

**Beeinflussung von DPOAEs durch Beschallung des  
kontralateralen Ohrs mit komplexen Stimuli in  
wachen und narkotisierten Tieren der  
Fledermausspezies *Carollia perspicillata***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Désirée Heidinger, geb. Schlenther  
aus Wuppertal

Frankfurt 2016

(D30)



Vom Fachbereich Biowissenschaften der Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Meike Piepenbring

1.Gutachter: Prof. Dr. M. Kössl

2.Gutachter: Prof. Dr. U. Baumann

Datum der Disputation:



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Zusammenfassung.....	XIII

## 1 Einleitung..... 1

1.1 Das auditorische System .....2

1.2 Otoakustische Emissionen.....6

1.2.1 OAE-Residuale .....9

1.3 Die Hörbahn und das efferente System.....10

1.4 Die Rolle von Fledermäusen in der Hörforschung.....13

1.4.1 Grundsätzliche Strategien der Echoortung.....13

1.4.2 *Carollia perspicillata* als Modellorganismus.....14

## 2 Material und Methoden..... 16

2.1 Messungen zur Untersuchung des Einflusses von KAS auf DPOAE.....16

2.1.1 Anästhesie .....17

2.1.2 Kontralaterale akustische Stimuli .....17

2.1.3 Versuchsaufbau .....18

2.1.4 Kriterium zur Bestimmung der natürlichen DPOAE-Pegelschwankungen .....20

2.1.5 Teilprojekt I: DPOAE Wachstumsfunktionen .....21

2.1.6	Teilprojekt II: Zeitverlauf efferenter Effekte .....	23
2.2	Histologie .....	24
2.2.1	Perfusion .....	25
2.2.2	Thiocholinmethode zum Nachweis von Acetylcholinesterasen.....	25
2.3	Messung von OAE-Residualen .....	27
2.3.1	Messung von OAE-Residualen unter Verwendung von Reintönen....	28
2.3.2	Messung von OAE-Residualen unter Verwendung natürlicher Stimuli	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
3.1	Vorversuche über die Wirkung einer Ketamin-Xylazin-Narkose auf die Generierung von DPOAE.....	29
3.2	Teilprojekt I: Vergleich von DPOAE-Wachstumsfunktionen gemessen mit und ohne KAS bei wachen und narkotisierten Tieren.....	31
3.2.1	Steigung der DPOAE-Wachstumsfunktionen.....	38
3.2.2	Differenzen der DPOAE-Wachstumsfunktionen mit und ohne KAS gemessen an zwei L <sub>2</sub> -Schwellen .....	39
3.3	Teilprojekt II: Vergleich von kontinuierlichen DPOAE-Messungen mit eingebetteter KAS bei wachen und narkotisierten Tieren.....	41
3.3.1	Differenz der DPOAE-Pegel über die Zeit .....	46
3.4	Teilprojekt III: Histologie .....	48
3.5	Teilprojekt IV: OAE-Residuale.....	50
3.5.1	Reintonstimulation .....	50
3.5.2	Stimulation mit natürlichen Lauten.....	51

<b>4 Diskussion.....</b>	<b>56</b>
4.1 Einfluss von KAS auf DPOAEs.....	56
4.1.1 Zeitverlauf efferenter Effekte.....	58
4.1.2 Einflussnahme der verwendeten Narkose .....	59
4.1.3 Methodische Gesichtspunkte .....	61
4.1.4 Schlussfolgerung über die Einflussnahme von kontralateraler akustischer Stimulation auf DPOAEs .....	64
4.2 Histologie .....	65
4.2.1 Schlussfolgerung der histologischen Untersuchungen.....	66
4.3 OAE-Residuale.....	66
4.3.1 Methodische Gesichtspunkte .....	68
4.3.2 Schlussfolgerung der OAE-Residuale-Messungen .....	70
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>83</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Innenohrs .....	4
Abbildung 2: DPOAE-Generierung .....	7
Abbildung 3: Darstellung der Hörbahn und des olivokochleären Systems.....	11
Abbildung 4: Darstellung der kontralateral verwendeten Stimuli.....	18
Abbildung 5: Darstellung des Versuchsaufbaus.....	19
Abbildung 6: Kriteriums-Messung.....	21
Abbildung 7: Darstellung der Differenzbildung in Versuchsparadigma II.....	24
Abbildung 8: Versuchsparadigma zur Messung von OAE-Residualen .....	27
Abbildung 9: Gemittelte DPOAE-Wachstumsfunktionen. ....	30
Abbildung 10: Abhängigkeit des DPOAE-Pegels von der $f_2$ -Freq.und dem $f_2$ -Pegel....	31
Abbildung 11: DPOAE-Wachstumsfunktionen bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz .....	32
Abbildung 12: DPOAE-Wachstumsfunktionen bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz.....	34
Abbildung 13: DPOAE-Wachstumsfunktionen bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz.....	36
Abbildung 14: DPOAE-Wachstumsfunktionen bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz.....	37
Abbildung 15: Steigung der DPOAE-Wachstumsfunktionen.....	38
Abbildung 16: Pegeldifferenz (wach und narkotisiert) .....	40
Abbildung 17: Einzelbeispiel einer DPOAE-Zeitmessung (40 kHz).....	42
Abbildung 18: Einzelbeispiel einer DPOAE-Zeitmessung unter Narkoseeinfluss .....	43
Abbildung 19: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz .....	44
Abbildung 20: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz .....	45

Abbildung 21: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz .....	45
Abbildung 22: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz .....	46
Abbildung 23: Differenz des Zeitfensters 1 zu den folgenden Zeitfenstern.....	47
Abbildung 24: Differenz des Emissionspegels eingeteilten Zeitintervalle (250 ms) .....	48
Abbildung 25: Histologische Präparate der Kochlea von <i>C. perspicillata</i> .....	49
Abbildung 26: OAE-Residual-Messung mit Reintonstimulation.....	51
Abbildung 27: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem KR.....	52
Abbildung 28: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei KR.....	53
Abbildung 29: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem EOR.....	54
Abbildung 30: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei EOR .....	55

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 A:	Mischungsverhältnis des Acetatpuffers.....	26
Tabelle 1 B:	Mischungsverhältnis der Inkubationslösung.....	26

## Abkürzungsverzeichnis

$2f_1-f_2$	kubisches Verzerrungsprodukt der Frequenz $2f_1-f_2$
ACh	Acetylcholin
ÄHZ	äußere Haarsinneszellen
BBR	Breitbandrauschen
CF	constant frequency (engl.), konstantfrequent
ddH <sub>2</sub> O	doppelt demineralisiertes Wasser
DPOAE	Distortions- (bzw. Verzerrungs-) Produkt otoakustische Emission
EOR	Echoortungsruf
$f_1$	Frequenz des Stimulustons $f_1$
$f_2$	Frequenz des Stimulustons $f_2$
FFT	fast Fourier transform (engl.), schnelle Fourier-Transformation
FM	frequency-modulated (engl.), frequenzmoduliert
GABA	gamma-Aminobutyric acid (engl.), Gamma-Aminobuttersäure
IHZ	innere Haarsinneszelle
KAS	kontralaterale akustische Stimulation
KR	Kommunikationsruf
L	Lautsprecher
MOK	mediale olivo-kochleäre Neurone
MOM	Mittelohrmuskeln
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OAE	otoakustische Emission
PFA	Perfluoralkoxylalkan
RES	Ruf-Echo-Sequenz

SM	<i>Scala media</i>
SOAE	spontane otoakustische Emission
ST	<i>Scala tympani</i>
StV	<i>Stria vascularis</i>
SV	<i>Scala vestibuli</i>
t1 (a-d)	timewindow 1 (engl.), Zeitfenster 1 mit den Abschnitten a-d
t2 (a-d)	timewindow 2 (engl.), Zeitfenster 2 mit den Abschnitten a-d
t3 (a-d)	timewindow 3 (engl.), Zeitfenster 3 mit den Abschnitten a-d
TEOAE	transitorisch evozierte otoakustische Emissionen
TM	Tektorialmembran

## Zusammenfassung

Das Hören hat für den Menschen eine maßgebliche Bedeutung hinsichtlich Kommunikation und Orientierung. Auch wenn sich der Mensch stark auf seinen visuellen Sinn verlässt, wird mit dem Ausfall des Hörvermögens deutlich, wie viele Informationen oft unterbewusst über die Analyse von Schallsignalen gezogen werden. Trotz dieser grundlegenden Relevanz sind bis heute noch nicht alle Komponenten, die dem Hörprozess zugrunde liegen, entschlüsselt.

Um sich diesen offenen Fragestellungen anzunähern, müssen Forscher oft auf Tiermodelle zurückgreifen. Auf Grund ihres exzellenten Gehörs haben sich hier in den letzten Jahrzehnten Fledermäuse als taugliche Versuchstiere qualifiziert. Diese Tiere sind in der Lage sich ohne Verwendung des visuellen Systems in absoluter Dunkelheit zu orientieren, indem sie mit Hilfe der wiederkehrenden Echos ihrer ausgesendeten Ultraschalllaute die Umgebungsstrukturen analysieren. Weiterhin umfasst der zur Kommunikation und Ortung verwendete Frequenzbereich bei Fledermäusen ein Vielfaches von dem des menschlichen, was ebenfalls verschiedene Aspekte der Hörforschung begünstigt. Die in dieser Studie verwendete fruchtfressende Fledermausart *Carollia perspicillata* eignet sich hervorragend für akustische Untersuchungen, da ihr Innenohr keine speziellen morphologischen Spezialisierungen aufweist.

Anhand der Fledermausart *C. perspicillata* sollen innerhalb der vorliegenden Studie verschiedene offene Fragestellungen bezüglich der Innenohrmechanik näher beleuchtet werden. Um sich diesen Fragestellungen anzunähern, wurde eine Kombination aus zwei etablierten Methoden verwendet. Zum einen die Messung von Distortions-Produkt otoakustischen Emissionen (DPOAEs), welche auf Grund ihrer Generierung durch aktive Prozesse innerhalb der Kochlea die Möglichkeit bietet, Veränderungen im Innenohr festzustellen und zum anderen kontralaterale akustische Stimulation (KAS), welche eine erprobte Methode zur Aktivierung des efferenten Systems darstellt. Dadurch, dass die äußeren Haarsinneszellen in der Kochlea direkte synaptische Kontakte mit efferenten Fasern der absteigenden Hörbahn eingehen, kann eine Aktivierung des efferenten Systems Modulationen des kochleären Verstärkers

bewirken, wodurch sich wiederum die Antworteigenschaften der Kochlea verändern. Mit einer Kombination dieser beiden Methoden lassen sich demnach zum einen höhere Zentren der Hörbahn aktivieren, die über efferente Fasern einen direkten Einfluss auf das Innenohr nehmen, zum anderen die induzierten Modulationen in Form von DPOAEs mit Hilfe eines sensitiven Mikrofons aufnehmen. Die Grundvoraussetzung für die Funktionalität dieser Methodenkombination ist das Vorhandensein von efferenten Fasern innerhalb der Kochlea. Da das efferente System verschiedener Säuger eine große Diversität aufweist, wurden innerhalb dieser Arbeit zusätzlich zu den akustischen Untersuchungen histologische Schnittserien der Kochlea von *C. perspicillata* angefertigt. Hierbei lag das Hauptaugenmerk auf dem Verlauf der efferenten Fasern innerhalb der Kochlea. Mit Hilfe der Thiocholinmethode wurde der Ort der Umsetzung des Acetylcholinabbauenden Enzyms Acetylcholin-esterase angefärbt. Acetylcholin ist der vorrangig vorkommende Transmitter an den efferenten Synapsen.

Diese Studie untersucht weiter den Einfluss der Narkose auf das Innenohr. In zahlreichen Studien, die Innenohrmechanik betreffend, wurden die Untersuchungen an narkotisierten Tieren durchgeführt. Oftmals wird zwar die Problematik der möglichen Beeinflussung des Innenohres durch das verwendete Narkosemittel diskutiert, aber meisthin als unumgänglich eingestuft. Innerhalb der vorliegenden Studie wurde ein Großteil der Experimente an narkotisierten und auch wachen Tieren durchgeführt, um die Auswirkungen der häufig verwendeten Ketamin-Xylazin-Narkose auf die Innenohraktivität zu verdeutlichen.

In der Literatur lässt sich eine Vielzahl von akustischen Untersuchungen finden, in denen artifizielle Stimuli wie Reintöne oder Rauschen verwendet werden. Die Problematik dahinter ergibt sich daraus, dass diese Art der Töne in der Natur selten zu finden sind. Derartige Studien werfen daher die Frage auf, ob das Innenohr beispielsweise Rauschstimuli auf die gleiche Weise verarbeitet wie natürliche, komplexere Stimuli. Innerhalb der vorliegenden Studie wurden demzufolge im Vergleich zu artifiziellen Stimuli arteigene Rufe der Fledermausspezies *C. perspicillata* aufgenommen und als akustische Stimuli während der Messungen verwendet.

Im Zuge dieser Fragestellung wurde in einem weiteren Teilprojekt versucht ein neues Verfahren zur Messung von OAEs zu etablieren, mit dem es möglich ist das Ohr nicht

ausschließlich mit den herkömmlich verwendeten Reintönen zu stimulieren, sondern ebenfalls mit komplexen Lauten, wie arteigenen Kommunikations- und Echoortungsrufen. Hierfür wurde ein von Douglas Keefe vorgestelltes Paradigma zur Messung von OAE-Residualen herangezogen, welches die am Trommelfell gemessenen akustischen Signale von den Trommelfellantworten auf einzelne Komponenten dieser Signale subtrahiert.

Anhand der in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse kann deutlich gezeigt werden, dass eine akustische Stimulation der kontralateralen Cochlea mit verschiedenen artifiziellen sowie arteigenen Stimuli zuverlässig eine Änderung des Pegels der  $2f_1$ - $f_2$  DPOAE von bis zu 37,3 dB in der ipsilateralen Cochlea bei wachen Tieren bewirkt. Dabei unterscheidet sich die Art der Beeinflussung deutlich je nach verwendetem kontralateralem Stimulus. Die Stimulation mit artifiziell Breitbandrauschen supprimiert den Emissionspegel über den gesamten getesteten Frequenzbereich um etwa 11,6 dB, während die verwendeten arteigenen Laute eine vergleichbare Beeinflussung des DPOAE-Pegels ausschließlich in einem Frequenzbereich zwischen 50 und 70 kHz bewirken. Im Frequenzbereich von 20 bis 30 kHz verursachen die arteigenen Laute nahezu keine Pegelabsenkung, was im deutlichen Kontrast zu den Ergebnissen unter KAS mit Breitbandrauschen steht. Unter Narkoseeinfluss konnte, unabhängig vom verwendeten Stimulus, keine Beeinflussung des DPOAE-Pegels festgestellt werden, was die Annahme bestätigt, dass die verwendete Ketamin-Xylazin-Narkose einen drastischen Einfluss auf den Hörprozess und insbesondere auf das efferente System nimmt. Die Ursache dafür, dass arteigene Stimuli anders verarbeitet werden als artifizielle Stimuli (wie z. B. Breitbandrauschen) konnte zwar nicht abschließend geklärt werden, aber die Vermutung liegt nahe, dass in diesem Verarbeitungsprozess höhere Zentren der Hörbahn involviert sind und selektiven Einfluss auf die ablaufenden Prozesse nehmen.

Die Etablierung des OAE-Residual-Messparadigmas auf der Basis der Methode von Keefe und Ling (1998) sollte die Möglichkeit bieten sowohl Reintöne als auch komplexe, arteigene Stimuli zu verwenden und so eine Erweiterung des herkömmlich verwendeten Messverfahrens darstellen. Über verschiedene Vorversuche unter Anwendung einer Zweitonreizung konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse des neu entwickelten Paradigmas mit denen der herkömmlichen DPOAE-Messungen

hinsichtlich Reintonstimuli vergleichbar sind. Anhand der gewonnenen Ergebnisse mit einer Stimulation mit komplexen Signalen zeigen sich allerdings die Schwierigkeiten der neuen Methode. Die bisher erhobenen Daten zeigen keine klaren, reproduzierbare Ergebnisse, sollten aber die Grundbedingungen für die weiterführenden Versuche ebnen.

# 1 Einleitung

„Die Bedeutung des Hörsystems für uns Menschen wird dramatisch durch seinen Ausfall klar.“ So leitet der Neurobiologe Prof. Dr. Friauf einen seiner Artikel zum Thema Hören ein und untermauert dies mit einem bekannten Zitat des Philosophen Immanuel Kant: „Nicht sehen trennt von den Dingen; Nicht hören trennt von den Menschen“ (Neuroforum, 2014). Beide Aussagen machen deutlich welche enorme Bedeutung das Hörsystem für den Menschen hat. Die Bewältigung des Alltags wird im hohen Maße durch das Hören, welches zur Kommunikation und Orientierung befähigt, beeinflusst. Während beim Menschen jedoch auch die visuelle Wahrnehmung eine entscheidende Rolle spielt, gibt es andere Säugetiere, die sich nahezu ausschließlich auf ihr Hörsystem verlassen. Ein bemerkenswertes Beispiel stellen hier Fledermäuse dar, die in der Lage sind sich in totaler Dunkelheit problemlos zu orientieren. Der Mechanismus, wie Fledermäuse sich ohne Benutzung des Sehsystems so präzise bewegen können, war lange Zeit nicht bekannt. Erst Mitte des 20. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass diese Tiere Ultraschalllaute aussenden und mit Hilfe der wiederkehrenden Echos in der Lage sind, ihre Umgebung zu erfassen (Griffin und Galambos, 1941; Griffin, 1951, 1958).

Auf Grund der exzellent entwickelten Hörfähigkeit und des zur Ortung verwendeten, breiten Frequenzspektrums haben sich Fledermäuse als Modellorganismen in der Hörforschung etabliert. An ihnen werden zahlreiche Fragestellungen zu Mechanismen, welche dem Hörprozess unterliegen, erforscht. Besonders die Verwendung der fruchtfressenden Fledermausart *Carollia perspicillata*, deren Innenohranatomie derjenigen von Laborsäugetieren weitgehend ähnelt, ist dazu prädestiniert sich diesen Fragestellungen anzunähern.

Trotz der fundamentalen Bedeutung des Hörsystems sind zahlreiche Aspekte der Innenohrmechanik bis heute noch nicht abschließend geklärt. Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe unterschiedlicher Methoden einzelne Mechanismen innerhalb des Hörprozesses der Fledermausart *C. perspicillata* näher zu beleuchten. Vor allem die Stimulation mit artigen Lauten, wie Kommunikations- und Echoortungsrufe, zur Untersuchung der Beeinflussung des Innenohres durch

zentralnervöse Prozesse lag im Fokus dieser Studie. Während in den meisten Studien zur Untersuchung des Hörsystems auf die Verwendung von artifiziellen Reintönen oder Rauschstimuli zurückgegriffen wird, welche in der natürlichen Umgebung der Tiere selten auftreten, sollen hier mögliche Unterschiede in der kochleären Verarbeitung zwischen artifiziellen und natürlichen Stimuli aufgezeigt werden.

Eine der grundlegenden, in dieser Studie verwendeten Methoden war die Messung von otoakustischen Emissionen (OAEs). Auf Grund ihrer Generierung durch aktive Prozesse innerhalb der Kochlea ermöglichen es OAEs funktionelle Veränderungen im Innenohr nichtinvasiv zu erfassen. Da die äußeren Haarsinneszellen in der Kochlea direkte synaptische Kontakte mit efferenten Fasern der absteigenden Hörbahn eingehen, bietet sich eine kombinierte Methode aus der Messung von OAEs und der Stimulation des efferenten Systems an, um sich den Fragestellungen dieser Studie zu nähern. Eine Aktivierung des efferenten Systems und eine damit verbundene efferente Modulation des kochleären Verstärkers kann durch akustische Reizung des olivo-kochleären Reflexbogens bewirkt werden. Mit Hilfe dieser Methodenkombination ist es möglich höhere Bereiche der Hörbahn akustisch anzuregen und gleichzeitig die dadurch veränderten Antwortigenschaften der Kochlea zu messen.

## **1.1 Das auditorische System**

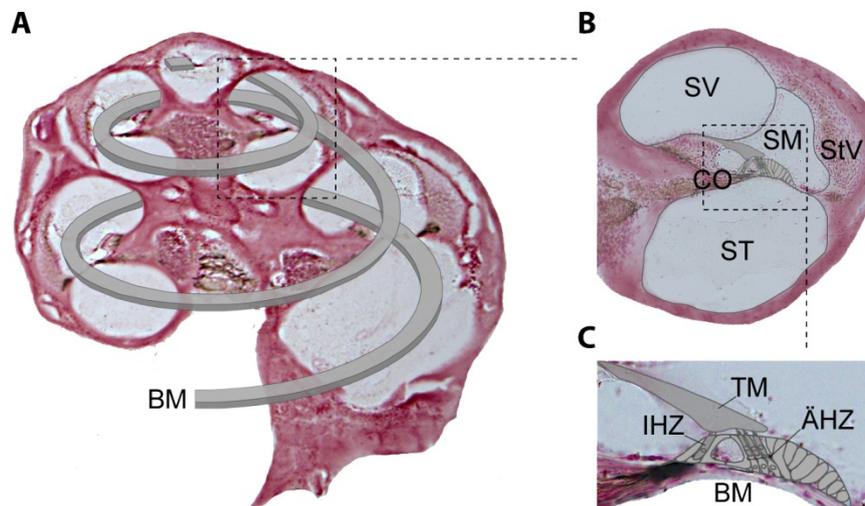
Der Hörprozess besteht aus der Umsetzung von Luftdruckschwankungen in neuronale Aktivitäten. Um diese mechano-elektrische Transduktion zu bewältigen, haben Säugetiere ein komplexes Hörorgan entwickelt, das aus drei Komponenten besteht: dem Außenohr, dem Mittelohr und dem Innenohr.

Das Außenohr umfasst zwei maßgebliche Strukturen, welche den Schall sammeln und in eine Richtung lenken. Zum einen eine trichterförmige Ohrmuschel (*Pinna*) und zum anderen der Gehörgang (*Meatus*), an dessen Ende sich das Trommelfell (*Tympanum*) befindet. Das *Tympanum* ist eine dünne Membran, die eine dichte Abgrenzung des Gehörgangs zum Mittelohr bildet. Direkt am *Tympanum* sind die Mittelohrknöchelchen Hammer (*Malleus*), Amboss (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*) befestigt, welche durch ihre Anordnung eine flexible, knöcherne Verbindung zwischen Außen- und Innenohr bilden. In ihrer Reihenfolge ist der *Malleus* starr mit dem *Incus*

verbunden, welcher wiederum eine bewegliche Verbindung zum *Stapes* aufweist. Die Fußplatte des *Stapes* setzt an einer weiteren, wesentlich kleineren Membran, dem ovalen Fenster, an, welche das luftgefüllte Mittelohr gegen das flüssigkeitsgefüllte Innenohr abgrenzt. Die Hebelwirkung der Gehörknöchelchen sowie der Größenunterschied der beiden Grenzmembranen sind maßgeblich an einer enormen Schalldruckverstärkung beteiligt, die gewährleistet, dass sich die Flüssigkeit im Innenohr in Bewegung setzt. Ohne diesen Mechanismus der Impedanzanpassung würde nahezu die gesamte Schallenergie am ovalen Fenster reflektiert werden. Abgesehen von dieser fundamentalen Aufgabe bietet das Mittelohr auch die Möglichkeit die Schalldruckverstärkung zu regulieren, was eine wichtige Schutzfunktion für das empfindliche Innenohr darstellt. Diese Regulierung läuft über zwei Muskeln, dem *Musculus tensor tympani*, welcher am *Malleus* ansetzt und bei einer Kontraktion das *Tympanum* versteift, und dem *Musculus stapedius*, welcher mit dem *Stapes* verbunden ist (Borg und Counter, 1989; Counter et al., 1989). An dem Schutzmechanismus gegen zu hohe Schalldruckpegel, dem sogenannten Mittelohrmuskel-Reflex (MOM-Reflex), ist vor allem eine Kontraktion des *M. stapedius* beteiligt, welche die Schwingungsfähigkeit des *Stapes* deutlich verringert und somit eine Verminderung der Schallübertragung verursacht (Pang und Peak, 1986).

Das Innenohr der Säugetiere setzt sich aus zwei Strukturen mit unterschiedlichen Aufgaben zusammen. Zum einen dem Labyrinth mit seinen Bogengängen, welches einen zentralen Teil des Gleichgewichtsorgans darstellt, und zum anderen der Cochlea, einer schneckenhausartig aufgewundenen Struktur, deren Komponenten die eigentliche Umwandlung der Schallenergie in neuronale Aktivitäten vollziehen (siehe Abbildung 1). Das Innere der von knöchernen Strukturen umgebenen Cochlea besteht aus drei mit Flüssigkeit gefüllten Kammern, der *Scala vestibuli*, der *Scala media* und der *Scala tympani*, welche sich um die starre Struktur der sogenannten Schneckenwindung (*Modiolus*) winden. Die ankommende Schallenergie wird durch eine Auslenkung des ovalen Fensters in die mit natriumreicher Perilymphe gefüllte *Scala vestibuli* geleitet. Diese ist an der Spitze der Cochlea, dem sogenannten Apex, über eine kleine Öffnung mit der *Scala tympani* verbunden. Der Druckausgleich dieses mit Flüssigkeit gefüllten Systems erfolgt über das runde Fenster, welches sich am basalen Ende der *Scala tympani* befindet. Zwischen diesen beiden Skalen, welche durch die

Reissnermembran zur *Scala vestibuli* und durch die Basilarmembran zur *Scala tympani* abgegrenzt sind, befindet sich die mit kaliumreicher Endolymphe gefüllte *Scala media*.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Innenohrs. **A:** Sagittalschnitt durch die Cochlea der Fledermausspezies *Carollia perspicillata* mit skizziertem Verlauf der Basilarmembran (BM). **B:** Vergrößerte Darstellung einer Kochleawindung. Zu erkennen sind die *Scala vestibuli* (SV), die *Scala media* (SM), die *Scala tympani* (ST), die *Stria vascularis* (StV) sowie das Corti-Organ (CO). **C:** Detaildarstellung des COs innerhalb der SM. Abgebildet sind die Tektorialmembran (TM), die Basilarmembran (BM) sowie die inneren- (IHZ) und äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ).

Die von den Mittelohrknöchelchen übertragene Schallenergie löst innerhalb der Cochlea eine Wanderwelle aus. Hierbei kommt es, der Druckveränderung folgend, zu einer Auslenkung der Basilarmembran, welche strukturelle Eigenschaften aufweist, die eine frequenzspezifische Reaktion auf einen Schallreiz ermöglichen. Da zum einen die Steifheit der Basilarmembran von der Basis bis zum Apex abnimmt, während zum anderen ihre Breite in gleicher Richtung zunimmt, werden einzelne Frequenzkomponenten eines Klangs ähnlich einer Fourieranalyse spektral aufgetrennt und so an verschiedenen Stellen frequenzabhängig abgebildet (Dallos, 1997). Während an ihrer vergleichsweise steifen Basis starke Auslenkungen durch hohe Frequenzen evoziert werden, stimulieren tiefere Frequenzen die Basilarmembran in apikalen Regionen. Dieses Phänomen wurde erstmals im Jahr 1960 von Georg von Békésy beschrieben und als Tonotopie bezeichnet. Die tonotope Repräsentation ankommender Reize auf der

Basilarmembran ist ein zentrales Prinzip innerhalb des kochleären Transduktionsprozesses.

Die eigentliche Umwandlung mechanischer Energie in Veränderungen des Ruhemembranpotentials von Sinneszellen läuft in dem auf der Basilarmembran sitzenden Corti-Organ (Abbildung 1C) ab. Das Corti-Organ ist das grundlegende rezeptive Element und enthält, eingebettet in stützende Strukturen (Deiterzellen, Hensen-Zellen), eine Reihe innerer Haarsinneszellen (IHZ) sowie drei Reihen äußerer Haarsinneszellen (ÄHZ), welche durch ein tunnelähnliches Gebilde voneinander getrennt sind. Auf den Spitzen dieser Sinneszellen befinden sich etwa 100 haarähnliche Stereozilien (Howard und Hudspeth, 1988), welche auf Grund eines aus f-Aktin bestehenden Zytoskeletts relativ steif sind und sich daher nur an der Basis verbiegen lassen (DeRosier et al., 1980). Die einzelnen Zilien sind durch Querstreben, den sogenannten „tip-links“ (Pickles, 1992), miteinander verbunden, die eine einheitliche Auslenkung der Zilien bewirken und wichtig sind für die Öffnung von Ionenkanälen während der Schallreizung. Durch den Zug der tip-links auf die Zellmembran der Stereozilien bei einer schallinduzierten Auslenkung der Basilarmembran öffnen sich unspezifische Kationen-Kanäle an den Spitzen der Stereozilien. Durch das Öffnen dieser Kanäle und auf Grund eines vorliegenden Konzentrationsgradienten strömen Kaliumionen aus der kaliumreichen Endolymphe in das Innere der Zelle und depolarisieren diese. Dieser Prozess aktiviert wiederum spannungsgesteuerte Kalziumkanäle, die zu einer Ausschüttung von Neurotransmittern führen, welche schließlich zu der Ausbildung eines Aktionspotentials in der nachgeschalteten, afferenten Nervenzelle führt. Die Neurone des Hörnervs (*Nervus vestibulocohlearis*) innervieren gezielt einzelne Haarzellen und haben deshalb eine spezifische charakteristische Frequenz, auf die sie am sensitivsten reagieren. Dadurch wird die auf der Basilarmembran erzeugte Tonotopie während der weiteren neuronalen Verarbeitung beibehalten, was ein grundlegendes Prinzip der auditorischen Signal-verarbeitung bildet.

Die Funktion der IHZ und ÄHZ unterscheidet sich maßgeblich voneinander. Die IHZ beziehen eine reiche afferente Innervation (90-95% der Neurone; Typ I Afferenzen) und dienen der eigentlichen Reizweiterleitung, während der Aufgabenbereich der schwach afferent innervierten ÄHZ (5-10% der Neurone; Typ II Afferenzen) nicht direkt in die

Transduktionsprozesse von mechanischen in elektrische Reize eingebunden ist, sondern vielmehr in der aktiven Verstärkung der einlaufenden Signale liegt (Ashmore, 2008). In den Zellwänden der ÄHZ ist das Motorprotein Prestin eingelagert, welches die Zelllänge aktiv verändern kann und so eine Aufwärts- und Abwärtsbewegung des Zellkörpers bewirkt (Dallos und Falker, 2002). Diese Bewegung führt zu einer Auslenkung der aus Kollagen und Glykoproteinen bestehenden Tektorialmembran, in welche die Stereozilien der ÄHZ eingebettet sind (Zheng et al., 2000). Die Tektorialmembran schwingt auf Grund ihrer zweifachen Aufhängung horizontal in einer um 90° verschobenen Phase zur Basilarmembran, was einer scherenartigen Bewegung entspricht. Durch diese Bewegung wird die Flüssigkeit im Subtektorialraum in Schwingung versetzt, was wiederum die Zilien der IHZ auslenkt. Auf diese Weise wird die Amplitude der Wanderwelle aktiv angehoben und die Abstimmstärke der Wanderwellen erhöht (Robles und Ruggero, 2001). Auch ein geringer Schalldruck kann so detektiert werden, was diesem Mechanismus die Bezeichnung „kochleärer Verstärker“ eingebracht hat (Robles und Ruggero, 2001; Ashmore, 2008). Die Funktionsweise dieser Verstärkung verläuft hochgradig nichtlinear. Leise Signale werden dabei stärker verstärkt, als laute Signale (Gold, 1948; Robles und Ruggero, 2001).

## 1.2 Otoakustische Emissionen

Bei der aktiven Verstärkung durch die ÄHZ wird als Nebenprodukt der nichtlinearen Prozesse zusätzliche Schallenergie freigesetzt, welche sich in der Flüssigkeit der Cochlea ausbreitet und retrograd über das Mittelohr eine Auslenkung des Trommelfells bewirkt. Derartige Schallereignisse sind mit Hilfe eines sensitiven Mikrofons im Gehörgang messbar. Bereits im Jahr 1948 vermutete der Physiker Thomas Gold einen aktiven Rückkopplungsmechanismus innerhalb des Innenohrs, konnte diesen allerdings nicht nachweisen. Seine Hypothese wurde erst im Jahr 1978 von David Kemp bestätigt und konkretisiert. Die damaligen „Kemp-Echos“ fanden in den folgenden Jahren in der Hörforschung enorme Beachtung und bildeten unter dem Namen otoakustische Emissionen (OAEs) den Grundstock für zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten. Mittlerweile finden OAEs selbst im klinischen Alltag eine verstärkte Anwendung, da sie eine ausgezeichnete Methode der objektiven Hördiagnostik darstellen. Mit Hilfe

dieser Messtechnik lässt sich gezielt die Funktion der Innenohrmechanik untersuchen ohne auf die subjektive Einschätzung des Patienten angewiesen zu sein (Lonsbury-Martin et al., 1991; Harrison et al., 2000; Janssen et al., 2003; Gehr et al., 2004). Diese objektive und nichtinvasive Methode bietet sich auch für die Bearbeitung akustischer Fragestellungen an Tiermodellen an. Bis dato wurden OAEs an diversen Säugetieren, Reptilien, Amphibien, Vögeln und sogar Insekten nachgewiesen (Kössl, 1992; Faulstich et al., 1996; Taschenberger et al., 1995; Dijk und Manley, 2001; Kössl et al., 2008).

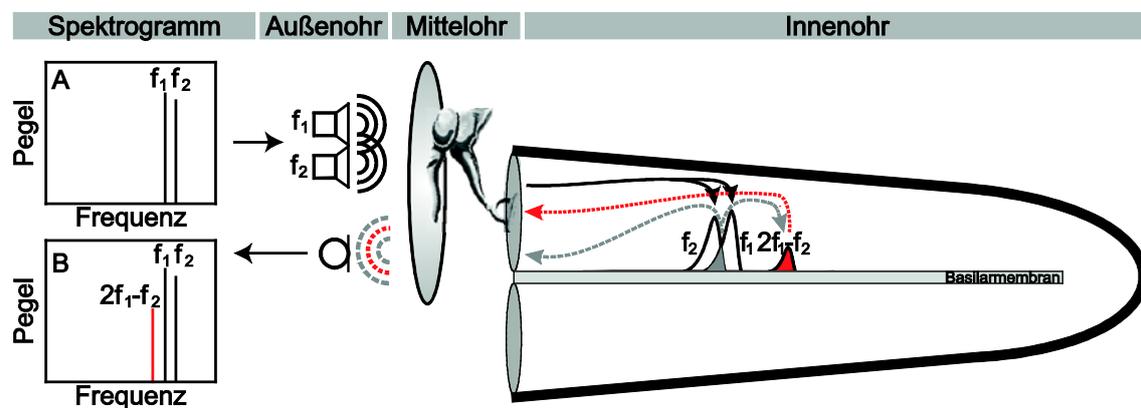


Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Generierung von DPOAEs. Dargestellt ist eine akustische Stimulation mit zwei Reintönen ( $f_1$  und  $f_2$ ) unterschiedlicher Frequenzen und Pegel (A), die über zwei getrennte Lautsprecherkanäle auf das Trommelfell appliziert werden und so zur Entstehung von Wanderwellen auf der Basilarmembran führen. Im Überlappungsbereich der durch die Reintöne induzierten Wanderwellen (grau) kommt es zu mechanischen Distorsionsprodukten, welche auf Grund der nichtlinearen Arbeitsweise der ÄHZ entstehen. Die Schallenergie dieser Distorsionsprodukte wird in beide Richtungen durch das Innenohr geleitet (graue Pfeile), wodurch sie einerseits das Mittelohr erreichen und andererseits weitere Wanderwellen auf der Basilarmembran auslösen, die wiederum zu einer Wahrnehmung der Distorsionsprodukte führen. Die Schallenergie der entstandenen DPOAE wird ebenfalls retrograd durch das Innenohr und über das Mittelohr geleitet und ist im Gehörgang mit Hilfe eines sensitiven Mikrofons messbar. Abgebildet ist die prominenteste DPOAE, die  $2f_1-f_2$  Emission (rot, B). Die Abbildung wurde nach Wittekindt (2009) verändert.

Die auftretenden Emissionen werden in zwei Klassen unterteilt. Einerseits in spontan auftretende Emissionen (SOAEs), welche ohne jegliche Stimulation in unterschiedlichen Zeitintervallen und bei unterschiedlichen Frequenzen auftreten können, sowie andererseits in evozierte Emissionen, die durch verschiedene Schallreize induziert werden können. Gängige Möglichkeiten OAEs hervorzurufen sind hierbei

kurze, breitbandige akustische Reize, wie beispielsweise Klicklaute (transistorisch evozierte OAE, TEOAE), frequenzspezifische Reintöne (Stimulus-Frequenz OAE, SFOAE) oder zwei simultan applizierte Reintöne eines bestimmten Frequenzverhältnisses (Distorsionsprodukt OAE, DPOAE) (zur Übersicht siehe Probst et al., 1991). Im Folgenden wird auf die in dieser Studie verwendeten DPOAEs näher eingegangen. Um DPOAEs zu erzeugen, wird das Ohr mit zwei Reintönen ( $f_1$  und  $f_2$ ) unterschiedlicher Frequenz stimuliert, die oft auch als Primärtöne bezeichnet werden. Wie in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, ist es von Vorteil für die DPOAE-Generierung die Stimulusfrequenz  $f_2$  mit einem geringeren Pegel zu applizieren als  $f_1$  (z.B. Brown und Kemp, 1984; Probst et al., 1991; Kössl, 1992; Mills, 1997).

Wie in Abbildung 2 dargestellt, versetzen die beiden Primärtöne die Basilarmembran in Schwingung und lösen so Wanderwellen aus. In dem Überlappungsbereich der erzeugten Wanderwellen werden auf Grund der hochgradig nichtlinearen Arbeitsweise der ÄHZ Distorsionsprodukte gebildet. Ein Teil der entstandenen Schallenergie wird über die Mittelohrknöchelchen aus dem Ohr geleitet, während der verbleibende Teil nahe der Abbildungsstelle des  $f_2$ -Stimulus in apikaler Richtung weitere Wanderwellen auslöst (Brown und Kemp, 1984). Die retrograd zum Trommelfell geleitete Schallenergie ist mit einem sensitiven Mikrofon im Gehörgang messbar. DPOAEs können in zwei Klassen eingeteilt werden, kubische und quadratische DPOAEs, welche sich in ihren Generierungskomponenten unterscheiden. Kubische DPOAEs werden durch asymmetrische Komponenten der ÄHZ-Transferfunktion generiert und spiegeln die Funktionalität und den Verstärkungsgrad des kochleären Verstärkers wider (Mills et al., 1993). Ein Beispiel für eine kubische Emission ist die häufig untersuchte  $2f_1-f_2$  Emission (z. B. Dolan und Abbas, 1985; Hauser und Probst, 1991; Frank und Kössl, 1996). Die quadratischen Verzerrungen werden hingegen durch die symmetrischen Komponenten der Transferfunktion erzeugt und reagieren auf eine Verschiebung des Arbeitspunktes (Frank und Kössl, 1996). Ein Beispiel hierfür ist die auch als Differenzton bezeichnete und bislang weniger untersuchte  $f_2-f_1$  Emission. In der vorliegenden Studie liegt der Fokus auf der kubischen  $2f_1-f_2$  Emission, da der Differenzton auf Grund seiner geringeren Amplitude vor allem bei wachen Tieren häufig nicht aus dem Hintergrundrauschen heraustritt.

Die Erzeugung der DPOAE ist an die aktiven, nichtlinearen Verstärkungsprozesse der ÄHZ gebunden, was zur Folge hat, dass eine Beschädigung der ÄHZ und dem daraus resultierenden Ausfall des Verstärkungsmechanismus schwerwiegende Hörverminderungen verursachen kann. Eine solche Beschädigung kann beispielsweise durch starke Lärmbelastung hervorgerufen werden, aber auch durch zahlreiche Medikamente, die bei verstärkter Einnahme bzw. Verwendung einen Einfluss auf die ÄHZ nehmen (Probst und Hauser, 1990; Kemp, 2002).

### 1.2.1 OAE-Residuale

DPOAE-Messungen werden bisher weitestgehend als Werkzeug zur Analyse der Innenohrmechanik unter Zuhilfenahme möglichst einfacher Schallstimuli, wie beispielsweise Reintönen, verwendet. Innerhalb der natürlichen Umgebung bzw. im natürlichen Kommunikationsbereich kommen solche einfachen Schallstimuli allerdings nicht oft vor. Daher besteht großes Interesse daran die Abläufe im Innenohr bei Stimulation mit komplexeren Schallstimuli zu untersuchen und zu verstehen. Eine entsprechende Variante der DPOAE-Messung wurde im Jahr 1998 von Douglas Keefe vorgestellt. Er bezieht sich in seinem Paradigma auf OAE-Residuale, welche sich durch Subtraktion von am Trommelfell gemessenen akustischen Signalen sowie den Trommelfellantworten auf einzelne Komponenten dieser Signale definieren. Der grundlegende Gedanke dahinter ist, dass eine mögliche Residualschwingung entsteht, wenn die Innenohrverarbeitung der gleichzeitig vorliegenden Komponenten nichtlinear erfolgt. Mit der von Keefe entwickelten Methode, der sogenannten „double-evoked“ OAE-Messung (englisch für doppelt evoziert), werden in einem ersten Schritt zeitlich getrennte, gleiche Schallsignale unterschiedlichen Pegels präsentiert. Im folgenden Schritt erfolgt eine gemeinsame Präsentation der gleichen Schallsignale. Diese Messabfolge ermöglicht es OAE-Residuale zu messen, welche durch Veränderungen des Schallpegels eines beliebigen Schallsignals hervorgerufen werden (Keefe und Ling, 1998).

Es ist noch weitgehend ungeklärt, welche Art von zusätzlichen Signalkomponenten das Innenohr in Form von OAE-Residualen bei Reizung mit natürlichen, komplexen Schallsignalen erzeugt. Erste Ergebnisse von sprachevozierten OAEs am Menschen

zeigen allerdings deutlich stärkere efferente Effekte unter Verwendung natürlicher Sprachsilben als Stimuli, als unter Verwendung artifizieller Töne (ARO-Abstract: Keefe et al., 2009).

