und Kawa, K. (1977) Permeation of Manganese, Cadmium, Zinc and Beryllium through Calcium Channels of an Insect Muscle Membrane. *Science* 196, 309-311.

- Fung, B.K.K. und Stryer, L. (1980) Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of agtp for bound GDP in retinal rod outer segments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 77, 2500-2504.
- Garcia, M.L., King, V.F., Shevell, J.L., Slaughter, R.S., Suarez-Kurtz, G., Winkquist, R.J. und Kaczorowski, G.J. (1990) Amiloride Analogs Inhibit L-type Calcium Channels and Display Calcium Entry Blocker Activity. J. Biol. Chem. 265, 3763-3771.
- Gillespie, P.G. und Hudspeth, A.J. (1991) High-purity isolation of bull-frog hair bundles and subcellular and topological localization of constituent proteins. J. Cell Biol. 112, 625-640.
- Gitter, A.H., Frömter, E. und Zenner, H.P. (1992) C-type potassium channels in the lateral cell membrane of guinea pig outer hair cells. Hear. Res. 60, 13-19.
- Giovanelli, A., Grassi, F., Mattei, E., Mileo, A.M. und Eusebi, F. (1991) Acetylcholine induced voltage-independent increase of cytosolic calcium in mouse myotubes. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 88, 10069-10073.
- Gleich, O. und Manley, G.A. (1988) Quantitative morphological analysis of the sensory epithelium of the starling and pigeon basilar papilla. Hearing Research 34, 69-85.
- Gleich, O., Johnstone, B.M. und Robertson, D. (1990) Effects of L-glutamate on auditory afferent activity in view of its proposed excitatory transmitter role in the mammalian cochlea. Hear. Res. 45, 295-312.
- Goodman, M.B. and Art, J.J. (1993) The effects of external cesium on the voltage-dependent conductances involved in tuning of turtle hair cell. Soc. Neurosci. Abstracts 19, 1538.
- Goodman, M.B. and Art, J.J. (1996) Variations in the ensemble of potassium currents underlying resonance in the turtle hair cells. J. Physiol. 497, 395-412.
- Gorden, J.L. (1986) Extracellular ATP: effects, sources and fate. Biochem. J. 233, 309-319.
- Grunewald, E., Bräucker, R. und Schwarzkopf, J. (1986) Auditory intensity discrimination in the pigeon (*Columba livia*) as measured by heart-rate conditioning. Naturwissenschaften 73,41.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260.6 3440-3450.
- Guharay, F. und Sachs, F. (1985) Mechanotransducer ion channels in the chick skeletal muscle: The effects of extracellular pH. J. Physiol. 363, 119-134.
- Gummer, A.W., Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1987) Basilar membrane motion in the Pigeon measured with the Mössbauer technique. Hearing Research 29, 63-92.
- Gummer, A.W., Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1989) Mechanics of a single-ossicle ear: I. The extra-stapedius of the pigeon. Hear. Res. 39, 1-14.
- Gummer, A.W., Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1989) Mechanics of a single-ossicle ear: II. The columella-footplate of the pigeon. Hear. Res. 39, 15-26.

Gummer, A.W. (1991a) First order temporal properties of spontaneous and tone-evoked activity of auditory afferent neurones in the cochlear ganglion of the pigeon. *Hear. Res.* 55, 143-166.

Gummer, A.W. (1991b) Postsynaptic inhibition can explain the concentration of short inter-spike-intervals in avian auditory nerve fibres.. *Hear. Res.* 55, 231-243.

Gustin, M.C., Zhou, X.-L., Martinac, B. und Kung, C. (1988) A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science* 242, 762-765.

Guth, P.S., Aubert, A., Ricci, A.J. und Norris, C. (1991) Differential modulation of sponaneous and evoked neurotransmitter release from hair cells: some novel hypotheses. *Hear. Res.* 56, 69-78.

Haas, U. (1981) Physik für Pharmazeuten und Mediziner, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, S. 251.

Hackney,C. M., Furness, D.N., Benos, D.J. (1991) Localisation of putative mechanoelectrical transducer channels in cochlear hair cells by immunoelectron microscopy. *Scanning microscopy* 5/3, 741-746.

Hackney,C. M., Furness, D.N., Benos, D.J., Woodley, J.F. und Barratt, J. (1992) Putative Immunolocalization of the Mechanoelectrical Transduction Channels in Mammalian Cochlear Hair Cells. *Proc. R. Soc. London B* 248, 215-221.

Hackney,C. M. und Furness, D.N. (1995) Mechanotransduktion in vertebrate hair cells: structure and function of the stereociliary bundle. *Am.J.Physiol.* 268, C1-C13.

Hägglad, J. und Heilbronn, E. (1987) Externally applied adenosine-5'-triphosphate causes inositol triphosphate accumulation in cultured chick myotubes. *Neurosci. Lett.* 74, 199-204.

Hamill, O.P., Lane, J.W. und McBride, D.W.(1992) Amiloride: a molecular probe for mechanosensitive channels.