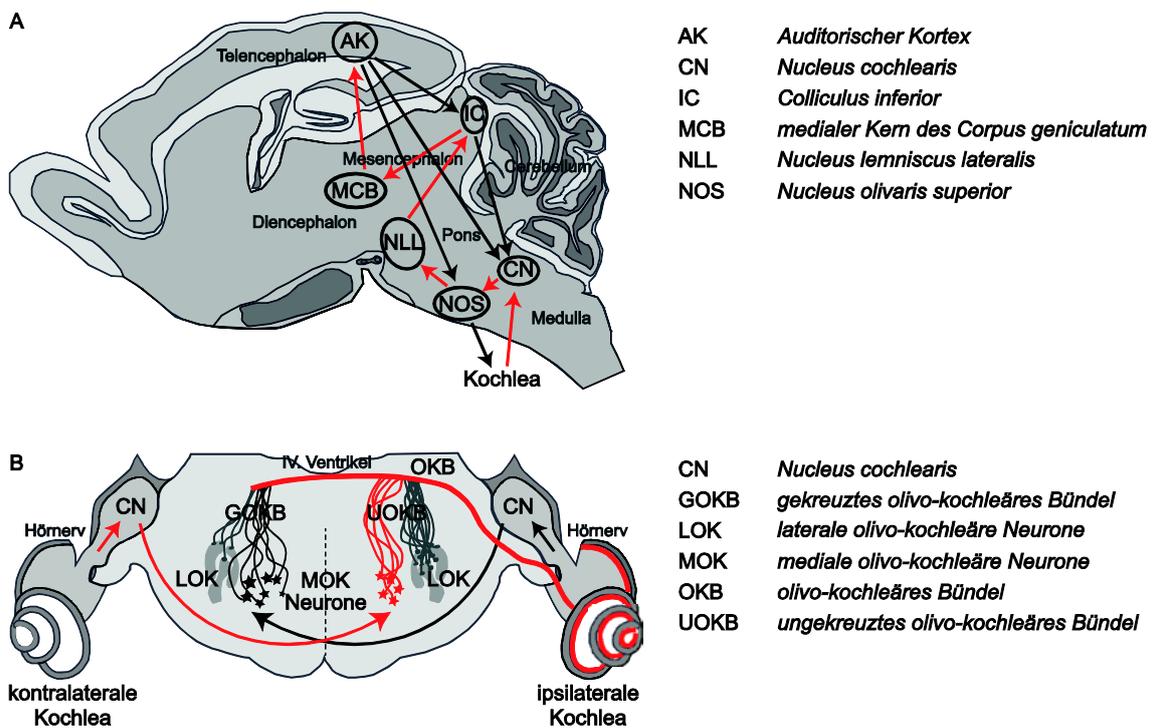
### 1.3 Die Hörbahn und das efferente System

Ankommende Schallsignale werden in der Cochlea über die beschriebene mechano-elektrische Signaltransduktion in elektrische Potentiale umgewandelt, die zu Transmitterausschüttungen an der IHZ führen und Aktionspotentiale in Hörnervfasern induzieren. Die Aktionspotentiale werden über verschiedene neuronale Kerngebiete bis hin zum auditorischen Kortex geleitet. Diese neuronale Signalkaskade, deren Hauptfunktion die Kodierung akustischer Informationen in neuronale Erregungsmuster ist, wird als aufsteigende Hörbahn bezeichnet (Abbildung 3A, rote Pfeile).

Die IHZ sind durch eine Vielzahl glutaminerger afferenter Typ I-Fasern des Hörnervs, deren Kerne im Spiralganglion liegen, innerviert. Die Neurone des Hörnervs projizieren als erste Schaltstation innerhalb des Stammhirns an den ipsilateralen *Nucleus cochlearis*. Folgend projiziert ein Großteil der involvierten Neurone in die kontralaterale Hemisphäre wo bereits komplexere Funktionen des akustischen Signals ausgewertet werden. Im *Nucleus olivaris superior* erfolgt ein interauraler Vergleich der auftretenden Zeit- und Intensitätsunterschiede beider Ohren. In den folgenden verarbeitenden Stationen der aufsteigenden Hörbahn, dem *Nucleus lemniscus lateralis* und dem *Colliculus inferior* werden zeitliche Schwankungen der akustischen Energien in den verschiedenen Frequenzbändern ausgewertet. Die Neurone des *Colliculus inferior* projizieren in die medialen Kerne des *Corpus geniculatum*, welche einen wichtigen Teil des Thalamus darstellen. Die Thalamus-Neurone projizieren letztendlich in den auditorischen Kortex. In der gesamten Hörbahn lässt sich eine tonotopische Organisation nachweisen, was bedeutet, dass benachbarte akustische Frequenzen zu Nerveneregerungen an benachbarten Orten im Gehirn führen (Neuweiler, 2003).

Zusätzlich zur aufsteigenden Schallverarbeitung von der Cochlea in den auditorischen Kortex ist die Hörbahn der Säugetiere auf allen beschriebenen Schaltstationen durch Rückkopplungsschleifen und efferente Nervenverbindungen gekennzeichnet, die man als absteigende Hörbahn zusammenfasst (Abbildung 3A,

schwarze Pfeile; Pickles, 1988). Beispielsweise kann der auditorische Kortex auf diese Weise direkten Einfluss auf den *Nucleus cochlearis* nehmen. Eine besondere Aufgabe in diesem Rückkopplungsprozess übernimmt die Verbindung zwischen dem Olivenkomplex und der Kochlea (Abbildung 3B).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Hörbahn und des olivokochleären Systems. **A:** Dargestellt ist ein sagittaler Hirnschnitt von *Carollia perspicillata*. Eingezeichnet sind die wichtigsten Stationen der Säugetierhörbahn in aufsteigender (Kochlea – auditorischer Kortex, rote Pfeile) und absteigender Richtung (auditorischer Kortex – Kochlea, schwarze Pfeile). **B:** Olivokochleäres System der Säuger, der Ursprung der Neurone des lateralen und medialen efferenten Systems im medialen oberen Olivenkomplex. Eingezeichnet ist der kontralaterale Übertragungsweg (rot) sowie der ipsilaterale Übertragungsweg (schwarz). Die Abbildung 3B wurde nach Guinan, 2006 verändert.

Über diese als olivo-kochleär bezeichnete Rückkopplungsschleife können die Haarsinneszellen im Innenohr eine direkte, massive, efferente Innervation erfahren (Rasmussen, 1946; zur Übersicht: Guinan, 1996; Russell und Lukashkin, 2008). Dadurch wird innerhalb des auditorischen Systems eine beträchtliche Modulation der Wahrnehmung ermöglicht, wie sie in keinem anderen Sinnessystem zu finden ist. Die Axone der im Stammhirn gelegenen Zellkörper der efferenten Neurone projizieren

zusammengefasst als olivo-kochleäres Bündel bis in die Kochlea. Ein Teil dieser Axone, das gekreuzte olivo-kochleäre Bündel, kreuzt in Höhe des vierten Ventrikels die Hemisphärgrenze im Gehirn und projiziert in die gegenüberliegende Kochlea. Die verbleibenden Axone erreichen die ipsilaterale Kochlea, weshalb sie als ungekreuztes olivo-kochleäres Bündel bezeichnet werden. Diese efferenten Neurone können anatomisch und funktionell in die medialen olivo-kochleären Efferenzen (MOK) und die lateralen olivo-kochleären Efferenzen (LOK) unterteilt werden. Wie sich aus der Bezeichnung schließen lässt, haben die MOK-Neurone ihren Ursprung im Bereich der medialen oberen Olive im Stammhirn. Sie haben dicke, myelinisierte Axone, welche nahezu ausschließlich Synapsen mit den ÄHZ ausbilden. Im Gegensatz dazu entspringen die LOK im Bereich der lateralen oberen Olive und sind durch dünnere, nicht-myelinisierte Axone charakterisiert, welche mit den afferenten Hörnervfasern Synapsen bilden.

Als Neurotransmitter wird dem efferenten System neben GABA (g-Aminobuttersäure) als inhibitorischen Transmitter an den MOK-Synapsen der ÄHZ maßgebliche Acetylcholin (ACh) zugeschrieben. Ashmore konnte im Jahr 2002 belegen, dass ACh an ACh- $\alpha 9/\alpha 10$ -Rezeptoren der ÄHZ-Synapsen bindet. In weiteren Studien stellte sich heraus, dass die Aktivierung dieses Rezeptors auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgt (Sridhar et al., 1997; Cooper und Guinan, 2003). Zum einen liegt eine schnelle Aktivierung innerhalb von 50-100 ms vor, welche auf eine Kalziumbedingte Hyperpolarisation der Zelle zurückzuführen ist (Oliver et al., 2000). Zum anderen wurde eine langsame Aktivierung mit einer Zeitkonstante von 25-50 s beschrieben, welche von einer Verwendung von Kalzium als sekundärem Botenstoff ausgeht (Sridhar et al., 1995). In der Literatur hat sich die Annahme etabliert, dass die Aufgabe des efferenten Systems in der Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (Dolan und Nuttall, 1988; Kawase et al., 1993), der Vergrößerung des Dynamikbereichs bei der Intensitätskodierung (Geisler, 1974), der Kontrolle des kochleären Verstärkers (Mountain, 1980; Siegel und Kim, 1982), der selektiven Aufmerksamkeit (Maison et al., 2001) sowie dem Schutz der Kochlea vor lautem Schall (Rajan, 1990; Xie und Henson, 1998) besteht. Zur Untersuchung der Funktion der Efferenzen wird das olivo-kochleäre System unter experimentellen Bedingungen häufig durch Beschallung des kontralateralen Ohrs aktiviert. Dieses Verfahren wird als kontralaterale akustische

Stimulation (KAS) bezeichnet (Guinan, 2006). Es findet auch in zwei der in dieser Studie behandelten Teilprojekte Verwendung.

## 1.4 Die Rolle von Fledermäusen in der Hörforschung

Die Ordnung der Fledertiere (Chiroptera), zu denen die Flughunde sowie die Fledermäuse gezählt werden, bildet die einzige Gruppe von aktiv flugfähigen Säugetieren und neben den Vögeln auch die einzige aktiv flugfähige Wirbeltiergruppe. Während allerdings nachtaktive Vogelgruppen bei vollständiger Dunkelheit das Fliegen einstellen oder vermehrt gegen Hindernisse fliegen, erweisen sich Fledertiere auch dann als geschickte Flieger.

Um diese Anforderungen zu erfüllen, verwenden die meisten Fledertiere zur Orientierung nicht das visuelle, sondern das auditorische System. Sie haben spezielle Mechanismen entwickelt, um sich mittels Aussendung von Ultraschallsignalen und der Analyse der wiederkehrenden Echos zu orientieren. Durch die evolutive Entwicklung extremer Gehörleistungen sind vor allem Fledermäuse schon seit den 50er Jahren ein beliebter Modellorganismus innerhalb der Hörforschung.

### 1.4.1 Grundsätzliche Strategien der Echoortung

Fledertiere haben artspezifische Echoortungsstrategien entwickelt, bei denen drei Typen von Ortungslauten („Klick-Ortung“, „CF/FM-Ortung“ und „FM-Ortung“) angewendet werden (Neuweiler, 2000; Ulanovsky und Moss, 2008). Der einzige echoortende Vertreter der Flughunde (*Rousettus aegyptiacus*, Pteropodidae) sowie einige Fledermausarten (z. B. Megadermatiden) werden auf Grund der Verwendung von kurzen etwa 1 ms langen Rufen, welche auf Grund der vielen beinhalteten Harmonischen einem breitbandigen „Klick“ ähneln, auch als Breitbandorter bzw. Breitbandfledermäuse bezeichnet (Neuweiler, 2000). Im Gegensatz hierzu stehen die sogenannten Schmalbandfledermäuse (z.B. Mormoopiden), welche zur Orientierung eine Kombination aus einem Signal mit konstanter Frequenz (englisch: *constant frequency*; CF) und einem frequenzmodulierten (englisch: *frequency modulated*; FM) Signal verwenden. Schmalbandfledermäuse sind in der Lage durch eine präzise

Frequenz- und Amplitudenanalyse der zurückkommenden Echos kleinste Frequenzmodulationen von wenigen 100 Hertz zu detektieren. Diese enorme Gehörleistung wird oftmals durch eine kochleäre Spezialisierung, bei der der für die Orientierung wichtige CF-Frequenzbereich auf der Basilarmembran überrepräsentiert wird, verwirklicht (Schuller und Pollak, 1979; Hoppe et al., 1982; Neuweiler, 2000; Vater et al., 2003). Trotz der enormen Effektivität der Ortung mit konstantfrequenten Elementen ist der am häufigsten verwendete Signaltyp bei insektivoren und frugivoren Fledermäusen die FM-Ortung (O'Neill, 1995). Bei diesem Ortungsverfahren werden etwa 1 bis 5 ms lange Signale ausgesendet, deren Frequenz meist abwärts gerichtet moduliert wird. Während der Ortung werden von der Fledermaus etwa 10 solcher Rufe pro Sekunde erzeugt. Bei Annäherung an eine Beute kann die Repetitionsrate jedoch zur besseren Ortung um bis zu 100 Laute pro Sekunde erhöht werden. Dieses Phänomen wird als finaler „Buzz“ bezeichnet und kommt nicht nur bei der FM-Ortung vor, sondern findet auch in der finalen Jagdphase der CF/FM-ortenden Tiere Anwendung.

#### **1.4.2 *Carollia perspicillata* als Modellorganismus**

Die Brillenblatt Nase (*Carollia perspicillata*) ist ein frugivorer Vertreter der Familie der Phyllostomidae und ist in Süd- und Mittelamerika beheimatet (Koay et al., 2003). Auch wenn sie auf Grund ihrer frugivoren Ernährungsweise zur Detektion ihrer Nahrungsquellen in erster Linie ihren olfaktorischen Sinn verwendet (Thies et al., 1998), verlässt sie sich bei der gezielten Annäherung an die Nahrung ausschließlich auf die Echoortung und ihr auditorisches System. Die Echoortungsrufe, welche im Kehlkopf erzeugt und über die Nasenlöcher ausgesendet werden (Hartley und Suthers, 1987), bestehen aus kurzen frequenzmodulierten Signalen mit mehreren Harmonischen (Koay et al., 2003). Derartige FM-Signale haben eine geringere Reichweite als CF-Komponenten. Der Ruf liefert jedoch ein zeitlich präzises Echo, welches zur genauen Lokalisierung und Oberflächenanalyse von Objekten geeignet ist. In der Regel besteht der Echoortungsruf von *C. perspicillata* aus vier Harmonischen. Die Zentrumsfrequenz des Grundtones liegt bei dieser Spezies bei 33 kHz, die Harmonischen sind jeweils ganzzahlige Vielfache dieser Grundfrequenz und umfassen insgesamt einen Frequenzbereich von 59 bis 117 kHz (Sterbing, 2002). Der höchste Energiegehalt steckt in der zweiten und dritten Harmonischen, die einen Pegel von 70 bis 80 dB SPL

erreichen (Griffin und Novick, 1955). Auf Grund dieser geringen Rufintensität wird *C. perspicillata* auch den „whispering bats“, also den flüsternden Fledermäusen, zugeordnet. Bis heute wurden die Echoortungsrufe verschiedener Fledermausspezies, darunter auch *C. perspicillata* detailliert beschrieben (Mogdans und Schnitzler, 1990; Sterbing, 2002; Thies et al., 1998; Vater et al., 2003). Die Kommunikationsrufe und ihre Rolle in der sozialen Struktur der Tiere sind bei *C. perspicillata* jedoch kaum erforscht. Allgemein lässt sich sagen, dass Kommunikation bei Fledermäusen sowohl intraspezifische (Pfalzer und Kusch, 2003) als auch interspezifische Anwendung findet (Russ et al., 2004), welche allerdings von Art zu Art stark variiert. Innerhalb der vorliegenden Studie wurde die Fledermausspezies *C. perspicillata* herangezogen, um Fragen bezüglich der genaueren Funktionsweise der Innenohrmechanik zu erforschen. Vor allem der breite Hörbereich macht *C. perspicillata* zu einem hervorragenden Versuchstier.

## 2 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in vier Teilprojekte (I-IV), welche sich alle auf die Untersuchung der Innenohrmechanik der Fledermausspezies *C. perspicillata* beziehen. Der Fokus liegt auf den ersten beiden Projekten, die sich mit der Beeinflussung der  $2f_1$ - $f_2$  Emission durch Aktivierung des efferenten Systems mittels KAS durch unterschiedliche artifizielle und arteigene Laute befassen. In beiden Projekten bezieht sich der Begriff „ipsilateral“ immer auf die jeweilige Seite, auf der die DPOAE-Messung stattfand, wohingegen sich „kontralateral“ auf das gegenüberliegende Ohr bezieht. In Teilprojekt I wurden DPOAE-Wachstumsfunktionen mit und ohne KAS bei verschiedenen Frequenzen gemessen. Im Falle der KAS wurde der jeweilige  $f_2$ -Stimulus während der gesamten Messungen mit einem konstanten Pegel appliziert. In Teilprojekt II wurde der Zeitverlauf der durch KAS verursachten Effekte untersucht. Hierfür wurde in ein kontinuierliches Stimulationsparadigma von 3 s eine 1-sekündige KAS eingebettet. Im Rahmen dieser beiden Studien wurden an insgesamt 10 Fledermäusen der Spezies *Carollia perspicillata* (Brillenblattnase, Carollinae, Phyllostomidae, Chiroptera) aus der institutseigenen Zucht akustische Messungen durchgeführt. In Teilprojekt III wurden an einem weiteren Tier histologische Schnittserien beider Kochleae erstellt. Angefertigt wurden Sagittalschnitte sowie Horizontalschnitte, die mit einer Thiocholinmethode zum Nachweis von Acetylcholinesterase (ACh-Esterase) nach Hardy und seinen Kollegen (1976) behandelt wurden, um den Verlauf der efferenten Fasern innerhalb der Kochlea zu verdeutlichen. In dem letzten Teilprojekt IV wurden Paradigmen zur Messung von OAE-Residualen erforscht. Hierbei wurde die Möglichkeit untersucht, komplexe Stimuli anstelle der sinuidalen Primärtöne bei der Messung von DPOAE zu verwenden.

### 2.1 Messungen zur Untersuchung des Einflusses von KAS auf DPOAE

Alle Versuche der ersten beiden Teilprojekte wurden an adulten Tieren unterschiedlicher Geschlechter mit einem Gewicht zwischen 19 und 25 g gemessen. Bei sechs Tieren war es möglich die verschiedenen Untersuchungen auch im wachen Zustand durchzuführen. Die Tiere wurden langsam innerhalb mehrerer Wochen auf die

jeweiligen Wachmessungen vorbereitet. Hierfür wurden die Fledermäuse mit einem minimalen Abstand von sieben Tagen leicht narkotisiert in die Versuchsapparatur eingespannt. Der zeitliche Abstand war nötig, um mögliche Nachwirkungen der verwendeten Narkose zu vermeiden. Während der Aufwachphase wurden über die Lautsprecher verschiedene Töne appliziert, um die Tiere an die Apparatur sowie den Ablauf der Messung zu gewöhnen. Erst wenn die Fledermäuse ihre Bewegung in der Versuchsapparatur auch im wachen Zustand auf ein Minimum beschränkt hatten, war es möglich, die verwendeten akustischen Koppler direkt vor dem Trommelfell zu positionieren und stabile, weitgehend störungsfreie Messungen zu erhalten.

### **2.1.1 Anästhesie**

Um mögliche narkosebedingte Einflüsse auf die akustischen Messungen zu untersuchen, wurden alle Versuche auch an narkotisierten Tieren durchgeführt. Es wurde eine Mischung aus 0,005 mg/g Körpergewicht Ketamin (Ketavet®, Pfitzer GmbH, Berlin, Deutschland) und 0,035 mg/g Körpergewicht Xylazin-hydrochlorid (Rompun® 2% Lösung, Bayer HealthCare AG, Mohnheim, Deutschland) subkutan in die Nackenfalte gespritzt. Um die Narkosewirkung zu kontrollieren, wurde etwa 1 Min nach der Injektion der Rückzugsreflex des Fußes durch leichtes Drücken überprüft. Die verwendete Narkose hatte eine Wirkungsdauer von etwa 120 Min.

### **2.1.2 Kontralaterale akustische Stimuli**

Für die KAS wurden während der Versuche vier verschiedene Stimuli verwendet (siehe Abbildung 4). Als artifizieller Laut wurde ein Breitbandrauschen (BBR) mit einer Zentrumsfrequenz von  $47,5 \text{ kHz} \pm 1 \text{ Oktave}$  verwendet. Das BBR wurde so gewählt, dass es den Großteil des während den Messungen untersuchten Frequenzbereichs abdeckt (23,75 bis 95 kHz). Als arteigene Laute wurden ein Kommunikationsruf (KR), ein Echoortungsruf (EOR) und eine Ruf-Echo-Sequenz (RES) verwendet, welche zuvor mittels eines ultraschallfähigen Avisoft Kondensatormikrophons (CM16/CPMA, Avisoft Bioakustik, Berlin, Deutschland) aufgenommen wurden.

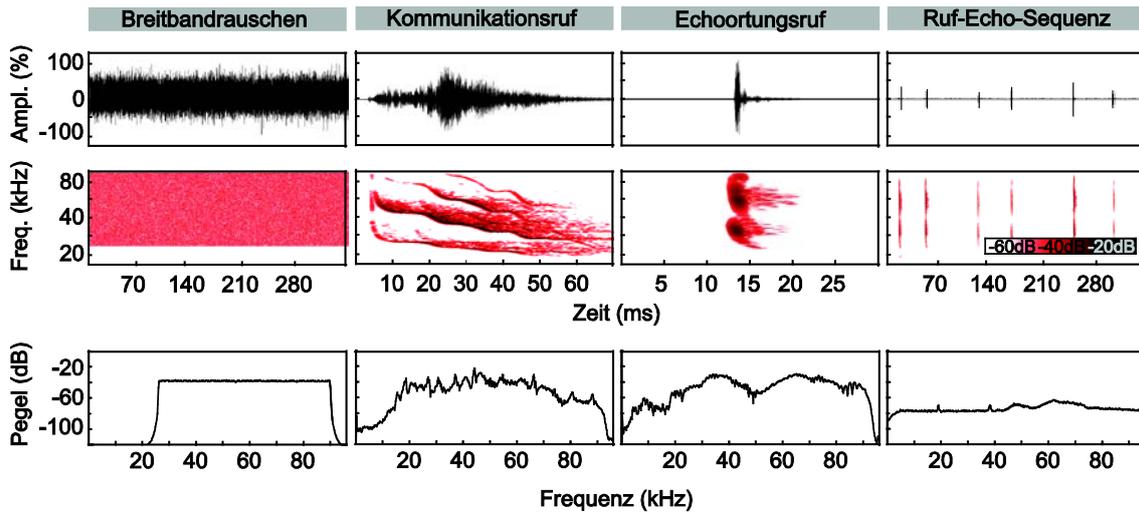


Abbildung 4: Darstellung der kontralateral verwendeten Stimuli. Dargestellt sind ein artifizielles Breitbandrauschen (BBR) sowie drei arteigene Rufe der Fledermausspezies *Carollia perspicillata* (Kommunikationsruf (KR), Echoortungsruf (EOR), Ruf-Echo-Sequenz (RES)). Ampl. (%) entspricht der durch die Soundkarte erfassbaren Maximalamplitude.

### 2.1.3 Versuchsaufbau

Das Versuchstier sowie die für die Stimulation und Aufnahme notwendigen Lautsprecher und Mikrofone befanden sich in einer elektrisch abgeschirmten, schallisolierten Kammer, die auf ca. 37°C erwärmt wurde. Alle weiteren Geräte sowie der Experimentator befanden sich außerhalb dieser Kammer (siehe Abbildung 5).

Sämtliche für die Messung benötigten akustischen Stimuli wurden in einem in MATLAB (MATLAB 2007b, MathWorks Inc., Ismaning, Deutschland) selbstgeschriebenen Programm (Prof. Dr. M. Kössl) generiert und über einen Computer (ThinkPad W530, Lenovo, Raleigh, USA) an eine Soundkarte (Fireface UC, RME Audio AG, Haimhausen, Deutschland) übermittelt. Die Stimuli wurden im Anschluss durch zwei selbstgebaute Verstärker erst vierfach und dann zehnfach verstärkt. Die für die Messung benötigten Kondensatorlautsprecher innerhalb der schallisolierten Kammer, die direkt mit dem 10x-Verstärker verbunden waren, konnten auf Grund dieser Verstärkungskette mit  $\pm 100$  V betrieben werden. Der Endverstärker produzierte außerdem noch +200 V Gleichspannung zur Polarisierung und Versteifung der Lautsprechermembranen. Für die Messung wurden drei Kondensatorlautsprecher ( $1/2''$ , MTG MK202, Microtech Gefell GmbH, Gefell, Deutschland) verwendet.

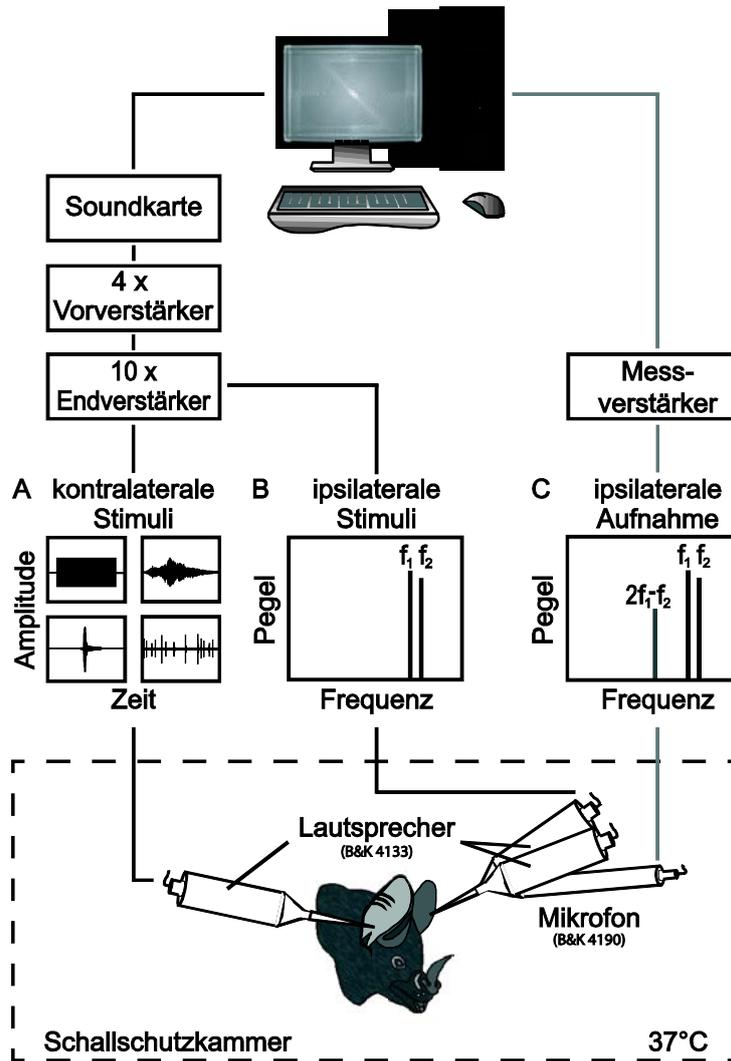


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. A: Kontralateral verwendete Stimuli (Breitbandrauschen (BBR), Kommunikationsruf (KR), Echoortungsruf (EOR), Ruf-Echo-Sequenz (RES)). B: Ipsilateral applizierte Reintonstimuli ( $f_1$  und  $f_2$ ) zur Generierung der DPOAEs. C: Ipsilaterale Aufnahme der  $2f_1 - f_2$  Emission.

Zwei dieser Lautsprecher wurden zusammen mit einem Mikrofon ( $1/4''$ , B&K 4939, Brüel & Kjær, Nærum, Dänemark) über einen Mikromanipulator und einen aufgesteckten, selbstgebauten Dreiwegekoppler direkt vor dem Trommelfell des jeweiligen Versuchstieres platziert. Der dritte Lautsprecher wurde auf der kontralateralen Seite ebenfalls über einen Mikromanipulator und einen aufgesteckten, selbstgebauten Koppler vor das Trommelfell gesetzt. Die durch die Stimulierung

evozierten Emissionen wurden von dem sensitiven Mikrofon aufgenommen und über einen Mikrofonvorverstärker und Messverstärker (1/4“, 2610 B&K, Brüel & Kjær, Nærum, Dänemark) zurück an die Soundkarte und erneut an den Computer überführt. Um die Messungen zu ermöglichen, wurde das jeweilige Versuchstier in einem seiner Körpergröße entsprechenden Schaumstoffhalter gespannt, welcher die Mobilität der Tiere stark einschränkte. Da auch leichte Bewegungen des Kopfes zu Schädigungen des Trommelfells durch die Spitze des akustischen Kopplers führen könnten, wurde der Kopf der Tiere durch einen speziell angefertigten Maulhalter zusätzlich immobilisiert.

#### **2.1.4 Kriterium zur Bestimmung der natürlichen DPOAE-Pegelschwankungen**

Eine Schwierigkeit bei der Analyse der DPOAE-Wachstumsfunktionen ist die Variabilität der DPOAE-Pegel. Die ermittelten DPOAE-Pegel schwanken über die Dauer der einzelnen Messungen deutlich. Die DPOAE-Pegelschwankungen unter Narkoseeinfluss sind zwar geringer als im wachen Zustand aber trotzdem nicht zu vernachlässigen. Um abschätzen zu können bei welchen Werten ein Effekt vorliegt, der nicht durch natürliche Schwankungen hervorgerufen wurde, wurde im Vorfeld ein Kriterium ermittelt, welches die natürliche DPOAE-Pegelschwankungen der Tiere festlegt.

Hierzu wurden bei  $f_2$ -Frequenzen von 40 und 60 kHz mehrere DPOAE-Messungen mit konstanten Primärton-Pegeln ( $L_1 = 50$  dB SPL und  $L_2 = 40$  dB SPL) über eine Dauer von 1 Min durchgeführt (Abbildung 6). Die Einzelmessungen wurden gemittelt und jeweils  $\pm 2$  Standardabweichungen berechnet. Der ermittelte Bereich der Standardabweichungen lag bei 40 kHz bei  $\pm 4,5$  dB und bei 60 kHz bei  $\pm 5,4$  dB. Basierend auf diesen Werten wurde festgelegt, dass alle in dieser Studie erhobenen DPOAE-Pegelabsenkungen  $\leq 6$  dB nicht als KAS induzierte Effekte berücksichtigt werden, da es sich um natürliche Schwankungen handeln könnte.

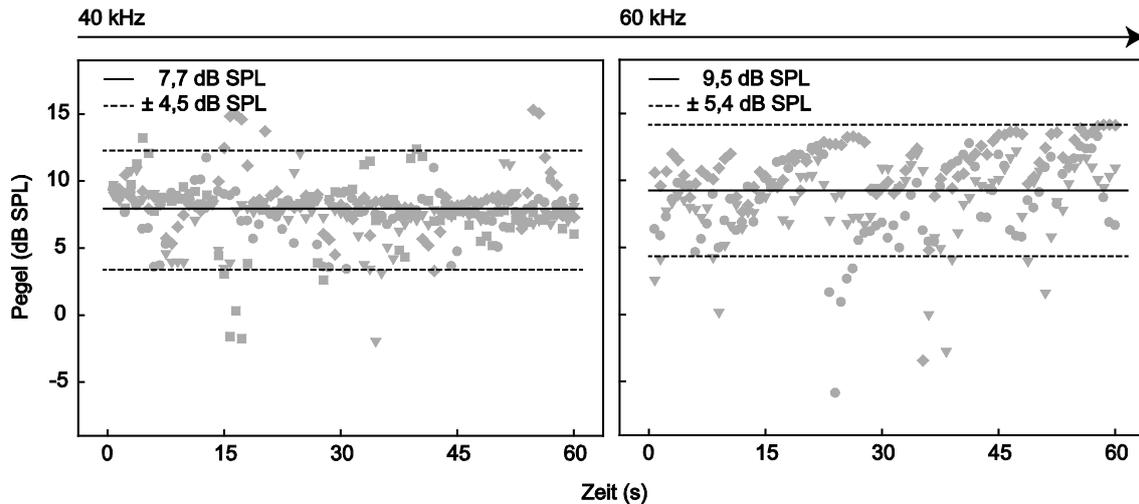


Abbildung 6: DPOAE-Messungen mit konstanten Primärton-Pegeln ( $L_1 = 50$  dB SPL und  $L_2 = 40$  dB SPL) über eine Dauer von 1 Min bei  $f_2$ -Frequenzen von 40 und 60 kHz. Dargestellt sind jeweils vier Einzelmessungen mit je 100 Mittlungen. Die durchgezogene schwarze Linie stellt den Mittelwert über alle Datensätze dar und die gestrichelten schwarzen Linien jeweils die zweifache Standardabweichungen.

### 2.1.5 Teilprojekt I: DPOAE Wachstumsfunktionen

Eine mögliche Beeinflussung der DPOAEs durch KAS wurde im ersten Versuchsparadigma durch die Erhebung von DPOAE-Wachstumsfunktionen mit und ohne KAS bei verschiedenen  $f_2$ -Frequenzen getestet. Hierzu wurden die Fledermäuse wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben in die Apparatur eingespannt. Vor jeder Messung wurde mit Hilfe eines Binokulars (280942, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) der Gehörgang der Versuchstiere auf eventuelle Verletzungen des Trommelfells oder eine Blockade des Gehörgangs untersucht, welche einen Einfluss auf die Hörfähigkeit der Tiere hätten haben können. Bei intakten Strukturen wurden verschiedene, aufeinander folgende Messschritte durchgeführt, um letztendlich die DPOAE-Wachstumsfunktionen zu ermitteln. Um optimale und vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden vor jedem Versuch das Mikrophon sowie die Lautsprecher im Gehörgang der ipsilateralen Seite kalibriert. Im Anschluss erfolgten mehrere Kontrollmessungen, um sicher zu stellen, dass die Versuchstiere eine  $2f_1$ - $f_2$  Emission ausbilden und diese bei wiederholten Messungen eine vergleichbare Amplitude aufweist. Hierfür wurden die Primärtonpegel ( $L_1 = 50$  dB SPL und  $L_2 = 40$  dB SPL) sowie ein  $f_2/f_1$  Frequenzverhältnis von 1,23 festgelegt. Die Frequenz von  $f_2$

wurde in 5 kHz Schritten über einen Frequenzbereich von 20 bis 90 kHz variiert. Wenn die ermittelten Emissionsamplituden nicht den vorherigen Messungen entsprachen, wurde die Position des Kopplers so lange korrigiert bis eine vergleichbare Messung garantiert werden konnte.

Daraufhin wurde das für die DPOAE-Wachstumsfunktionen optimale Frequenzverhältnis  $f_2/f_1$  ermittelt. Erneut wurden die Primärtonpegel ( $L_1 = 50$  dB SPL und  $L_2 = 40$  dB SPL) und diesmal die jeweilige  $f_2$ -Frequenz (20 bis 90 kHz) als konstante Parameter festgelegt, während die  $f_1$  Frequenz schrittweise durch Erhöhung des Frequenzverhältnisses (von 1,01 bis 1,37 in Schritten von 0,2) verändert wurde. Auf diese Weise wurde ermittelt, welches Frequenzverhältnis die höchsten Amplituden der  $2f_1-f_2$  Emission hervorruft und sich so als optimal für die weiteren Messschritte erwies. Anders als bei DPOAE-Messungen bei Menschen, wo in der Regel ein konstantes Frequenzverhältnis von 1,22 angewendet wird (Harris et al., 1989), ist es bei der Fledermausart *C. perspicillata* ratsam das Frequenzverhältnis vor jeder Messung neu zu bestimmen. Wie vorherige Studien gezeigt haben, variiert das optimale Frequenzverhältnis vor allem zwischen Messungen mit und ohne Narkoseeinfluss beträchtlich (Schlenter et al., 2012).

Für die eigentliche Messung der DPOAE-Wachstumsfunktionen konnten nun, auf Grund des ermittelten optimalen Frequenzverhältnisses, die beiden Primärtonfrequenzen als konstante Parameter verwendet werden. Die Pegel der beiden Primärtöne wurden in 16 Schritten von  $L_1 = 0$  dB SPL und  $L_2 = -10$  dB SPL jeweils um 5 dB SPL erhöht. Die im Gehörgang aufgenommenen DPOAEs (Dauer: 42,7 ms) wurden hundertfach gemittelt und ihre spektrale Zusammensetzung über eine Fourier Transformation (FFT) analysiert. Die Messungen wurden jeweils ohne zeitgleiche KAS, im Folgenden als Kontrollmessung bezeichnet, sowie mit zeitgleicher KAS durchgeführt. Die kontralateralen Stimuli hatten während der Messung einen Maximalpegel von 50 dB SPL.

Für die weitere Analyse wurden zwei  $L_2$ -Pegelwerte, im Folgenden als  $L_2$ -Schwellen bezeichnet, bei 40 sowie 60 dB SPL festgelegt, an deren Positionen der erreichte  $2f_1-f_2$  Emissionspegel abgelesen wurde. Um zu ermitteln, welchen Einfluss die jeweilige KAS auf den Pegel der  $2f_1-f_2$  Emission hat, wurde die Differenz der Schwellenwerte mit und

ohne KAS gebildet. Die Differenzwerte wurden für alle Messungen im wachen Zustand sowie für alle Messungen unter Narkoseeinfluss gemittelt.

Die ermittelten Pegeldifferenzen wurden für die weitere statistische Analyse herangezogen. Da die Datenmenge zu gering war, um einen Test auf Normalverteilung durchzuführen, wurde alternativ der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummen-Test verwendet. Hier wird die Gleichheit der zentralen Tendenzen der zugrundeliegenden Grundgesamtheiten anhand zweier gepaarter Stichproben überprüft (\*p < 0,05).

### **2.1.6 Teilprojekt II: Zeitverlauf efferenter Effekte**

Im zweiten Versuchsparadigma lag der Fokus auf dem Zeitverlauf der durch KAS verursachten Effekte. Hierfür wurde eine KAS von 1 s in ein kontinuierliches Stimulationsparadigma von 3 s eingebettet. Die Vorarbeiten für Teilprojekt II sind mit denen in Abschnitt 2.1.5 beschriebenen Schritten identisch. Sobald das optimale Frequenzverhältnis und damit die Primärtonfrequenzen festgelegt waren, wurden zur Evozierung der  $2f_1-f_2$  Emission im ipsilateralen Ohr zwei pegelkonstante Stimuli ( $L_1 = 50$  dB SPL,  $L_2 = 40$  dB SPL) mit einer Dauer von 3 s (An- und Abstiegszeit 0,01 s) appliziert. Auf der kontralateralen Seite setzte mit 1 s Verzögerung eine 1-sekündige akustische Stimulation jeweils mit einem der in 2.1.2 beschriebenen Stimuli ein. Dieses Paradigma wurde bei verschiedenen KAS-Pegeln von 40 bis 70 dB SPL getestet.

Für die erste Analyse wurden die DPOAE-Pegel während der jeweiligen Versuchsabschnitte (1. Sekunde ohne KAS, 2. Sekunde mit KAS, 3. Sekunde ohne KAS) gemittelt und die Differenz zur Basis (1. Sekunde ohne KAS) gebildet (Abbildung 6A). Um eine höhere zeitliche Auflösung zu erreichen, wurden dann die einzelnen Datensätze in 250 ms lange Intervalle unterteilt und gemittelt. Für diese Teildatensätze wurde erneut die Differenz zur Basis gebildet (Abbildung 6B).

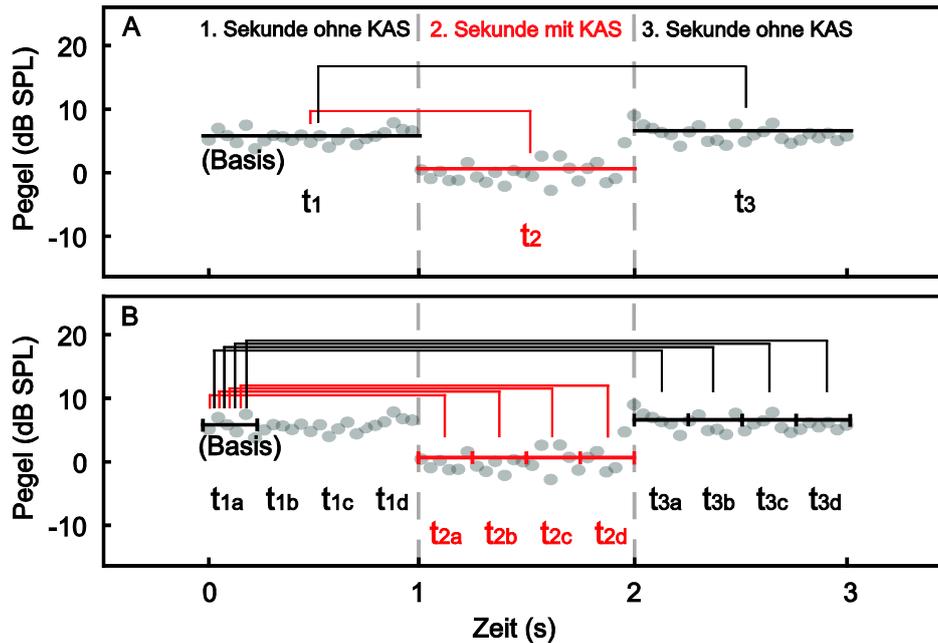


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Differenzbildung in Versuchsparadigma II. A: Mittelung und Differenzbildung der gesamten Versuchsabschnitte. B: Mittelung und Differenzbildung der einzelnen Kompartimente der Versuchsabschnitte (je 250 ms).

Die so ermittelten DPOAE-Pegeldifferenzen wurden zur weiteren statistischen Analyse verwendet. Wie bereits in Kapitel 2.1.5 beschrieben, war auch hier die Datenmenge zu gering, um einen Test auf Normalverteilung durchzuführen. Daher wurde ebenfalls der nichtparametrische Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt (\* $p < 0,05$ ).

## 2.2 Histologie

Das efferente System verschiedener Säuger weist eine große Diversität auf (z.B. Katze: Liberman und Brown, 1986; Meerschweinchen: Brown, 1987a; Ratte: Dannhof und Bruns 1993). Um einen Überblick über den Verlauf der efferenten Fasern innerhalb der Cochlea von *Carollia perspicillata* zu erlangen, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden beide Cochleae eines perfundierten Tieres heraus präpariert, fixiert und mit einem Kryotom geschnitten (Schnittdicke: 45  $\mu\text{m}$ ). Die Schnittserien wurden mit der Thiocholinmethode zum Nachweis von Acetylcholinesterasen (ACh-Esterase) behandelt und analysiert.

### **2.2.1 Perfusion**

Die histologischen Untersuchungen fanden an zwei heraus präparierten Kochleae statt. Um die Präparation durchführen zu können, wurde der Fledermaus in einem ersten Schritt eine letale Narkosedosis von 0,15 ml einer 1:10 Verdünnung von Pentobarbital (Narcoren©, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) und NaCl verabreicht. Nach Überprüfung der Narkosewirkung wurde das Tier fixiert und der Thorax geöffnet, so dass das Herz frei zugänglich war. In den rechten Vorhof konnte im Anschluss eine Kanüle eingeführt werden, über die mit Hilfe eines Schlauchpumpensystems die Perfusion erfolgte. In einem ersten Schritt wurde für eine Dauer von 5 Min mit einer Durchflussrate von 3,5 ml/Min, eine Spüllösung (0,9 g NaCl; 100 ml ddH<sub>2</sub>O) appliziert. Damit das gesamte Organsystem durchgespült wird, aber kein zu hoher Druck entsteht, wurde nach Anschalten der Schlauchpumpe ein kleiner Schnitt in den linken Ventrikel getätigt, über den das Blut sowie die durchgeflossene Spüllösung austreten konnten. In einem zweiten Schritt wurde das Organsystem für 30 Min mit einem Fixativ (80 ml 4% PFA, 120 ml ddH<sub>2</sub>O) durchspült. Das Fixativ denaturiert und vernetzt zelluläre Proteine und konserviert die Zellstruktur.

Im Anschluss an die Perfusion wurden die Kochleae auf beiden Seiten heraus präpariert und für 12 Stunden bei 4 °C in der bereits zuvor verwendeten PFA-Lösung nachfixiert. Im Folgenden wurden die Kochleae für fünf Tage in 7,5%iger EDTA-Lösung bei 4 °C entkalkt. Danach wurden die Kochleae in Gelatine eingebettet und anschließend gefriergeschnitten. Aus der einen Kochlea wurden 45 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt und aus der zweiten Kochlea wurden 45 µm dicke Horizontalschnitte angefertigt.