Heidenreich, O., Füllgraff, G. (1992) Therapeutische Beeinflussung der Elektrolyt- und Wasserausscheidung der Niere. In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.: *allg. und spez. Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftsverlag, S. 433.

Hill, K.G., Mo, J. und Stange, G. (1989) Excitation und suppression of primary auditory fibres in the pigeon. *Hear. Res.* 39, 37-48.

Hill, K.G., Mo, J. und Stange, G. (1989) Induced suppression in spike responses to tone-on-noise stimuli in the auditory nerve of the pigeon. *Hear. Res.* 39, 49-62.

Hille, B. (1981) *Ionic channels of excitable Membranes*. Sinauer associates Inc., Sunderland MA.

Hille, B. (1989) Ionic channels: evolutionary origins and modern roles. *Q. J. Exp. Physiol.* 74, 785-804.

Holley, M. (1991) High Frequency Force Generation in Outer Hair Cells from the Mammalian Ear. *BioEssays* 13/3, 115-120.

Housley, G.D. und Ashmore, J.F. (1992) Ionic Currents of Outer Hair Cells Isolated from the Guinea-Pig Cochlea. *J.Physiol.(London)* 448, 73-98.

Howard, J., Roberts, W.M. und Hudspeth, A.J. (1988) Mechanoelectrical transduction by hair cells. *Ann.Rev.Biophys.Chem.* 17, 99-124.

Huang, P.L. und Corey, D.P. (1990) Calcium influx into hair cell stereocilia - further evidence for transduction channels at the tips. *Biophys.J.* 57, 530a.

Hudspeth, A.J. und Corey, D.P. (1977) Sensitivity, polarity and conductance change in the response of vertebrate hair cells to controlled mechanical stimuli. *Proc.Nat. Acad.Sci.* 74, 2407-2477.

Hudspeth, A.J. (1982) Extracellular current flow and the site of transduktion by hair cells. *J. Neuroscience* 2, 1-10.

Hudspeth, A.J. (1983) Mechanoelectrical transduktion by hair cells in the acoustico-lateralis system. *Ann. Rev. Neuroscience* 6, 187-215.

Hudspeth, A.J. (1986) The ionic channels of a vertebrate hair cell. *Hearing Research* 22, 21-27.

Hudspeth, A.J. und Lewis, R.S. (1988a) Kinetic analysis of voltage- and ion-dependent conductances in saccular hair cell of the bull-frog, *Rana catesbeiana*. *J. Physiol.* 400, 237-274.

Hudspeth, A.J. und Lewis, R.S. (1988b) A model for electrical resonance and frequency tuning in saccular hair cells of the bull-frog *Rana temporaria*. *J. Physiol.* 400, 275-297.

Hudspeth, A.J. (1989) How the ear's works work. *Nature* 341, 397-404.

Hudspeth, A.J., Gillespie P.G. (1994) Pulling springs to tune transduktion: adaption of Hair Cells. *Neurone* 12, 187-215.

Hudspeth, A.J. (1994) How hearing happens: Mechanoelectrical Transduktion and adaptation by hair cells of the vertebrate internal ear. Sensory transduktion: Proceedings of the 22nd Göttingen Neurobiology Conference 1994; Vol.I, 47-61.

Hudspeth, A.J. und Issa, N.P. (1995) Microdomains of elevated Ca^{2+} -concentration due to clustered ion channels at presynaptic active zones of hair cells from the bullfrog sacculus. *J. Physiol.* 485, 17P.

Hudspeth, A.J., Choe, Y., Metha, A.D. und Martin, P. (2000) Putting ion channel to work: mechano-electrical transduktion, adaptation and amplification by hair cells. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 97, Iss. 22, 11765-11772.