### **2.2.2 Thiocholinmethode zum Nachweis von Acetylcholinesterasen**

Die angefertigten Schnittserien wurden mit der Thiocholinmethode zum Nachweis von ACh-Esterase behandelt. Die Rezeptur des Inkubationsmediums geht ursprünglich auf Georg Koelle und Jonas Friedewald (1949) zurück und wurde in den folgenden Jahren von Morris Karnovsky und Logan Roots (1964) sowie Hay Hardy und Kollegen (1976) modifiziert. Bei dieser Färbung wird die Lokalisation des Enzyms ACh-Esterase im Gewebe ermittelt. Da der maßgebliche Transmitter des efferenten Systems ACh ist,

konnte so eine gezielte Anfärbung der efferenten Fasern ermöglicht werden. Die Schnittserien wurden in einem ersten Schritt zweimal gründlich in einem 0,1 M Acetatpuffer mit einem pH Wert von 6,0 (Tabelle 1 A) gewaschen. Im Anschluss daran wurden sie bei Raumtemperatur für 35 Min in der Inkubationslösung (Tabelle 1 B) geschüttelt (80 Rüttlungen pro Minute). Dann wurden die Schnitte erneut fünf Mal für jeweils 10 s im 0,1 M Acetatpuffer gewaschen. Darauf folgten fünf 10-sekündige Spülungen in 0,1 M Natriumnitrat (0,85 g NaNO<sub>3</sub>; 100 ml ddH<sub>2</sub>O), eine Spülung mit 0,1%iger Silbernitrat-Lösung (0,1 g AgNO<sub>3</sub>; 100 ml ddH<sub>2</sub>O) für 1 Min unter starker Bewegung, sowie erneut fünf 10-sekündige Spülungen in 0,1 M Natriumnitrat.

**Tabelle 1: Mischungsverhältnis des während des ACh-Esterase-Färbeprotokolls verwendeten Acetatpuffers (A) und der Inkubationslösung (B).**

A

<b>Acetatpuffer (0,1 M)</b>	
90 ml	ddH <sub>2</sub> O
0,82 g	Natriumacetat
0,1 M	Essigsäure

(Lösung mit Essigsäure auffüllen, bis ein pH Wert von 6,0 eingestellt ist)

B

<b>Inkubationslösung</b>	
200 ml	ddH <sub>2</sub> O
1,77 g	Natriumacetat
0,098 g	Acetylthiocholiniodid
0,29 g	Natriumcitrat x 2H <sub>2</sub> O
0,096 g	Kupfersulfat (wasserfrei)
0,013 g	Kaliumferricyanid

Im Anschluss an die ACh-Esterase-Färbung wurden die Schnittserien einer Gegenfärbung mit Neutralrot unterzogen. Hierzu wurden die Schnitte in einem ersten Schritt für 30 Min in 70%iges Ethanol gelegt und im Anschluss für etwa 5 Min mit doppelt demineralisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gespült. Darauf folgend wurden sie für 3 Min unter leichter Bewegung in eine Neutralrot-Färbelösung gelegt. Nach erneutem kurzem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O folgte eine Ethanolspülung mit ansteigenden Konzentrationen (je 3 Min: 70% C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, 2 x 96% C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), sowie zwei Spülvorgänge über jeweils 5 Min mit 100%igem Isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O). Abschließend folgten drei Reinigungen und Auswaschungen der Schnittserien mit Roti-Histol für je 5 Min.

## 2.3 Messung von OAE-Residualen

In einem weiteren Teilprojekt dieser Studie wurden Messungen zur Untersuchung von OAE-Residualen durchgeführt. Als Versuchsansatz diente vorrangig ein Messparadigma, welches im Jahr 1998 von Douglas Keefe entwickelt wurde (Abbildung 8). Der Versuchsaufbau entsprach dem der herkömmlichen DPOAE-Messungen (Abbildung 5). Verwendet wurden zwei Lautsprecher sowie ein sensitives Mikrofon, welche über einen Koppler vor dem Trommelfell des jeweiligen Versuchstiers positioniert wurden. Die Versuche wurden zunächst mit einer Stimulation aus Reintönen und später auch mit arteigenen Lauten durchgeführt, wobei das verwendete Grundparadigma identisch war.

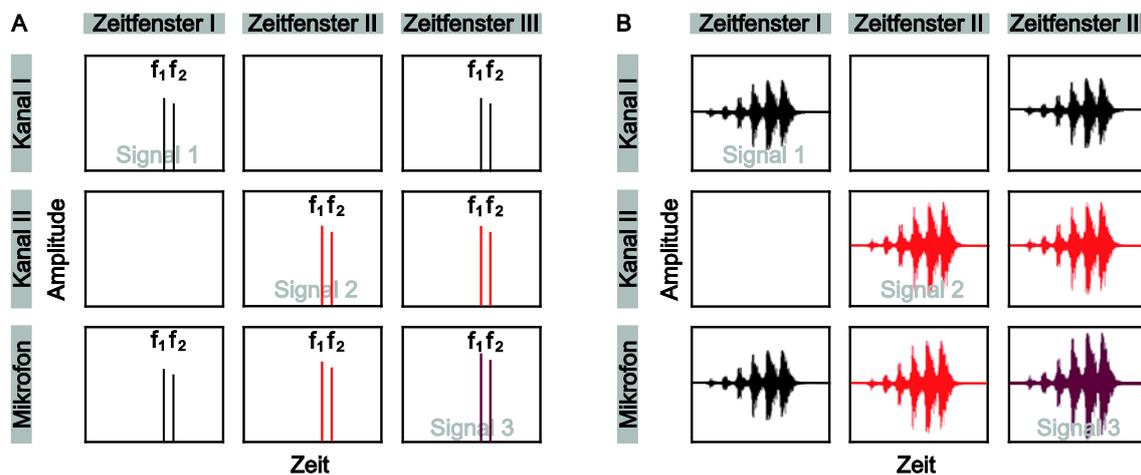


Abbildung 8: Versuchsparadigma zur Messung von OAE-Residualen unter Stimulation mit Reintönen (A) und komplexen Stimuli (B). Zur Erläuterung siehe Text.

OAE-Residuale werden gemessen, indem ein beliebiger akustischer Stimulus über einen der Lautsprecher (Kanal I) auf das Trommelfell appliziert wird. Zeitlich versetzt wird der gleiche Stimulus mit einem um 5 dB höheren Pegel über den zweiten Lautsprecher (Kanal II) abgegeben. In einem dritten Zeitfenster werden die beiden zuvor applizierten Stimuli zeitgleich über die jeweiligen Lautsprecherkanäle abgegeben. Aus den mit dem Mikrofon aufgenommenen Schallereignissen kann nun das OAE-Residual berechnet werden. Hierfür wird die Formel:  $R = \text{Signal 3} - (\text{Signal 1} + \text{Signal 2})$  verwendet. Würde es sich beim Innenohr um ein völlig linear

arbeitendes System handeln, welches keinerlei otoakustische Emissionen erzeugt, ergäbe das OAE-Residual (R) Null.

### **2.3.1 Messung von OAE-Residualen unter Verwendung von Reintönen**

Für die Bewertung des OAE-Residual-Versuchsparadigmas wurde in den ersten Messreihen eine Zweiton-Reizung (Abbildung 8A) verwendet, um die Vergleichbarkeit mit herkömmlichen DPOAE-Messungen zu ermitteln. Es wurden zuerst konventionelle DPOAE-Wachstumsfunktionen ermittelt (siehe 2.1.5) und im Anschluss daran die OAE-Residual-Messungen durchgeführt. Hierzu wurden in jedem Zeitfenster jeweils zwei Reintöne ( $f_1$  und  $f_2$ ) unterschiedlicher Frequenzen mit einem zuvor festgelegten optimalen Frequenzabstand appliziert. Durch schrittweise Erhöhung des Pegels von Signal 1 bei konstanter Pegeldifferenz zu Signal 2 wurden Residual-Wachstumsfunktionen ermittelt. Diese wurden bei jedem Versuchstier jeweils für  $f_2$ -Frequenzen von 20, 40, 60 und 80 kHz erstellt. Die Abfolge der Einzelmessungen bei den unterschiedlichen  $f_2$ -Frequenzen erfolgte randomisiert.

### **2.3.2 Messung von OAE-Residualen unter Verwendung natürlicher Stimuli**

Das eigentliche Ziel des OAE-Residual-Versuchsparadigmas lag darin eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht das Ohr mit komplexeren Stimuli als Reintönen anzuregen und gleichzeitig otoakustische Emissionen zu erfassen. Der ersten Messreihe folgend wurden daher zuvor aufgenommene Kommunikations- und Echoortungsrufe getestet. In jedem Zeitfenster wurden hierzu anstelle der Reintöne, die komplexen Stimuli appliziert (Abbildung 8B). In einem ersten Schritt wurde jeweils ein einzelner Ruf pro Zeitfenster getestet und in einem weiteren Schritt wurde eine Abfolge von drei aneinander gehängten Rufen (Abstand 1 ms) geprüft.

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Projekte zur Untersuchung der Innenohrmechanik der Fledermausspezies *C. perspicillata* vorgestellt. Zuerst werden dabei Daten präsentiert, welche als Vorversuche dienten, um die Wirkweise der verwendeten Ketamin-Xylazin-Narkose auf die gemessene  $2f_1$ - $f_2$  Emission abschätzen zu können. Im Weiteren werden die gewonnenen Daten über die Beeinflussung der  $2f_1$ - $f_2$  Emission durch Aktivierung des efferenten Systems mittels KAS sowie die zugrundeliegende Anatomie näher beleuchtet. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse der OAE-Residual-Messungen mit Reintönen und komplexen Stimuli präsentiert.

#### 3.1 Vorversuche über die Wirkung einer Ketamin-Xylazin-Narkose auf die Generierung von DPOAE

In vorrangigen Experimenten sind DPOAE-Wachstumsfunktionen an 17 narkotisierten und 17 wachen Fledermäusen der Spezies *C. perspicillata* gemessen worden, ohne gleichzeitig das efferente System zu stimulieren (siehe Schlenther et al., 2014). Im Gegensatz zu den weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Projekten wurden in diesen Versuchen zunächst unterschiedliche Tiere unter Narkoseeinfluss und im wachen Zustand gemessen. Bei fünf der 17 verwendeten Tiere konnte die Messungen in beiden Zuständen durchgeführt werden. Generell sollte durch die im Vorfeld ausgeführten Versuchsreihe ein Überblick über die Wirkweise der während der Messungen verwendeten Ketamin-Xylazin-Narkose gewonnen werden. Ein Großteil der Daten wurde bereits im Zuge einer Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen von otoakustischen Emissionstypen bei der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*“ gewonnen. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden weitere Daten in Form von vier Messreihen erhoben und neue Auswertmethoden angewendet.

Abbildung 9 zeigt die über alle 17 Tiere gemittelten DPOAE-Wachstumsfunktionen, aufgenommen im narkotisierten sowie im wachen Zustand. Abgebildet sind alle Daten ab einem Messpunkt unterhalb der gesetzten -10 dB Schwelle, um den eigentlichen Schwellenübertritt hervorzuheben. Deutlich zu erkennen ist bei allen Messungen bei

den exemplarisch gezeigten Frequenzen (20, 40, 60 und 80 kHz), dass die unter Narkoseeinfluss gemessene Amplitude der  $2f_1-f_2$  Emission bei Stimulationspegeln ab 30 dB SPL höhere Pegel erreicht als im wachen Zustand. Bei der Messung mit einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einem  $L_2$ -Pegel von 55 dB SPL wird mit 33,9 dB die maximale Differenz der Mittelwerte erreicht. Allerdings liegen auch bei den Messungen mit  $f_2$ -Frequenzen von 40 und 60 kHz deutliche Unterschiede vor. Eine zweite Auffälligkeit ist, dass bei den Messungen im mittleren Frequenzbereich (40 und 60 kHz) bei wachen Tieren ein geringerer Stimulationspegel ausreicht, um eine  $2f_1-f_2$  Emission von -10 dB SPL zu erreichen.

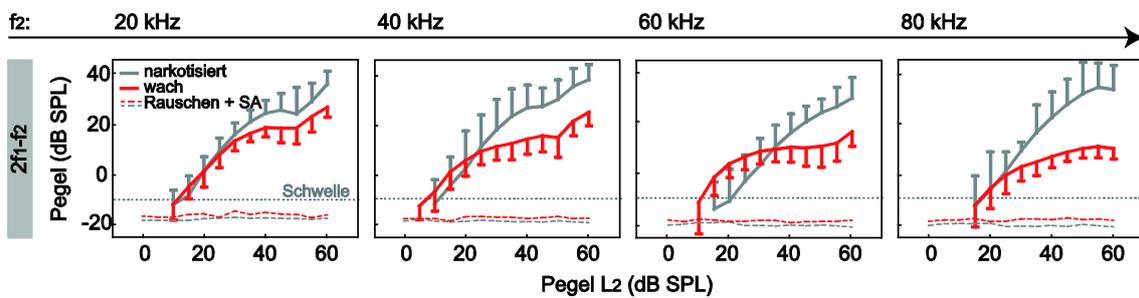


Abbildung 9: Gemittelte DPOAE-Wachstumsfunktionen der  $2f_1-f_2$  Emission von jeweils 17 narkotisierten (grau) und 17 wachen (rot) Tieren der Fledermausspezies *C. perspicillata*. Dargestellt sind alle Pegelwerte ab einem Messpunkt oberhalb des gewählten -10 dB SPL Schwellenkriteriums (grau gepunktete Linie). Die beiden weiteren gestrichelten Linien (grau und rot) geben den jeweiligen Pegel des akustischen Umgebungsrauschens plus eine Standardabweichung an. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung, welche aus graphischen Gründen nur in eine Richtung dargestellt ist.

Um den Narkoseeffekt hochaufgelöst über einen größeren Frequenzbereich darzustellen, zeigt Abbildung 10 die Abhängigkeit des DPOAE-Pegels von dem  $f_2$ -Pegel sowie der  $f_2$ -Frequenz exemplarisch für eine Fledermaus, welche unter Narkoseeinfluss sowie im wachen Zustand gemessen wurde. Zu sehen ist der farb-kodierte Pegel der  $2f_1-f_2$  Emission der Messung unter Narkoseeinfluss (Abbildung 10A), der Messung im wachen Zustand (Abbildung 10B) sowie die ermittelte Pegeldifferenz der beiden Zustände (Abbildung 10C). Vergleichbar mit den erhobenen Wachstums-funktionen sind höhere  $2f_1-f_2$  Pegel unter Narkoseeinfluss, vor allem bei hohen Stimulationspegeln, deutlich zu erkennen. Vor allem bei der Messung niedriger  $f_2$ -Frequenzen unterhalb von 45 kHz treten  $2f_1-f_2$  Pegel von bis zu 40 dB SPL auf. Die

höchsten Emissionspegel im wachen Zustand werden bei einer Stimulation mit  $f_2$ -Frequenzen zwischen 40 und 55 kHz durch Stimulationspegel oberhalb von 50 dB SPL erreicht. Weiterhin zu erkennen ist, dass vor allem im Bereich von 40 kHz sowie oberhalb von 60 kHz bei niedrigen Stimulationspegeln im wachen Zustand höhere Emissionspegel erreicht werden als unter Narkoseeinfluss. In dem vorliegenden Beispiel sind die größten Unterschiede zwischen dem unter Narkoseeinfluss gemessenen DPOAE-Pegel und dem im wachen Zustand erhobenen DPOAE-Pegel bei Stimulationen mit  $f_2$ -Frequenzen unterhalb von 40 kHz und  $f_2$ -Pegeln oberhalb von 25 dB SPL sowie bei der Stimulation mit  $f_2$ -Frequenzen von 40 und 65 kHz und  $f_2$ -Pegeln unterhalb von 25 dB SPL zu beobachten. Die individuellen Unterschiede des Effekts der Anästhesie sind jedoch beträchtlich. Bei anderen Tieren gab es maximale Effekte bei höheren  $f_2$ -Frequenzen (siehe auch Abbildung 9).

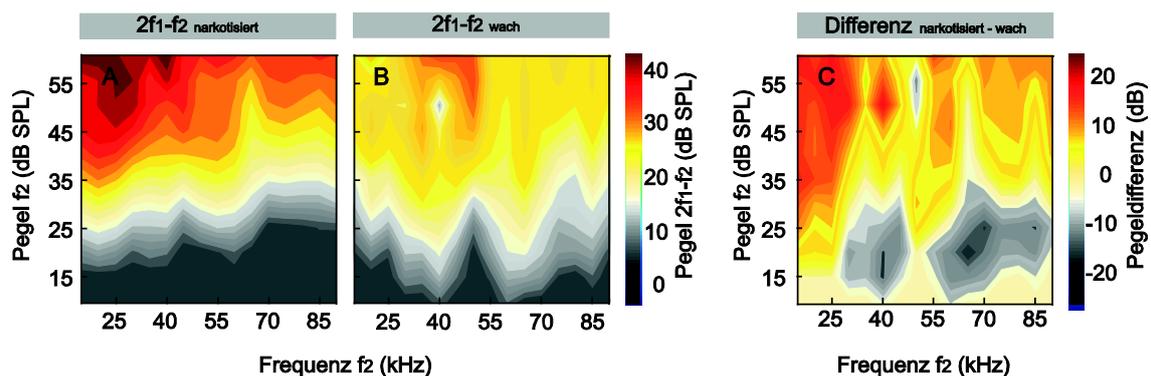


Abbildung 10: Abgebildet ist die Abhängigkeit des DPOAE-Pegels im wachen (A) und narkotisierten (B) Zustand sowie die kalkulierte Differenz (C) von der  $f_2$ -Frequenz in kHz sowie dem  $f_2$ -Pegel in dB SPL einer einzelnen Fledermaus der Spezies *C. perspicillata*. Die Daten wurden in 5 kHz Schritten ermittelt. Die Farbkodierung gibt den jeweiligen Pegel der  $2f_1-f_2$  Emission wieder.

### 3.2 Teilprojekt I: Vergleich von DPOAE-Wachstumsfunktionen gemessen mit und ohne KAS bei wachen und narkotisierten Tieren

Um zu überprüfen ob KAS einen Einfluss auf den Pegel der ipsilateral gemessenen  $2f_1-f_2$  Emission nimmt, wurden DPOAE-Wachstumsfunktionen im wachen und

narkotisierten Zustand mit und ohne KAS gemessen. Weiterhin wurde getestet, ob sich die Art einer etwaigen Beeinflussung durch unterschiedliche kontralaterale Stimuli ändert.

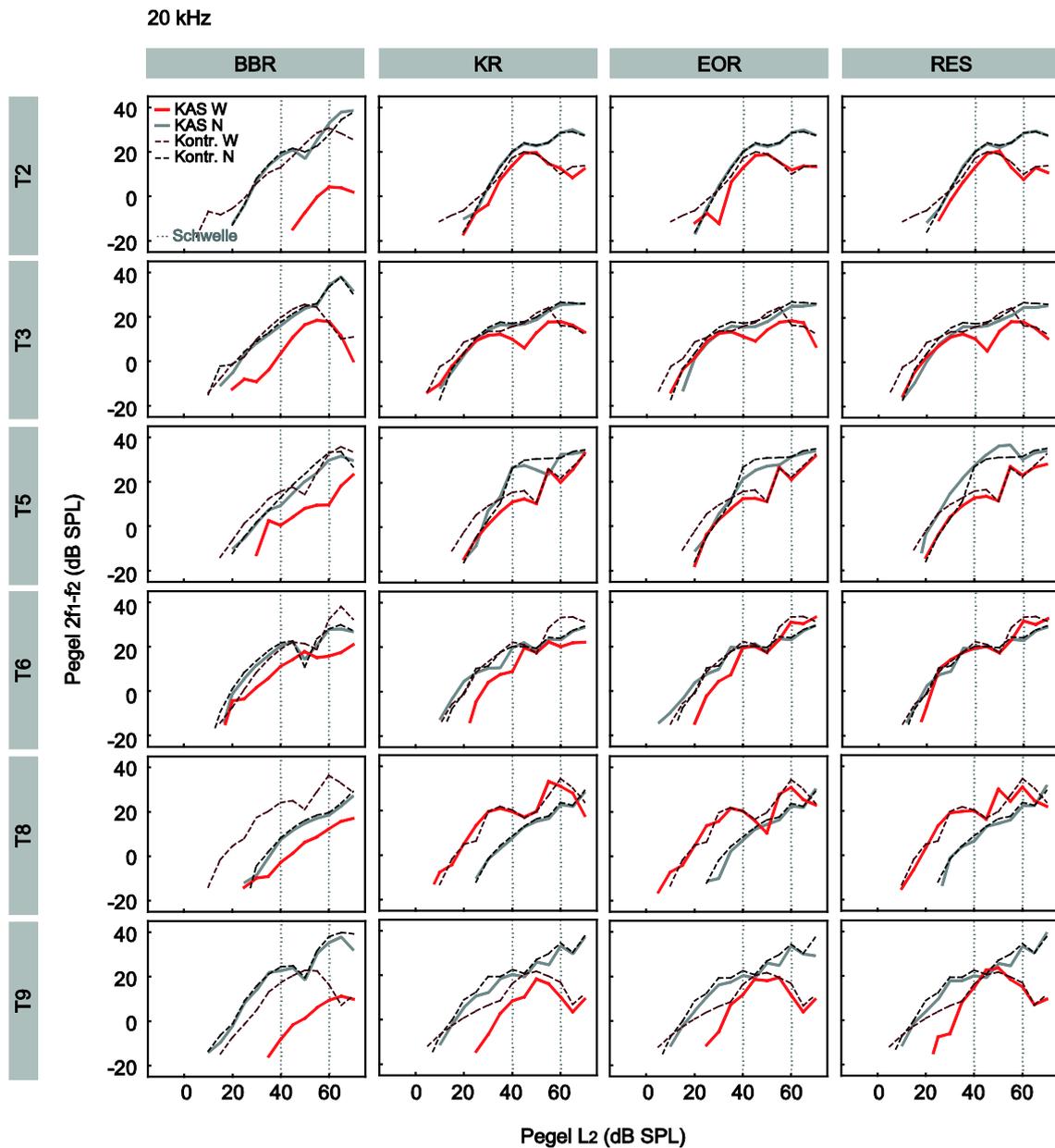


Abbildung 11: DPOAE-Wachstumsfunktionen gemessen bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz für alle gemessenen Tiere bei vier verschiedenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkelrot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger kontralateraler akustischer Stimulation (KAS) im narkotisierten (grau) und wachen Zustand (rot). Die gepunkteten Linien markieren die  $L_2$ -Schwellen bei 40 und 60 dB SPL.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Suppression des Emissionspegels um bis zu 37,3 dB während gleichzeitiger kontralateraler Beschallung in wachen Versuchstieren. Unter Narkoseeinfluss konnten nahezu keine Effekte erzielt werden. Zwischen den verschiedenen kontralateralen Stimuli konnte ein frequenzspezifischer Unterschied ermittelt werden.

In den Abbildungen 11 bis 14 sind die Ergebnisse aller Versuchstiere für die ausgewählten  $f_2$ -Frequenzen 20, 40, 60 und 80 kHz aufgetragen. Dargestellt sind  $2f_1-f_2$  Wachstumskurven im wachen (rot / dunkelrot gestrichelt) und im narkotisierten Zustand (grau / schwarz gestrichelt) mit und ohne kontralaterale Beschallung. Die vertikalen, gestrichelten Linien markieren den  $L_2$ -Pegel, an welchem in der späteren Auswertung die Differenz zwischen dem  $2f_1-f_2$  Pegel der Kontrollmessung und der Messung mit KAS ermittelt wurde (im Weiteren als  $L_2$ -Schwelle bezeichnet).

Bei DPOAE-Messungen mit einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (Abbildung 11) ist zu erkennen, dass sich die durch KAS verursachten Effekte ausgelöst durch artifizielle und arteigene Stimuli unterscheiden. Während unter Verwendung von BBR als kontralateralen Stimulus bei allen wachen Versuchstieren supprimierende Effekte bis zu 23,2 dB erreicht werden, unterscheidet sich der  $2f_1-f_2$  Pegel bei KAS mit arteigenen Rufen nur wenig von den Kontrollmessungen ohne KAS. Ähnlich verhält es sich mit den unter Narkoseeinfluss gewonnenen Daten. Hier lassen sich ebenfalls nur sehr geringe Abweichungen zwischen Kontrollmessung und KAS-Messung erkennen. Eine Auffälligkeit zeigt der Amplitudenverlauf der  $2f_1-f_2$  Emission von Versuchstier T8 während der Kontrollmessung im wachen Zustand, welcher über den gesamten Messverlauf bis zu 21,8 dB höher ist als unter Narkoseeinfluss. Bei den Versuchstieren T2, T3, T5 sowie T9 fällt weiterhin auf, dass  $L_2$ -Pegel über 40 dB SPL unter Narkoseeinfluss um etwa 10 dB höhere DPOAE-Pegel evozieren als im wachen Zustand.

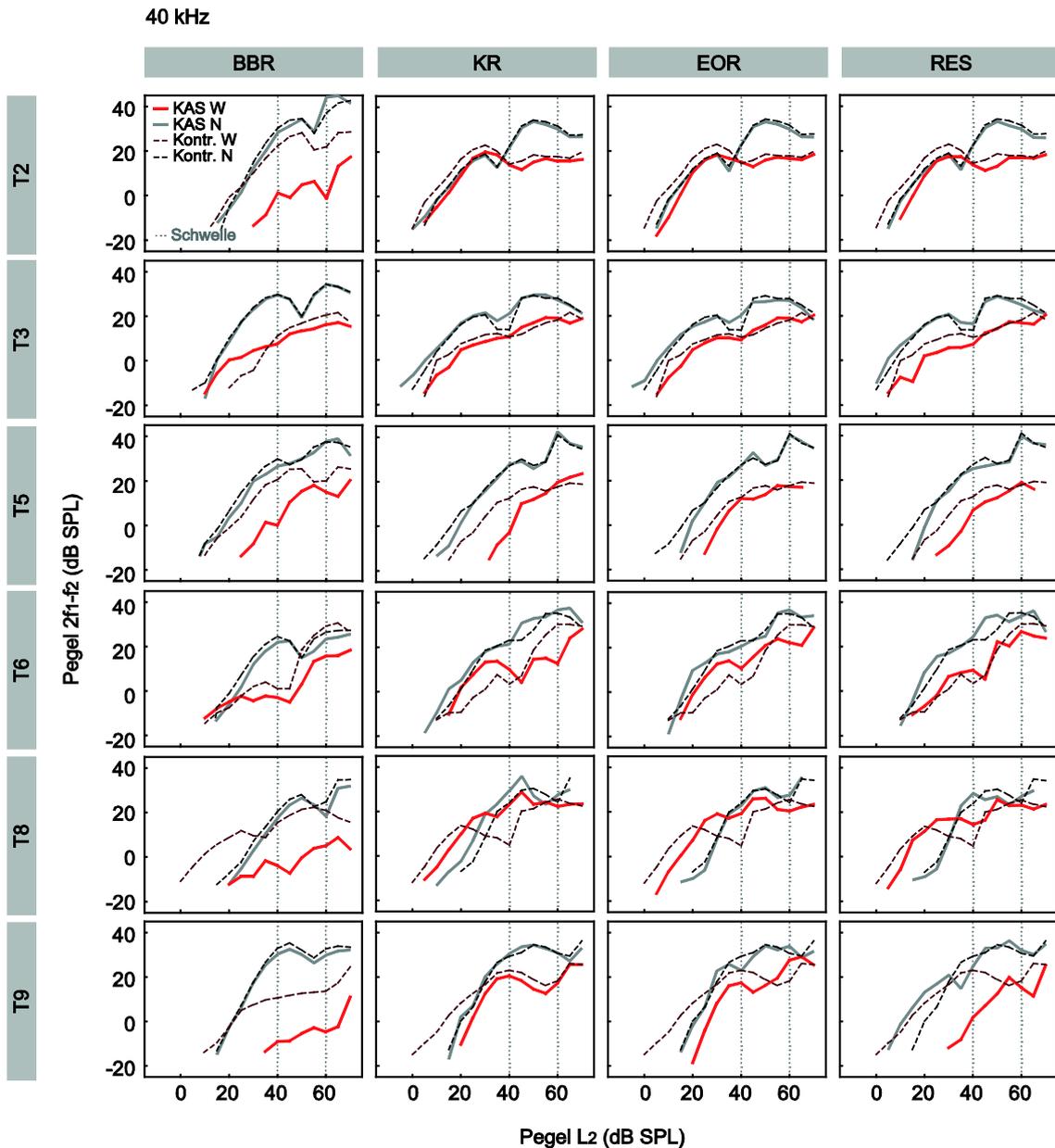


Abbildung 12: DPOAE-Wachstumsfunktionen gemessen bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz für alle gemessenen Tiere bei vier verschiedenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkelrot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten (grau) und wachen Zustand (rot). Die gepunkteten Linien markieren die  $L_2$ -Schwellen bei 40 und 60 dB SPL.

Bei einer ipsilateralen DPOAE-Messung mit einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz ist der Unterschied zwischen Effekten von BBR und arteigenen Rufen weniger deutlich ausgeprägt (Abbildung 12). Zwar lassen sich mit einer maximalen Suppression von 37,3 dB erneut bei einer KAS mit BBR die größten Effekte erzielen, aber auch bei

Verwendung der arteigenen Rufe treten Pegelabsenkungen von bis zu 18,9 dB auf. Vor allem Versuchstier T5 (KR) und Versuchstier T9 (RES) zeigen eine deutliche Beeinflussung des  $2f_1$ - $f_2$  Pegels durch KAS mit arteigenen Lauten im wachen Zustand. Wie schon bei der Stimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz, lassen sich auch hier nur minimale Pegelschwankungen im narkotisierten Zustand erkennen. Auffällig sind wiederum die Pegeldifferenzen, welche zwischen narkotisierten und wachen Tieren auftreten. Auch bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz konnten unter Narkoseeinfluss bei fünf von sechs Versuchstieren deutlich höhere Emissionspegel erzielt werden.

Bei Betrachtung von Abbildung 13, welche die gemessenen Wachstumskurven bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz zeigt, sind vergleichbare supprimierende Effekte bei allen verwendeten kontralateralen Stimuli zu erkennen. Im Gegensatz zu den Messungen mit den niedrigeren  $f_2$ -Frequenzen ist die Effektstärke zwischen KAS-Messung und Kontrollmessung im wachen Versuchstier mit BBR als kontralateralen Stimulus sogar im Mittel etwas geringer als beispielsweise unter Verwendung von KR als kontralateralen Stimulus ( $L_2 = 40$  dB SPL: BBR = 9,9 dB, KR = 15,1 dB;  $L_2 = 60$  dB SPL: BBR = 9,7 dB, KR = 16,3 dB). Vor allem bei Versuchstier T6 konnte eine starke Beeinflussung des  $2f_1$ - $f_2$  Pegels unter KAS mit arteigenen Stimuli erzielt werden (maximale Beeinflussung: BBR = 17,8 dB, KR = 31,8 dB, EOR = 31,0 dB, RES = 30,8 dB). Erneut lassen sich hinsichtlich des festgelegten Kriteriums ( $\pm 6$  dB, siehe Kapitel 2.1.4) für alle verwendeten kontralateralen Stimuli keine Beeinflussungen der DPOAE-Amplitude unter Einfluss von Narkose nachweisen. Eine weitere Auffälligkeit ist, wie schon bei der Stimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz, die hohe  $2f_1$ - $f_2$  Amplitude der Kontrollmessung im wachen Zustand bei Versuchstier T8. Hier ist der Emissionspegel erneut über den gesamten Pegelbereich um bis zu 22,2 dB höher als unter Narkoseeinwirkung, was auf kein weiteres Tier zutrifft. Im Gegensatz zu Versuchstier T8, bei dem höhere DPOAE-Amplituden im wachen Kontrollzustand verzeichnet werden konnten, und Versuchstier T6, welches annähernd vergleichbare DPOAE-Amplituden im wachen und narkotisierten Zustand aufweist, liegen die unter Narkoseeinfluss erhobenen DPOAE-Amplituden immer über denen im wachen Zustand erhobenen Werten. Somit sind sie mit den an 17 Tieren gewonnenen quantitativen Daten zum Effekt der Narkose (siehe Kapitel 3.1) vergleichbar.

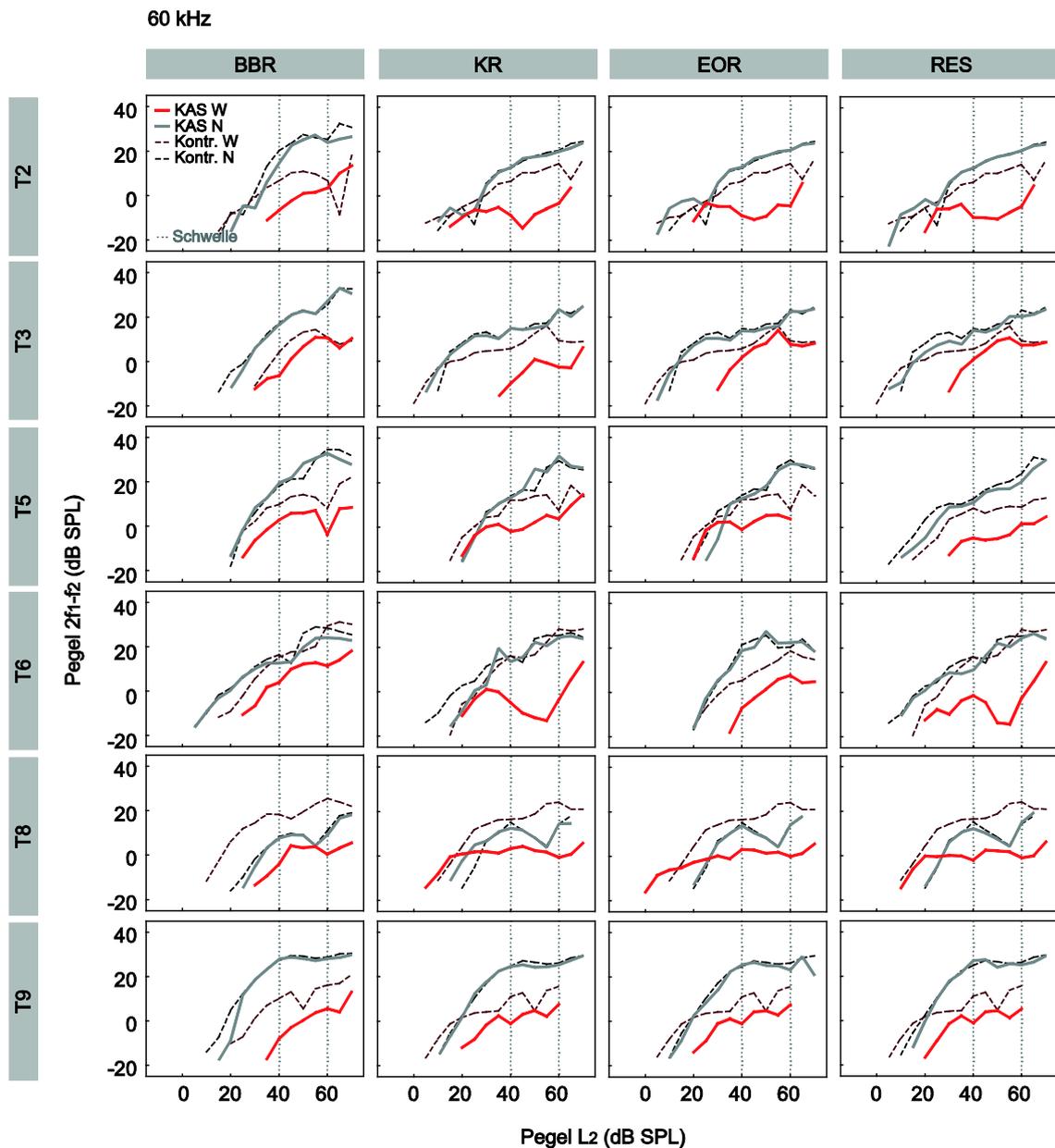


Abbildung 13: DPOAE-Wachstumsfunktionen gemessen bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz für alle gemessenen Tiere bei vier verschiedenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkelrot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten (grau) und wachen Zustand (rot). Die gepunkteten Linien markieren die  $L_2$ -Schwellen bei 40 und 60 dB SPL.

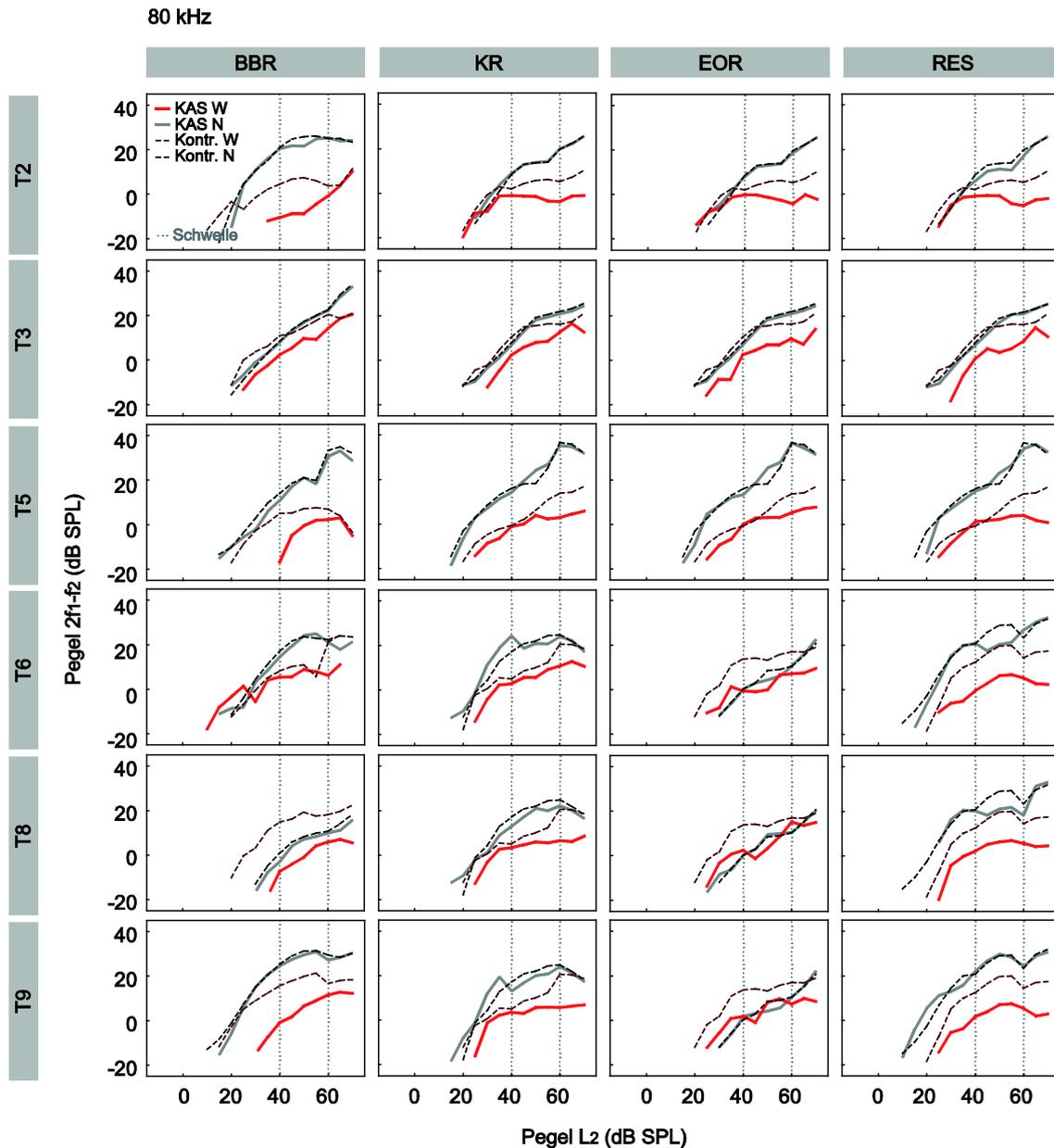


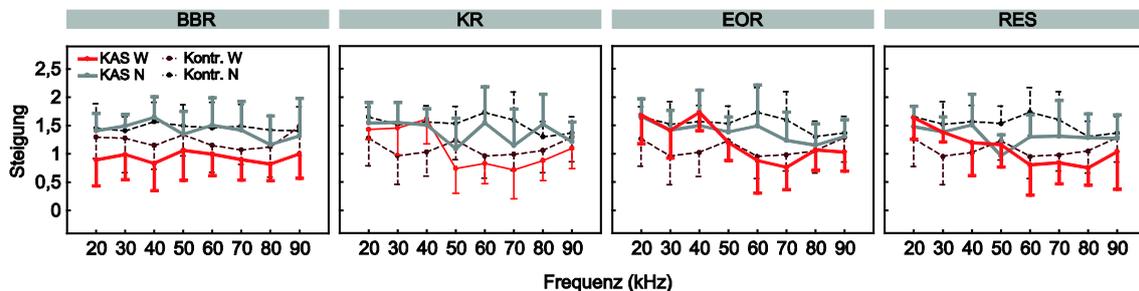
Abbildung 14: DPOAE-Wachstumsfunktionen gemessen bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz für alle gemessenen Tiere bei vier verschiedenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkelrot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten (grau) und wachen Zustand (rot). Die gepunkteten Linien markieren die  $L_2$ -Schwellen bei 40 und 60 dB SPL.

Wie die Ergebnisse einer ipsilateralen DPOAE-Messung mit einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz zeigen (Abbildung 14), wird auch hier der  $2f_1-f_2$  Pegel bei wachen Versuchstieren durch KAS mit allen getesteten Stimuli beeinflusst. Der Grad der Beeinflussung ist geringer als bei der DPOAE-Messung mit einer  $f_2$ -Frequenz von

60 kHz. Ähnlich wie bei der DPOAE-Messung mit einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz weicht erneut der Amplitudenverlauf der  $2f_1$ - $f_2$  Emission in der Kontrollmessung im wachen Zustand von Versuchstier T8 ab. Die Pegelwerte sind wiederum bis zu 24,2 dB höher als unter Narkoseeinfluss. Ebenfalls lassen sich, bezogen auf das festgelegte Kriterium, auch bei dieser Messung keine Beeinflussungen durch KAS an narkotisierten Tieren nachweisen. Bei Betrachtung der Amplitudenverläufe ist wiederum zuerkennen, dass mit Ausnahme von Versuchstier T8 die unter Narkoseeinfluss erhobenen DPOAE-Pegel höher sind als solche, die in einem wachen Tier ermittelt wurden.

### 3.2.1 Steigung der DPOAE-Wachstumsfunktionen

Um zu überprüfen, ob Unterschiede in der Steigung der einzelnen DPOAE-Wachstumsfunktionen vorliegen, wurden diese für alle verwendeten kontralateralen Stimuli in beiden Zuständen berechnet. Hierzu wurde der erste Datenpunkt, welcher 10 dB über dem jeweiligen Hintergrundrauschen lag, herangezogen um die Steigung in einem Bereich von 10 dB zu bestimmen.



**Abbildung 15: Berechnete Steigung der DPOAE-Wachstumsfunktionen.** Zu sehen ist die Steigung der KAS Messungen im wachen (rot) sowie im narkotisierten (grau) Zustand und die Steigung der Kontrollmessungen im wachen (dunkelrot gestrichelt) und narkotisierten Zustand (schwarz gestrichelt) über die getesteten Frequenzen. Für die Berechnung der Steigung wurde ein Bereich von 10 dB gewählt der jeweils 10 dB über dem Hintergrundrauschen lag.

In Abbildung 15 sind die berechneten Steigungen der DPOAE-Wachstumsfunktionen über den getesteten Frequenzbereich von 20 bis 90 kHz dargestellt. Während der Kontrollmessungen ohne KAS-Einwirkung beträgt die Steigung der DPOAE-Amplitude im wachen Zustand im Mittel 1,2 und unter Narkoseeinfluss 1,5. Bei einer kontralateralen Stimulation mit BBR ist die Steigung der

DPOAE-Amplitude im wachen Zustand durchschnittlich um 0,3 geringer als bei der Kontrollmessung, während die DPOAE-Amplitude im narkotisierten Zustand im Mittel bei 1,4 liegt und damit der Steigung im Kontrollzustand ähnelt. Während der kontralateralen Stimulation mit arteigenen Lauten ist die Steigung im narkotisierten Zustand im Mittel um 0,1 geringer als ohne kontralaterale Einflussnahme (KR = 0,1, EOR = 0,1, RES = 0,1). Im wachen Zustand fällt auf, dass die Steigung bei Messungen bis zu einer Frequenz von 60 kHz im Mittel um 0,3 über der berechneten Steigung während der Kontrollmessung liegt (KR = 0,2, EOR = 0,4, RES = 0,2). Bei Messungen höherer Frequenzen überhalb von 60 kHz ist die Steigung der DPOAE-Amplitude vergleichbar mit der Steigung der Kontrollmessung.

### **3.2.2 Differenzen der DPOAE-Wachstumsfunktionen mit und ohne KAS gemessen an zwei L<sub>2</sub>-Schwellen**

Um eine bessere Übersicht über die Effektstärke zu erlangen wurde die Differenz des Emissionspegels unter KAS-Einfluss zu dem im Kontrollzustand bei L<sub>2</sub>-Pegeln von 40 dB SPL und 60 dB SPL gebildet und über alle Versuchstiere gemittelt. In Abbildung 16 sind die Differenzen für das gesamte gemessene Frequenzspektrum für alle kontralateralen Stimuli aufgetragen.

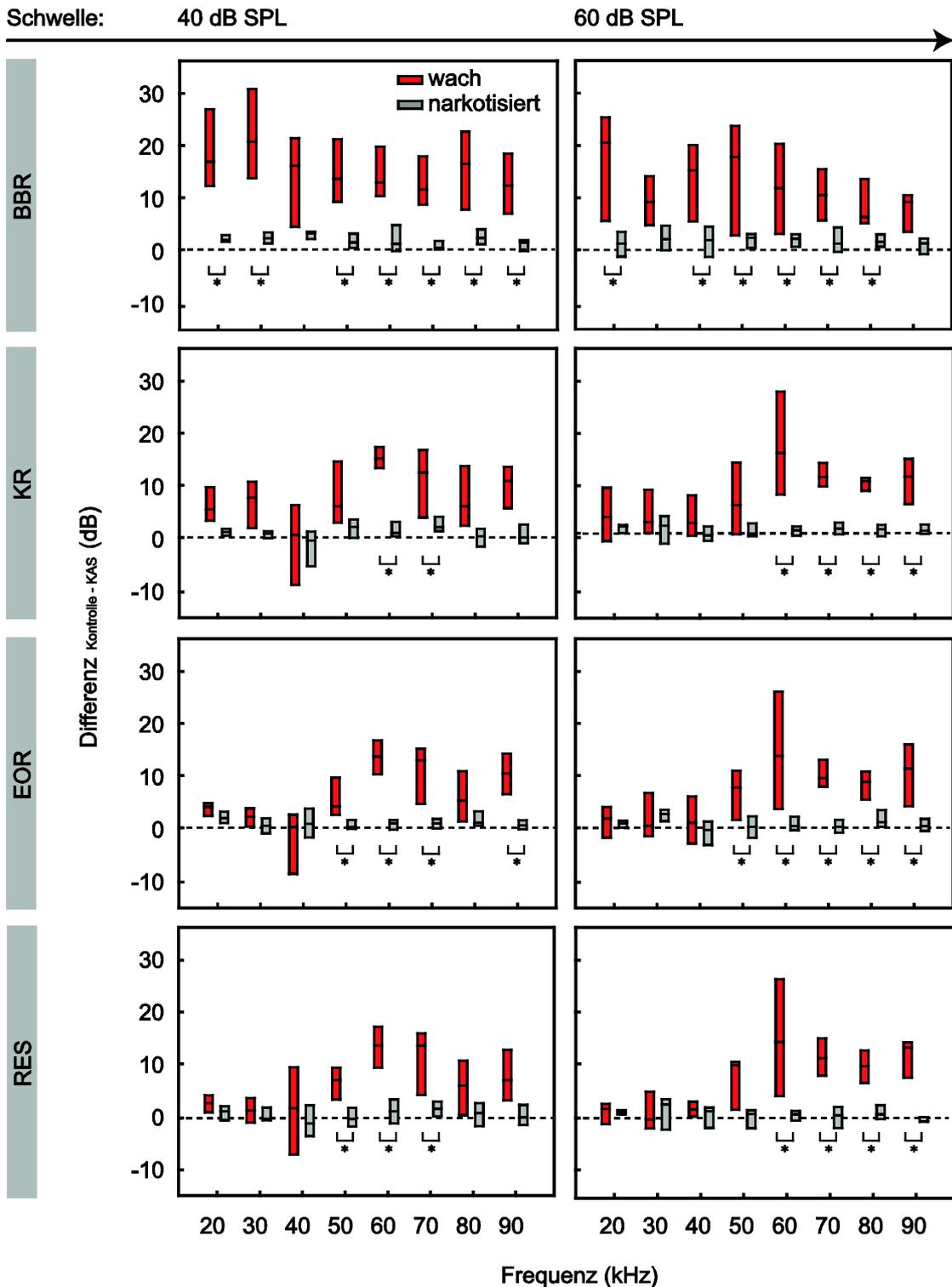


Abbildung 16: Abgebildet ist die gemittelte Differenz des  $2f_1-f_2$ -Pegels der Kontrollmessung und des  $2f_1-f_2$ -Pegels der KAS-Messung bei 40 und 60 dB SPL bei allen verwendeten kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES) über alle gemessenen Frequenzen (Boxplot: Median und Quartile). In grau ist die Differenz der unter Narkose ermittelten Daten dargestellt und in rot die Differenz der im wachen Tier erhobenen Daten. Signifikante Unterschiede zwischen den im wachen und narkotisierten Zustand erhobenen Daten sind vermerkt (Wilcoxon-Rangsummen-Test, \* $p < 0,05$ ).

Bei allen als kontralaterale Stimuli verwendeten Signalen ist zu erkennen, dass es unter Narkoseeinfluss keinen deutlichen Unterschied zwischen der gemessenen  $2f_1-f_2$  Amplitude ohne KAS und mit KAS gibt. Die ermittelten Mediane liegen zwischen -0,4 dB und 3,8 dB. Die Beeinflussung des  $2f_1-f_2$  Pegels durch KAS bei Versuchstieren im wachen Zustand ist wesentlich deutlicher. Bei Verwendung von BBR als kontralateralen Stimulus ist über den gesamten gemessenen Frequenzbereich bei beiden  $L_2$ -Schwellenkriterien im Mittel eine minimale Suppression des  $2f_1-f_2$  Pegels von 7,1 dB zu verzeichnen. Mit zwei Ausnahmen (40 dB SPL: 40 kHz; 60 dB SPL: 30 kHz) sind diese Unterschiede auch auf dem  $*p < 0,05$  Niveau signifikant. Alle Differenzen unter Verwendung von arteigenen Rufen als kontralateraler Stimulus zeigen hingegen eine frequenzabhängige Beeinflussung des  $2f_1-f_2$  Pegels. Bei Betrachtung der Amplitudendifferenzen an der  $L_2$ -Schwelle von 40 dB SPL ist deutlich zu erkennen, dass die maximale Beeinflussung des  $2f_1-f_2$  Pegels bei der Messung mit  $f_2$ -Frequenzen zwischen 60 und 70 kHz liegt. Bei DPOAE-Messungen im Frequenzbereich zwischen 20 und 50 kHz sowie 80 und 90 kHz sind die Differenzen um 8,2 dB bzw. 5,9 dB geringer als im Frequenzbereich zwischen 60 und 70 kHz. Bei der Betrachtung der Differenzen an der 60 dB SPL  $L_2$ -Schwelle ist die Effektstärke bei der Stimulusfrequenz 60 kHz noch deutlicher zu erkennen. Hier liegt sie mit einem Maximalwert von 24,7 dB deutlich über den Differenzen, welche an anderen Frequenzen gemessen wurden (z.B. 40 kHz = 5,1 dB, 80 kHz = 10,8 dB).

### **3.3 Teilprojekt II: Vergleich von kontinuierlichen DPOAE-Messungen mit eingebetteter KAS bei wachen und narkotisierten Tieren**

Während der pegelkonstanten ( $L_1 = 50$  dB SPL,  $L_2 = 40$  dB SPL), 3-sekündigen DPOAE-Messungen konnte eine deutliche Beeinflussung der  $2f_1-f_2$  Amplitude durch die zeitverzögert einsetzende KAS beobachtet werden. Der Pegel der  $2f_1-f_2$  Emission wurde bei zeitgleicher KAS um bis zu 7,6 dB verringert. Nach Beendigung der KAS stieg der DPOAE-Pegel unverzüglich auf den Ausgangswert vor Einsetzen der KAS an.

Wie in dem Einzelbeispiel in Abbildung 17 gezeigt wird, ist die Effektstärke der DPOAE-Beeinflussung durch KAS in hohem Maße vom verwendeten KAS-Pegel abhängig.

T2 |  $f_2$ : 40 kHz | wach

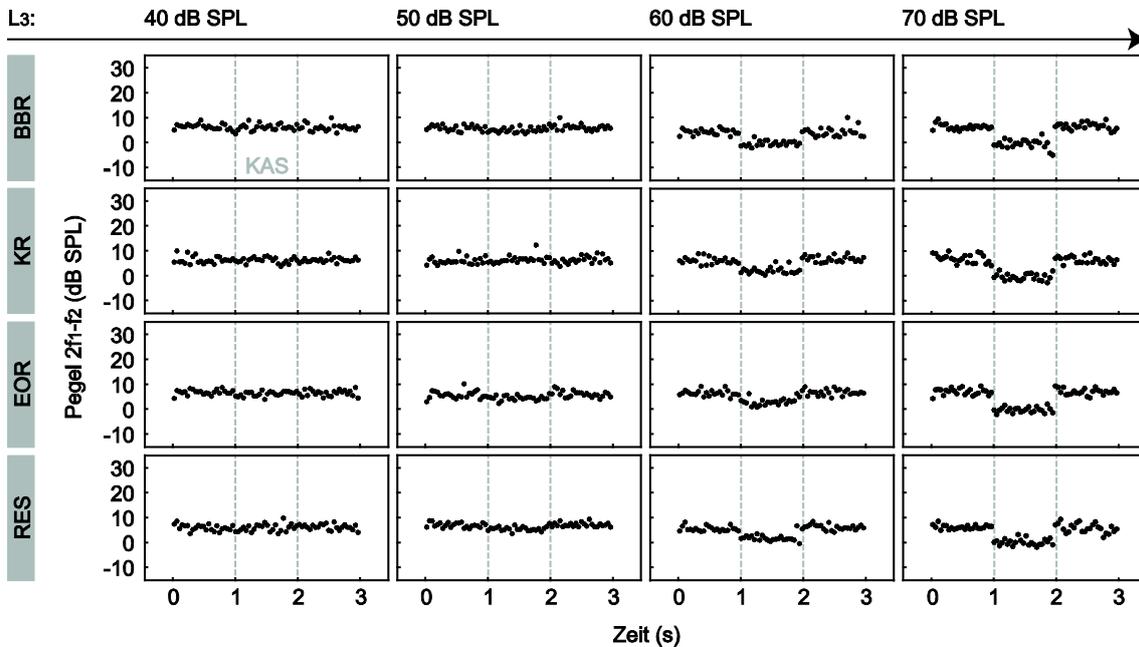


Abbildung 17: Einzelbeispiel einer DPOAE-Zeitmessung über 3 s bei Stimulationen mit einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer 1-sekündigen KAS bei 40, 50, 60 sowie 70 dB SPL für alle getesteten Stimuli (BBR, KR, EOR, RES).

Dargestellt ist die  $2f_1-f_2$  Amplitude eines wachen Tieres (T2) bei Stimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz bei allen getesteten kontralateralen Stimuli sowie vier verschiedenen KAS-Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Ein Absinken der DPOAE-Amplitude im Mittel um 3,3 dB ist ab einem KAS-Pegel von 60 dB SPL zu verzeichnen. Um etwa 3,1 dB stärkere Effekte sind bei einem um 10 dB höheren KAS-Pegel zu erkennen. In allen folgenden Abbildungen sind daher die gewonnenen Daten bei einem KAS-Pegel von 70 dB SPL gezeigt. Wie in Kapitel 3.2 bereits beschrieben wurde, konnten auch innerhalb der Messungen dieses Teilprojekts an narkotisierten Tieren keine Beeinflussungen der  $2f_1-f_2$  Amplitude durch KAS festgestellt werden. Exemplarisch sind daher in Abbildung 18 die gewonnenen Daten der Messungen an einem narkotisierten Tier (T2) für alle getesteten kontralateralen Stimuli (KAS-Pegel = 70 dB SPL) bei  $f_2$ -Frequenzen von 20, 40, 60 sowie 80 kHz gezeigt. Über den gesamten gemessenen Frequenzbereich ist zu erkennen, dass mit keinem der getesteten

kontralateralen Stimuli eine Änderung der  $2f_1-f_2$  Amplitude erreicht werden konnte. Im Folgenden wird daher ein Fokus auf die Messungen im wachen Zustand gelegt.

T2 | narkotisiert

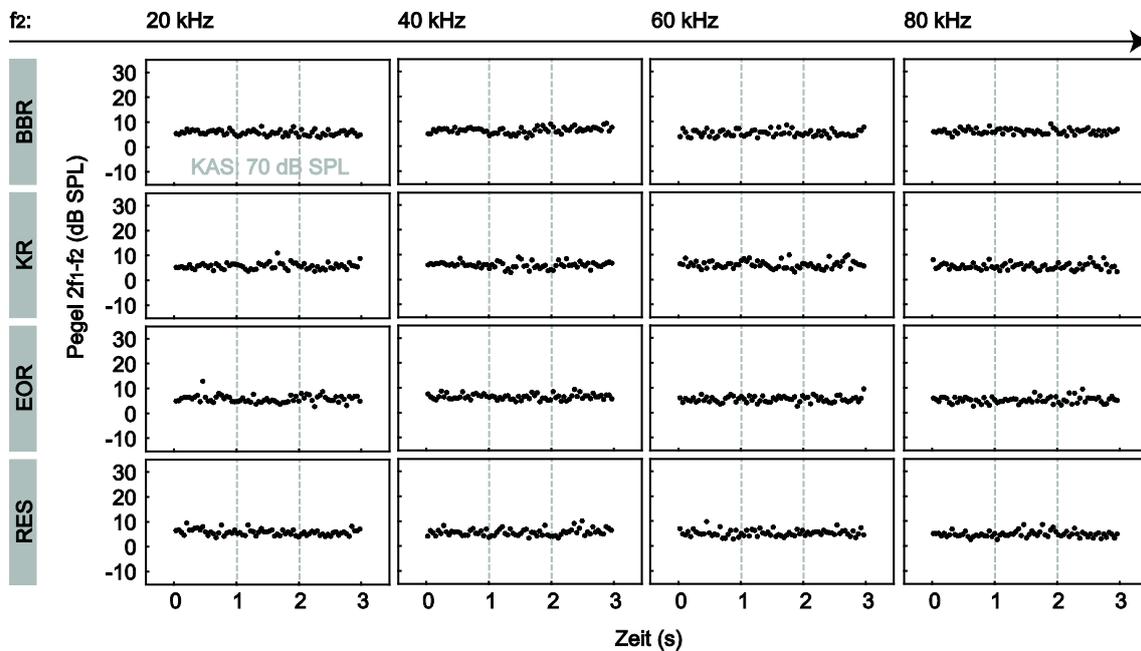


Abbildung 18: Einzelbeispiel einer DPOAE-Zeitmessung über 3 s bei Stimulation mit  $f_2$ -Frequenzen von 20, 40, 60 und 80 kHz und einer 1-sekündigen KAS bei 70 dB SPL für alle getesteten Stimuli (BBR, KR, EOR, RES) an einem narkotisierten Tier (T2).

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 19-22) zeigen die ermittelte Amplitude der  $2f_1-f_2$  Emission bei Stimulation mit verschiedenen  $f_2$ -Frequenzen (20, 40, 60 und 80 kHz) für alle getesteten Versuchstiere. Die  $2f_1-f_2$  Emission wurde durch eine kontinuierliche ipsilaterale Zweittonstimulation ( $L_1 = 50$  dB SPL,  $L_2 = 40$  dB SPL) über 3 s evoziert.

Bei näherer Betrachtung des Amplitudenverlaufs der  $2f_1-f_2$  Emission bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (Abbildung 19) ist zu erkennen, dass sich die Amplitude während einer KAS mit BBR um 5,6 dB absenkt. Die Stimulation mit den arteigenen Stimuli scheint hingegen keinen Effekt auf den Pegel der  $2f_1-f_2$  Emission zu nehmen. Der Ausgangspegel der Emission in der ersten Sekunde vor Einsetzen der KAS (im Folgenden als Zeitfenster 1 bezeichnet) lag bei allen getesteten Stimuli im Mittel bei 5,7 dB SPL (BBR = 5,9 dB SPL, KR = 5,9 dB SPL, EOR = 5,5 dB SPL, RES = 5,7 dB SPL). Der DPOAE-Pegel während der kontralateralen Beschallung

(Zeitfenster 2) mit BBR lag im Mittel bei 0,2 dB SPL und damit 5,7 dB niedriger als in Zeitfenster 1. Bei Verwendung der arteigenen Stimuli liegt der DPOAE-Pegel durchschnittlich bei 5,5 dB SPL, wodurch sich hinsichtlich des gewählten Kriteriums kein Unterschied zu Zeitfenster 1 zeigt. In Zeitfenster 3, der Sekunde nach Abschalten der KAS, lag der Emissionspegel aller getesteten Stimuli im Mittel bei 5,7 dB SPL, was in etwa dem Ausgangspegel aus Zeitfenster 1 entspricht.

wach |  $f_2$ : 20 kHz

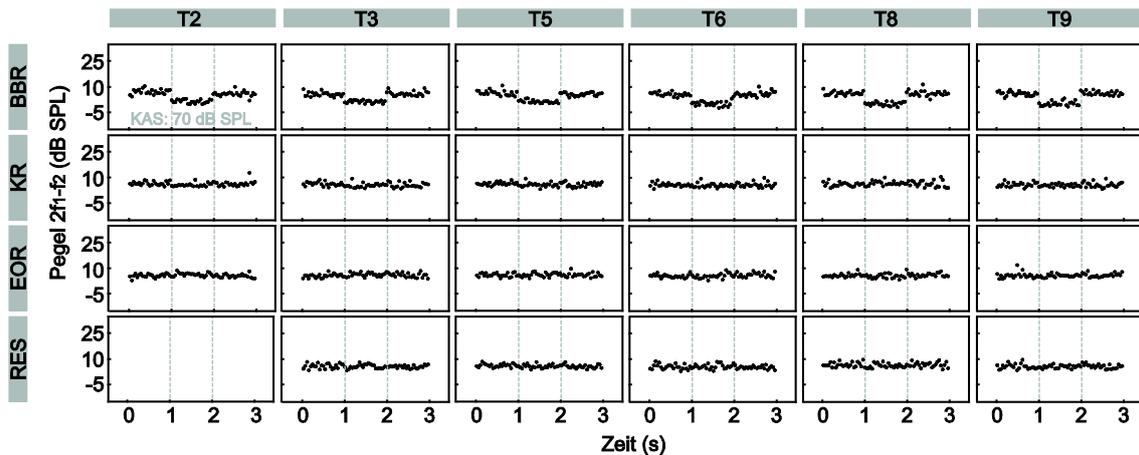


Abbildung 19: DPOAE-Zeitmessung über 3 s bei einer Stimulation mit  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer 1-sekündigen KAS (gekennzeichnet durch gestrichelte Linien; maximaler Pegel: 70 dB SPL).

Abbildung 20 stellt den ermittelte  $2f_1-f_2$  Emissionspegel bei einer Zweittonstimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz dar. Im Vergleich zu dem Beispiel in Abbildung 19 ist deutlich zu erkennen, dass in diesem Beispiel bei allen getesteten kontralateralen Stimuli eine Beeinflussung des Emissionspegels vorliegt. In Zeitfenster 1 liegt der Pegel der  $2f_1-f_2$  Emission zwischen 5,9 dB SPL (RES) und 6,1 dB SPL (KR). Während der KAS sinkt dieser im Mittel um 6,1 dB ab. In Zeitfenster 3 ist der Emissionspegel mit dem Ausgangspegel zu vergleichen (im Mittel 5,9 dB SPL). Eine Auffälligkeit ist bei Versuchstier T6 bei einer KAS mit Kommunikationsrufen zu verzeichnen. Hier steigt der Emissionspegel nach dem Abschalten der KAS nicht wie in allen anderen gezeigten Datensätzen abrupt an, sondern nähert sich schon während der KAS dem Ausgangspegel an.

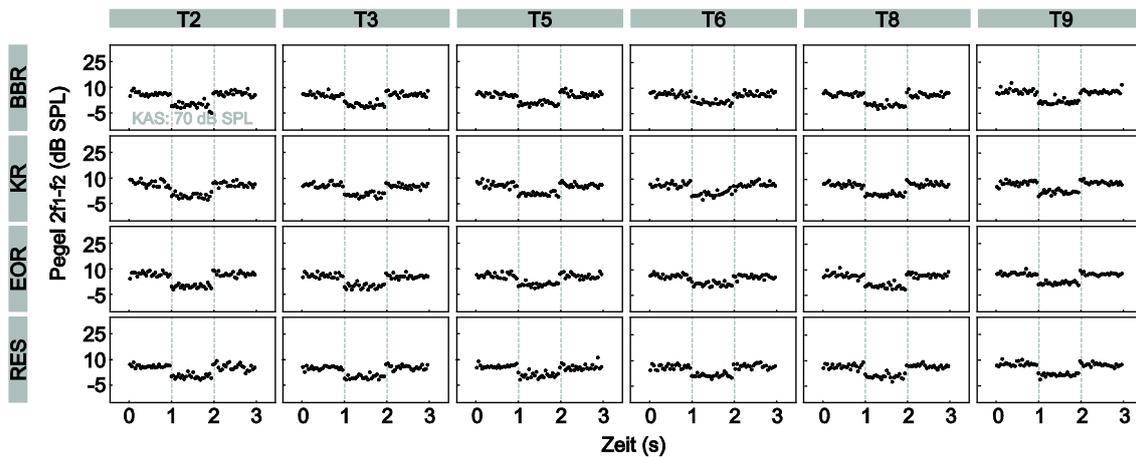
wach |  $f_2$ : 40 kHz

Abbildung 20: DPOAE-Zeitmessung über 3 s bei einer Stimulation mit  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer 1-sekündigen KAS (gekennzeichnet durch gestrichelte Linien; maximaler Pegel: 70 dB SPL).

Bei ipsilateraler Stimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz werden Emissionspegel von etwa 5,3 dB SPL erreicht (Abbildung 21). Im Mittel wird dieser nach Einschalten der KAS um 5,6 dB abgesenkt. Die Pegelwerte in Zeitfenster 3 sind im Vergleich zu den Ausgangspegeln etwas erhöht und liegen im Mittel bei 5,6 dB SPL. Wie bereits in Abbildung 19 erwähnt, war es auch bei einer Zweitstimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz bei zwei Versuchstieren (T3 und T6) nicht möglich eine kontralaterale Messung mit der RES durchzuführen, da die Tierbewegungen während der Messung zu stark waren.

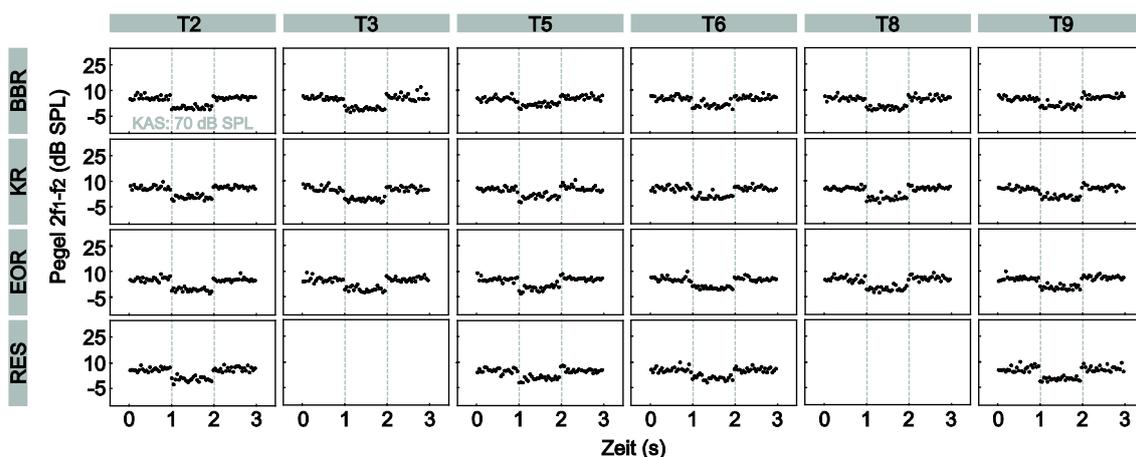
wach |  $f_2$ : 60 kHz

Abbildung 21: DPOAE-Zeitmessung über 3 s bei einer Stimulation mit  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer 1-sekündigen KAS (gekennzeichnet durch gestrichelte Linien; maximaler Pegel: 70 dB SPL).

Wie Abbildung 22 zeigt, liegt der  $2f_1-f_2$  Emissionspegel bei einer Zweittonstimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz im Zeitfenster 1 zwischen 5,4 dB SPL (RES) und 5,5 dB SPL (EOR). Die Effektstärke während der KAS liegt im Mittel bei 5,4 dB und ist damit ein wenig geringer als bei den Messungen mit niedrigeren  $f_2$ -Frequenzen. Auffällig sind die Kurvenverläufe bei den Versuchstieren T8 und T9 jeweils mit der RES als kontralateralen Stimulus. Hier sinkt und steigt der Emissionspegel nach Anschalten bzw. nach Abschalten der KAS nicht schlagartig, sondern nimmt einen fließenden Verlauf an.

wach |  $f_2$ : 80 kHz

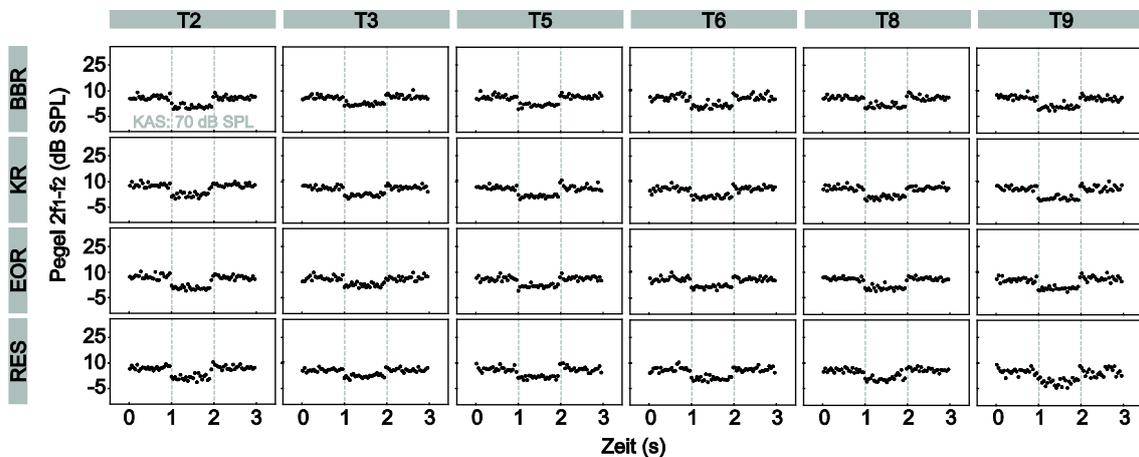


Abbildung 22: DPOAE-Zeitmessung über 3 s bei einer Stimulation mit  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer 1-sekündigen KAS (gekennzeichnet durch gestrichelte Linien; maximaler Pegel: 70 dB SPL).

### 3.3.1 Differenz der DPOAE-Pegel über die Zeit

Für die weitere Analyse der Daten wurde die Differenz der DPOAE-Pegel über die einzelnen Zeitfenster berechnet. Das erste Zeitfenster wurde als Ausgangswert bzw. Kontrolle verwendet. In Abbildung 23 sind die DPOAE-Pegel-Differenzen, für alle verwendeten kontralateralen Stimuli gemittelt über alle Tiere im wachen sowie narkotisierten Zustand, abgebildet. Deutlich erkennbar ist, dass nur zwischen Zeitfenster 1 und Zeitfenster 2 im wachen Zustand signifikante Pegeldifferenzen von bis zu 6,1 dB auftreten. Während dies bei der Stimulation mit 40, 60 und 80 kHz für alle kontralateral verwendeten Stimuli gilt, trifft die Pegelabsenkung bei der Messung mit einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz nur für BBR zu.

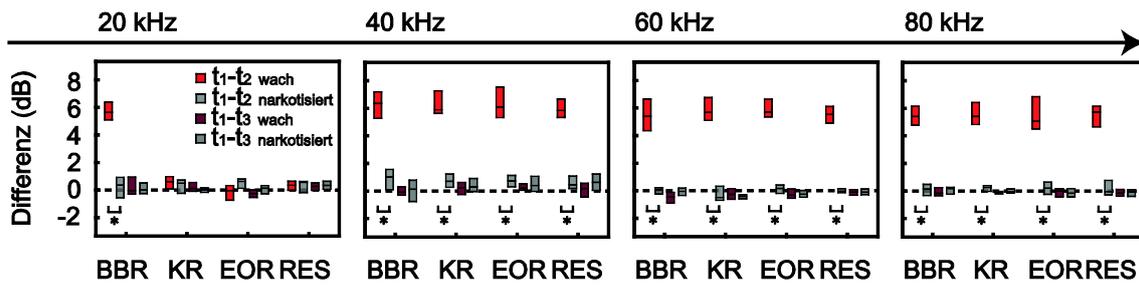


Abbildung 23: Abgebildet ist die Differenz des durchschnittlichen Emissionspegels in Zeitfenster 1 zu den folgenden Zeitfenstern ( $t_1-t_2$  wach = rot,  $t_1-t_2$  narkotisiert = hell grau,  $t_1-t_3$  wach = dunkelrot,  $t_1-t_3$  narkotisiert = dunkelgrau) für alle kontralateralen Stimuli (Boxplot: Median und Quartile). Die Daten wurden über alle Versuchstiere im wachen und narkotisierten Zustand für die Messungen bei  $f_2$ -Frequenzen von 20, 40, 60 und 80 kHz gemittelt. Signifikante Unterschiede zwischen den im wachen und narkotisierten Zustand erhobenen Daten sind vermerkt (Wilcoxon-Rangsummen-Test,  $*p < 0,05$ ).

Um einen genaueren Überblick über den Zeitverlauf der Effekte zu erlangen, wurden die Zeitfenster in einem weiteren Schritt in 250 ms lange Intervalle eingeteilt, von denen wiederum die Differenz zum Ausgangswert berechnet wurde (siehe Abbildung 7B). In Abbildung 24 sind die jeweiligen ermittelten Differenzen aufgetragen. Bei Betrachtung der Differenzen in den einzelnen Zeitintervalle sind keine Unterschiede im Vergleich zur Gesamt-Betrachtung zu erkennen. Signifikante Differenzen von etwa 6 dB sind wiederum ausschließlich in den Daten zwischen Zeitfenster 1 und 2 zu erkennen und treten bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz ausschließlich bei Verwendung von BBR als kontralateralen Stimulus auf. Zwischen Zeitfenster 1 und 3 sowie unter Narkoseeinfluss schwanken die Mediane zwischen -0,8 dB und 1,6 dB.

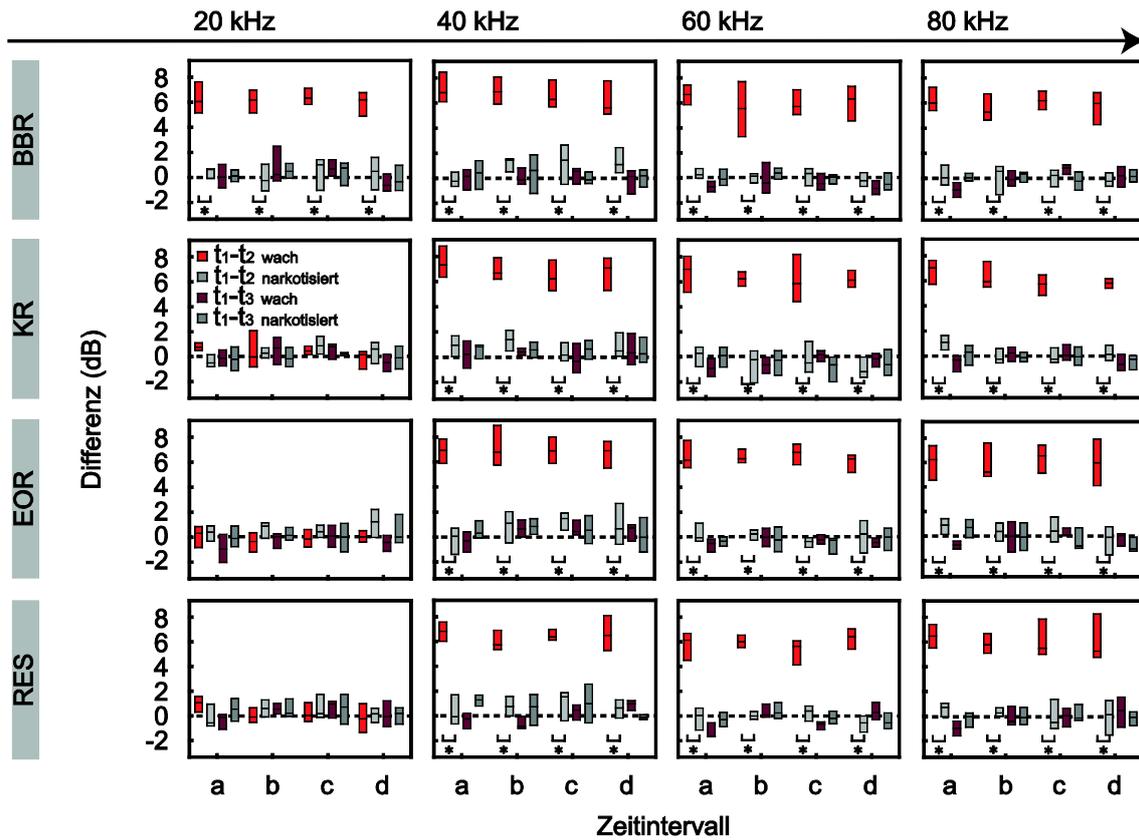


Abbildung 24: Abgebildet ist die jeweilige Differenz des Emissionspegels der in 250 ms eingeteilten Zeitintervalle in Zeitfenster 1 zu den folgenden Zeitfenstern ( $t_1-t_2$  wach = rot,  $t_1-t_2$  narkotisiert = hell grau,  $t_1-t_3$  wach = dunkelrot,  $t_1-t_3$  narkotisiert = dunkelgrau) für alle kontralateralen Stimuli, gemittelt über alle Versuchstiere im wachen und narkotisierten Zustand für die Messungen bei  $f_2$ -Frequenzen von 20, 40, 60 und 80 kHz (Boxplot: Median und Quartile). Signifikante Unterschiede zwischen den im wachen und narkotisierten Zustand erhobenen Daten sind vermerkt (Wilcoxon-Rangsummen-Test,  $*p < 0,05$ ).

### 3.4 Teilprojekt III: Histologie

Ergänzend zu den Projekten zur Untersuchung der Innenohrmechanik mittels DPOAE-Messungen unter KAS wurden histologische Schnittserien angefertigt. Diese sollen einen Überblick über das Vorhandensein und den Verlauf der efferenten Fasern innerhalb der Kochlea von *Carollia perspicillata* geben. Mit Hilfe der Thiocholinmethode wurde der Ort der Umsetzung des Enzyms ACh-Esterase angefärbt, wodurch ein Rückschluss auf das Vorhandensein des, für das efferente System maßgeblichen Transmitters ACh getroffen werden kann.

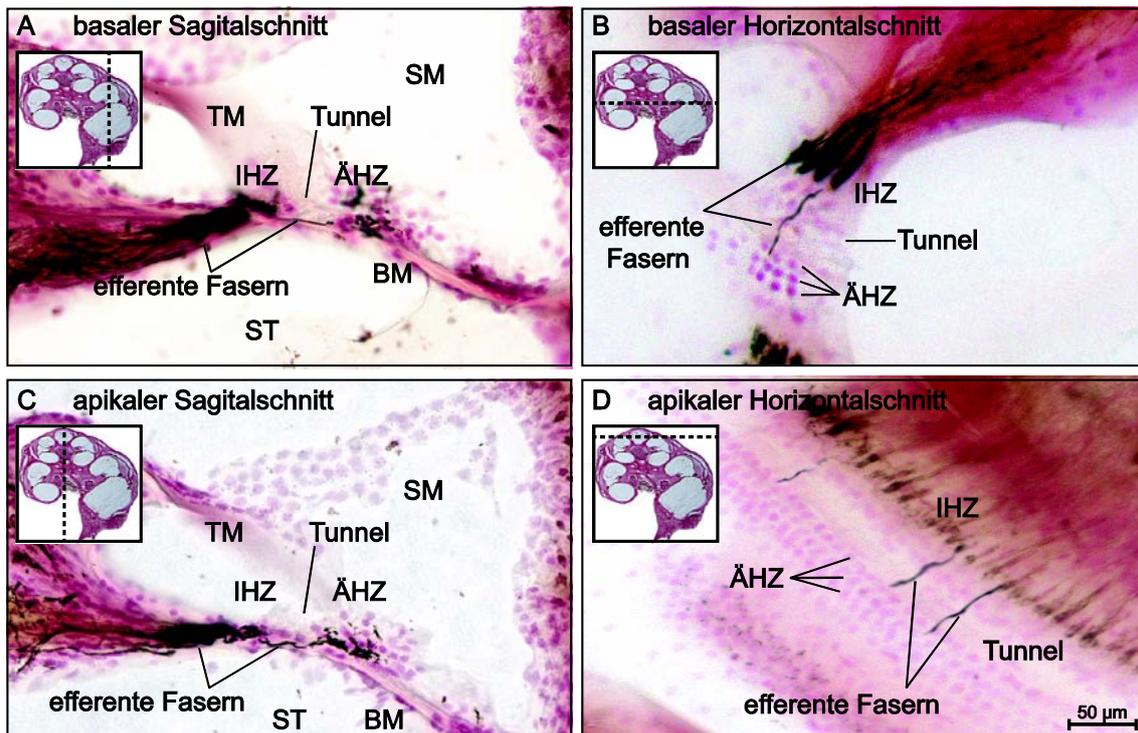


Abbildung 25: Histologische Präparate der Kochlea von *C. perspicillata*. Zur Kenntlichmachung der efferenten Fasern wurden 45 µm dicke Schnitte mit Hilfe der Thiocholinmethode angefärbt. A: Sagittalschnitt durch die basale Kochlea. B: Horizontalschnitt durch die basale Kochlea. C: Sagittalschnitt durch die apikale Kochlea. D: Horizontalschnitt durch die apikale Kochlea. Abgebildet ist die *Scala media* (SM), die *Scala tympani* (ST), die Tektorialmembran (TM), die Basilarmembran (BM), die inneren Haarsinneszellen (IHZ) sowie die äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ).

Abbildung 25 zeigt vier repräsentative Beispiele der verschiedenen Schnittserien. Dargestellt sind jeweils Sagittal- sowie Horizontalschnitte an basalen und apikalen Bereichen der Kochlea. Gezeigt ist in allen Schnitten der Bereich des Corti-Organs mit seinen wichtigen Strukturen. Während die Horizontalschnitte lediglich die Haarsinneszellen sowie die tunnelartige Struktur zwischen ihnen zeigen, sind in den sagittalen Schnitten zusätzlich die einzelnen Skalen sowie die BM und TM zu erkennen. Durch die kräftige Färbung ist die starke Umsetzung des Enzyms ACh-Esterase im Bereich der IHZ deutlich zu sehen. Anhand der beiden sagittalen Schnitte ist diese enzymatische Umsetzung ebenfalls an den ÄHZ zu verzeichnen. Die Horizontalschnitte zeigen zwar im basalen Bereich sowie im apikalen Bereich der Kochlea efferente Fasern, die Umsetzung des Enzyms ACh-Esterase an den ÄHZ kann allerdings nicht gezeigt werden. Bei der Auswertung der Schnittserien konnte festgestellt werden, dass

efferente Fasern über die gesamte Länge der Cochlea zu finden sind. Regionale Unterschiede zwischen den basalen und apikalen Bereichen der Cochlea konnten nicht festgestellt werden, wobei eine quantitative Auszählung der efferenten Fasern auf Grund der Schnittdicke und Färbequalität nicht möglich war.

### **3.5 Teilprojekt IV: OAE-Residuale**

Das OAE-Residual-Paradigma basiert auf einer von Douglas Keefe entwickelten Methode zur Messung von „double-evoked“ OAEs. Das Paradigma ermöglicht es, das Ohr mit komplexen Schallstimuli zu reizen. Es werden anhand einer Subtraktion der am Trommelfell gemessenen akustischen Signale sowie den Trommelfellantworten auf die einzelnen Komponenten dieser Signale mögliche Residualschwingung detektiert.