- Iurato, S., Luciano, L., Pannese, E. und Reale, E. (1971) Histochemical localization of acetylcholinesterase activity in the inner ear. *Acta Otolaryngologica* 279, 1-50.
- Iwasa, K.H., Mizuta, K., Lim, D.J., Benos, D.J. und Tachibana, M. (1994) Amiloride-sensitive channels in marginal cells in the stria vascularis of the guinea pig cochlea. *Neuroscience Letters* 172, 163-166.
- Jaramillo, F. und Hudspeth, A.J. (1991) Localization of the hair cell's transduction channels at the hair bundle's top by iontophoretic application of a channel blocker. *Neuron* 7, 409-420.
- Johnson, J.D., Epel, D. und Paul, M. (1976) Intracellular pH activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature London* 262, 661-664.
- Johnstone, B.M., Johnstone, J.R. und Pugsley, I.D. (1966) Membrane resistance in the endolymphatic walls of the first turn of the guinea-pig cochlea. *J. Acoust. Soc. Am.* 40, 1398-1404.
- Johnstone, B.M. und Sellick, P.M. (1972) The peripheral auditory apparatus. *Quart. Revs. Biophys.* 5, 1-57.
- Johnstone, B.M., Patuzzi, R. und Yates, G.K. (1986) Basilar membrane measurement and the travelling wave
- Jones, E.M., Gray-Keller, M., Art, J.J. und Fettiplace (1999) The functional role of alternative splicing of Ca(2+)-activated K⁺-channels in auditory hair cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 868, S.379-385.
- Jørgensen, F.O. (1977) Cochlear potentials of the pigeon inner ear recorded with microelectrodes. *Acta Physiol. Scand.* 100, 393-403.
- Jørgensen, F. (1983) Influence of Ca²⁺ on the mechanosensitivity of the hair cells in the lateral line organs of *Nectulus maculosus*. *Acta physiologica scandinavica* 118, 423-431.
- Jørgensen, F. und Ohmori; H.(1988) Amiloride blocks the mechano-electrical Transduktion channel of hair cells of the chick. *J. Physiol.* 403, 577-588.
- Kaczorowski, G.J., Barros, F., Dethmers, J.K., Trumble, M.J. und Cragoe Jr., E.J. (1985) Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ Exchange in Pituitary Plasma Membrane Vesicles by Analogues of Amiloride. *Biochemistry* 24, 1394-1403.
- Kakehata, S., Nakagawa, T., Takasaka, T., und Akaike, N. (1993) Cellular mechanism of acetylcholine-induced response in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *J. Physiol.* 463, 227-244.
- Kataoka, Y., Ohmori, H. (1994) Activation of glutamate receptors in response to membrane depolarization of Hair cells isolated from chick cochlea. *J. Physiol* 477, 3, 403-414.
- Keppler, C., Schermuly, L. and Klinke, R. (1994) The course and morphology of efferent nerve fibres in the papilla basilaris of the pigeon (*Columba livia*). *Hearing Research* 74, 259-264.

- Kimitsuki, T. und Ohmori, H. (1992) The effect of caged calcium release on the adaptation of the transduction current in chick hair cell. *J. Physiol.* 458, 27-40.
- Kimitsuki, T. und Ohmori, H. (1993) Dihydrostreptomycin modifies adaptation and blocks the mechano-electrical transducer in chick cochlear hair cells. *Brain Research* 624, 143-150.
- Kleyman, T.R. und Cragoe Jr., E.J.(1988) Amiloride and its Analogs as Tools in the Study of Ion Transport. *J. Membrane Biol.* 105, 1-21.
- Klinke, R., Galley, N. (1974) Efferent innervation of vestibula and auditory receptors. *Physiological reviews* 54, 316-357.
- Klinke, R. (1986) Neurotransmission in inner ear. *Hear. Res.* 22, 235-243.
- Klinke, R. und Schermuly, L. (1986) Inner ear mechanism of the crocodylian and avian basilar papilla in comparison to neuronal data. *Hear. Res.* 22, 183-184.
- Klinke, R. (1987) Die Verarbeitung von Schallreizen im Innenohr - Eine Übersicht über neuere Forschungsereignisse. *HNO* 35, 139-148.
- Klinke, R. (1990) Physiologie des Hörens In: *Physiologie des Menschen* R.F. Schmidt, G. Thews (Hrsg.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg S. 297 ff.
- Klinke, R. und Smolders, J.W.Th (1993) Performance of the avian inner ear. *Progress in Brain Research* 97, 31-43.
- Klinke, R. (1993) Das Höhrorgan des Vogels: Funktionelle Unterschiede zum Innenohr des Säugers. Franz Steiner Verlag Stuttgart.
- Klinke, R., Müller, M., Richter, C.-P. und Smolders, J.W.Th (1994) Preferred intervals in birds and mammals: A filter response to noise? *Hear. res.* 74, 238-246.
- Kolmer, W. (1928) Über die Innervation des Tegmentum vasculosum des Vogellabyrinths. *Anat. Anz.* 66, 42-47.
- Kroese, A.B.A. und Bercken, J.v.d. (1982) Effekt of ototoxic antibiotics on sensory hair cell functioning. *Hear. Res.* 6, 183-198.
- Kroese, A.B.A., Das, A. und Hudspeth, A.J. (1989) Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hear. Res.* 37, 203-218.
- Kros, C.J. und Crawford, A.C. (1990) Potassium currents in inner ear hair cells isolated from the guinea-pigs cochlea. *J. of Physiol.* 421, 263-291.
- Kuijpers, W. und Bonting, S.L. (1970a) The cochlear potentials I. The effect of ouabain on the cochlear potentials of the guinea pig. *Pflügers Arch.* 320, 348-58.
- Kuijpers, W. und Bonting, S.L. (1970b) The cochlear potentials II. The nature of the cochlear endolymphatic resting potential. *Pflügers Arch.* 320, 359-372.

Kuijpers, W., Houben, N.M.D. und Bonting, S.L. (1970) Distribution and properties of the ATPase activities in the cochlea of the chicken. *Comp. Biochem. Physiol.* 36, 669-676.

L'Allemain, G., Franchi, A., Cragoe Jr., E. und Poyssesgur J. (1884) Blockade of the Na⁺/H⁺ Antiport abolishes Growth Factor-induced DNA Synthesis in Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259, 4313-4319.