#### **3.5.1 Reintonstimulation**

Um einen genaueren Überblick über die Vergleichbarkeit des OAE-Residual-Versuchsparadigmas mit der herkömmlichen DPOAE-Messmethode zu erlangen, wurde in einem ersten Schritt eine Reintonstimulation angewendet. In Abbildung 26 sind die exemplarischen Daten von vier Tieren bei Stimulation mit  $f_2$ -Frequenzen von 20, 40, 60 und 80 kHz aufgetragen. Abgebildet sind jeweils die DPOAE-Amplitude der  $2f_1$ - $f_2$  Emission aus dem herkömmlichen DPOAE-Messparadigma, die Amplitude der während der OAE-Residual-Messung direkt erfassten DPOAE (resDPOAE) sowie die Amplitude des berechneten OAE-Residuals. Die Amplituden der direkt während der Residualmessung aufgenommenen DPOAE in Zeitfenster 2 zeigen einen vergleichbaren Verlauf mit denen der  $2f_1$ - $f_2$  Emission aus der herkömmlichen DPOAE-Messung. Die beiden Messungen unterscheiden sich stimulationstechnisch vor allem darin, dass bei der konventionellen Messung zwei unterschiedliche Lautsprecher für den  $f_1$  und den  $f_2$ -Stimulus verwendet werden. Bei der Residualmessung werden  $f_1$  und  $f_2$  über denselben Lautsprecher dargeboten. Beispiele 2 und 3 zeigen bei Stimulation mit einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz einen maximalen Amplitudenunterschied von etwa 13 dB. Bei den übrigen Beispielen liegt die Amplitudendifferenz im Mittel bei 2,8 dB. Die Amplitude des berechneten OAE-Residuals zeigt deutliche Abweichungen zu den Vergleichskurven. Zum einen treten bei den Daten aller getesteten  $f_2$ -Frequenzen

Amplitudendifferenzen von bis zu 17,8 dB auf und zum anderen werden höhere  $L_2$ -Pegel benötigt um eine OAE-Residual-Amplitude zu erzeugen, die oberhalb des Rauschpegels liegt. Weiterhin lässt sich bei Beispiel 1 (40, 60 und 80 kHz), Beispiel 2 (20, 40 und 60 kHz), Beispiel 3 (20 kHz) sowie Beispiel 4 (40 und 60 kHz) erkennen, dass die OAE-Residual-Amplitude konträr zu den jeweiligen anderen Kurven verläuft. Das bedeutet, dass die OAE-Residual-Kurve ein Minimum aufweist, wenn die beiden anderen ein Maximum haben und umgekehrt.

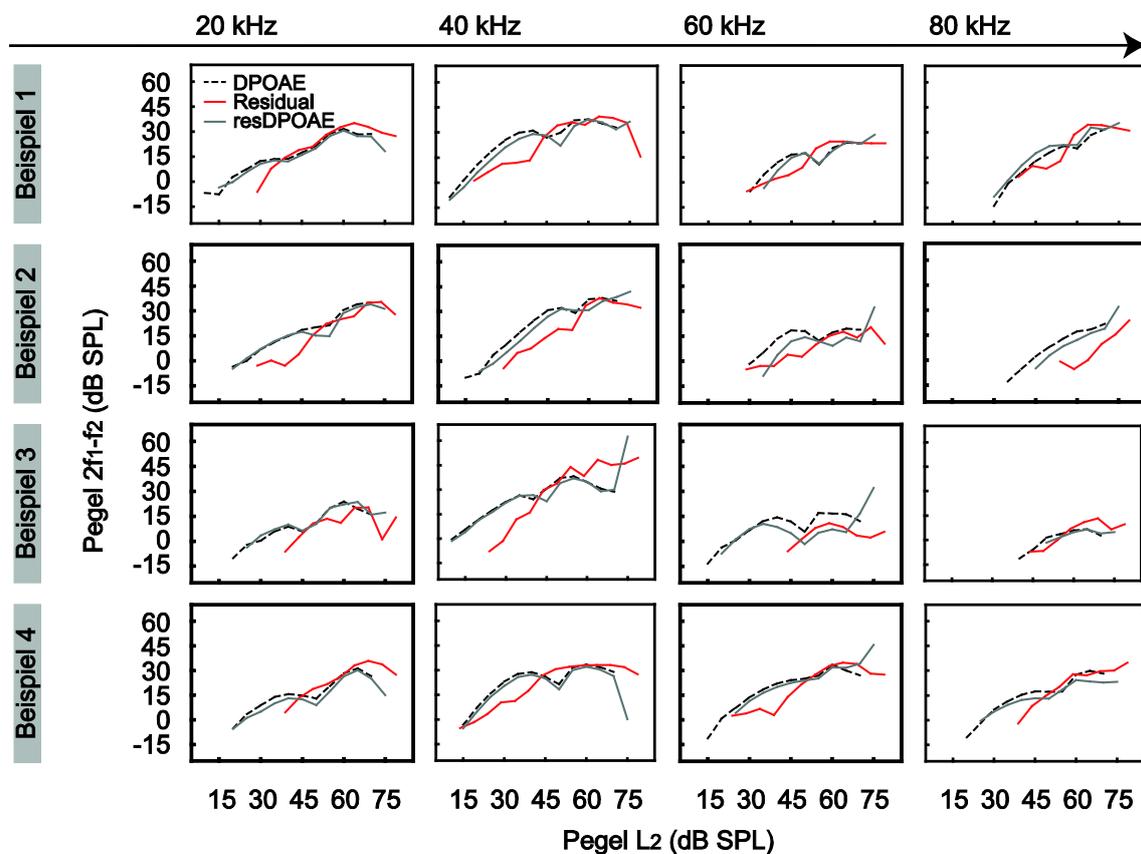


Abbildung 26: OAE-Residual-Messung mit Reintonstimulation. Dargestellt sind vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren jeweils für Stimulusfrequenzen von 20, 40 60 und 80 kHz. Aufgetragen sind alle Messpunkte, die 6 dB über dem Rauschniveau lagen.

### 3.5.2 Stimulation mit natürlichen Lauten

Im Anschluss an die Reintonstimulation wurden OAE-Residuale unter Verwendung von komplexen Stimuli gemessen. Hierfür wurden die in Abbildung 4 gezeigten artspezifischen Rufe (KR und EOR) der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*

verwendet. Die Rufe wurden in randomisierten Messreihen einzeln sowie in einer Abfolge von drei Lauten mit einem Interstimulusintervall von 1 ms abgespielt. Im Folgenden sind für jede dieser Messreihen vier Beispiele aufgeführt, welche die aufgetretene Variabilität der gemessenen Daten widerspiegelt. Alle folgenden prozentualen Angaben beziehen sich auf die Amplitude der durch die Soundkarte erfassbaren Maximalamplitude. Die temporäre Spitzenamplitude liegt bei 94 dB SPL.

Abbildung 27 zeigt anhand von vier Beispielen die aufgenommenen Daten nach Applikation eines einzelnen KR. Während die Betrachtung des Stimulussignals noch eine annähernd vergleichbare Amplitude mit einer gemittelten Maximalamplitude von 7,4% zeigt, unterscheiden sich die berechneten OAE-Residuale deutlich voneinander. Hier umfassen die Maximalamplituden einen Bereich von 2,2 bis 8,3%.

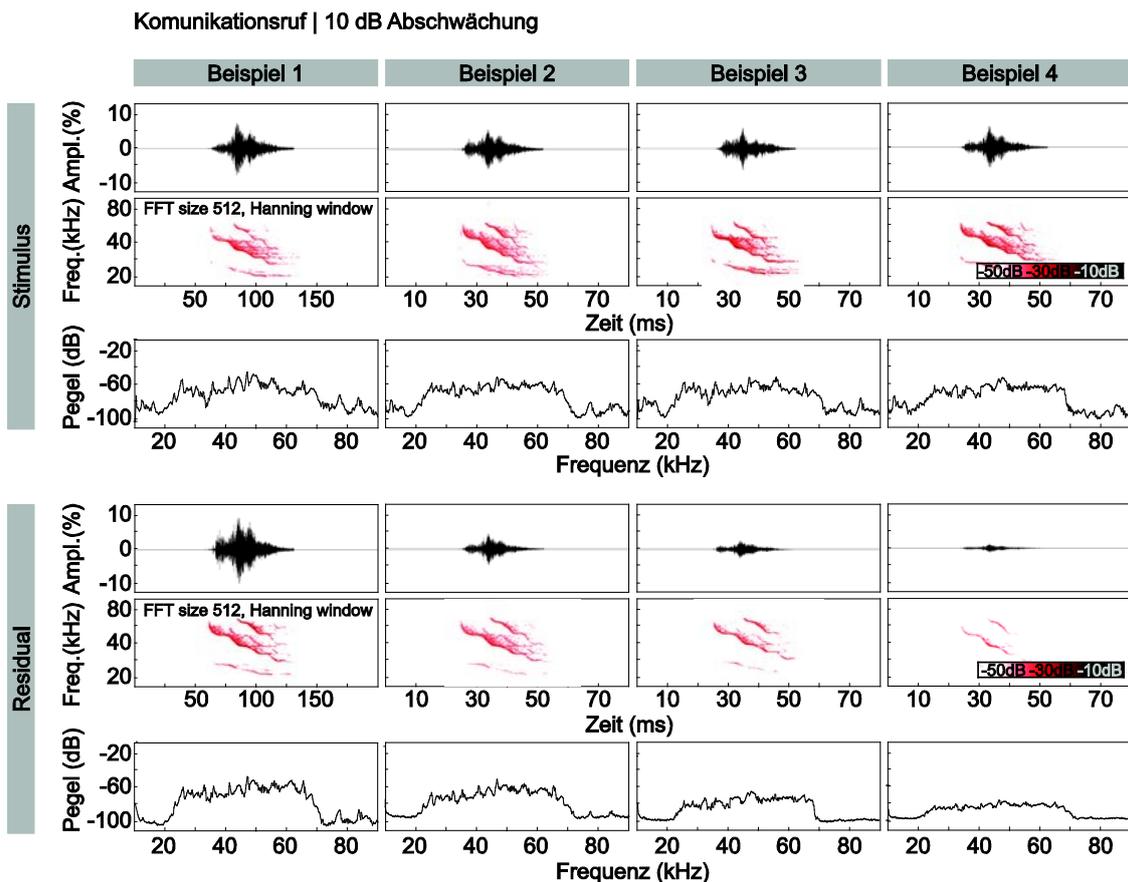


Abbildung 27: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

Die Beschallung mit drei aufeinander folgenden KR (Abbildung 28) zeigt ein anderes Bild. Hier variieren bereits die aufgenommenen Amplituden des Stimulussignals deutlich. Weiterhin lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Amplitudenhöhe des Stimulussignals und des berechneten OAE-Residuals erkennen. So liegt die Maximalamplitude des Stimulussignals in Beispiel 2 bei 2,8% und die des OAE-Residuals bei 8,3% während die Maximalamplituden des Stimulussignals in Beispiel 4 bei 5,8% und die des OAE-Residuals bei 2,6% liegen.

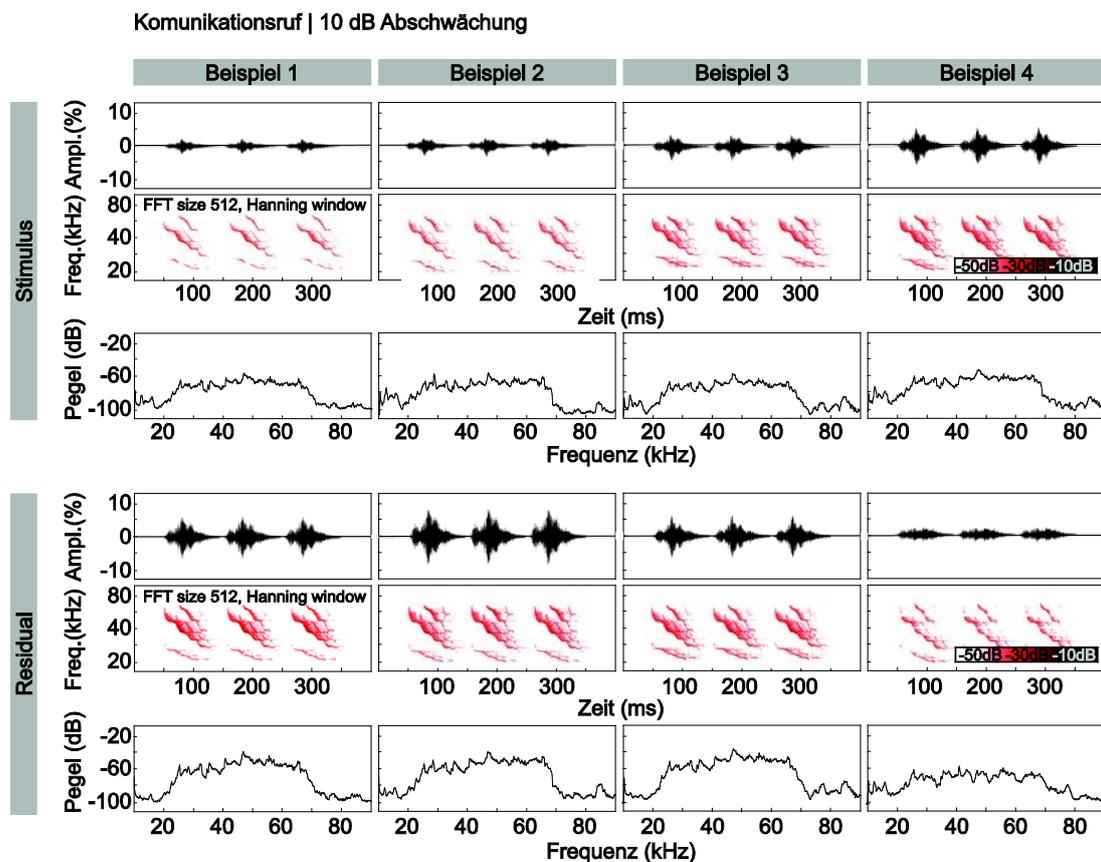


Abbildung 28: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei aneinandergereihten KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

Weitere vier Datensätze, in diesem Fall nach Beschallung der Fledermaus mit einem einzelnen EOR, sind in Abbildung 29 dargestellt. Vergleichbar mit den Daten nach Applikation des einzelnen KR's weisen die Stimulussignale eine ähnliche Amplitude von im Mittel 8,9% auf. Auch die Maximalamplitude des OAE-Residuals umfasst,

ähnlich der Daten nach Stimulation mit dem einzelnen KR, einen Bereich von 1,7% bis 6,2%.

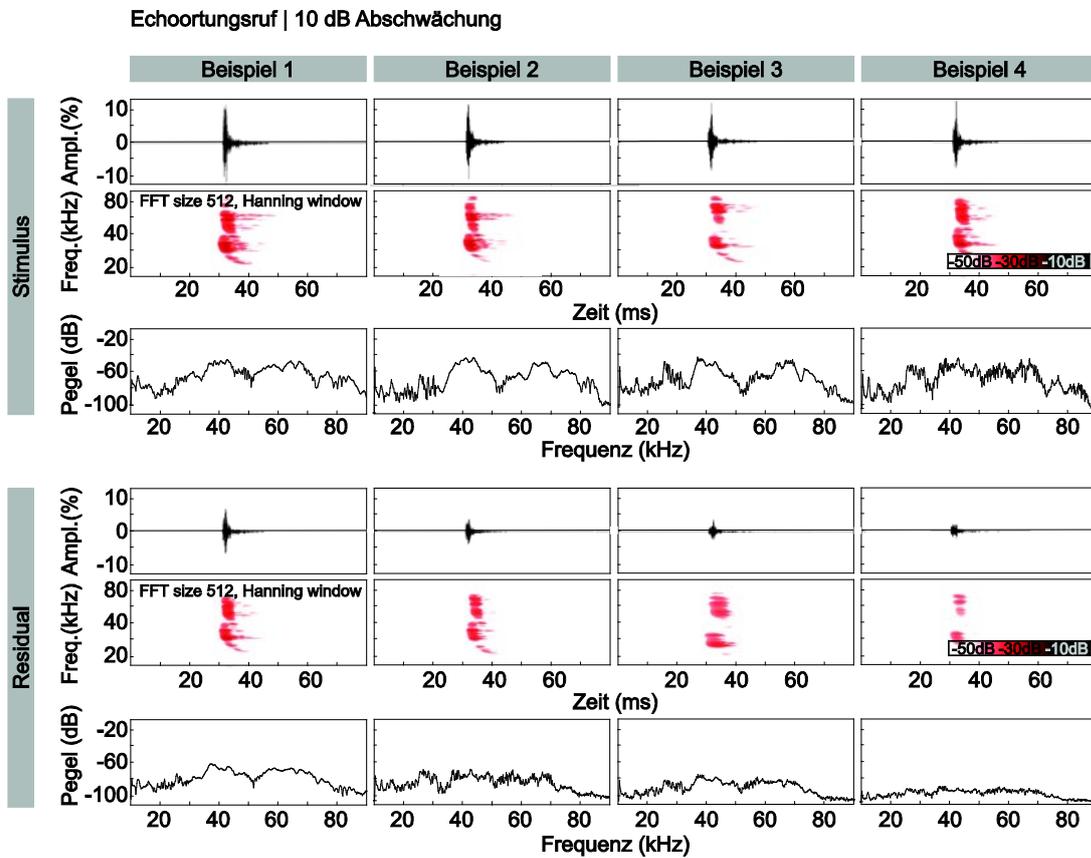


Abbildung 29: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen EOR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

Eine stärkere Variabilität ist bei den Ergebnissen der Stimulation mit drei aufeinanderfolgenden ER in Abbildung 30 zu erkennen. Wie nach Beschallung mit einem einzelnen KR oder EOR sind die Amplituden des Stimulussignals vergleichbar. Sie liegen im Mittel bei 8,9%. Eine Auffälligkeit ist, dass sich bei den berechneten OAE-Residualen die Amplituden der einzelnen Signale ändern. Während in Beispiel 1 sowie Beispiel 3 die Maximalamplituden der drei Einzelsignale vergleichbar sind, steigt die Amplitude der Einzelsignale in Beispiel 2 an. Das berechnete OAE-Residual des ersten Signals hat eine Amplitude von 1,5%, die des zweiten Signals beträgt 6,8% und die des dritten Signals 9,0%. In Beispiel 4 hingegen sind die Amplituden des OAE-

Residuals des ersten und dritten Signals mit 3,5% sowie 3,4% vergleichbar, während die des zweiten Signals einen Wert von 6,7% annimmt.

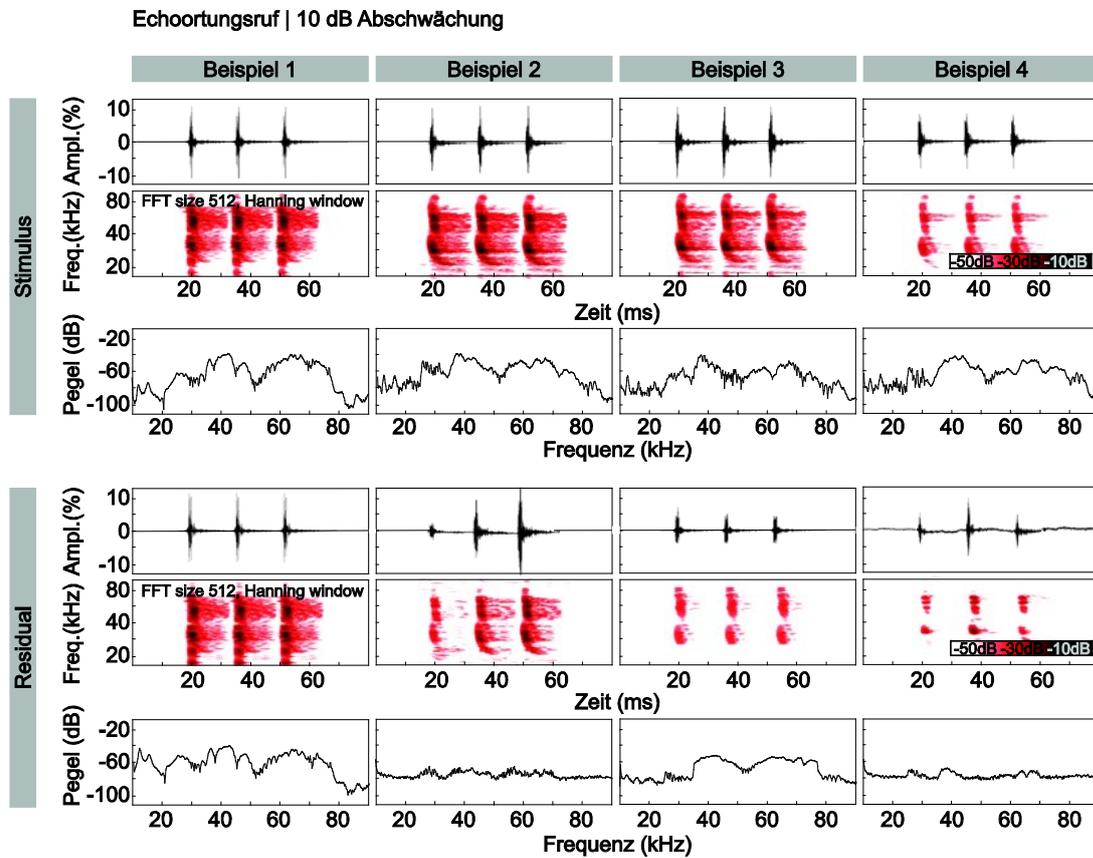


Abbildung 30: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei aneinandergereihten EOR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von KAS auf DPOAEs

Die Hauptmotivation hinter den vorliegenden Versuchen war die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der ipsilateral gemessenen DPOAE-Pegel durch KAS. Besonders interessant war die Fragestellung, ob verschiedene kontralaterale Stimuli unterschiedliche Beeinflussungen hervorrufen und weiterhin ob es einen Unterschied in der DPOAE-Beeinflussung durch arteigene und artifizielle Laute gibt.

Die Ergebnisse des Teilprojektes I dieser Studie zeigen deutlich, dass sich die Verarbeitungsmechanismen zwischen artifiziellen und arteigenen Stimuli unterscheiden. Während die Stimulation mit dem verwendeten artifiziellen BBR eine starke Suppression der DPOAE-Pegel über den gesamten Frequenzbereich verursacht, treten nach der Stimulation mit allen arteigenen Stimuli ausschließlich frequenzspezifische Suppressionen ab 50 kHz auf. Die Pegelreduktion der DPOAE unter Verwendung von BBR als kontralateralen Stimulus ist über den gesamten Frequenzbereich nahezu konstant und erreicht sogar bei 30 kHz ein Suppressions-Maximum von 37,3 dB. Alle drei getesteten arteigenen Rufe bewirken im tieferen Frequenzbereich zwischen 20 und 50 kHz und bei einem  $L_2$ -Pegel von 40 dB SPL eine im Mittel um 5,9 dB (CC = 5,8 dB, EC = 6,2 dB, CES = 5,9 dB) geringere Suppression und bei einem  $L_2$ -Pegel von 60 dB SPL sogar eine im Mittel um 8,2 dB (CC = 7,3 dB, EC = 8,1 dB, CES = 9,3 dB) geringere Suppression des DPOAE-Pegels als bei Frequenzen über 50 kHz. In der Literatur gibt es bislang nur wenige Studien, die Rückschlüsse auf eine Frequenzselektivität efferenter Einflüsse auf die Innenohrmechanik zulassen (Chang und Norton, 1997; Lilaonitkul und Guinan, 2009a and 2009b). In der Wüstenrennmaus sind derartige frequenzspezifische Effekte bei kontralateraler Reintonstimulation besonders ausgeprägt für die  $f_2$ - $f_1$  DPOAE (Abel et al., 2009; Althen et al., 2012). Hinsichtlich der Kochleaanatomie der Katze wurde beschrieben, dass die Anzahl der efferenten Fasern von der Basis bis hin zum Apex zunimmt (Lieberman et al., 1990), was auf Grund der Tonotopie innerhalb der Kochlea auf frequentielle Unterschiede in der Verarbeitung hindeutet. Für Fledermäuse ist eine derartige Spezialisierung allerdings nicht bekannt. Auch die in dieser Studie durchgeführten histologischen

Untersuchungen der Kochlea von *C. perspicillata* geben keinen Hinweis auf eine Zunahme der efferenten Fasern entlang der Kochlea (Kapitel 3.4). Diskutiert werden weiterhin Einflüsse der Bandbreite des verwendeten kontralateralen Stimulus. BBR wurde schon in einer Vielzahl von Studien an unterschiedlichen Versuchstieren als kontralateraler Stimulus verwendet (Katze: Puria et al., 1996; Meerschweinchen: Kujawa et al., 1993, 1994; Mensch: Berlin et al., 1993; Fledermaus: Drexl et al., 2003). Dabei stellte sich heraus, dass die Bandbreite des jeweiligen Rauschstimulus einen erheblichen Einfluss auf die Suppression der DPOAE-Pegel ausübt. Je mehr Frequenzen das BBR umfasst, desto geringere Amplituden reichen aus, um den DPOAE-Pegel zu senken (Hennig, 2014). Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass ein BBR größerer Bandbreite eine größere Anzahl an MOK-Eingängen anregt (Maison et al., 2000). Generell aktivieren breitbandige Stimuli eine größere Zahl von MOK-Eingängen als spektral schmalbandigere Stimuli. Das in dieser Studie verwendete BBR hatte eine Zentrumsfrequenz von 47,5 kHz und das Rauschen erstreckte sich über zwei Oktaven, wodurch nahezu der gesamte ipsilaterale DPOAE-Messbereich abgedeckt werden konnte. Die arteigenen Laute deckten ebenfalls einen Großteil des relevanten Frequenzbereiches ab. Die gefundenen Unterschiede in der Wirkung von artifiziellem BBR und den arteigenen Rufen lassen sich daher nicht auf eine unterschiedliche räumliche Zusammenfügung der jeweiligen aktivierten MOK-Eingänge zurückführen. Ebenfalls gegen diese Erklärung spricht, dass die Effekte der arteigenen Stimuli nahezu vergleichbar sind obwohl sich die Stimuli untereinander deutlich unterscheiden. Der maßgebliche Unterschied der einzelnen arteigenen Laute im Vergleich zum artifiziellem BBR liegt in der Amplitudenmodulation. Zwar nehmen die Amplitudenfluktuationen mit der Bandbreite des verwendeten Rauschstimulus zu (Gummer et al., 1988), eine derartige Modulation, wie sie bei den arteigenen Lauten vorliegt, wird allerdings nicht erreicht. Es kann daher angenommen werden, dass die Amplitudenmodulation der kontralateral applizierten Stimuli einen maßgeblichen Einfluss auf die Art der neuronalen Weiterverarbeitung ausübt. Generell kann davon ausgegangen werden, dass für die Wahrnehmung einer Amplitudenmodulation deren zeitliche Struktur genutzt wird (Kohlrausch et al., 2000). Daraus ergibt sich, dass die Analyse der zeitlichen Signalstruktur innerhalb der aufsteigenden Hörbahn für die Art und Weise der kontralateralen Beeinflussung von Bedeutung ist.

#### 4.1.1 Zeitverlauf efferenter Effekte

Um einen Eindruck über den Zeitverlauf der Effekte durch kontralaterale Beschallung zu bekommen, wurden über 3 s DPOAE bei konstanten Pegeln gemessen und innerhalb dieses 3-sekündigen Fensters für 1 s kontralateral stimuliert. Zu erkennen ist deutlich, dass eine KAS mit arteigenen Rufen keine supprimierenden Effekte auf den ipsilateral gemessenen DPOAE-Pegel bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz ausübt. Bei der Stimulation mit  $f_2$ -Frequenzen ab 40 kHz sind die Stärke der Effekte sowie der zeitliche Verlauf der Effekte zwischen artifiziellen Lauten und arteigenen Lauten vergleichbar. Die während der Erfassung der DPOAE-Wachstumsfunktionen (Teilprojekt I) beobachtete Frequenz-spezifität tritt bei diesen Versuchen nur bedingt auf. Weiterhin unterscheiden sich die Daten im Vergleich zu Teilprojekt I in der Stärke der auftretenden Effekte. Bei Stimulationen mit einem kontralateralen Stimulus von 60 dB SPL wird der  $2f_1-f_2$  Pegel für eine  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz im Mittel um 4,4 dB supprimiert. Bei den durchgeführten Wachstumsfunktionen lag die Stärke der Suppression des  $2f_1-f_2$  Pegels bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und bei 40 dB SPL  $L_2$ -Pegel im Mittel bei 13,7 dB. Anzunehmen ist, dass es für die Beeinflussung des DPOAE-Pegels über das MOK-System eine Rolle spielt, ob der kontralaterale Stimulus konstant über die Gesamtdauer der Messung appliziert wird oder ob er lediglich für ein kurzes Zeitintervall vorgespielt wird. Der Wirkweise des efferenten Systems kommt demnach eine zeitliche Komponente zu, welche einen Einfluss auf die Effektstärke zu haben scheint. Diesbezüglich werden in der Literatur zwei zeitlich unterschiedlich einsetzende Effekte während kontralateraler akustischer Stimulation diskutiert (Sridhar et al., 1997; Cooper und Guinan, 2003). Zum einen der „schnelle Effekt“, welcher innerhalb von 50 bis 100 ms nach Aktivierung der KAS einsetzt. Dieser ist auf einen direkten Kalziumeinstrom in die Zelle zurückzuführen, der über kalziumabhängige Ionenkanäle einen Kaliumausstrom bewirkt, was letztendlich zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt (Oliver et al., 2000). Zum anderen der „langsame Effekt“, dessen Auswirkungen erst 25 bis 50 s nach Einsetzen der KAS zu verzeichnen sind (Sridhar et al., 1995). Dieser Effekt basiert auf der Verwendung von Kalzium als sekundären Botenstoff. In diesem Fall erfolgt eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration bei akustischer Reizung. In den hier präsentierten Ergebnissen aus Teilprojekt II erfolgt nach Anschalten des kontralateralen Signals eine direkte

Suppression der ipsilateralen DPOAE-Pegel, welche über die gesamte Dauer der KAS konstant vorliegt. Nach Beendigung der KAS steigt der Pegel der  $2f_1$ - $f_2$ -Emission wieder auf seinen ursprünglichen Wert. Die aufgetretenen Suppressionen sind alle auf den beschriebenen „schnellen Effekt“ zurückzuführen. Die kontralaterale Stimulation erfolgte über eine Dauer von 1 s und die Gesamtlänge der Messung betrug 3 s, wodurch eine Einflussnahme des „langsamen Effekts“ ausgeschlossen werden kann.

#### 4.1.2 Einflussnahme der verwendeten Narkose

In der vorliegenden Studie wurde weiterhin überprüft, welchen Effekt die verwendete Ketamin-Xylazin-Narkose auf die Prozesse innerhalb des Hörvorgangs ausübt. Dafür wurden sämtliche Versuchstiere im wachen Zustand sowie unter Einflussnahme des in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Anästhetikums gemessen.

Wie vorangegangene Studien bereits vermuten ließen, war davon auszugehen, dass die verwendete Narkose einen Einfluss auf mehrere der untersuchten Vorgänge, wie beispielsweise die DPOAE-Generierung im Innenohr, sowie die neuronale olivokochleäre Aktivität im efferenten System, haben könnte. An *Carollia perspicillata* konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung von Narkose höhere DPOAE-Pegel generiert werden als im wachen Tier (Schlenter et al., 2014). Weiterhin ist deutlich zu erkennen, dass die DPOAE-Pegel narkotisierter Tiere keinerlei Suppression durch KAS zeigen, während bei wachen Versuchstieren KAS-induzierte Suppressionen bis zu 37,3 dB erreicht werden. Es ist daher anzunehmen, dass die verwendete Ketamin-Xylazin-Narkose einen beträchtlichen Einfluss auf das MOK-System sowie die Haarsinneszellen innerhalb der Cochlea nimmt.

Die Wirkstoffkombination aus Ketamin und Xylazin ist in der Tiermedizin ein weit verbreitetes Narkosemittel. Ketamin wurde hauptsächlich synthetisiert, um ein Narkosemittel zu erhalten, welches trotz sedativer Wirkung die Herzfrequenz und Atmung nicht maßgeblich beeinträchtigt (Crossen und Domino, 1966). Zwar sind die komplexen biochemischen sowie die elektrophysiologischen Mechanismen, die einer Ketaminanästhesie zu Grunde liegen, noch nicht abschließend geklärt, allerdings wird der maßgebende Wirkmechanismus in einer Blockade des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptors) gesehen (Irifune et al., 1992; Klepstad et al., 1990; Øye

et al., 1992). NMDA-Rezeptoren gehören zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. Ketamin hat am NMDA-Rezeptor eine nichtkompetitiv antagonistische Wirkung und beeinflusst auch das cholinerge System, indem es die NMDA-Rezeptor-abhängige ACh-Esterase-Freisetzung verhindert (Harrison und Simmonds, 1985). Die Auswirkungen einer Ketaminbasierten Narkose sind hauptsächlich eine Hemmung des Kortex und des Thalamus sowie eine gleichzeitige Erregung des limbischen Systems (Schmid, 1980). Eine alleinige Verwendung von Ketamin löst bei zahlreichen Tierarten krampfartige Zustände aus (Löscher et al., 1997), weshalb es nahezu ausschließlich in Kombination mit  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten oder Benzodiazepinen verwendet wird (Hall und Clarke, 1991). Xylazin, einer der ersten in der Veterinärmedizin verwendeten  $\alpha 2$ -Adrenozeptor-Agonisten (Berthelsen und Pettinger, 1977; Hsu, 1981), wird auf Grund seiner Wirkung als Sedativum, Analgetikum und Muskelrelaxans häufig in Verbindung mit Ketamin verwendet (Burns und McMullan, 1972; Clark und Hall, 1969; Yates, 1973). Riskante Nebenwirkungen von Ketamin, wie Tachykardie, Hypertonie und erhöhter Muskeltonus, können auf diese Weise entgegengewirkt werden (Haskins und Klide, 1992).

Trotz der häufigen Verwendung einer Ketamin-Xylazin-Narkose sind die möglichen Auswirkungen auf Messergebnisse schon lange Gegenstand von Diskussionen. Die beeinflussten NMDA-Rezeptoren und  $\alpha 2$ -Adrenozeptoren sind im zentralen Nervensystem weit verbreitet, wodurch die verwendete Narkose die Aktivität der efferenten Fasern indirekt beeinflussen könnte. Die durch Ketamin hauptsächlich blockierten NMDA-Rezeptoren finden sich sogar im Bereich der Haarsinneszellen in der Kochlea (Eybalin, 1993). Innerhalb der Hörforschung wurde schon früh der Einfluss einer Ketamin-Xylazin-Narkose auf die OAE-Evozierung untersucht. Zwar beschreiben Schwender und seine Kollegen in den Jahren 1989 sowie 1993, dass im Unterschied zu anderen Anästhetika die Verarbeitung akustischer Stimuli bis hin zum primären auditorischen Kortex unter Ketamineinfluss erhalten bleibt und daher eine Unterdrückung der auditiven Information erst auf höherer kortikaler Ebene stattfinden müsse, allerdings zeigte Charles Liberman ebenfalls im Jahr 1989, dass sich die Aktivität des vorrangig hemmend wirkenden olivo-kochleären Systems in Abhängigkeit der Narkosetiefe verringert. Dies führte zu einer Erhöhung der OAE-Amplitude, wodurch ähnlich wie sie auch bei den vorliegenden Daten an *Carollia perspicillata* ab

mittellauten Primärtonpegeln auftritt. Auch Harel und seine Kollegen (1997) führten die Erhöhung der OAE-Amplitude am Chinchilla unter Narkoseeinfluss auf eine Hemmung der Aktivität des efferenten Systems zurück. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, wie oben beschrieben, vorrangig zwei Effekte, welche auf die Wirkung der verwendeten Narkose zurückzuführen sind. Zum einen sind die Pegel der gemessenen  $2f_1-f_2$  Emission unter Narkoseeinfluss höher als im wachen Zustand und zum anderen sind keine KAS verursachten Suppressionen des DPOAE-Pegels zu verzeichnen. Beide Effekte lassen sich durch eine Änderung der Kochleaphysiologie erklären, denn ACh ist der Haupttransmitter des efferenten Systems und Ketamin verhindert die NMDA-Rezeptor-abhängige ACh-Esterase-Freisetzung (Eybalin, 1993). Eine Ketamin-Xylazin-Narkose könnte so auf die Haarsinneszellen und den kochleären Verstärker wirken sowie das efferente System beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine Ketamin-Xylazin-Beeinflussung bereits in den frühen Stationen der aufsteigenden Hörbahn einsetzt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie konnten in den meisten anderen Studien eher geringe KAS-verursachte Effekte in narkotisierten Tieren gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass die Physiologie der Kochlea und des MOK-Systems bei *C. perspicillata* besonders stark von der verwendeten Narkose beeinflusst wird.

#### **4.1.3 Methodische Gesichtspunkte**

Im Folgenden werden zwei methodische Diskussionspunkte näher betrachtet. Diese sind zum einen eine mögliche Beeinflussung der erhobenen Messdaten durch einen akustischen Übersprecher, sowie zum anderen eine Beeinflussung der Messung durch eine Kontraktion der Mittelohrmuskeln des Tieres.

Ein akustischer Übersprecher würde für die durchgeführten Messungen bedeuten, dass bei der ipsilateralen DPOAE-Messung kontralateral verabreichte Schallsignale direkt aufgenommen werden und die Messung nicht über den efferenten Weg sondern über eine ipsilaterale akustische Supression beeinflussen. Dies könnte auf zwei unterschiedliche Weisen zu Stande kommen. Zum einen indem kontralateral applizierte Stimuli von außen über Luftschall das ipsilaterale Ohr erreichen und zum anderen über eine durch die Stimulation verursachte Gewebeschalleitung. Um einer akustischen

Beeinflussung über den Kopf des Tieres entgegen zu wirken, wurden beide verwendeten Kopplersysteme so konzipiert, dass getrennte Applikations- und Aufnahmekanäle im Gehörgang direkt vor dem Tympanum platziert wurden, was nahezu einer geschlossenen Stimulationssituation entspricht. Weiterhin ist wichtig, dass bei einer potentiellen Schallbeugung um den Kopf die Wellenlänge des jeweiligen Stimulus von Bedeutung ist. Wird bei einem akustischen Übersprecher von einer Koehlea zur anderen der dazwischen liegende Kopf als Hindernis bewertet, sollten höhere Frequenzen vom Kopf reflektiert werden. Der relevante Frequenzbereich dieser Studie liegt über 20 kHz, was die Annahme zulässt, dass in dem Falle, dass Schallwellen das nahezu geschlossene Messsystem verlassen sollten, diese nicht an das gegenüberliegende Ohr gelangen, sondern reflektiert werden. Ein mögliches Übersprechen durch Gewebeschalleitung kann nicht durch Optimierungen der Versuchsapparatur entgegen gewirkt werden. Deshalb kann auch eine Beeinflussung der Ergebnisse dieser Studie durch Gewebeschalleitung nicht direkt ausgeschlossen werden. In einem intakten Schädel wird der erzeugte Schall über den Knochen und Gewebeverbund zwischen den Koehleae übertragen. Grundlegend weist dieser Übertragungsweg tiefe Resonanzfrequenzen auf, was sich auch in den Untersuchungen von Sabine Reinfeld und ihren Kollegen (2007) widerspiegelt. In ihrer Studie über die Eigenschwingung des menschlichen Kopfes konnte gezeigt werden, dass knöcherne Strukturen eine tiefe Resonanzfrequenz von unter 10 kHz aufweisen. Auch wenn für die Fledermausspezies *C. perspicillata* keine konkreten Untersuchungen vorliegen, lässt sich vermuten, dass die Ergebnisse von Reinfeld und Kollegen (2007) auch auf andere Säugetiere übertragen werden können. Da innerhalb der vorliegenden Studie ein Frequenzbereich zwischen 20 und 90 kHz von Bedeutung war, kann davon ausgegangen werden, dass eine Beeinflussung der Messung durch Gewebeschalleitung ebenfalls zu vernachlässigen ist.

In die methodische Betrachtung muss in allen Fällen eine mögliche Beeinflussung der Messergebnisse durch eine Kontraktion der Mittelohrmuskeln einbezogen werden. Dieser auch als MOM-Reflex bezeichnete Vorgang wird oftmals als Schutzmechanismus des Ohres vor Schallstimuli mit hohen Pegeln beschrieben (zur Übersicht siehe Gelfand, 1984). Vor allem der *M. stapedius* ist auf Grund seiner direkten Verbindung zu den Mittelohrknochen in der Lage die Schwingungsfähigkeit

---

des *Stapes* zu vermindern und so eine Verschlechterung der Schallübertragung zu verursachen (Pang und Peak, 1986). Sobald die Pegelschwelle zur Auslösung des MOM-Reflexes an einem Ohr überschritten wird, setzt die verursachte Kontraktion des *M. stapedius* in beiden Ohren ein. Für die vorliegende Studie bedeutet diese binaurale Wirkweise des MOM-Reflexes, dass sowohl die ipsilaterale DPOAE-Messung als auch die kontralaterale akustische Stimulation eine Kontraktion der MOM hervorrufen könnten.

In der Literatur sind zahlreiche Studien über den MOM-Reflex bei verschiedenen Säugetieren zu finden. Gemeinhin werden zur Auslösung des Reflexes Schallpegel von über 70 dB SPL angegeben, was seiner Funktion als Schutzmechanismus entsprechen würde (z. B. Mensch: > 72 dB SPL, Gelfand, 1984; Ratte: > 75 dB SPL, Pilz et al., 1997; Fledermaus: > 75 dB SPL, Henson et al., 1995). Auch wenn für die Fledermausspezies *C. perspicillata* keine expliziten Daten vorliegen, kann davon ausgegangen werden, dass die von Henson und seinen Kollegen (1995) erhobenen Werte für die Fledermausspezies *Pternotus parnelii* auch für *C. perspicillata* zutreffen sollten. In Teilprojekt I wurden zur Erhebung der DPOAE-Wachstumsfunktionen maximale  $L_1$ -Pegel von 80 dB SPL verwendet. Dieser Wert liegt zwar oberhalb der angegebenen Kontraktionsschwelle des MOM-Reflexes, allerdings sind bereits bei geringen ipsilateralen Stimulationspegeln deutliche Suppressionen des DPOAE-Pegels bei wachen Tieren unter kontralateraler Beschallung festzustellen. Daher wird eine Beeinflussung durch den MOM-Reflex ausgeschlossen. Der Maximalpegel der kontralateralen Stimuli wurde in Teilprojekt I auf 50 dB SPL gesetzt, weshalb die Auslösung des MOM-Reflexes durch die kontralaterale Messung ebenfalls ausgeschlossen werden kann. In Teilprojekt II wurden die Stimulationspegel der ipsilateralen DPOAE-Messung auf  $L_1 = 50$  dB SPL und  $L_2 = 40$  dB SPL festgesetzt, während auf kontralateraler Seite maximale Stimulationspegel zwischen 40 und 70 dB SPL getestet wurden. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, treten suppressive Effekte auch hier bereits bei geringeren kontralateralen Stimulationspegeln auf, was auch in diesem Teilprojekt eine Einflussnahme auf die Ergebnisse durch Auslösung des MOM-Reflexes unwahrscheinlich macht. Betrachtet man des Weiteren die Frequenzabhängigkeit des MOM-Reflexes, so ist bekannt, dass er die Eigenschaft eines Hochpassfilters aufweist. Das bedeutet, dass eine Kontraktion der MOM vor allem die

Transmission tiefer Frequenzen im Mittelohr behindert. Diese Eigenschaft wurde bereits bei einigen Säugern, darunter auch Fledermäuse, nachgewiesen. Bei Fledermäusen tritt demnach eine maximale Abschwächung kochleärer Aktivität durch die Mittelohrmuskel kontraktionen bei 20 kHz auf (Pollak und Henson, 1973). Da in dieser Studie die ipsilateralen DPOAE, zumindest unter Verwendung von BBR als kontralateralen Stimulus, über den gesamten Frequenzbereich hinweg durch KAS beeinflusst wurden, stellt dies ein weiteres Indiz dar, dass eine Beeinflussung durch die MOM vernachlässigt werden kann.

#### **4.1.4 Schlussfolgerung über die Einflussnahme von kontralateraler akustischer Stimulation auf DPOAEs**

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe unterschiedlicher Methoden einzelne Mechanismen innerhalb des Hörprozesses der Fledermausspezies *C. perspicillata* näher beleuchtet. Der Fokus lag dabei auf der Verwendung von arteigenen Lauten, wie Kommunikations- und Echoortungsrufen. Die Verarbeitungsmechanismen des Innenohrs bei Applikation von sogenannten komplexen Stimuli sind noch nicht ausreichend geklärt, da innerhalb der Hörforschung hauptsächlich mit artifiziellen Stimuli gearbeitet wird. Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen, liegen deutliche Unterschiede zwischen der Beeinflussung der ipsilateral gemessenen DPOAE-Pegel von kontralateral applizierten artifiziellen und arteigenen Lauten vor. Verschiedene Messansätze zeigten jeweils eine efferente Beeinflussung der gemessenen  $2f_1-f_2$  Emission durch kontralateral applizierte Stimuli. Warum arteigene Stimuli eine andere efferente Beeinflussung der DPOAE-Pegel verursachen als beispielsweise artifizielles BBR konnte zwar nicht abschließend geklärt werden, allerdings liegt die Vermutung nahe, dass höhere Zentren der Hörbahn in diese Prozesse einbezogen sind. Durch die Aktivierung des efferenten Systems ist nicht nur das Innenohr als verarbeitendes Element involviert, sondern auch der *Nucleus cochlearis* und der *Nucleus olivaris superior*. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auch höhere Zentren der Hörbahn selektiven Einfluss auf die ablaufenden Prozesse nehmen und beispielsweise die Relevanz unterschiedlicher Stimuli bewerten.

Weiterhin wurde die Beeinflussung einer für die Forschung üblichen Ketamin-Xylazin-Narkose auf die untersuchten Prozesse im Hörvorgang geprüft. Es konnte

deutlich gezeigt werden, dass die verwendete Narkose bei *C. perspicillata* einen besonders starken Einfluss auf die Physiologie der Cochlea und das MOK-System ausübt. Sämtliche in wachen Tieren detektierten und durch KAS ausgelösten Suppressionen der DPOAE-Pegel wurden durch die Anästhesie unterdrückt. Ebenfalls lassen die Ergebnisse auf eine starke Beeinflussung des cochleären Verstärkers hindeuten, welcher durch die efferenten Synapsen an den ÄHZ auch auf eine Hemmung des efferenten Systems zurückzuführen sein könnte.

## 4.2 Histologie

Anhand der histologischen Schnittserien sollte das Vorhandensein efferenter Fasern in der Cochlea von *Carollia perspicillata* nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Thiocholinmethode wurde der Ort der Umsetzung des abbauenden Enzyms ACh-Esterase angefärbt, wodurch ein Rückschluss auf das Vorhandensein des maßgeblichen Transmitters des efferenten Systems ACh getroffen werden konnte. Anhand der Intensität der Thiocholinfärbung lässt sich gut erkennen, dass an den afferenten Dendriten unterhalb der IHZ eine größere Menge ACh-Esterase umgesetzt wird als an den ÄHZ. Eine quantitative Aussage über den efferenten Einfluss auf die Verarbeitung der verschiedenen Frequenzen ist mit den in dieser Studie vorliegenden Schnitten nicht möglich, da hierfür die räumliche Verteilung der Synapsen längs der Frequenzachse des Corti-Organs genau hätte erfasst werden müssen. Weiterhin sind alle ACh-Esterasehaltigen Strukturen in direkter Nachbarschaft nicht voneinander zu trennen, was eine Auszählung der einzelnen Fasern ausschließt. In vorangegangenen Studien an anderen Säugern konnte gezeigt werden, dass die ÄHZ mit bis zu neun efferenten Synapsen innerviert werden (Takasaka et al., 1983) und die Zahl der Synapsen pro ÄHZ von apikal nach basal zunimmt (Libermann et al., 1990). Bei Fledermäusen scheint diese Frequenzspezifität der efferenten Innervation nicht gegeben zu sein. Xie und seine Kollegen konnten im Jahr 1993 quantitative Daten aus der Cochlea von *P. parnellii* vorlegen, aus denen hervorging, dass pro ÄHZ eine einzelne große Synapse existiert. Auch wenn die vorliegenden Schnittserien keine quantitative Aussage zulassen, zeigen sie, dass kein deutlicher Unterschied in der Anzahl efferenter Fasern zwischen basalen und apikalen Bereichen der Cochlea besteht.

#### 4.2.1 Schlussfolgerung der histologischen Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen der beiden Kochleae von *C. perspicillata* dienen hauptsächlich dem Nachweis von efferenten Fasern innerhalb der Kochlea. Da einige Fledermausarten, hauptsächlich aus der Familie der Rhinolophidae (Bruns und Schmieszek, 1980), keine efferenten Synapsen an ihren ÄHZ besitzen, war der Nachweis für *C. perspicillata* innerhalb dieser Studie wichtig. Zwar konnten keine quantitativen Aussagen über die Anzahl der efferenten Fasern gezogen werden, aber die generelle Anwesenheit efferenter Synapsen an den ÄHZ wurde für *C. perspicillata* nachgewiesen. Ebenfalls lassen die Untersuchungen den Schluss zu, dass sich die Anzahl und der Verlauf der Fasern über die Länge der Kochlea nicht maßgeblich verändert. Durch den Nachweis der efferenten Fasern konnte die Basis für die Diskussionsgrundlage der kochleären Beeinflussung über das efferente System sowie der Narkosebeeinflussung gelegt werden. Zukünftig sollte über eine quantitative Auswertung der efferenten Fasern nachgedacht werden, damit genauere Rückschlüsse über den Verlauf und die Anzahl der Fasern innerhalb der Kochlea getroffen werden können.

#### 4.3 OAE-Residuale

Die Etablierung des OAE-Residual-Messparadigmas sollte eine Erweiterung des herkömmlich verwendeten DPOAE-Messverfahrens darstellen. Während bei bisherigen DPOAE-Messungen das Hauptaugenmerk auf der Untersuchung der Innenohrmechanik unter Verwendung von einfachen Schallstimuli lag, bietet das OAE-Residual-Paradigma die Möglichkeit die Innenohrmechanik mit Hilfe komplexer Stimuli zu analysieren. Die Verwendung von Reintönen innerhalb akustischer Versuche ist zwar weit verbreitet, stellt aber keine natürliche Schallsituation für das Ohr dar. Durch die frequenzspezifische Stimulation wird nur ein begrenzter Bereich der Kochlea angeregt, wodurch die Frage offen bleibt, ob sich das Innenohr bei der Signalverarbeitung bei einer zeitgleichen Anregung über den gesamten Frequenzbereich anders verhalten würde. Der in dieser Studie angewandte Versuchsansatz auf Basis des Messparadigmas von Keefe und Ling (1998) bietet die Möglichkeit sowohl Reintöne als auch komplexe, arteigene Stimuli zu verwenden. Das Paradigma beruht auf der Subtraktion von den am

Trommelfell gemessenen akustischen Signalen sowie den Trommelfellantworten auf einzelne Komponenten dieser Signale (Brass und Kemp 1991).

Vor der Verwendung der komplexen, arteigenen Stimuli sollte in einem ersten Schritt die Vergleichbarkeit der neuen und der herkömmlichen Messmethode bewertet werden. Dafür wurden in denselben Versuchstieren Pegelläufe mit der beschriebenen OAE-Residual-Methode mit einer Zweitonreizung sowie eine herkömmliche DPOAE-Messung durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Kurven der herkömmlichen DPOAE-Messung sowie die der aufgenommenen DPOAE während der OAE-Residual Messung bis auf leichte Amplitudenschwankungen, einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Dieses Resultat entspricht den Erwartungen für eine vergleichbare Messung, da die aufgenommenen Stimuli und DPOAEs der während der OAE-Residual-Messungen bei einer Zweitonreizung, denen der herkömmlichen DPOAE-Messung entsprechen sollen. Die Verläufe der berechneten Residualkurven unterscheiden sich deutlich von denen der während der Residualmessung direkt aufgenommenen DPOAEs, was auf Grund der durchgeführten Subtraktion ebenfalls zu vermuten war. Die Amplitude der OAE-Residuale verläuft in einer Vielzahl der Beispiele konträr zu denen der während der Messung direkt aufgenommenen DPOAEs. Das bedeutet, dass ein Pegelbruch in der Wachstumsfunktion der konventionell gemessenen DPOAE mit einem Amplitudenmaximum der OAE-Residuale einhergeht. Auch dieses Verhalten lässt sich auf die durchgeführte Residual-Berechnung zurückführen, was als Indikator für das fehlerfreie Arbeiten des neuen Paradigmas gewertet werden kann, zumindest was die Zweitonreizung anbelangt. Die Sensitivität sowie die Amplitudenverläufe der während der Residualmessung direkt erfassten DPOAE sind mit denen der herkömmlichen DPOAE-Messung vergleichbar. Auf Grund dieser Datenlage wurde im Anschluss mit der Stimulation mittels komplexer Töne begonnen. Durchgeführt wurden die Versuche mit zuvor aufgenommenen KR sowie EOR der Fledermausspezies *C. perspicillata*. Die Wahl der Stimuli zielte auf die Möglichkeit ab, eine Aussage über eine eventuelle Aufweitung oder Verschiebung des in der Cochlea selbst erzeugten spektralen Signals zu treffen. Mit Hilfe solcher Veränderungen könnten Rückschlüsse auf die weitergehende neuronale Verarbeitung sowie pegelabhängige zeitliche Dynamik der Residualentstehung gezogen werden. Um eventuelle zeitliche Effektkomponenten besser detektieren zu können, wurden die Rufe sowohl als Einzellaute als auch in einer

Abfolge von jeweils drei hintereinander gelegten Rufen abgespielt. Wie in den aufgetragenen Beispielen deutlich zu erkennen ist, variieren die individuellen Ergebnisse sehr stark. Die während der Residualmessung nochmals gemessenen Einzelrufe (KR und EOR) weisen zwar vergleichbare Amplituden auf, aber anhand der berechneten Residualdaten lässt sich kein wiederkehrendes Muster erkennen. In Beispiel 1 des einzeln applizierten KR liegen sogar im berechneten OAE-Residual höhere Amplituden vor als bei dem aufgenommenen Stimulus. Da sich die Residualberechnung allerdings auf eine Subtraktion von den am Trommelfell gemessenen akustischen Signalen sowie den Trommelfellantworten auf einzelne Komponenten dieser Signale bezieht, ist eine Erhöhung der Amplitude im Vergleich zu den Stimuli-Daten fragwürdig. Bei der Beschallung mit drei aneinander gesetzten Signalen liegen bereits bei den aufgenommenen Stimuli-Daten deutliche Amplitudenschwankungen vor. Wie auch bei Beispiel 1 des einzelnen KR, ist die Amplitude der Residualantwort in mehreren Fällen höher als die der Stimuli-Daten, was weiterhin Zweifel aufwirft. Bei der Analyse der EOR-Folge gab es eine interessante Auffälligkeit, die auf eine zeitliche Dynamik innerhalb der Residualentstehung hindeuten könnte. Wie anhand einiger Beispielen zu erkennen ist, werden die einzelnen Elemente der applizierten Stimuli unterschiedlich verarbeitet. Aber auch dieses Phänomen war über die Summe der Messungen nicht reproduzierbar.

#### **4.3.1 Methodische Gesichtspunkte**

Bei der methodischen Betrachtung des OAE-Residual-Paradigmas müssen alle in Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 beschriebenen Punkte ebenfalls in Erwägung gezogen werden. Ein möglicher akustischer Übersprecher, ein Narkosebedingter Effekt sowie eine Kontraktion der MOM könnten auch hier die Messungen beeinflusst haben. Aber wie bereits beschrieben, war auch in diesem Paradigma der Versuchsaufbau so angesetzt, dass die Kopplerspitze im Gehörgang direkt vor dem Tympanum saß, was nahezu einer geschlossenen Stimulationssituation entspricht. Daher ist auch während den OAE-Residual-Messungen eine Beeinflussung durch einen direkten akustischen Übersprecher als sehr gering einzuschätzen. Auch eine Beeinflussung der OAE-Residual-Amplituden durch die verwendete Narkose kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In Teilprojekt IV wurden alle Messungen unter Narkoseeinfluss durchgeführt, weshalb

keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit sich die Amplituden im Vergleich zu wachen Tieren verändert haben könnten. Allerdings würde eine Einflussnahme der Narkose nicht die in Kapitel 3.5.2 gezeigten Ergebnisse erklären. Vielmehr wäre mit einer gleichförmigen Beeinflussung zu rechnen. Diese könnte zwar individuelle Schwankungen aufweisen, aber es ist nicht davon auszugehen, dass die verwendete Narkose einzelne Komponenten der applizierten Stimuli unterschiedlich beeinflusst. Dies lässt den Schluss zu, dass die Ketamin-Xylazin-Narkose zwar die Amplitude der OAE-Residuale beeinflusst haben kann, die Schwankungen innerhalb einer Messung aber nicht auf diese zurückzuführen ist. Ähnlich verhält es sich mit der Kontraktion der MOM. Auch hier kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine ausgelöste Kontraktion der MOM nicht ausgeschlossen werden. Es könnte in der Tat sein, dass kurz auftretende Spitzenpegel der Stimuli ein komplexes und daher auch variables Kontraktionsverhalten der MOM evozieren. Dies konnte innerhalb dieser Studie leider nicht quantitativ verifiziert werden, da keine Möglichkeit bestand an der Fledermaus im Ultraschallbereich MOM-Effekte direkt zu messen.

Ein weiterer Punkt in der methodischen Betrachtung des OAE-Residual-Paradigmas ist die Art und Weise der Stimulusapplikation. Dieser kann auf zwei unterschiedliche Wege erfolgen, zum einen über die Präsentation der Schallstimuli über zwei getrennte Lautsprecherkanäle (siehe Kapitel 2.3) und zum anderen über die Präsentation der Stimuli über einen einzelnen Lautsprecherkanal. Während der ersten Variante besteht die Möglichkeit, dass bei der gleichzeitigen Applikation der Signale 1 und 2 im dritten Zeitfenster akustische Auslöschungen innerhalb des Ohrkanals bzw. bereits im akustischen Koppler entstehen und damit das Grundsignal verändert wird. Diese Veränderung könnte im Zuge der OAE-Residual-Berechnung zu Verfälschungen der Ergebnisse führen. Innerhalb der zweiten Variante werden Signal 1 und 2 im Computer addiert und gemeinsam über einen Lautsprecher ausgegeben. Hier sind zwar die in Variante 1 möglichen Interferenzen ausgeschlossen, allerdings birgt diese Methode das Risiko von Artefakten durch Lautsprecherverzerrungen. Da dieses Risiko schwer abzuschätzen ist, wurde in der vorliegenden Studie die Applikation der Stimuli über zwei getrennte Lautsprecherkanäle bevorzugt. Den möglichen, auftretenden Interferenzen wurde durch einen optimierten Versuchsausbau entgegengewirkt. Damit es nicht innerhalb des akustischen Kopplers zu Auslöschungen kommt, wurde dieser so

konzipiert, dass zwei durchgehend getrennte Kanalwege für die einzelnen Lautsprecher vorhanden sind. Weiterhin wurde während der Messung darauf geachtet, dass die Spitze des Kopplersystems unmittelbar vor dem Tympanum des jeweiligen Versuchstiers platziert wurde, um zu verhindern, dass es innerhalb des Ohrkanals zu Interferenzen kommt.

#### **4.3.2 Schlussfolgerung der OAE-Residuale-Messungen**

Das Ziel des beschriebenen OAE-Residual-Projektes war eine möglichst vollständige Erfassung aller im Innenohr erzeugten Signalkomponenten bei Stimulation mit natürlichen Schallsignalen. Durch die Überarbeitung und Weiterentwicklung des von Keefe und Ling (1998) vorgestellten Paradigmas sollte sich die Möglichkeit ergeben die Bedeutung von Innenohreigenschaften unter natürlichen Hörbedingungen besser zu verstehen. Wie in den Vorversuchen unter Anwendung einer Zweitonreizung gezeigt werden konnte, ist das entwickelte Paradigma mit den herkömmlichen DPOAE-Messungen vergleichbar. Die Grundbedingungen für die weiterführenden Versuche sollten damit geebnet sein. Anhand der Stimulation mit komplexen Stimuli zeigen sich allerdings die Schwierigkeiten der neuen Methode. Die bisher erhobenen Daten zeigen keine klaren, reproduzierbaren Ergebnisse. Einzelne Beobachtungen weisen allerdings auf eine zeitliche Dynamik innerhalb der Residualentstehung hin, welche die potentiellen Möglichkeiten des neuen Verfahrens verdeutlicht.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abel C**, Wittekind A und Kössl M (2009): Contralateral Acoustic Stimulation Modulates Low-Frequency Biasing of DPOAE: Efferent Influence on Cochlear Amplifier Operating State? *J. Neurophysiol.* 101:2362-2371.
- Althen H**, Wittekindt A, Gaese B, Kössl M und Abel C (2012): Effect of contralateral pure tone stimulation on distortion emissions suggests a frequency-specific functioning of the efferent cochlear control. *J. Neurophysiol.* 107(7):1962-1969.
- Ashmore J** (2002): Biophysics of the cochlea - biomechanics and ion channelopathies. *Br Med Bul* 63:59-72.
- Ashmore J** (2008): Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev* 88(1):173-210.
- Békésy von G** (1960): Experiments in hearing. New York, McGraw-Hill.
- Berlin CI**, Hood LJ, Wen H, Szabo P, Cecola RP, Rigby P und Jackson DF (1993): Contralateral suppression of non-linear click-evoked otoacoustic emissions. *Hear Res* 71(1-2):1-11.
- Berthelsen S** und Pettinger WA (1977): A functional basis for classification of  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Life Sci* 21:596-606.
- Borg E** und Counter SA (1989): The middle-ear muscles. *Sci Am* 261(2):74-80.
- Brass D** und Kemp DT (1991): Time-domain observation of otoacoustic emissions during constant tone stimulation. *J Acoust Soc Am* 90:2415-2427.
- Brown AM** und Kemp DT (1984): Suppressibility of the 2f1-f2 stimulated acoustic emissions in gerbil and man. *Hear Res* 13(1):29-37.
- Brown MC** (1987a): Morphology of labeled efferent fibers in the guinea pig cochlea. *J of Comp Neurol* 260:605-618.
- Burns SJ** und McMullan WC (1972): Clinical application of Bay Va 1470 in the horse. *VMSAC* 67:77-79.

- Bruns V** und **Schmieszek E** (1980): Cochlear innervation in the greater horseshoe bat: demonstration of an acoustic fovea. *Hear Res* 3(1):27-43.
- Chang KW** und **Norton SJ** (1997): Efferently mediated changes in the quadratic distortion product ( $f_2-f_1$ ). *JASA* 102 (3): 1719-1733.
- Clark KW** und **Hall LW** (1969): Xylazine – A new sedative for horses and cattle. *Vet Rec* 85:512-517.
- Cooper NP** und **Guinan JJ** (2003): Separate mechanical processes underlie fast and slow effects of medial olivocochlear efferent activity. *J Physiol* 548(1):307-312.
- Counter SA**, **Borg E** und **Engström B** (1989): Acoustic middle ear reflex in laboratory animals using clinical equipment: technical considerations. *Audiology* 28:135-143.
- Crossen G** und **Domino F** (1966): Dissociative anaesthesia: further pharmacological studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581. *Anesth Analg Curr Res* 45:29-40.
- Dallos P**, **He DZ**, **Lin X**, **Sziklai I**, **Mehta S** und **Evans BN** (1997): Acetylcholine, outer hair cell electromotility, and the cochlear amplifier. *J. Neurosci.* 17(6):2212–2226.
- Dallos P** und **Fakler B** (2002): Prestin, a new type of motor protein. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2):104-111.
- Dannhof BJ** und **Bruns V** (1993): The innervating of the organ of Corti in the rat. *Hear Res* 66:8-22.
- DeRosier DJ**, **Tilney LG** und **Egelman E** (1980): Actin in the inner ear: the remarkable structure of the stereocilium. *Nature* 287:291-6.
- Dijk P van** und **Manley GA** (2001): Distortion product otoacoustic emissions in the tree frog *Hyla cinerea*. *Hear Res* 153(1-2):14-22.

- Dolan** TG und Abbas PJ (1985): Changes in the 2f1-f2 acoustic emission and whole-nerve response following sound exposure: long-term effects. *J Acoust Soc Am* 77:1475-1483.
- Dolan** DF und Nuttall AL (1988): Masked cochlear whole-nerve response intensity functions altered by electrical stimulation of the crossed olivocochlear bundle. *J Acoust Soc Am* 3:1081-1086.
- Drexl** M und Kössl M (2003): Sound-evoked efferent effects on cochlear mechanics of the mustached bat. *Hear Res* 184:61-74.
- Eybalin** M (1993): Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73(2):309-373.
- Faulstich** M, Kössl M und Reimer K (1996): Analysis of non-linear cochlear mechanics in the marsupial *Monodelphis domestica*: ancestral and modern mammalian features. *Hear Res* 94(1-2):47-53.
- Frank** G und Kössl M (1996): The acoustic two-tone distortions 2f1-f2 and f2-f1 and their possible relation to changes in the operating point of the cochlear amplifier. *Hear Res* 98(1-2):104-115.
- Friauf** E (2014): Editorial zum Thema Hören. In: *Neuroforum, Springer-Spectrum* 3.14 (S.238-239).
- Gehr** DD, Janssen T, Michaelis CE, Deingruber K und Lamm K (2004): Middle ear and cochlear disorders result in different DPOAE growth behaviour: implications for the differentiation of sound conductive and cochlear hearing loss. *Hear Res* 193(1-2):9-19.
- Geisler** CD (1974): Hypothesis on the function of the crossed olivocochlear bundle. *J Acoust Soc Am* 56(6):1908-1909.
- Gelfand** SA (1984): The contralateral acoustic-reflex threshold. In: *The acoustic reflex*, S. Silman (Hg.). Academic Press Inc (S. 137-186).

- Gold T** (1948): Hearing ii. the physical basis of the action of the cochlea. Proc R Soc B 135(881):492-498.
- Griffin DR** und Galambos R (1941): The sensory basis of obstacle avoidance by flying bats. J Exp Zool 86.
- Griffin DR** (1951): Audible and ultrasonic sounds of bats. Experientia 7:448-453.
- Griffin DR** und Novick A (1955): Acoustic orientation of neotropical bats. J Exp Zool 130:251-299.
- Griffin DR** (1958): Listening in the dark: the acoustic orientation of bats and men. New Haven: Yale University Press.
- Guinan JJ** (1996): Physiology of olivocochlear efferents. In: The cochlea, P. Dallos, A. N. Popper and R. R. Fay (Hg.). Springer, New York (S. 435-502).
- Guinan JJ** (2006): Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. Ear Hear 27(6):589-607.
- Gummer M**, Yates GK und Johnstone BM (1988): Modulation transfer function of efferent neurons in the guinea pig cochlea. Hear Res 36:41-51.
- Hall LW** und Clarke KW (1991): Veterinary Anaesthesia. 9. Aufl., W.B. Saunders Philadelphia.
- Hardy H**, Heimer L, Switzer R und Watkins D (1976): Simultaneous demonstration of horseradish peroxidase and acetylcholinesterase. Neurosci 3:1-5.
- Harel N**, Kakigi A, Hirakawa H, Mount RJ und Harrison RV (1997): The effects of anesthesia on otoacoustic emissions. Hear Res 110:25-33.
- Harris FP**, Lonsbury-Martin BL, Stagner BB, Coats AC und Martin GK (1989): Acoustic distortion products in humans: systematic changes in amplitude as a function of f2/f1 ratio. J Acoust Soc Am 85(1):220-229

- Harrison** WA, Dunnell JJ, Mascher K, Fletcher K, Vohr BR und Gorga MP (2000): Identification of neonatal hearing impairment: experimental protocol and database management. *Ear Hear* 21(5):357-372.
- Harrison** NL und Simmonds MA (1985): Quantitative studies on some antagonists of N-methyl D-aspartate in slices of rat cerebral cortex. *Br J Pharmac* 84:381-391.
- Hartley** DJ und Suthers RA (1987): The sound emission pattern and the acoustical role of the noseleaf in the echolocating bat, *Carollia perspicillata*. *JASA* 82(6):1892-1900.
- Haskins** SC und Klide AM (1992): Precautions when using ketamine for induction of anesthesia. *Vet Clin North Am, Small Anim Pract* 22:268-269.
- Hauser** R und Probst R (1991): The influence of systematic primary-tone level variation L2 - L1 on the acoustic distortion product emission - f2 in normal human ears. *J Acoust Soc Am* 89:280-286.
- Hennig** S (2013): Das efferente System und seine frequenzspezifische Modulation des cochleären Verstärkers bei der Fledermaus *Carollia perspicillata*. Dissertation im Fachbereich Biowissenschaften der Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Henson** OW, Xie DH, Keating AW und Henson MM (1995): The effect of contralateral stimulation on cochlear resonance and damping in the mustached bat: the role of the medial efferent system. *Hear Res* 86(1-2):111-124.
- Hoppe** W, Lohmann W, Markl H und Ziegler H (1982): *Biophysik*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Howard** J und Hudspeth AJ (1988): Compliance of the hair bundle associated with gating of mechano-electrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. *Neuron* 1:189-99.
- Hsu** WH (1981): Xylazine-induced depression and its antagonism by alpha adrenergic blocking agents. *J Pharmacol Exp Ther* 218:188-192.

- Irifune M, Shimizu T, Nomoto M und Fukuda T (1992):** Ketamine-induced anesthesia involves the N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex in mice. *Brain Res* 596:1-9.
- Janssen T und Gehr DD (2003):** Contralateral DPOAE suppression in humans at very low sound intensities. In: *Biophysics of the cochlea: From molecules to models*, A. W. Gummer (Hg.). World Scientific, Singapore (S. 498-505).
- Karnovsky MJ und Roots L (1964):** A “direct-coloring” thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12:219-222.
- Kawase T, Delgutte B und Liberman MC (1993):** Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J Neurophysiol* 70(6):2533-2549.
- Keefe DH (1998):** Double-evoked otoacoustic emissions: I. Measurement theory and nonlinear coherence. *J Acoust Soc Am* 103:3489-3498.
- Keefe DH und Ling R (1998):** Double-evoked otoacoustic emissions: II. Intermittent noise rejection, calibration and ear canal measurements. *J Acoust Soc Am* 103:3499-3508.
- Keefe DH, Alexander JM und Fitzpatrick DF (2009):** Speech-evoked otoacoustic emissions elicited by speech in quiet and noise. Abstracts of the 32nd Midwinter research meeting of the Assoc Res Otolaryngol (S. 183).
- Kemp DT (1978):** Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. *J Acoust Soc Am* 64(5):1386-1391.
- Kemp DT (2002):** Otoacoustic emissions, their origin in cochlear function, and use. *Br Med Bull* 63:223-241.
- Klepstad P, Maurset A, Moberg ER und Øye I (1990):** Evidence of a role for NMDA receptors in pain perception. *Hear Res* 187(3):513-518.
- Koay G, Heffner RS, Bitter KS und Heffner HE (2003):** Hearing in American leafnosed bats. II: *Carollia perspicillata*. *Hear Res* 178:27-34

- Koelle** GB und **Friedenwald** JS (1949): A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Exp Biol Med* 70: 617-622.
- Kohlrausch** A, **Fassel** R und **Dau** T (2000): The influence of carrier level and frequency on modulation and beat-detection thresholds for sinusoidal carriers. *J Acoust Soc Am* 108:723-734.
- Kössl** M (1992): High frequency distortion products from the ears of two bat species, *Megaderma lyra* and *Carollia perspicillata*. *Hear Res* 60(2):156-164.
- Kössl** M, **Möckel** D, **Weber** M und **Seyfarth** EA (2008): Otoacoustic emissions from insect ears: evidence of active hearing? *J Comp Physiol A* 194:597-609.
- Kujawa** SG, **Glatcke** TJ, **Fallon** M und **Bobbin** RP (1993): Contralateral sound suppresses distortion product otoacoustic emissions through cholinergic mechanisms. *Hear Res* 68(1):97-106.
- Kujawa** SG, **Glatcke** TJ, **Fallon** M und **Bobbin** RP (1994): A nicotinic-like receptor mediates suppression of distortion product otoacoustic emissions by contralateral sound. *Hear Res* 74(1-2):122-134.
- Lieberman** MC und **Brown** MC (1986) Physiology and anatomy of single olivocochlear neurons in the cat. *Hear Res* 24:17-36.
- Lieberman** MC (1989): Rapid assessment of sound-evoked olivocochlear feedback: suppression of compound action potentials by contralateral sound. *Hear Res* 38(1-2):47-56.
- Lieberman** MC, **Dodds** LW und **Pierce** S (1990): Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 301(3):443-460.
- Lilaonitkul** W und **Guinan** JJ (2009a): Reflex control of the human inner ear: a half-octave offset in medial efferent feedback that is consistent with an efferent role in the control of masking. *J Neurophysiol* 101:1394–1406.

- Lilaonitkul W** und Guinan JJ (2009b): Human medial olivocochlear reflex: effects as functions of contralateral, ipsilateral, and bilateral elicitor bandwidths. *J Assoc Res Otolaryngol* 10:459–470.
- Lonsbury-Martin BL**, Whitehead ML und Martin GK (1991): Clinical applications of otoacoustic emissions. *J Speech Hear Res* 34(5):964-981.
- Löscher W**, Ungemach FR und Kroker R (1997): Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren. 2. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Maison S**, Micheyl C, Andéol G, Gallégo S und Collet L (2000): Activation of medial olivocochlear efferent system in humans: influence of stimulus bandwidth. *Hear Res* 140:111-25.
- Maison S**, Micheyl C und Collet L (2001): Influence of focused auditory attention on cochlear activity in humans. *Psychophysiol* 38(1):35-40.
- Mills DM**, Norton SJ und Rubel EW (1993): Vulnerability and adaptation of distortion product otoacoustic emissions to endocochlear potential variation. *J Acoust Soc Am* 94(4):2108-2122.
- Mills DM** (1997): Interpretation of distortion product otoacoustic emission measurements. I. Two stimulus tones. *J Acoust Soc Am* 102:413-429.
- Mogdans J** und Schnitzler HU (1990): Range resolution and the possible use of spectral information in the echolocating bat, *Eptesicus fuscus*. *J Acoust Soc Am* 88:754.
- Mountain DC** (1980): Changes in endolymphatic potential and crossed olivocochlear bundle stimulation alter cochlear mechanics. *Science* 210(4465):71-72.
- Neuweiler G** (2000): The biology of bats. Oxford: Oxford University Press.
- Neuweiler G** (2003): Vergleichende Tierphysiologie Bd. 1 – Neuro- und Sinnesphysiologie. Spektrum Akad Verl, Berlin.
- Oliver D**, Klöcker N, Schuck J, Baukowitz T, Ruppertsberg JP und Fakler B (2000): Gating of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels controls fast inhibitory synaptic transmission at auditory outer hair cells. *Neuron* 26(3):595-601.

- Øye I, Paulsen O und Maurset A (1992):** Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 260:1209-1213.
- Pang XD und Peak WT (1986):** How do contractions of the stapedius muscle alter the acoustic properties of the ear? In: *Peripheral Auditory Mechanisms*, Allen JB, Hubbard A, Neely ST and Tubis A (Hg.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York (S.36-43).
- Pfalzer G und Kusch J (2003):** Structure and variability of bat social calls: implications for specificity and individual recognition. *J Zool* 261:21-23.
- Pickles JO (1988):** An introduction to the physiology of hearing (2. Aufl.). Academic Press.
- Pickles JO (1992):** Tip links and hair cells. *Curr Biol* 2:48-50.
- Pilz PK, Ostwald J, Kreiter A und Schnitzler HU (1997):** Effect of the middle ear reflex on sound transmission to the inner ear of rat. *Hear Res* 105(1-2):171-182.
- Pollak G und Henson OW (1973):** Specialized functional aspects of the middle ear muscles in the bat, *Chilonycteris parnellii*. *J Comp Physiol A* 84:167-74.
- Probst R und Hauser R (1990):** Distortion product otoacoustic emissions in normal and hearing-impaired ears. *Am J Otolaryngol* 11:236-243.
- Probst R, Lonsbury-Martin BL und Martin GK (1991):** A review of otoacoustic emissions. *J Acoust Soc Am* 89(5):2027-2067.
- Puria S, Guinan JJ und Liberman MC (1996):** Olivocochlear reflex assays: effects of contralateral sound on compound action potentials versus ear-canal distortion products. *J Acoust Soc Am* 99(1):500-507.
- Rajan R (1990):** Electrical stimulation of the inferior colliculus at low rates protects the cochlea from auditory desensitization. *Brain Res* 506(2):192-204.
- Rasmussen GL (1946):** The olivary peduncle and other fiber projections of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 84:141-216.

- Reinfeld S**, Stenfeld S, Good T und Håkansson B (2007): Examination of bone-conducted transmission from sound field excitation measured by threshold, ear-canal sound pressure, and skull vibrations. *J Acoust Soc Am* 121(3):1576-1587.
- Robles L** und Ruggero MA (2001): Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81(3):1305-1352.
- Russ JM**, Jones G, Mackie IJ und Racey PA (2004): Interspecific responses to distress calls in bats (Chiroptera: Vespertilionidae): a function for convergence in call design? *Anim Behav* 67:1005-1014.
- Russell IJ** und Lukashkin AN (2008): Cellular and molecular mechanisms in the efferent control of cochlear nonlinearities. In: Active processes and otoacoustic emissions, Manley GA, Fay RR und Popper AN (Hg.). Springer Verlag, New York (S.343-379).
- Schlenther D** und Kössl M (2012): Residual OAE measurements in the short-tailed fruit bat *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae). Abstracts of the 8<sup>th</sup> FENS Forum of Neuroscience, Barcelona
- Schlenther D**, Voss C und Kössl M (2014): Influence of ketamine-xylazine anaesthesia on cubic and quadratic high-frequency distortion-product otoacoustic emissions. *JARO* 15:695-705.
- Schmid A** (1980): Wirkungsmechanismus, pharmakologische Wirkungen und Nebenwirkungen von Ketamin-Hydrochlorid. *Tierärztl Prax* 8:5-12.
- Schuller G** und Pollak GD (1979): Disproportionate frequency representation in the inferior colliculus of doppler-compensating Greater Horseshoe Bats. Evidence for an acoustic fovea. *J Comp Physiol A* 132:47-54.
- Schwender D**, Klasing S, Keller I und Madler C (1989): Sensorische Informationsverarbeitung während Allgemeinanaesthetie: Der Effekt von Propofol und Ketamin auf die akustisch evozierten Potentiale mittlerer Latenz (AEPML). *Anaesthesist* 38:664-672.

- Schwender D**, Klasing S, Madler C, Pöppel E und Peter K (1993): Mid-latency auditory evoked potentials during ketamine anaesthesia in humans. *Br J Anaesth* 71:629-632.
- Siegel JH** und Kim DO (1982): Efferent neural control of cochlear mechanics? Olivocochlear bundle stimulation affects cochlear biomechanical nonlinearity. *Hear Res* 6(2):171-182.
- Sridhar TS**, Liberman MC, Brown MC und Sewell WF (1995): A novel cholinergic „slow effect“ of efferent stimulation on cochlear potentials in the guinea pig. *J Neurosci* 15(5.1):3667-3678.
- Sridhar TS**, Brown MC und Sewell WF (1997): Unique postsynaptic signaling at the hair cell efferent synapse permits calcium to evoke changes on two time scales. *J Neurosci* 17(1):428-437.
- Sterbing SJ** (2002): Postnatal development of vocalizations and hearing in the phyllostomid bat, *Carollia perspicillata*. *J Mammal* 83:516-525.
- Takasaka T**, Shinkawa H, Hashimoto S, Watanuki K und Kawamoto K (1983): High-voltage electron microscopic study of the inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 92:3-12.
- Taschenberger G**, Gallo L und Manley GA (1995): Filtering of distortion-product otoacoustic emissions in the inner ear of birds and lizards. *Hear Res* 91(1-2):87-92.
- Thies W**, Kalko EK und Schnitzler HU (1998): The roles of echolocation and olfaction in two neotropical fruit-eating bats, *Carollia perspicillata* and *C. castanea*, feeding on Piper. *Behav Ecol Sociobiol* 42:397-409.
- Ulanovsky N** und Moss CF (2008): What the bat's voice tells the bat's brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:8491-8498.
- Vater M**, Kössl M, Foeller E, Coro F, Mora E und Russll IJ (2003): Development of echolocation calls in the mustached bat, *Pternotus parnellii*. *J Neurophysiol* 90:2274-2290.

- Wittekindt A** (2009): Untersuchung der efferenten Beeinflussung der Innenohrfunktion durch Messung otoakustischer Emissionen. Dissertation im Fachbereich Biowissenschaften der Goethe-Universität in Frankfurt am Main.
- Xie DH** und **Henson OW Jr** (1998): Tonic efferent-induced cochlear damping in roosting and echolocating mustached bats. *Hear Res* 124:60-68.
- Xie DH**, **Henson MM**, **Bishop AL** und **Henson OW Jr.** (1993): Efferent terminals in the cochlea of the mustached bat: quantitativ data. *Hear Res* 66:81-90.
- Yates WD** (1973): Clinical uses of xylazine, a new drug of old problems. *VMSAC* 68:483-486.
- Zheng J**, **Shen W**, **He DZ**, **Long KB**, **Madison LD** und **Dallos P** (2000): Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405(6783):149-155.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis des Anhangs

Abbildung 31: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T2.....	92
Abbildung 32: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T3.....	93
Abbildung 33: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T5.....	94
Abbildung 34: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T6.....	95
Abbildung 35: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T8.....	96
Abbildung 36: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T9.....	97
Abbildung 37: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T2; narkotisiert)....	98
Abbildung 38: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T2; wach).....	99
Abbildung 39: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T2; narkotisiert)...	100
Abbildung 40: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T2; wach).....	101
Abbildung 41: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T2; narkotisiert)...	102
Abbildung 42: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T2; wach).....	103
Abbildung 43: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T2; narkotisiert)...	104
Abbildung 44: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T2; wach).....	105
Abbildung 45: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T3; narkotisiert)...	106
Abbildung 46: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T3; wach).....	107
Abbildung 47: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T3; narkotisiert)...	108
Abbildung 48: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T3; wach).....	109

Abbildung 49: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T3; narkotisiert)...110

Abbildung 50: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T3; wach).....111

Abbildung 51: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T3; narkotisiert)...112

Abbildung 52: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T3; wach).....113

Abbildung 53: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T5; narkotisiert)...114

Abbildung 54: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T5; wach).....115

Abbildung 55: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T5; narkotisiert)...116

Abbildung 56: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T5; wach).....117

Abbildung 57: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T5; narkotisiert)...118

Abbildung 58: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T5; wach).....119

Abbildung 59: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T5; narkotisiert)...120

Abbildung 60: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T5; wach).....121

Abbildung 61: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T6; narkotisiert)...122

Abbildung 62: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T6; wach).....123

Abbildung 63: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T6; narkotisiert)...124

Abbildung 64: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T6; wach).....125

Abbildung 65: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T6; narkotisiert)...126

Abbildung 66: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T6; wach).....127

Abbildung 67: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T6; narkotisiert)...128

Abbildung 68: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T6; wach).....129

Abbildung 69: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T8; narkotisiert)...130

Abbildung 70: DPOAE-Zeitmessung bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T8; wach).....131

---

Abbildung 71: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T8; narkotisiert)...	132
Abbildung 72: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T8; wach).....	133
Abbildung 73: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T8; narkotisiert)...	134
Abbildung 74: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T8; wach).....	135
Abbildung 75: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T8; narkotisiert)...	136
Abbildung 76: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T8; wach).....	137
Abbildung 77: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T9; narkotisiert)...	138
Abbildung 78: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 20 kHz (T9; wach).....	139
Abbildung 79: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T9; narkotisiert)...	140
Abbildung 80: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 40 kHz (T9; wach).....	141
Abbildung 81: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T9; narkotisiert)...	142
Abbildung 82: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 60 kHz (T9; wach).....	143
Abbildung 83: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T9; narkotisiert)...	144
Abbildung 84: DPOAE-Zeitmessung bei einer $f_2$ -Frequenz von 80 kHz (T9; wach).....	145
Abbildung 85: OAE-Residualmessung mit Reintonstimulation (I).....	146
Abbildung 86: OAE-Residualmessung mit Reintonstimulation (II).....	147
Abbildung 87: OAE-Residualmessung mit Reintonstimulation (III).....	148
Abbildung 88: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem KR (I).....	149
Abbildung 89: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem KR (II).....	150
Abbildung 90: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem KR (II).....	151
Abbildung 91: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem inversen KR (I).....	152
Abbildung 92: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem inversen KR (II).....	153

Abbildung 93: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei KR (I).....	154
Abbildung 94: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei KR (II).....	155
Abbildung 95: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei KR (III).....	156
Abbildung 96: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem EOR (I).....	157
Abbildung 97: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem EOR (II).....	158
Abbildung 98: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem EOR (III).....	159
Abbildung 99: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem EOR (IV).....	160
Abbildung 100: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem inversen EOR.....	161
Abbildung 101: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei EOR (I).....	162
Abbildung 102: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei EOR (II).....	163

## 6.2 Abbildungen

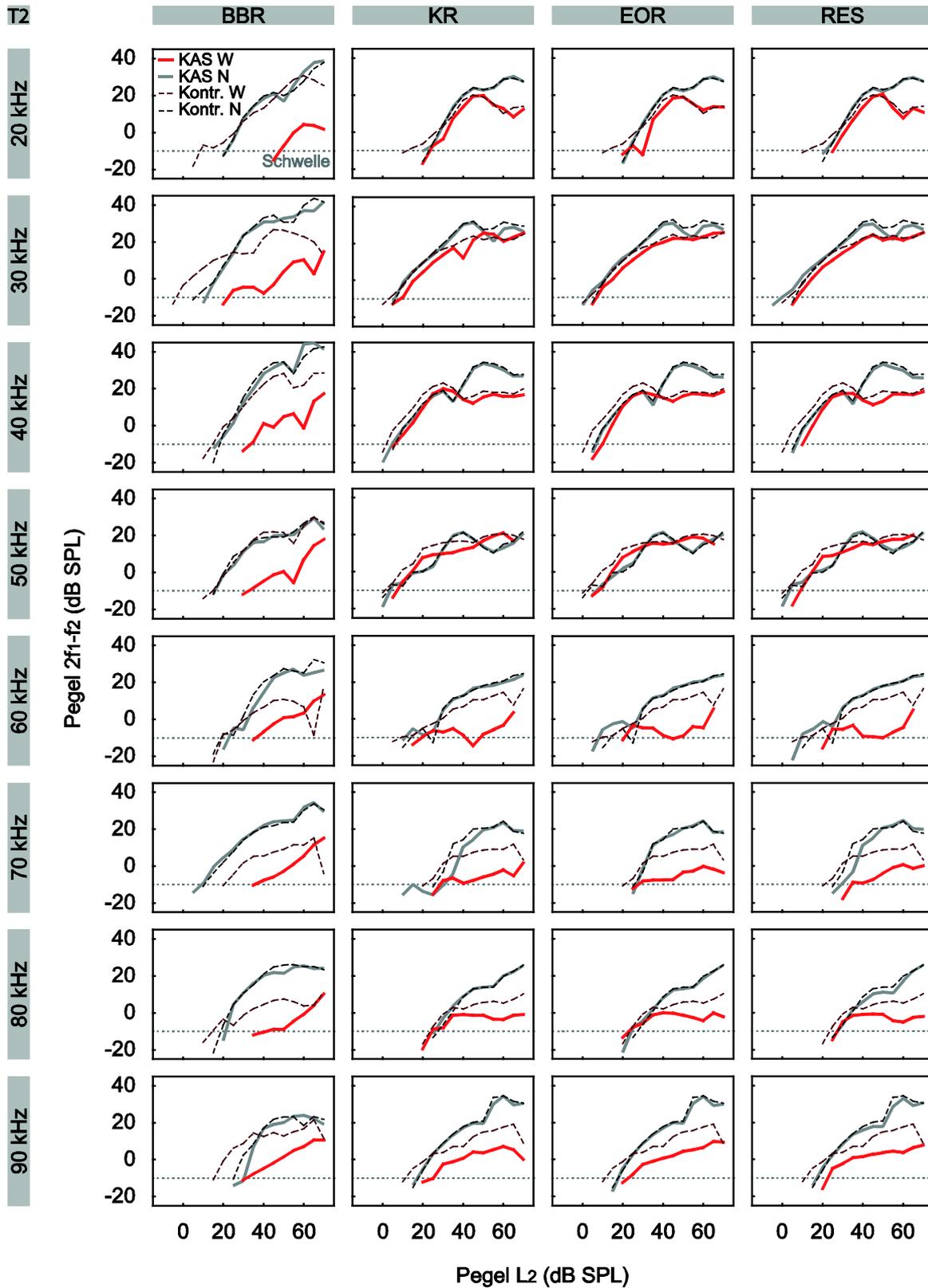


Abbildung 31: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T2 bei  $f_2$ -Frequenzen von 20 kHz bis 90 kHz für alle gemessenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten- (schwarz) und wachen Zustand (dunkel rot), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten- (grau) und wachen Zustand (rot).