Lane, J.W., McBride, D.W. und Hamill, O.P., (1991) Amiloride block the mechanosensitive cation channel in *Xenopus* Oocytes. *J. Physiol.* 441, 347-366.

Lane, J.W., McBride, D.W. und Hamill, O.P., (1992) Structur-activity relations of amiloride and its analogues in blocking the mechanosensitive channel in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 106, 283-286.

Lattore, R. und Miller, C. (1983) Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membr. Biology* 71, 11-30.

Leng, G. (1980) The Davis theory: A review, and implications of resent electrophysiological evidence. *Hear. Res.* 3, 17-25.

Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., El Far, O., Sato, K., Martin-Moutot, N., Newsom Davis, J., Takahashi, M. und Seager, M.J. (1992) The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myathenic syndrome antigen. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 89, 24925-24928.

Lewis, R.S. und Hudspeth, A.J. (1983) Voltage- and ion-dependent conductances in solitary vertebrate hair cells. *Nature* 304, 538-541.

Lumpkin, E.A. und Hudspeth, A.J. (1998) Regulation of free Ca²⁺ concentration in hair-cell stereocilia. *J. Neuroscience* 18 (16), 6300-6318.

Mahe, Y., Garcia-Romeu, F. und Montais, R. (1985) Inhibition by amiloride of both adenylate cyclase activity and the Na⁺/H⁺ antiporter in fish erythrocytes. *Eur.J.Pharmacol.* 116, 199-206.

Manley, G.A. (1979) Preferred intervals in the spontaneous activity of primary auditory neurons. *Naturwissenschaften* 66, 582-584.

Manley, G.A. und Gleich, O. (1984) Avian primary auditory neurons. *Naturwissenschaften* 71, 592--594.

Manley, G.A., Gleich, O., Leppelsack, H.-J. und Oeckinghaus, H. (1985) Activity patterns of cochlear ganglion neurons in the starling. *J. Comp. Physiol. A* 157, 161-181.

Manley, G.A. (1990) *Peripheral hearing mechanisms in reptiles and birds.* Springer Verlag, Berlin New York

Manley, G.A. (2000) Cochlear mechanisms from a phylogenetic viewpoint. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 97, 11736-11743.

Martin, A.R. und Fuchs, P.A. (1992) The dependence of calcium-activated potassium currents on membrane potential. Proc.R.Soc.London[Biol.]. 250, 71-76.

Murrow, B.W. und Fuchs, P.A. (1990) Preferential expression of transient current (IA) by short hair cells of the chick's cochlea. Proc. R. Soc. Lond. (Biol) 242, 189-195.

Murrow, B.W. (1994) Position-dependent expression of potassium currents by chick cochlear hair cells. J. Physiol. 480.2, 247-259.

Nakagawa, T., Akaike, N., Kimitsuki, T., Komune, S. und Arime, T. (1990) ATP-induced current in isolated outer hair cells of guinea-pig cochlea. J. of Neurophysiology 63, 1068-1074.

Nakagawa, T., Kakehata, N., Akaike, S., Takasaka, T. und Uemura, T. (1992) Effects of Ca²⁺ antagonists and aminoglycoside antibiotics on Ca²⁺ current in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. Brain Res. 580, 345-347.

Necker, Reinhold (1970) Zur Entstehung der Cochleapotentiale von Vögeln: Verhalten bei O₂-Mangel, Cyanidvergiftung und Unterkühlung sowie Beobachtungen über die räumliche Verteilung. Z. vergl. Physiologie 69, 367-425.

Necker, R. (1983) Hearing. In: Abs, M. (ed.) Physiology and behaviour of the pigeon. Acad. Press., Lond.

Newgreen, D.T., Bray, K.M., McHarg, A.D., Weston, A.H., Duty, S., Brown, B.S., Kay, P.B., Edwards, G., Longmore, J., Southerton, J.S. (1990) The action of Diazoxid and minoxidil sulphate on rat blood vessels: a comparison with cromakalim. Brit. J. Pharmacol., 100, 605-613.

Nilles, R., Järlebark, L., Zenner, H.P. und Heilbronn, E. (1994) ATP-induced cytoplasmatic [Ca²⁺] increases in isolated cochlear outer hair cells. Involved receptor and channel mechanisms. Hearing Res. 73, 27-34.

Nuttall, A.L., Brown, M.C., Masta, R.I. und Lawrence, M. (1981) Inner hair cell responses to the velocity of basilar membrane motion in the guinea pig. Brain Res. 211, 171-174.

Ochi, R. (1975) Manganese action potentials in mammalian cardiac muscle. Experimentia 31, 1048-1049.

Oesterle, E.C. (1992) Ultrastructure of Hyaline, Border and Vacuole Cells in the chick inner ear. J. Comparative Neurology 318, 64-82.

Offner, F.F., Dallos, P. und Cheatham, M.A. (1987) Positive endocochlear potential: Mechanism of production by marginal cells of stria vascularis. Hearing Research, 29117-124.

Ohmori, H. (1984) Studies of ionic currents in the isolated vestibular hair cell of the chick. J. Physiol.(London) 350, 561-581.

Ohmori, H. (1985) Mechano-electrical transduction currents in isolated vestibular hair cells of the chick. J. Physiol.(London) 359, 189-217.

- Ohmori, H. (1986) Ionic currents and transduction currents in the hair cell of the chick. *Biomedical Research* 7, 103-107.
- Ohmori, H. (1987) Gating properties of the mechano-electrical transducer channel in the dissociated vestibular hair cell of the chick. *J. Physiol.*, 387, 589-610.
- Ohmori, H. (1988) Mechanical stimulation and Fura-2 Fluorescence in the hair bundle of dissociated hair cells of the chick. *J. of Physiol.* 399, 115-137.
- Ohmori, H. (1988b) Mechano-electrical Transduction of the chick Hair Cell. *Progress in Brain Research* 74.
- Ohmori, H. (1989) Mechano-electrical transduction of the hair cell. *Jap.J.Physiol.* 39, 643-657.
- Ohmori, H. und Yoshida, N. (1993) Intracellular Ca^{2+} mediates inhibitory postsynaptic potentials in hair cells. *Biomedical Research* 14/2, 121-124.
- Pallotta, B.S., Magleby, K.L. und Barrett, J.N. (1981) Single channel recordings of Ca^{2+} -activated K^+ -currents in rat muscle cell culture. *Nature* 293, 471-474.
- Palmer, L.G. (1984) Voltage dependant block by amiloride and other monovalent cations of apikal Na channels in the toad urinary bladder. *J. membrane biol.* 80, 153-165.
- Palm, D., Hellenbrecht, D., Quiring, K. (1992) Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.: allg. und spez. Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftsverlag, S. 188.
- Patuzzi, R:B:, Bull C.L. (1991) Electrical responses from the chicken basilar papilla. *Hearing Research*, 53, 57-77.
- Pickles, J.O., Brix, J., Comis, S.D., Gleich, O., Köppl, C., Manley, G.A. und Osborne, M.P. (1989) The organization of tip links and stereocilia on hair cells of bird and lizard basilar papillae. *Hear. Res.* 41, 31-42.
- Pickles, J.O. und Corey, D.P. (1992) Mechanoelectrical transduction by hair cells. *TINS* 15, 254-259.
- Pierson, M. und Dallos, P. (1976) Re-examination of avian cochlear potentials. *Nature* 262, 59-601.
- Pratz, J., Mondot, S., Montier, F. und Caverio, I. (1991) Effects of the K^+ -channel activators, RP 52891, cromakalim and diazoxide, on the Plasma Insulin level, plasma renin activity and blood pressure in rats. *J. pharmacol. and exp. Therap.* 258, 216-222.
- Precht, W. (1967) Physiology of the peripheral and central vestibular system. In: R. Llinas and W.Brecht (Eds.) *Frog Neurobiology*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 481-512.

- Preyer, S., Pfister, M., Zenner, H.P. (1991) The influence of K⁺-channels modulators on the receptor potential of outer hair cell. In: Proc. 20th Göttingen Neurobiol. Conference. Elsner, N. und Richter, H. (Eds.), Thieme, Stuttgart, p. 100.
- Ramanathan, K., Michael, T.H. und Fuchs (2000) beta subunits modulate alternatively sliced, large conductance, calcium-activated potassium channels of avian hair cells. *J. Neurosci.* 20 (5), S.1675-1684.
- Reng, D., Hack, I., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999a) Functional recovery of hearing after damage to the hair cell-neural synapses in the pigeon. *Euro. J. Physiol. Supp.* 437, O 6-8.
- Reng, D., Hack, I., Müller, M. und Smolders, J.W.T. (1999b) Glutamate receptor subunits and ototoxicity of AMPA in the pigeon inner ear. *Ass.Res.Otolaryngol.*22, 362.
- Rezius, G. (1884) *Das Gehörorgan der Wirbeltiere.* Vol.2, Stockholm, 1884.
- Ricci, A.J., Gray-Keller, M. und Fettilplace (2000) Tonotopic variations of calcium signalling in turtle auditory hair cells. *J. Physiol. (Lond.)* 524 Pt 2, S.423-436.
- Richter, C.-P. und Klinke, R. (1991) The effects of high concentrations sodium and potassium solutions in the scala media on pigeon primary afferents. In: Proc. 19th Göttingen Neurobiol. Conference. Elsner, N. und Penzlin, H. (Eds.), Thieme, Stuttgart, p. 104.
- Richter, C.-P. und Klinke, R. (1994) Artifact-free application of drugs into the avian endolymphatic space. *J. of Neuroscience Methods* 51, 171-175.
- Richter, C.-P., Heynert, S. und Klinke, R. (1995) Rate-intensity-functions of pigeon auditory primary afferents. *Hearing Research* 83 (1995) 19-25.
- Rudy, B. (1988) Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25, 729-749.
- Rüegg, J.C. (1990) Muskel. In: *Physiologie des Menschen.* Schmidt, Thews. (Hrsg.), Springer-Verlag, S. 66-86.
- Rüsch, A., Kros, C.J. und Richardson, G.P. (1994) Block by amiloride and its derivatives of mechano-electrical transduction in outer hair cells of mouse cochlear cultures. *Journal of Physiology* 474.1, 75-86.
- Sachs, M.B. (1964) Response to akustic stimuli from single units in the eighth nerve of the green frog. *J. Acoust. Soc. Am.* 36, 1956-1958.
- Sachs, M.B., Young, E.D. und Lewis, R. (1974) Discharge patterns of single fibers in the pigeon auditory nerve. *Brain Research* 70, 431-447.
- Saito, K. (1983) Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: subsurface cisternae and lamella bodies in the outer hair cell. *Hear. Res.* 31, 155-160.
- Salt, A.N., DeMott, J. (1994) Time course of endolymph volume increase in experimental hydrops measured in vivo with an ionic volume marker. *Hearing Research* 74, 165-172.