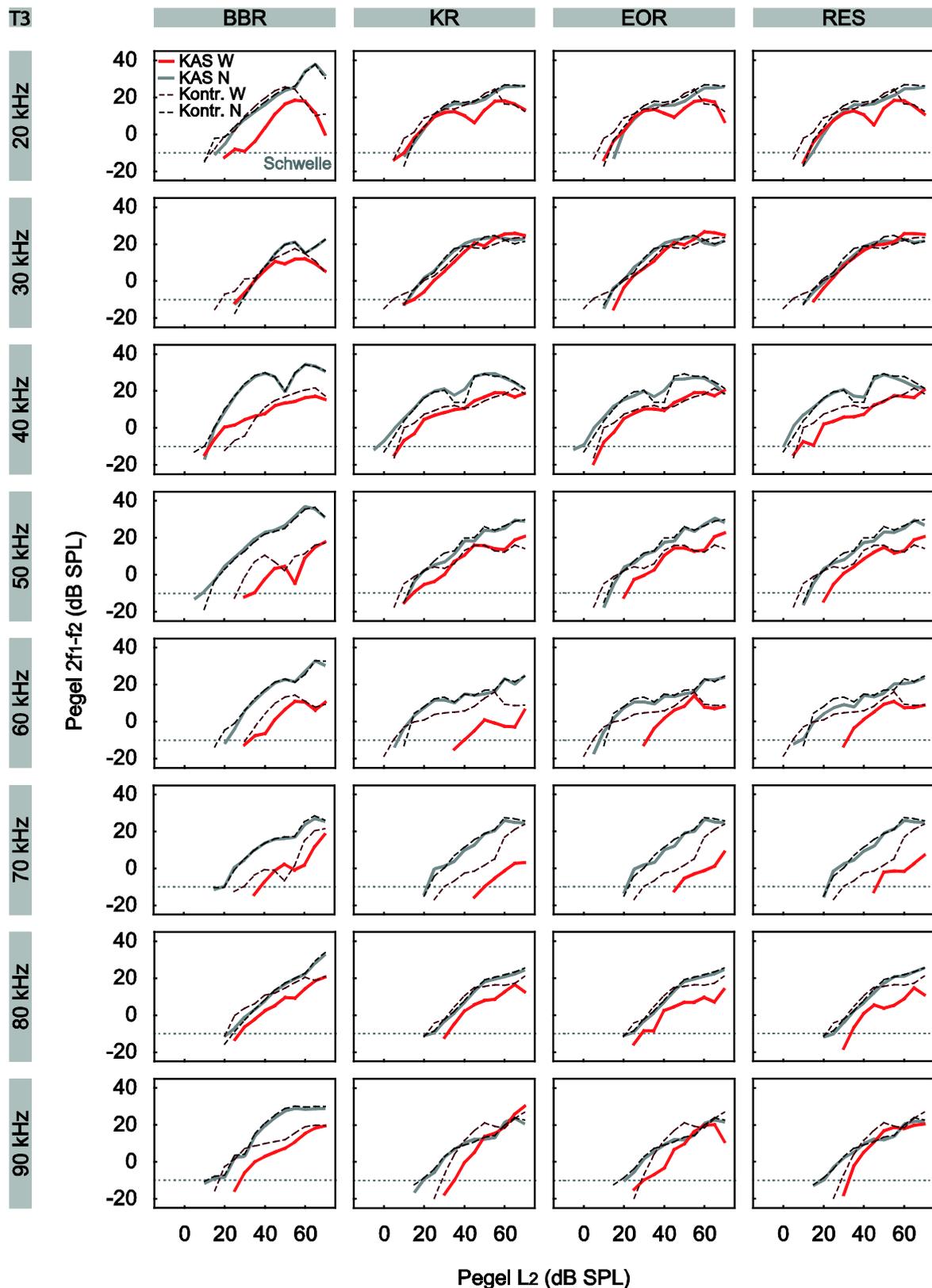


Abbildung 32: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T3 bei  $f_2$ -Frequenzen von 20 kHz bis 90 kHz für alle gemessenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten- (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkel rot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten- (grau) und wachen Zustand (rot).

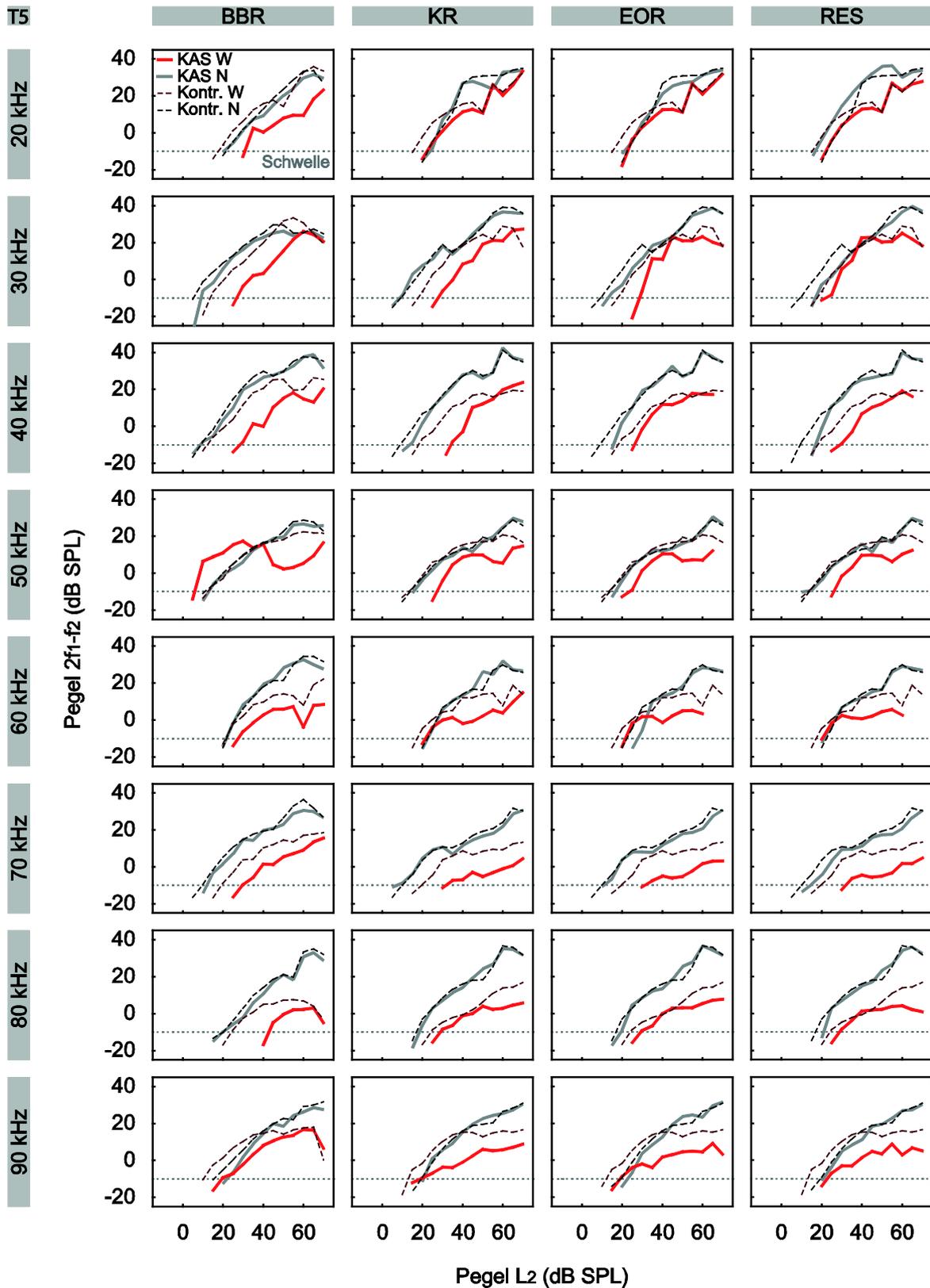


Abbildung 33: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T5 bei  $f_2$ -Frequenzen von 20 kHz bis 90 kHz für alle gemessenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten- (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkel rot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten- (grau) und wachen Zustand (rot).

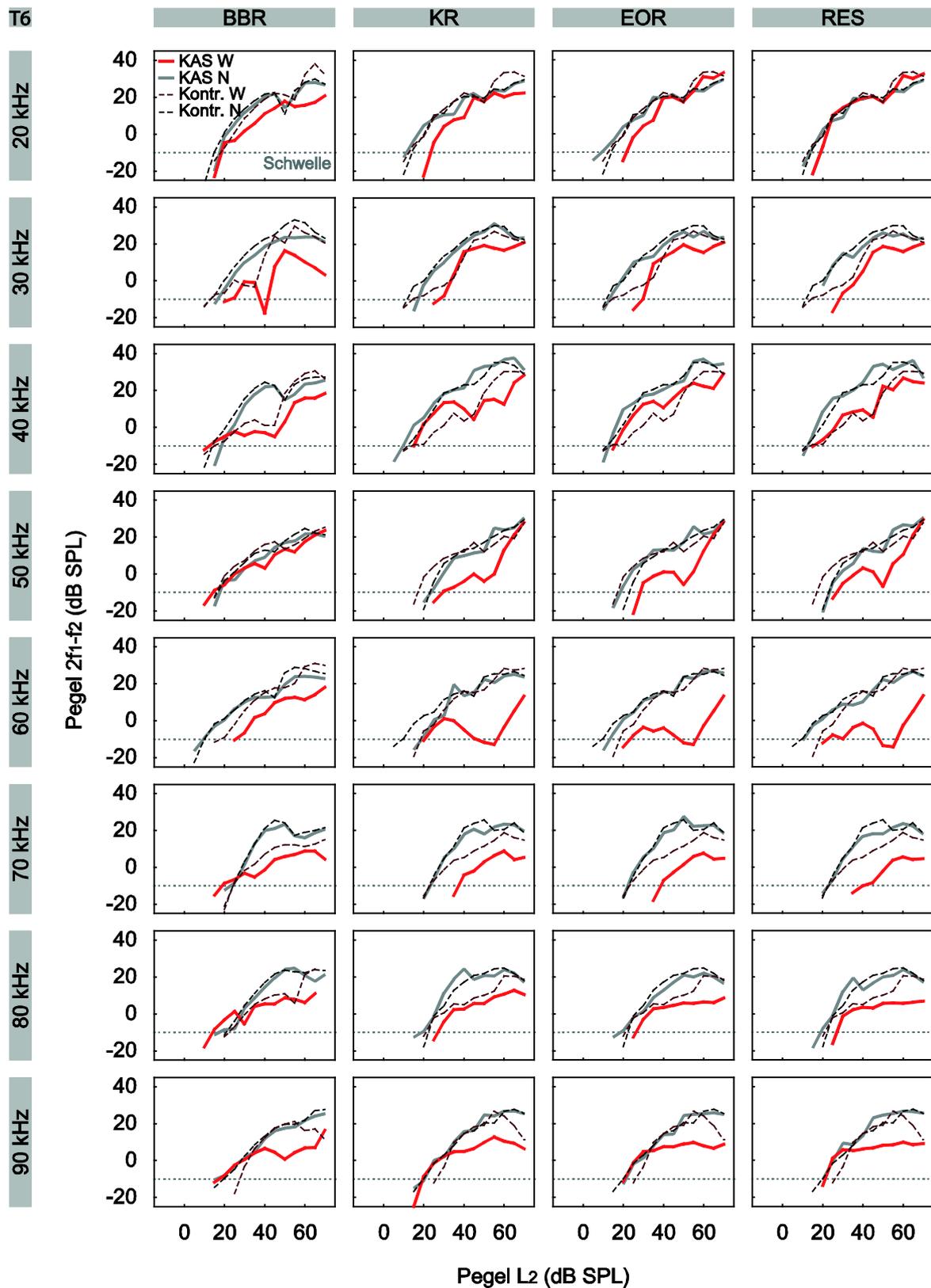


Abbildung 34: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T6 bei  $f_2$ -Frequenzen von 20 kHz bis 90 kHz für alle gemessenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten- (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkel rot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten- (grau) und wachen Zustand (rot).

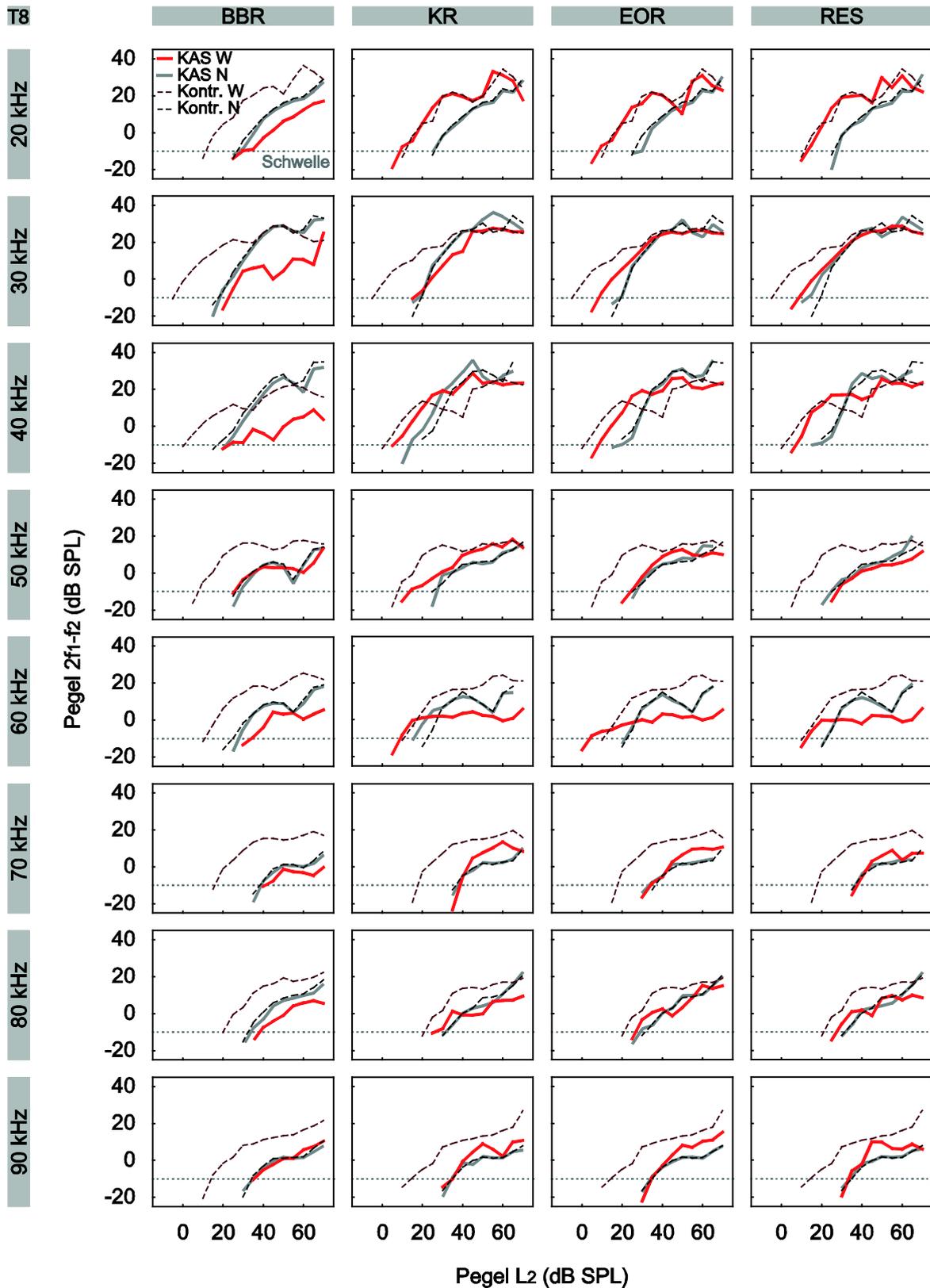


Abbildung 35: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T8 bei  $f_2$ -Frequenzen von 20 kHz bis 90 kHz für alle gemessenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten- (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkel rot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten- (grau) und wachen Zustand (rot).

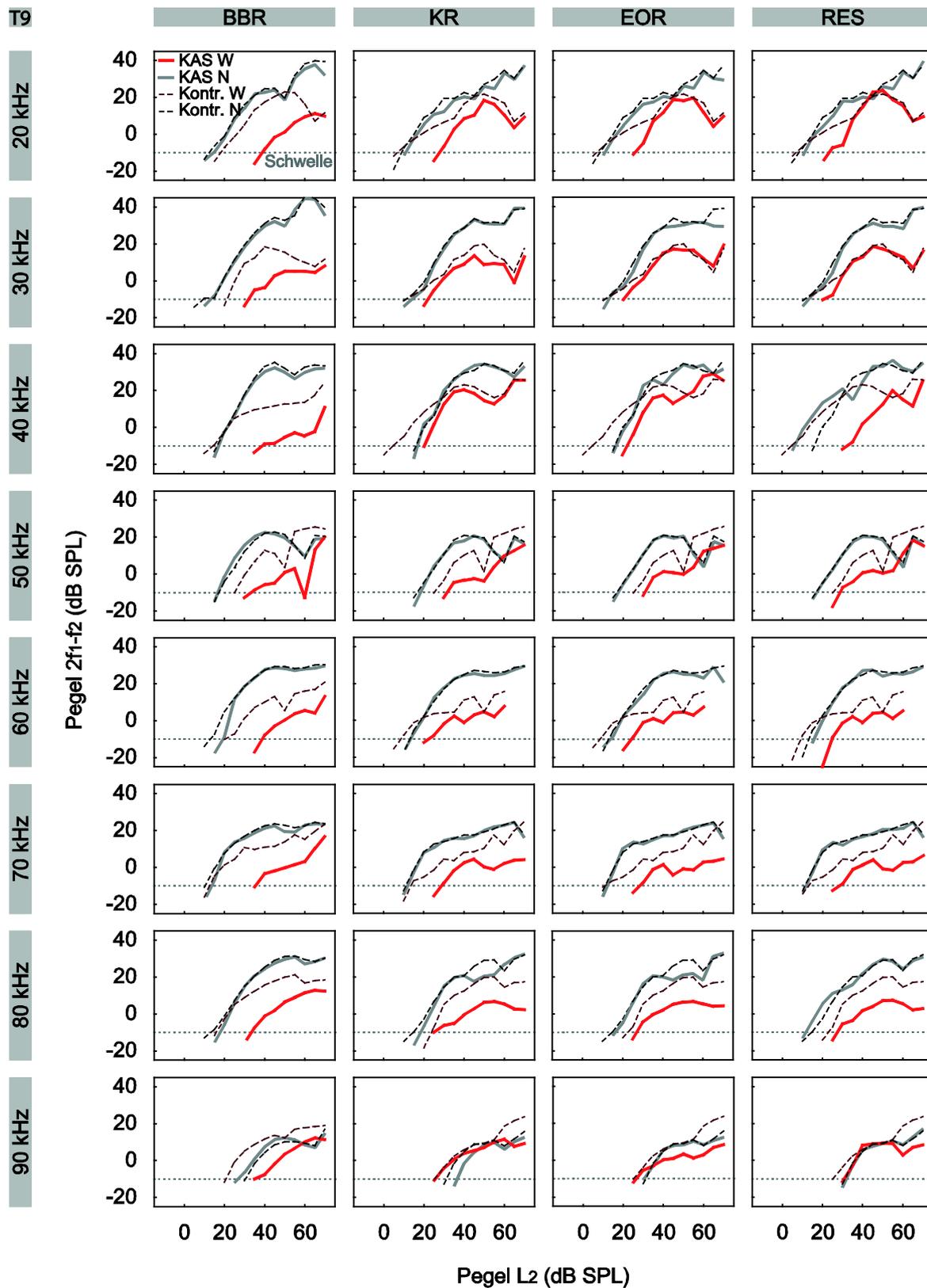


Abbildung 36: DPOAE-Wachstumsfunktionen von Versuchstier T9 bei  $f_2$ -Frequenzen von 20 kHz bis 90 kHz für alle gemessenen kontralateralen Stimuli (BBR, KR, EOR, RES). Dargestellt sind Kontrollmessungen ohne kontralaterale Stimulation im narkotisierten- (schwarz gestrichelt) und wachen Zustand (dunkel rot gestrichelt), sowie Messungen bei gleichzeitiger KAS im narkotisierten- (grau) und wachen Zustand (rot).

T2 | 20 kHz | narkotisiert

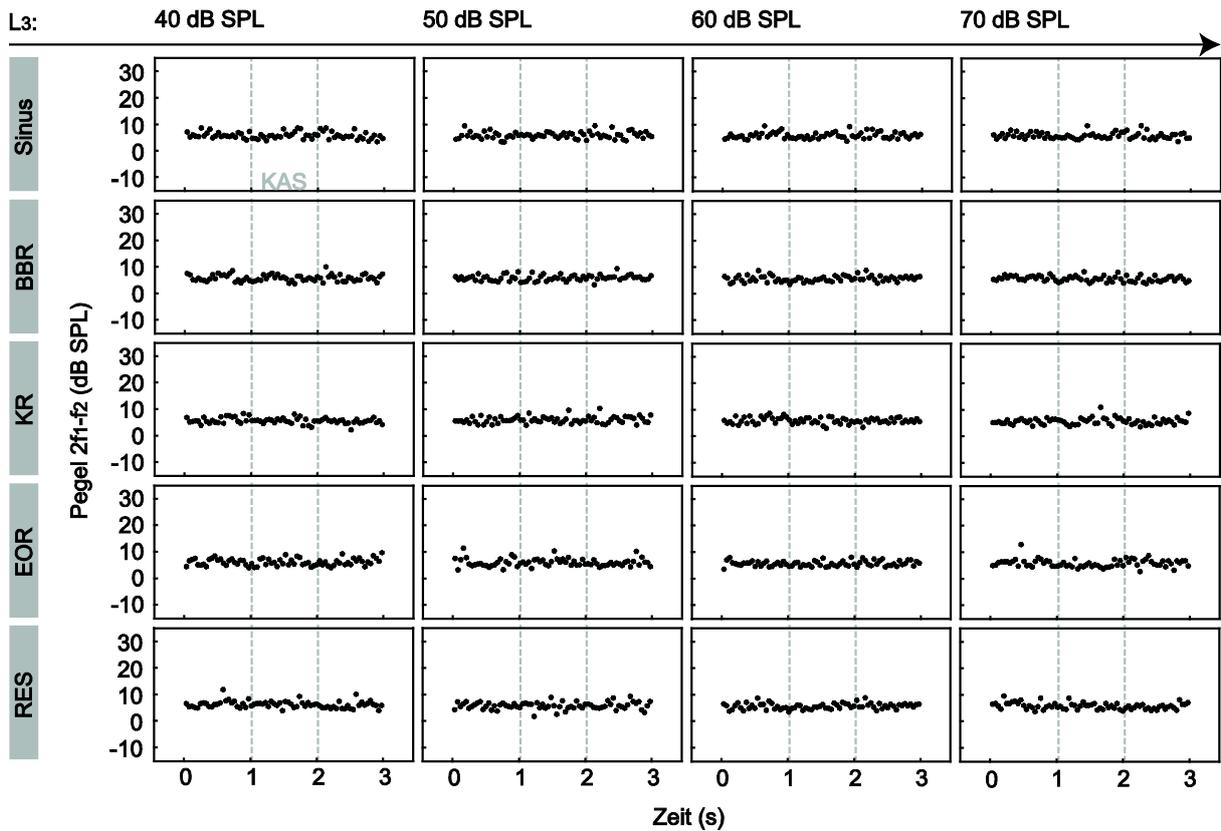


Abbildung 37: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T2 | 20 kHz | wach

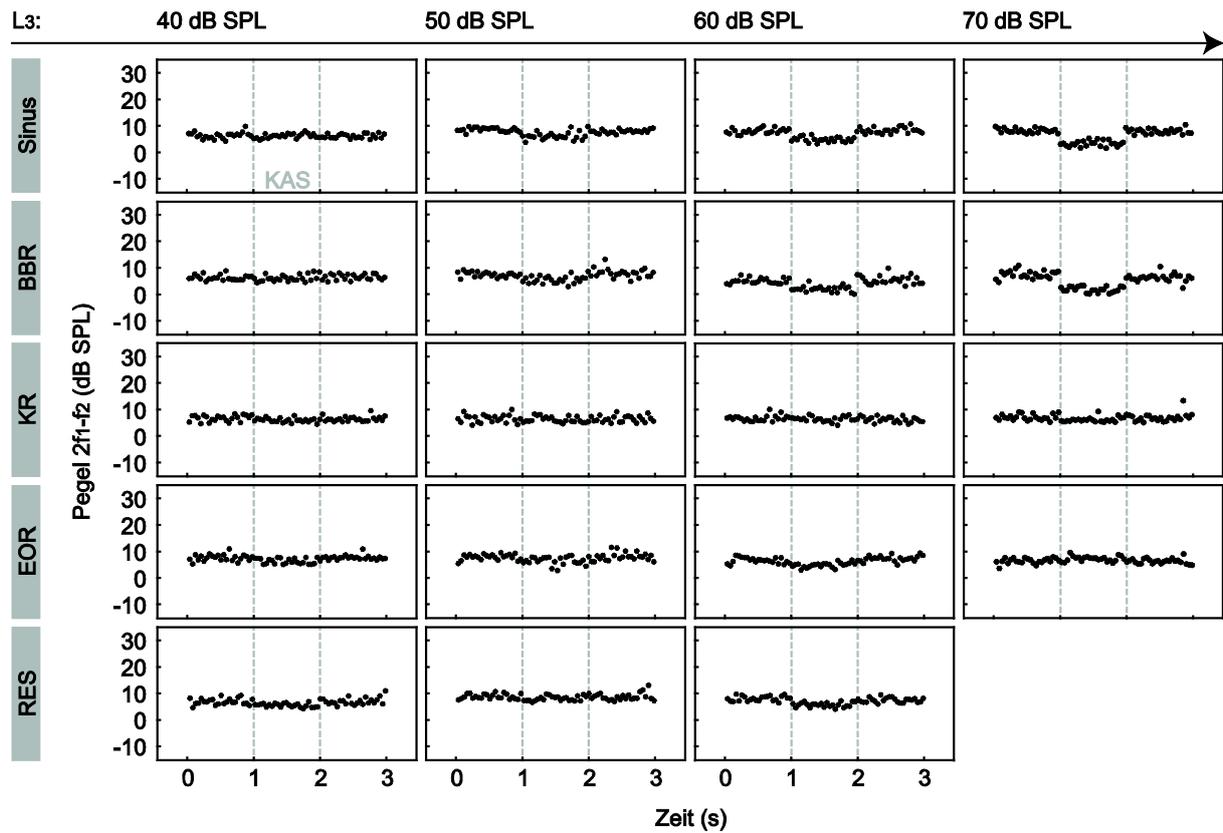


Abbildung 38: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T2 | 40 kHz | narkotisiert

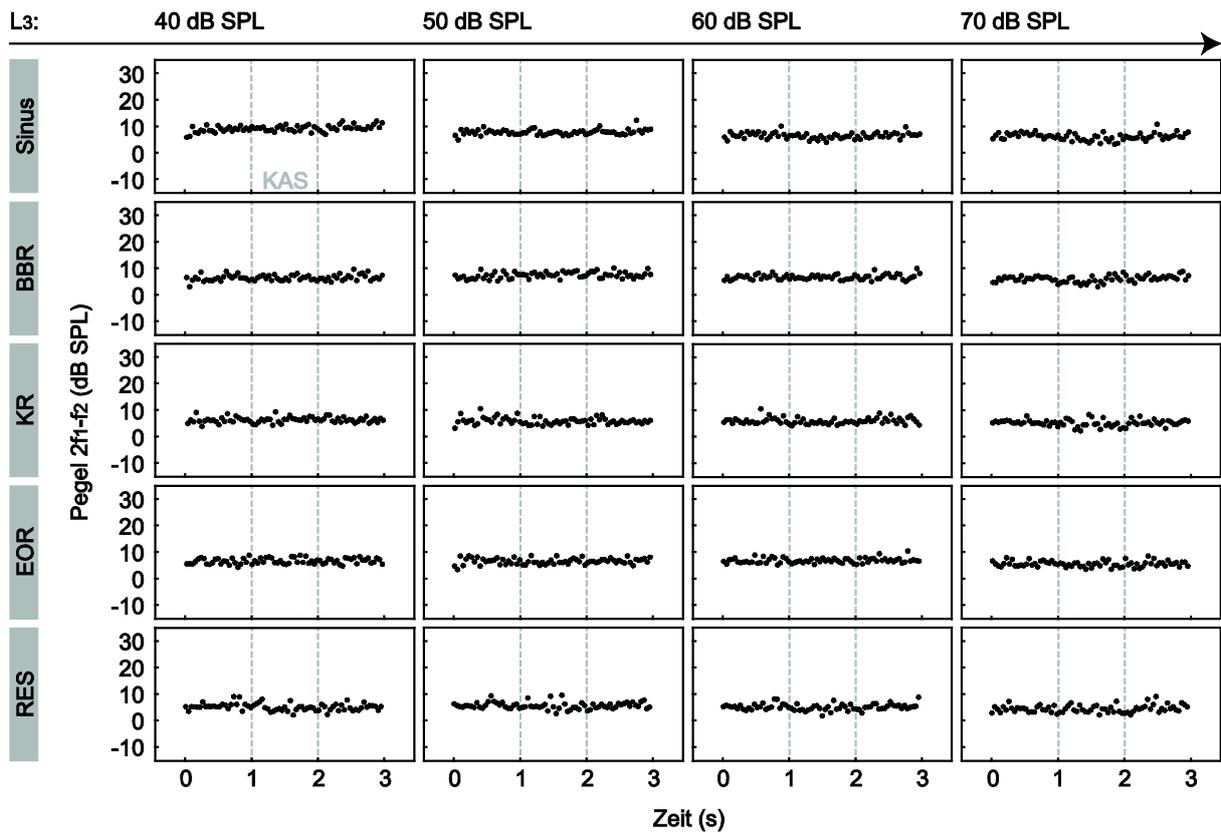


Abbildung 39: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren ontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T2 | 40 kHz | wach

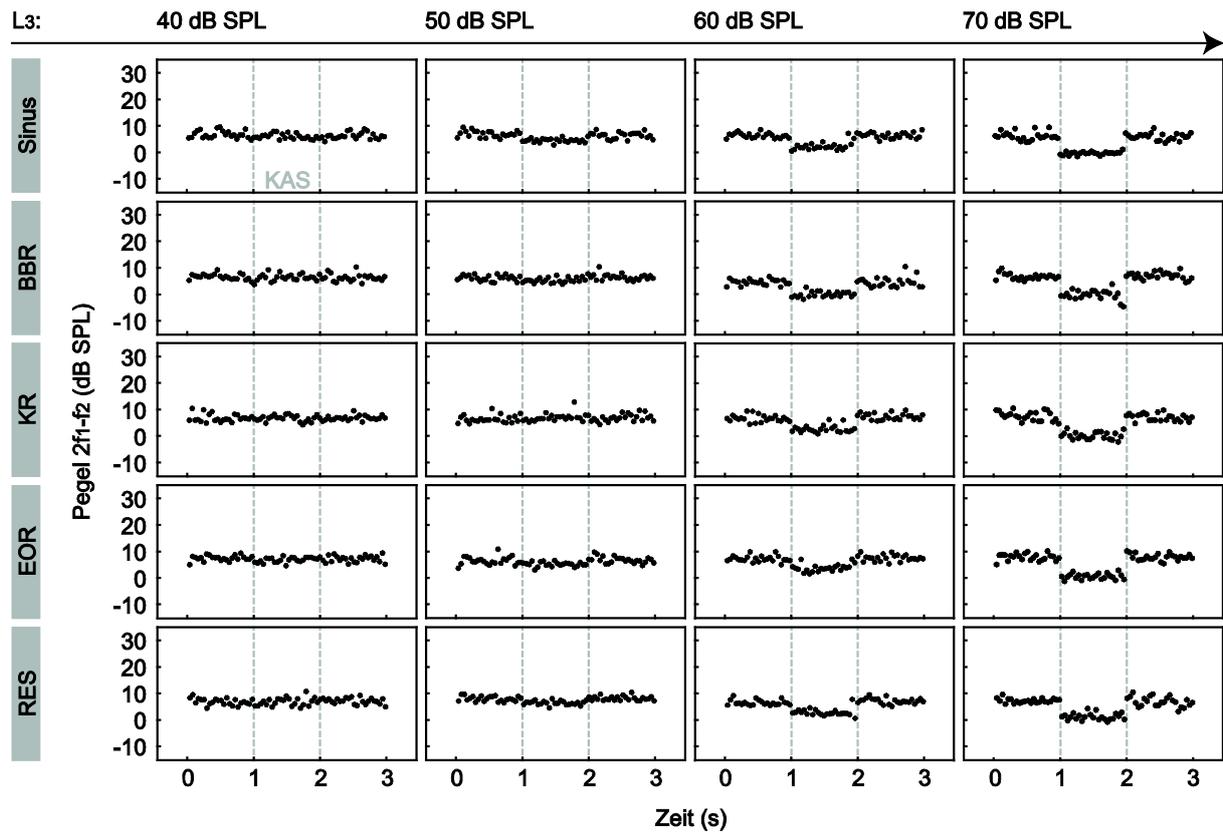


Abbildung 40: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T2 | 60 kHz | narkotisiert

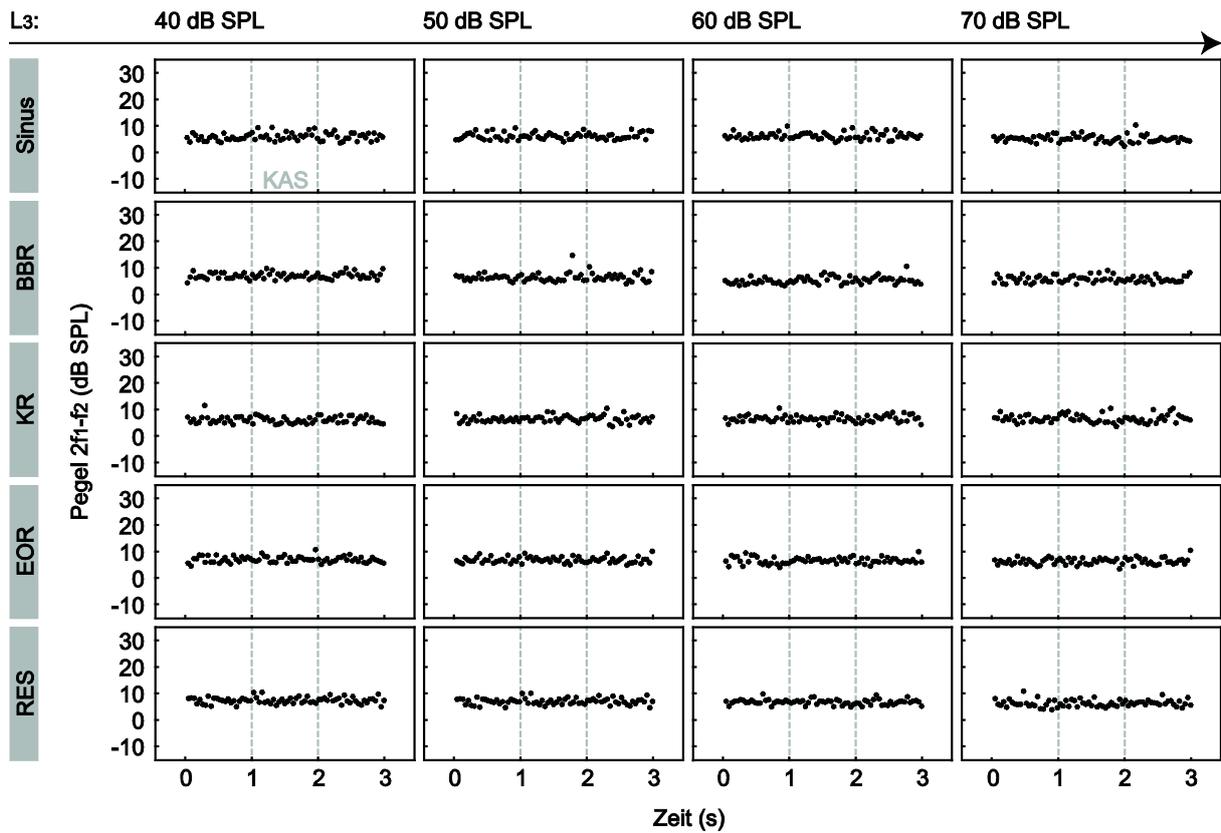


Abbildung 41: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T2 | 60 kHz | wach

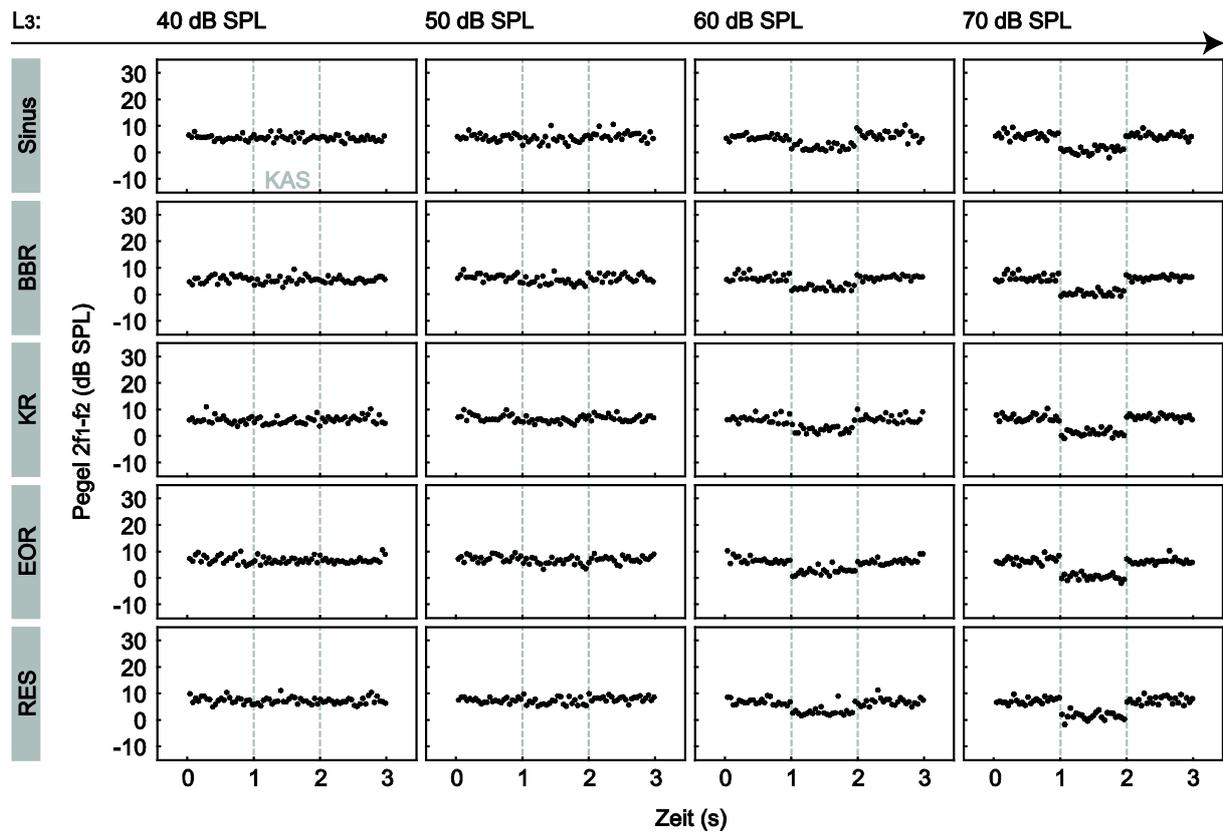


Abbildung 42: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T2 | 80 kHz | narkotisiert

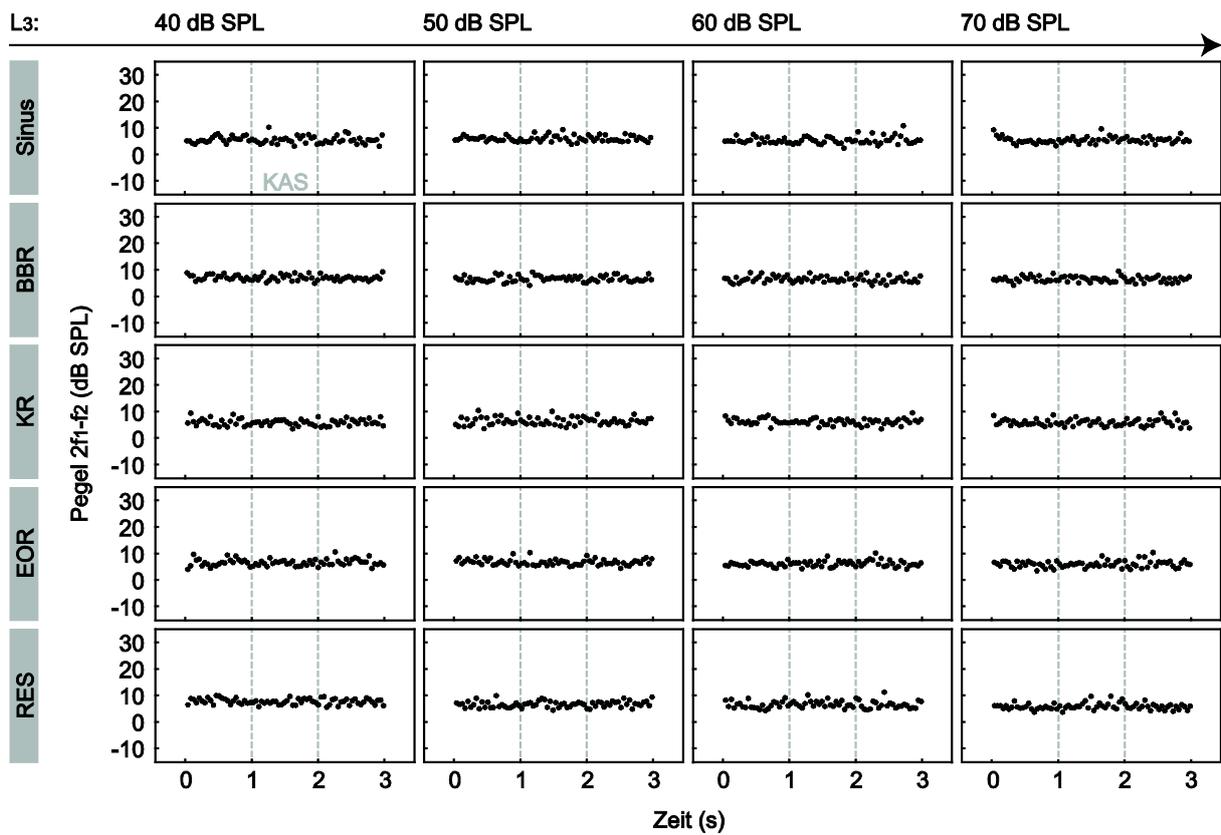


Abbildung 43: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T2 | 80 kHz | wach