Sand, O. (1975) Effects of different ionic environments on the mechanosensitivity of lateral line organs in the mudpuppy. *J. Comp. Physiol. A* 102, 27-42.

Sariban-Sohraby, Sarah und Benos, D.J. (1986) The amiloride-sensitive sodium channel. *Am. J. Physiol.* 250 (Cell Physiol. 19), C175-C190.

Sauer, G.A. (1995) Messung von Ionenkonzentrationen im Innenohr und Abschätzung der Leitfähigkeiten des Tegmentum vasculosum bei der Taube. Diplomarbeit, S. 61.

Sauer, G., Richter, C.-P. und Klinke, R. (1999) Sodium, potassium, chloride and calcium concentrations measured in pigeon perilymph and endolymph. *Hearing Research* 129, 1-6.

Saunders, J.C. (1985) Auditory structure and function in the bird middle ear: An evaluation by SEM and capacitive probe. *Hear. Res.* 18, 253-268.

Schacht, Zenner (1987). Evidence that phosphoinositides mediate motility in cochlear outer hair cells. *Hear. Res.* 31, 155-160.

Schermuly, L., Göttl, K.-H. und Klinke, R. (1983) Little ototoxic effect of furosemide on the pigeon inner ear. *Hear. Res.* 10, 279-282.

Schermuly, L., und Klinke, R. (1985) Change of characteristic frequency of pigeon primary auditory afferents with temperature. *J. Comp. Physiol. A* 156, 209-211.

Schermuly, L., und Klinke, R. (1990a) Infrasound sensitive neurones in the pigeon cochlear ganglion. *J. Comp. Physiol. A* 166, 355-363.

Schermuly, L., und Klinke, R. (1990b) Origin of infrasound sensitive neurones in the papilla basilaris of the pigeon: an HRP study. *Hear. Res.* 48, 69-78.

Schermuly, L., Voßieck, T. und Klinke, R. (1991) Peri-stimulus suppression and post-stimulus ringing in tuned and untuned fibres of the pigeon auditory nerve. In: *Proc. 19th Göttingen Neurobiol. Conference*. Elsner, N. und Penzlin, H. (Eds.), Thieme, Stuttgart, p.101.

Schneider, M.E., Cotanche, D.A., Fambrough, D.M., Saunders, J.C. und Matschinsky, F.M. (1987) Immunocytochemical and quantitative studies of Na⁺-K⁺ ATPase distribution in the developing chick cochlea. *Hear. Res.* 31, 39-54.

Schwartzkopff, J. und Winter, P. (1960) Zur Anatomie der Vogelcochlea unter natürlichen Bedingungen. *Biol. Zbl.* 79, 609-629.

Sellick, P.M. und Bock, G.R. (1974) Evidence for an electrogenic potassium pump as the origin of the positive component of the endocochlear potential. *Pflügers Arch.* 352, 351-361.

Sellick, P.M. und Russell, I.J. (1980) The responses of inner hair cells to basilar membrane velocity during low frequency auditory stimulation in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 1980 Jun;2 (3-4), 439-445.

Sewell, W.F. (1996) Neurotransmitters and synaptic transmission. In: *The cochlea*, Eds. P. Dallos, A.N. Popper und R.R. Fay, Springer Verlag, New York, 503-533.

Shehata-Dieler, W.E., Richter, C.-P., Dieler, R. und Klinke, R. (1994) Effects of endolymphatic and perilymphatic application of salicylate in the pigeon. I. Single fiber activity and cochlear potentials. *Hear. Res.* 74, 77-84.

Shigemoto, T. und Ohmori, H. (1990) Muscarinic agonists and ATP increase the intracellular Ca^{2+} Concentration in chick hair cells. *J. Physiol.* 420, 127-148.

Shigemoto, T. und Ohmori, H. (1990) Muscarinic receptor hyperpolarizes cochlear hair cells of chick by activating Ca^{2+} -activated K^+ channels.

Siebiens, A.W. und F.M. Kregenow (1978) Volume regulatory responses of salamander red cells incubated in anisotonic media-effects of amiloride. *Physiologist* 21 (4), 110.

Smolders, J.W.T. und Klinke, R. (1984) Effects of temperature on the properties of primary auditory fibres of the spectacled caiman, *Caiman crocodilus L.* *J. Comp. Physiol. A* 155, 19-33.

Smolders, J.W.T., Ding-Pfenningdorff, D. und Klinke, R. (1995) A functional map of the pigeon basilar papilla: correlation of the properties of single auditory nerve fibres and their peripheral origin. *Hearing Research* 92 (1-2), S.151-169.

Suga, N., Simmons, J.A. und Jen, P.H.-S. (1975) Peripheral specialization for fine analysis of Doppler-shifted echoes in the auditory system of the 'CF-FM' bat *Pteronotus parnellii*. *J. Exp. Biol.* 63, 161-192.

Takasaka, T. und Smith, C.A. (1971) The structure and innervation of the pigeon's basilar papilla. *J. Ultrastruct. Res.*, 35, 20-65.

Tanaka, K. und Smith, C.A. (1975) Structure of the avian tectorial membrane. *Ann. Otol.* 84, 287-296.

Tang, C.-M., Presser, F. und Morad, M. (1988) Amiloride Selectivity Blocks the Low Threshold (T) Calcium Channel. *Science* 240, 213-215.

Tasaki, I., Davis, H. und Eldredge, D.H. (1954) Exploration of cochlear potentials in guinea pig with a microelectrode. *J. Acoust. Soc. Am.* 26, 765-773.

Temchin, A.N. (1988) Unusual discharge patterns of single fibers in the pigeons auditory nerve. *J.Comp.Physiol.A.* 163, 99-116.

Thurman, C.L. und Higgins Jr., J.T. (1982) Amiloride stimulation of sodium transport in the presence of calcium and a divalent cation chelator. *Biochemica et Biophysica Acta* 689, 561-566.

Tilney, L.G. und Saunders, J.C. (1983) Actin filaments, stereocilia, and haircells of the bird cochlea. Length, number, width and distribution of stereocilia of each haircell are related to the position of the haircell on the cochlea. *J. Cell. Biol.* 96, 807-821.

Tonndorf, J. (1986) Effects of changes in endolymph fluid volume. *Hear.Res.* 22, 170.

- Trube, G., Rorsman, P. und Ohno-Shosaku, T. (1986) Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ -channel in mouse pancreatic β -cells. *Pflügers Arch* 407, 493-499.
- Tse, C.-M., Levine, S.A., Yun, C.H.C, Brant, S.R., Pouyssegur, J., Montrose, M.H. und Donowitz, M. (1993) Functional characteristics of a cloned epithelial Na^+/H^+ exchanger (NH_3) : Resistance to amiloride and inhibition by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9110-9114.
- Ulfendahl, M., Khanna, S. M. und Heneghan, C. (1995) Shearing motion in the hearing organ measured by confocal laser heterodyne interferometry. *NeuroReport* 6, 1157-1160.
- von Düring, M., Andres, K.H. und Simon, K. (1985) The comparative anatomy of the basilar papillae in birds. *Fortschr. Zool.* 30, 681-685.
- Voßieck, T. und Klinke, R. (1990) A method for changing the avian endocochlear potential by current injection. *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.* 248, 11-14.
- Voßieck, T., Schermuly, L., und Klinke, R. (1991) The influence of DC-polarisation of the endocochlear potential on single fibre activity in the pigeon auditory nerve. *Hear. Res.* 56, 93-100.
- Voßieck, T. (1991) Der Einfluß des endocochleären Potentials auf die Innenohrfunktion der Taube (*Columba livia*). Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. med.) des Fachbereiches Humanmedizin der J.W.Goethe Univ. Frankf./M.
- Walker, R.G. und Hudspeth, A.J. (1996) Calmodulin controls adaption of mechanoelektrical transduction by haircells of the bullfrog's sacculus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2203-2207.
- Wangemann, P. und Shiga, N. (1994) Ba^{2+} and amiloride uncover or induce a pH-sensitive and a Na^+ or non-selective cation conductance in transitional cells of the inner ear. *European J. of Physiology* 426, 258-266.
- Wangemann, P., Liu, J. and Marcus, D.C. (1995) Ion transport mechanisms responsible for K^+ secretion and the transepithelial voltage across marginal cells of stria vascularis in vitro. *Hear. Res.* 84, 19-29.
- Wen-Mei Fu (1994) Potentiation by ATP of the postsynaptic acetylcholine response at developing neuromuscular synapses in *Xenopus* cell cultures. *J. Physiol.* 477.3, 449-458.
- Whitehead, M.C. und Morest, D.K. (1985) The growth of cochlear fibres and formation of their synaptic endings in the avian inner ear: a study with the electron microscope. *Neuroscience* 14, 277-300.
- Wu, Y.-C., Art, J.J., Goodman, M.B., Fettiplace, R. (1995) A kinetik description of the Calcium-activated potassium channel and its application to electrical tuning of hair cells. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 63, 131-158.

Yamoah, E.N., Lumpkin, E.A., Dumont, R.A. Smith, P.J., Hudspeth, A.J. und Gillespie, P.G. (1998) Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase extrudes Ca^{2+} from haircell stereocilia. *J. Neuroscience* 18 (2), 610-624.

Zenner, H.P., Zimmermann, U. und Schmitt, U. (1985) Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear. Res.* 18, 127-133.

Zenner, H.P., Zimmerman, R. und Gitter, A.H. (1988) Active movements of the cuticular plate induce sensory hair motion in mammalian outer hair cells. *Hear. Res.* 34, 233-240.

Zimmermann, U., Reuter, G., Gitter, A.H., Zenner, H.P. and Klinke, R. (1989) Isolation and short term culture of pigeon hair cells. In: N. Elsner and W. Singer (Eds.), *Dynamics and Plasticity in Neuronal Systems*, Thieme, Stuttgart, S.286.

Zwislocki, J.J. (1979) Tectorial membrane: a possible sharpening effect on the frequency analysis in the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 87, 267-269.

Sven Heynert

Otto-Leininger-Str. 17
53501 Grafschaft

Lebenslauf

Name : Heynert
Vornahme : Sven
Geburtstag/Geburtsort : 07.11.1967 in Gräfelting
Familienstand : verheiratet
Nationalität : deutsch
Eltern : Brunhild Heynert (geb. Wagner), Bankangestellte
Bernd Heynert, selbstständiger Unternehmensberater

Schule, Studium und berufliche Erfahrung:

1973 - 1977 Erich-Simdorn-Schule, 63543 Neuberg
1977 - 1979 Kaethe-Kollwitz-Schule, 63505 Langenselbold
1979 - 1984 Karl-Rehbein-Schule, 63450 Hanau
1984 - 1987 Gg.-Chr.-Lichtenberg-Oberstufen-Gymnasium, 63451 Bruchköbel
Mai 1987 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

Juni 1987 - Januar 1989 Zivildienst: Deutsches Rotes Kreuz, 63065 Offenbach
(mobiler sozialer Hilfsdienst)

April 1989 - September 1993 Studium der Humanmedizin an der J.-W.-Goethe Universität,
Frankfurt/Main

Oktober 1993 - Mai 1996 Studium der Humanmedizin an der J.-Liebig Universität, Gießen
Juli 1996 - Juni 1998 AiP und Assistenzarzt in der Neurologischen Abteilung des St.Josef
Krankenhauses in 56856 Zell/Mosel (Chefarzt: Dr.med. Masuhr)

Juli 1998 – Dezember 1999 Assistenzarzt in der Neurologischen Klinik Meisenheim (Chefarzt:
Dr.med. Hachgenei)

Seit Februar 2000 Assistenzarzt in der Dr.von Ehrenwall'schen Klinik (Psychiatrie und
Neurologie) in Ahrweiler (Chefarzt: Dr.med. Smolenski)

Prüfungen :

4. April 1991	ärztliche Vorprüfung (Physikum)
16. September 1992	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12. April 1995	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
8. Mai 1996	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen :

September 1991	Innere Medizin	Stadtkrankenhaus Hanau
März/April 1994	Psychiatrie	Southmead Hospital, Bristol, GB
August 1994	Neurologie	Neurologische Klinik Braunfels
September 1994	Radiologie	Praxis Dr. Schleipen, Hanau

Praktisches Jahr :

01.Mai 1995 - 30.April 1996	1.Tertial: Innere Medizin	Kreiskrankenhaus Wetzlar
	2.Tertial: Chirurgie	Kreiskrankenhaus Wetzlar
	3.Tertial: Neurologie	St.Vincent's Hospital, Dublin, Irland

Frankfurt am Main, den 23.07.2001

(Sven Heynert)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Der Einfluß von Amilorid und Diazoxid auf die
Innenohrfunktion der Taube (*Columba livia*)

im Zentrum der Physiologie der J. W. Goethe Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. med. R. Klinke ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der Arbeit wurden in folgenden Fachbeiträgen bereits veröffentlicht:

Heynert, S., Richter, C.-P. und Klinke, R. (1993) Effects of Amiloride on the mechano-electrical transduction process in the inner ear of pigeon. In: Gene-Brain-Behaviour, Hrsg. N. Elsner und M. Heisenberg. Thieme Verlag Stuttgart, S.238.

Richter, C.-P., Heynert, S. und Klinke, R. (1994) In vivo effects of Streptomycin and Amiloride on the mechano-electrical transduction in pigeon auditory hair cells. In: Sensory Transduction, Hrsg. N. Elsner und H. Beer. Thieme Verlag Stuttgart, S.72.

Richter, C.-P., Heynert, S. und Klinke, R.: Effects of streptomycin and amiloride on the function of the pigeon inner ear; J. Comp. Physiol. A 179 (1996) 415-427.

Frankfurt am Main, den 23.07.2001

(Sven Heynert)