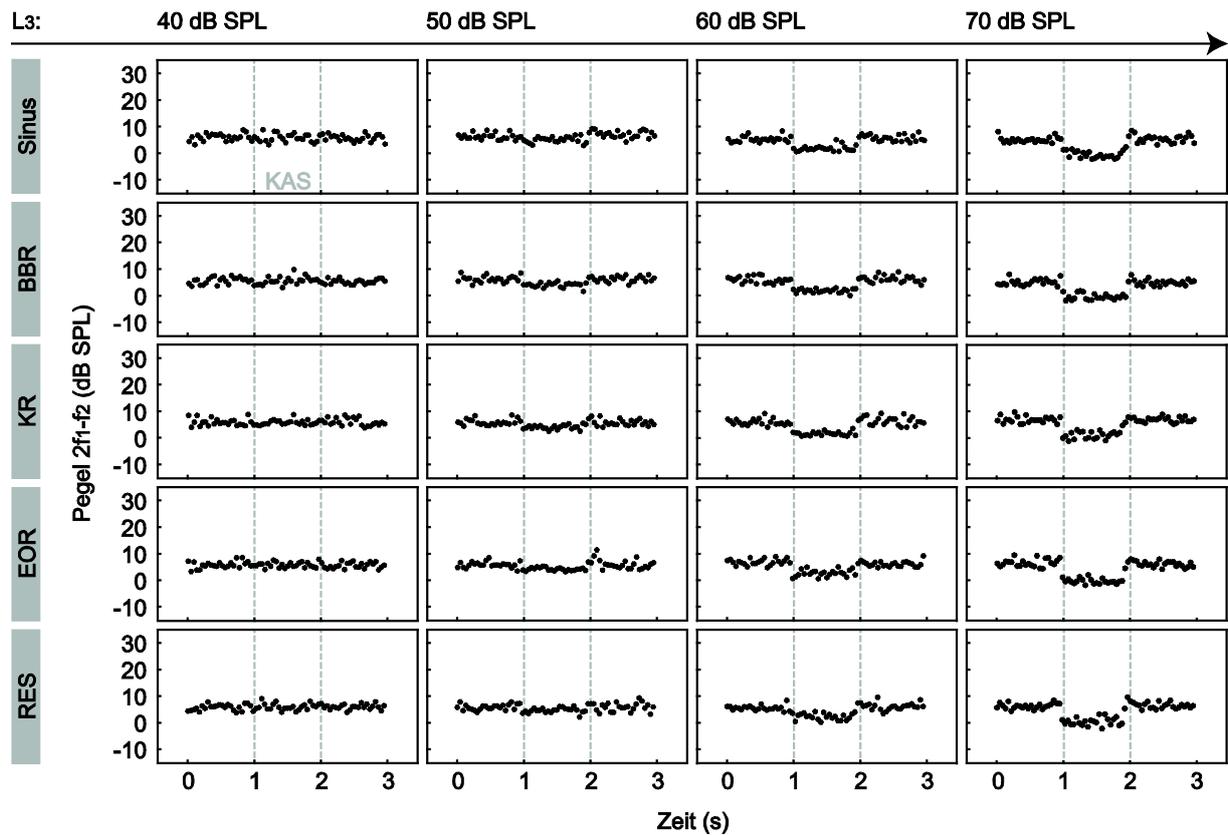


Abbildung 44: Einzelbeispiel (T2) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 20 kHz | narkotisiert

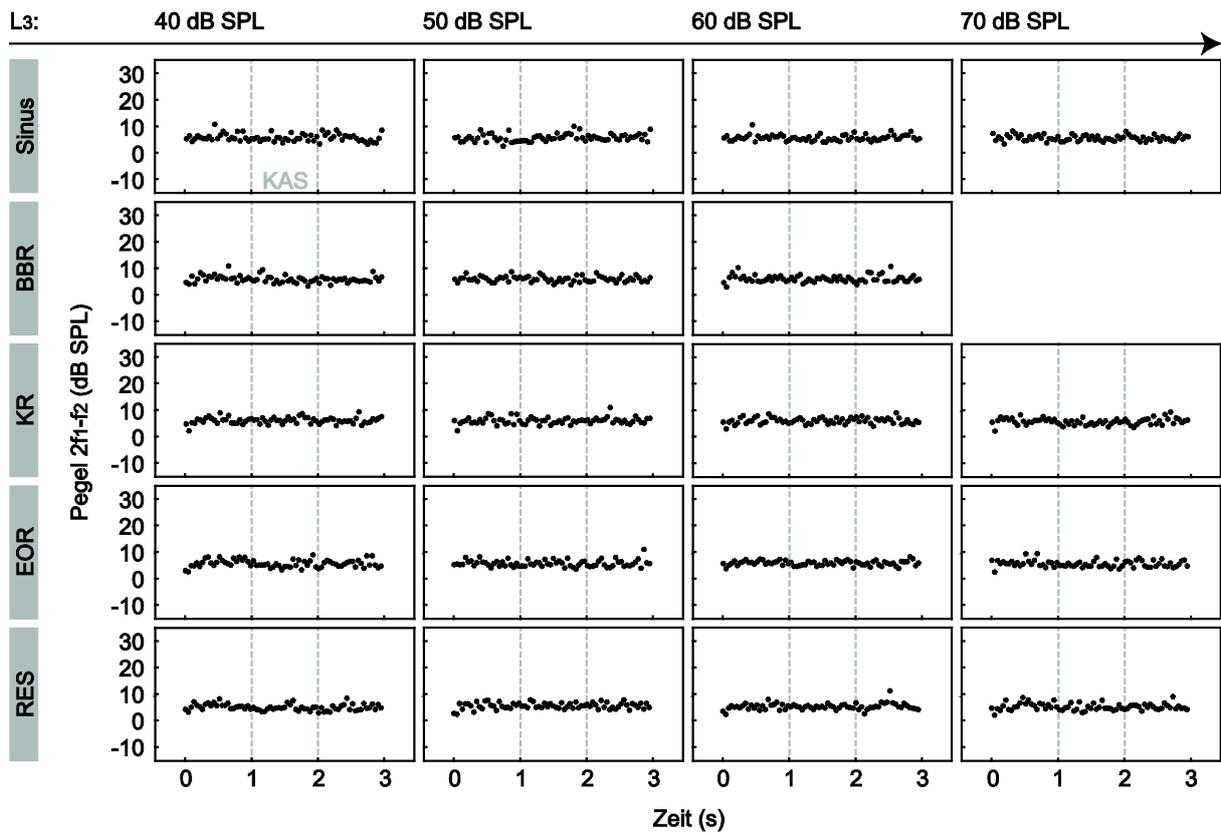


Abbildung 45: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 20 kHz | wach

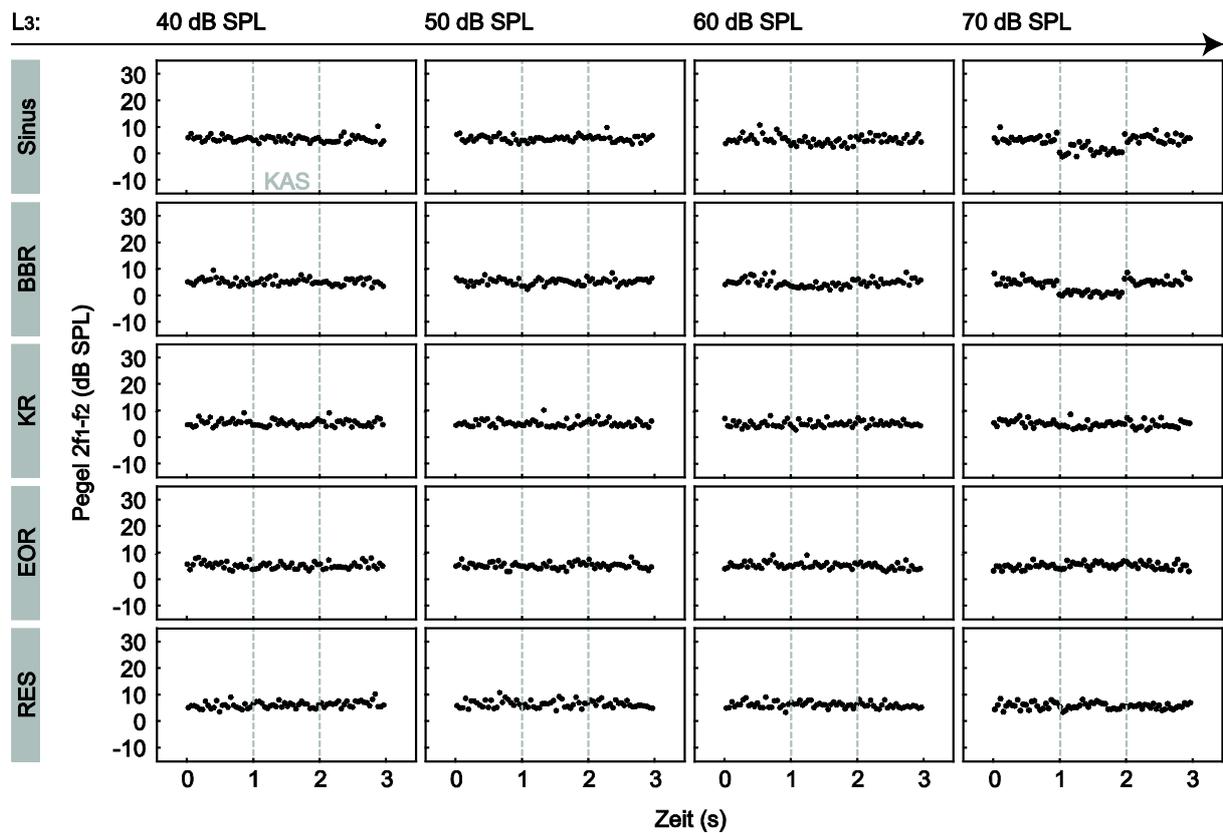


Abbildung 46: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 40 kHz | narkostisiert

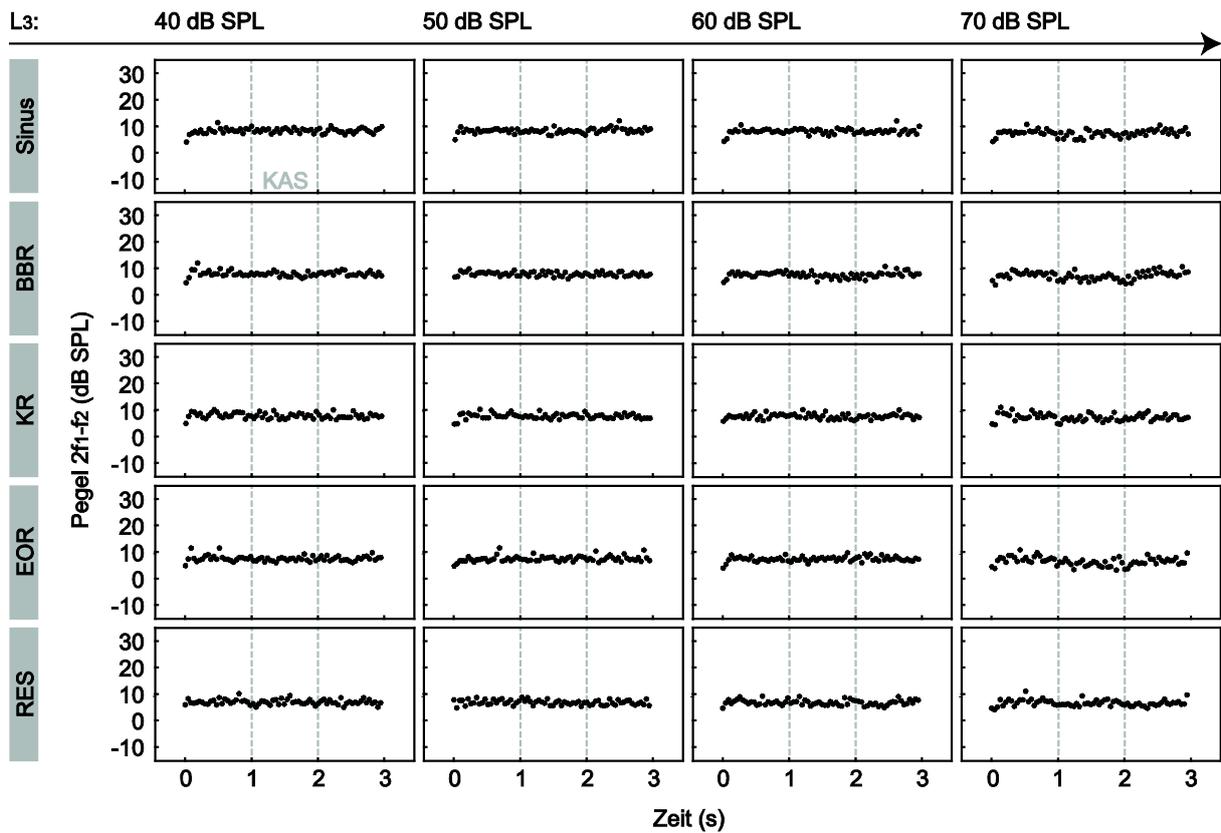


Abbildung 47: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 40 kHz | wach

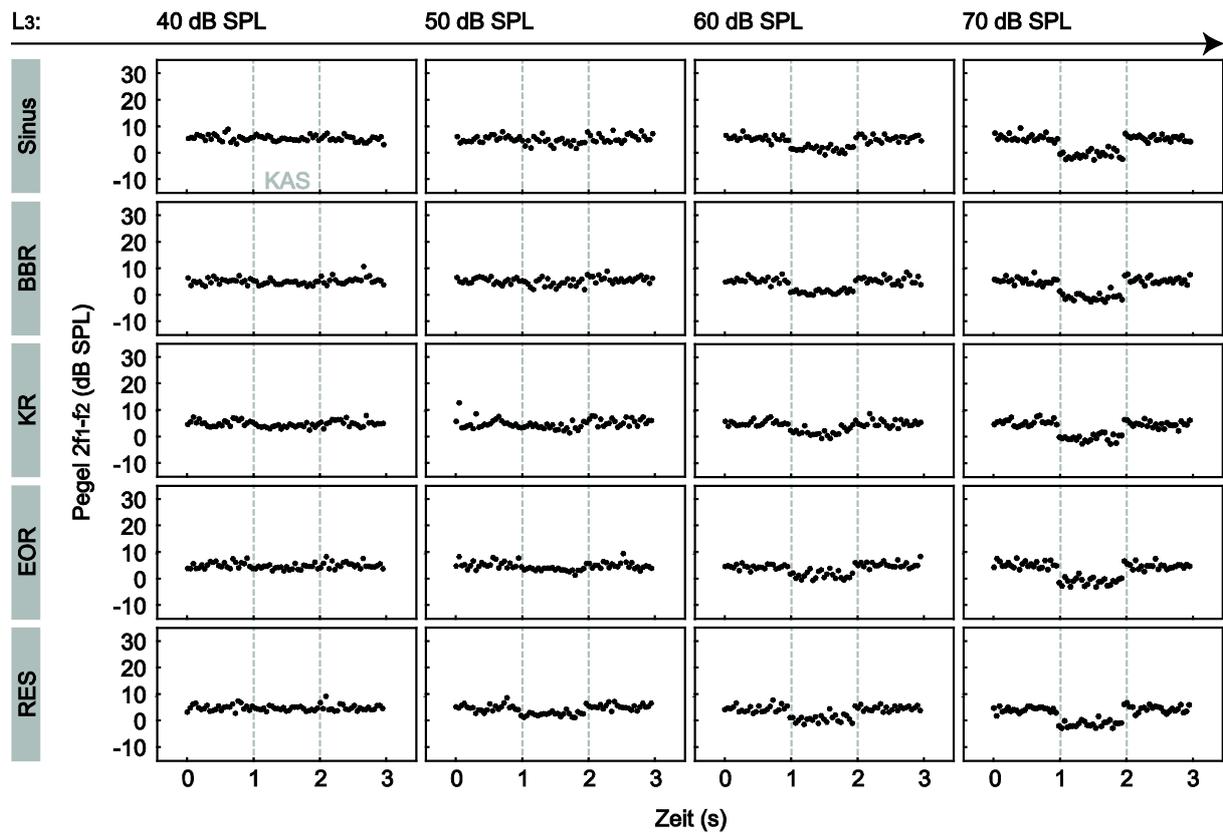


Abbildung 48: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 60 kHz | narkostiziert

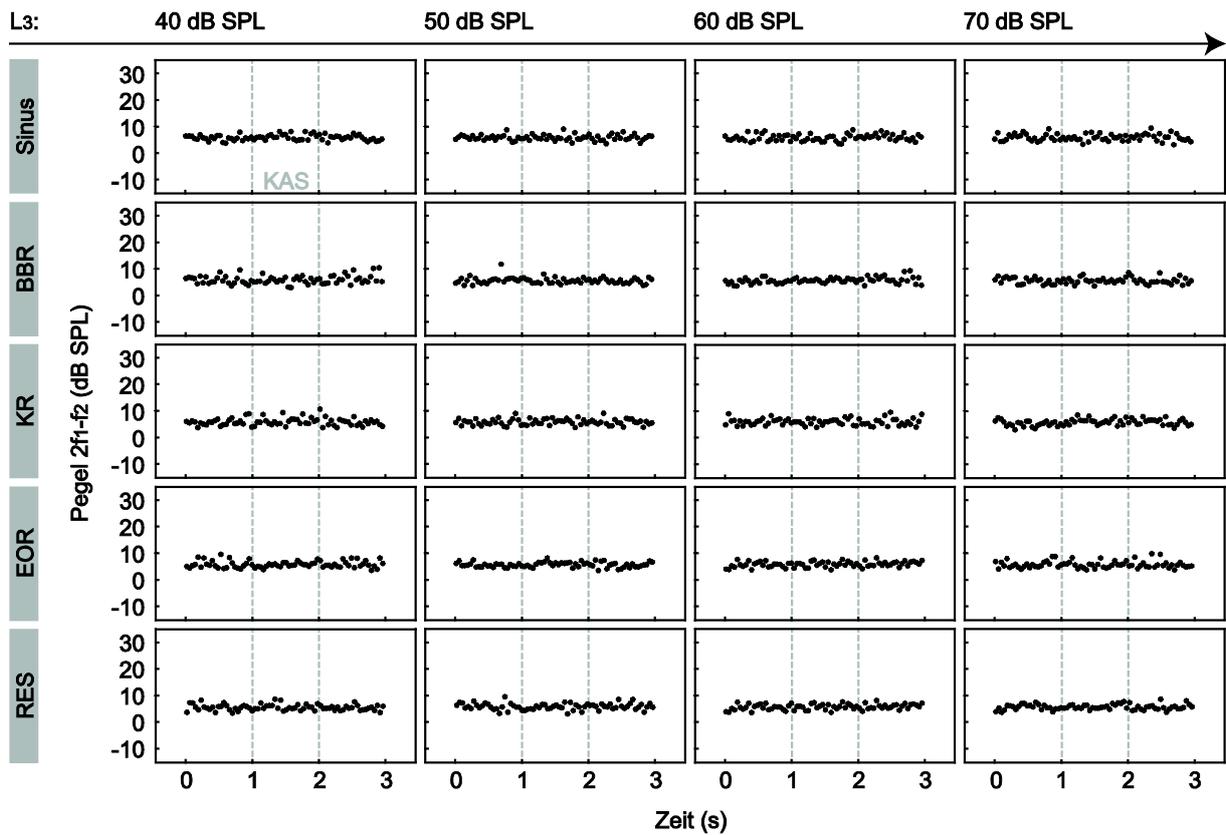


Abbildung 49: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ - Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 60 kHz | wach

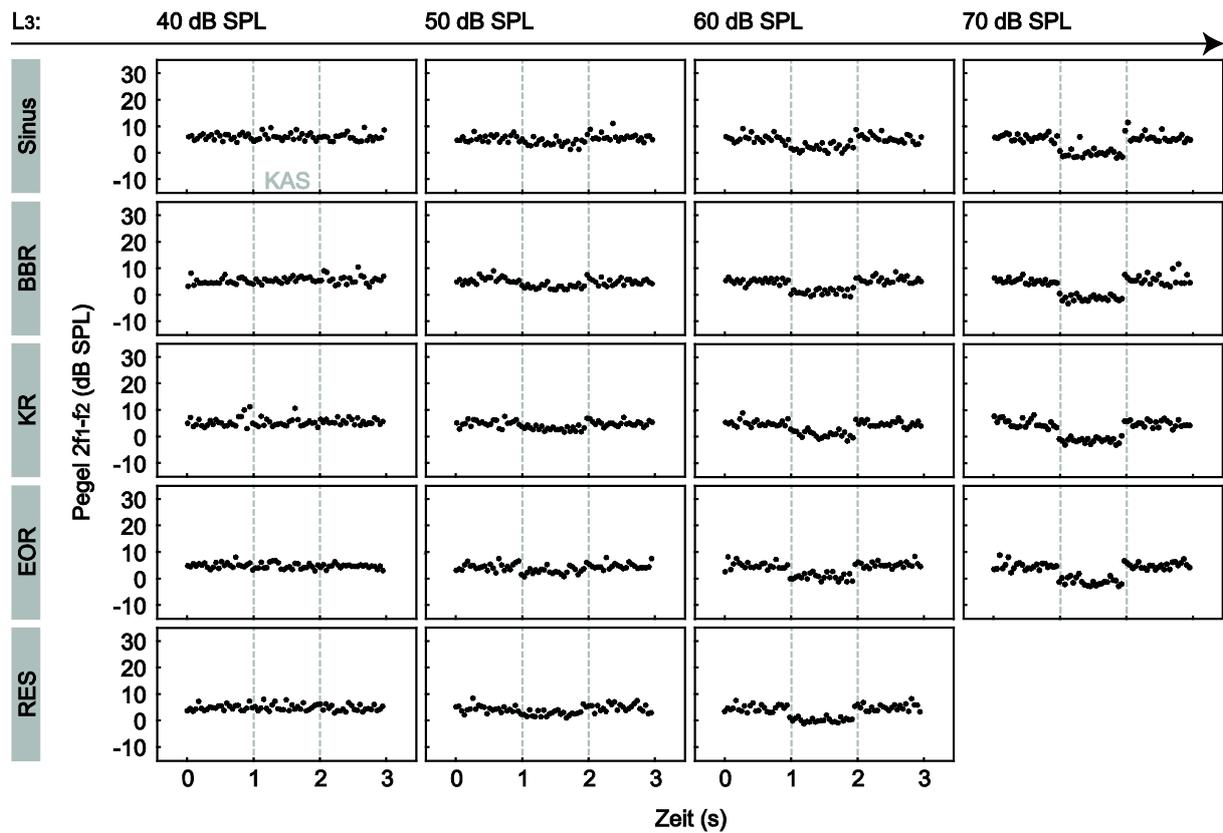


Abbildung 50: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 80 kHz | narkotisiert

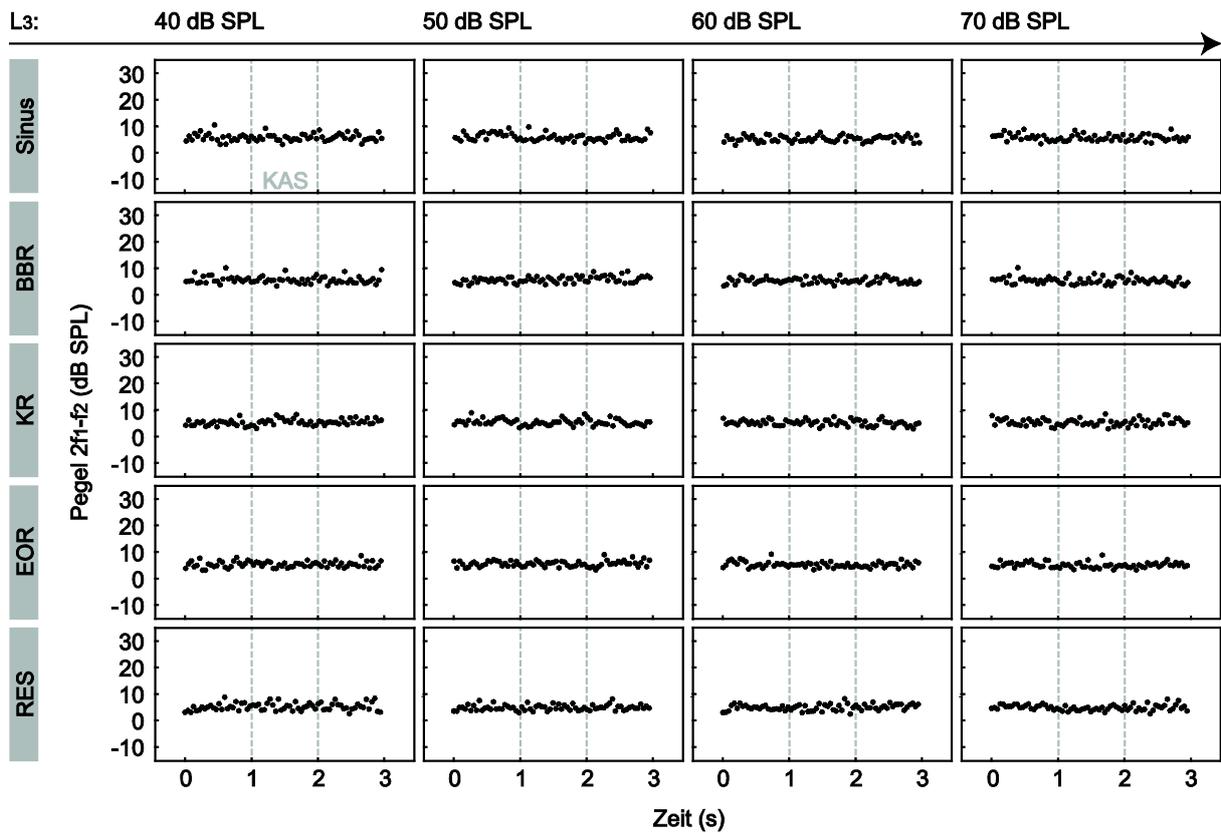


Abbildung 51: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T3 | 80 kHz | wach

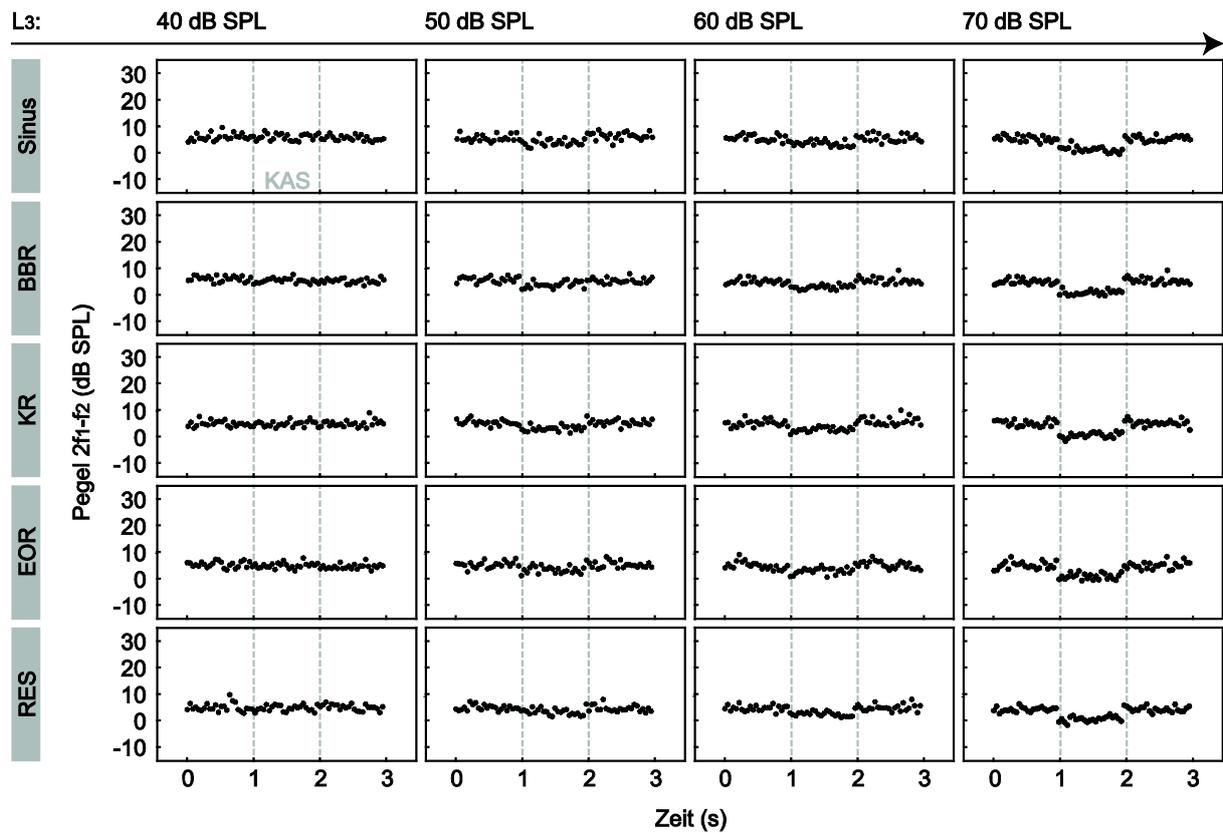


Abbildung 52: Einzelbeispiel (T3) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 20 kHz | narkotisiert

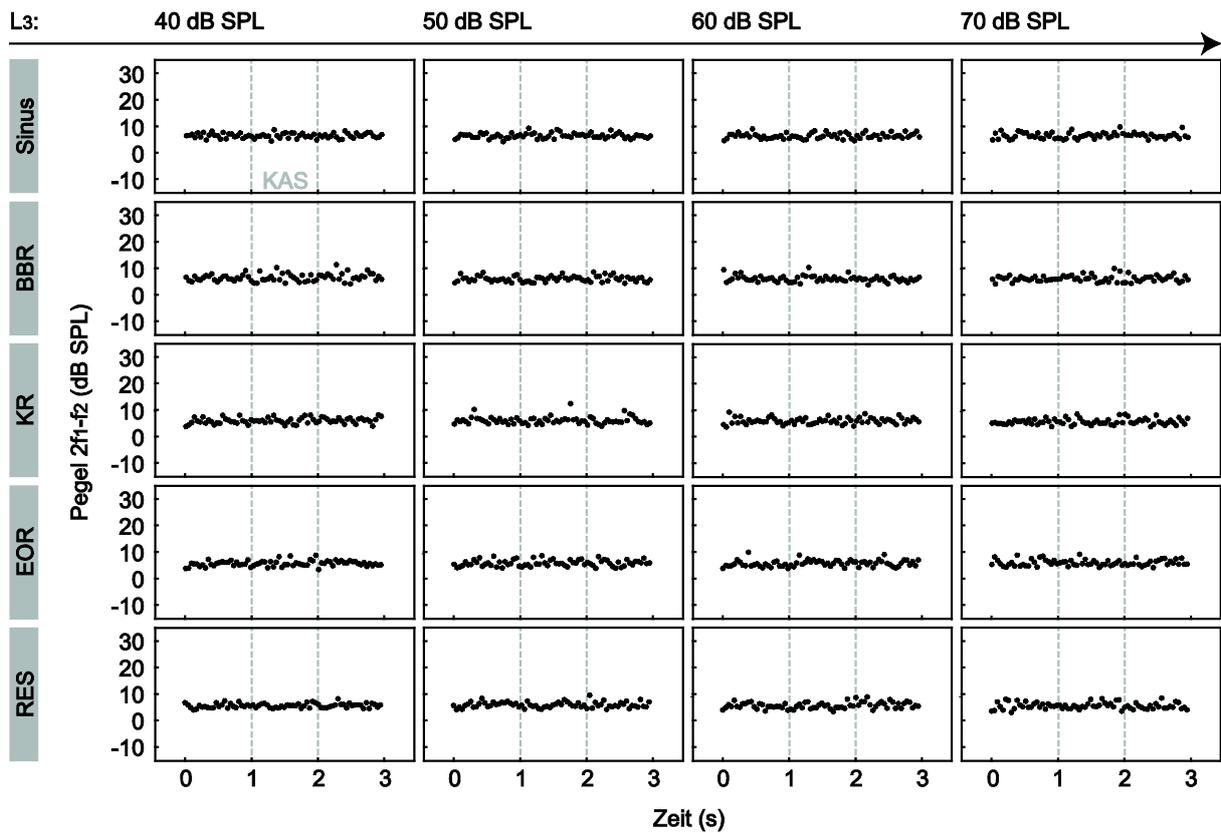


Abbildung 53: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 20 kHz | wach

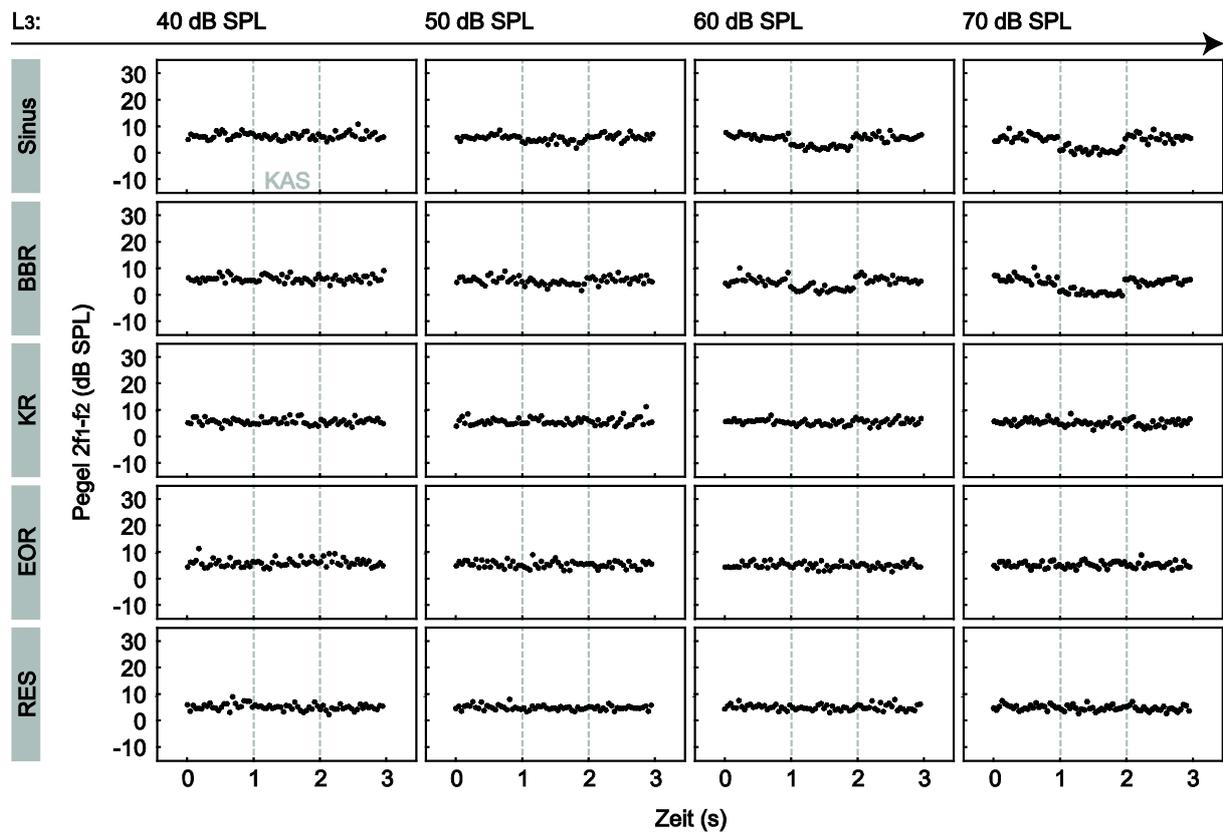


Abbildung 54: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 40 kHz | narkotisiert

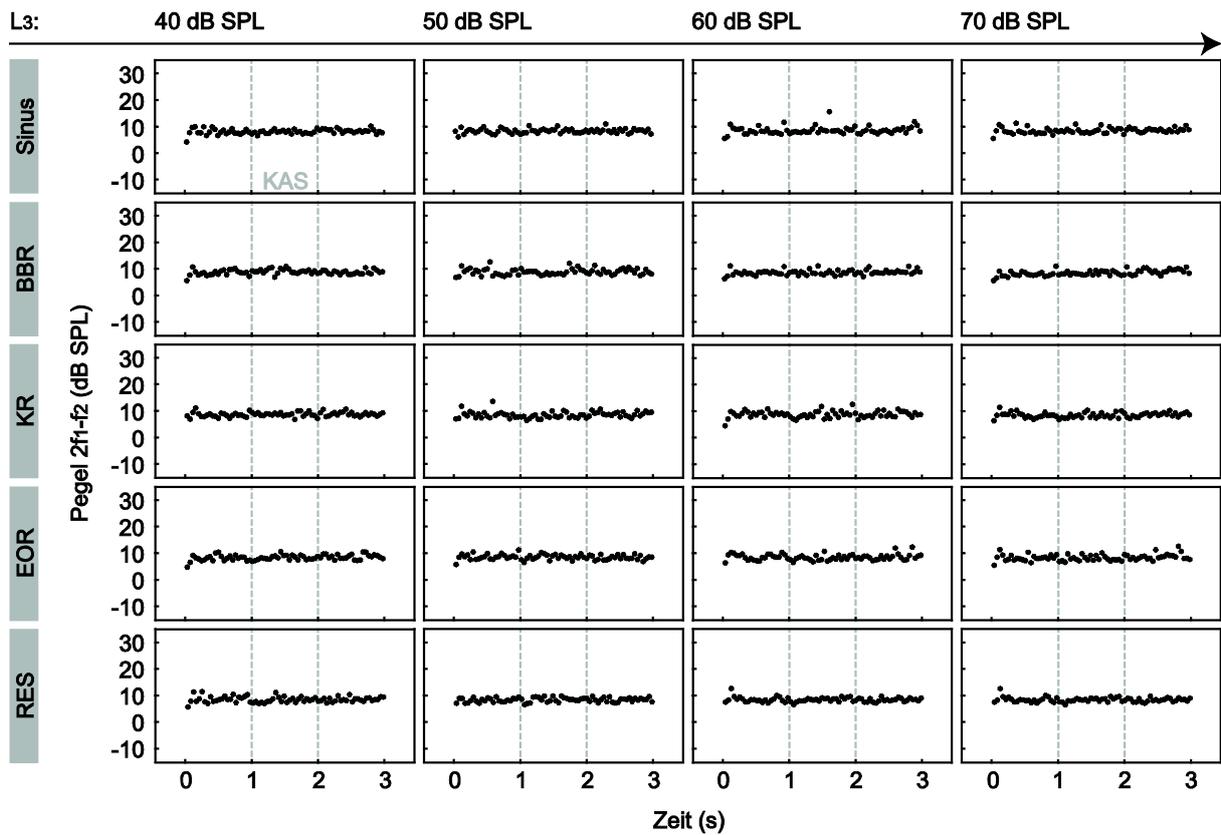


Abbildung 55: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 40 kHz | wach

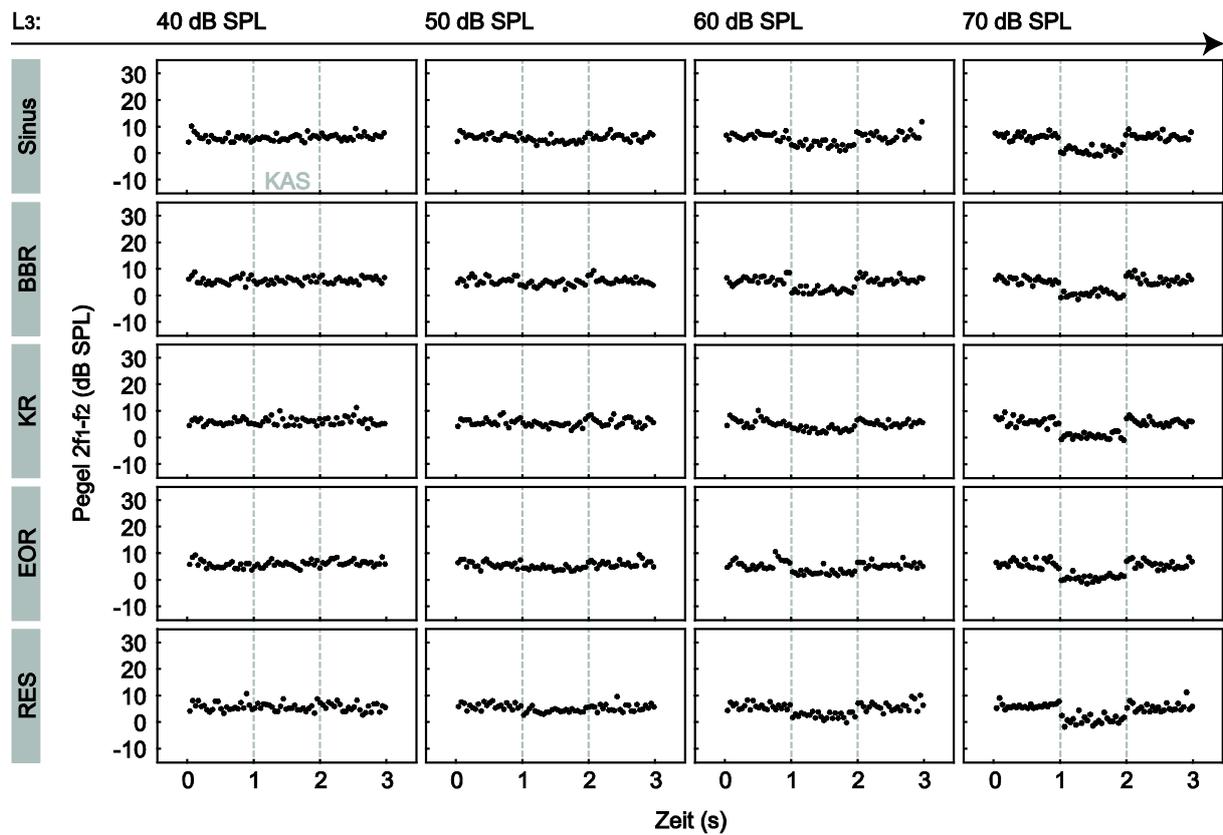


Abbildung 56: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 60 kHz | narkotisiert

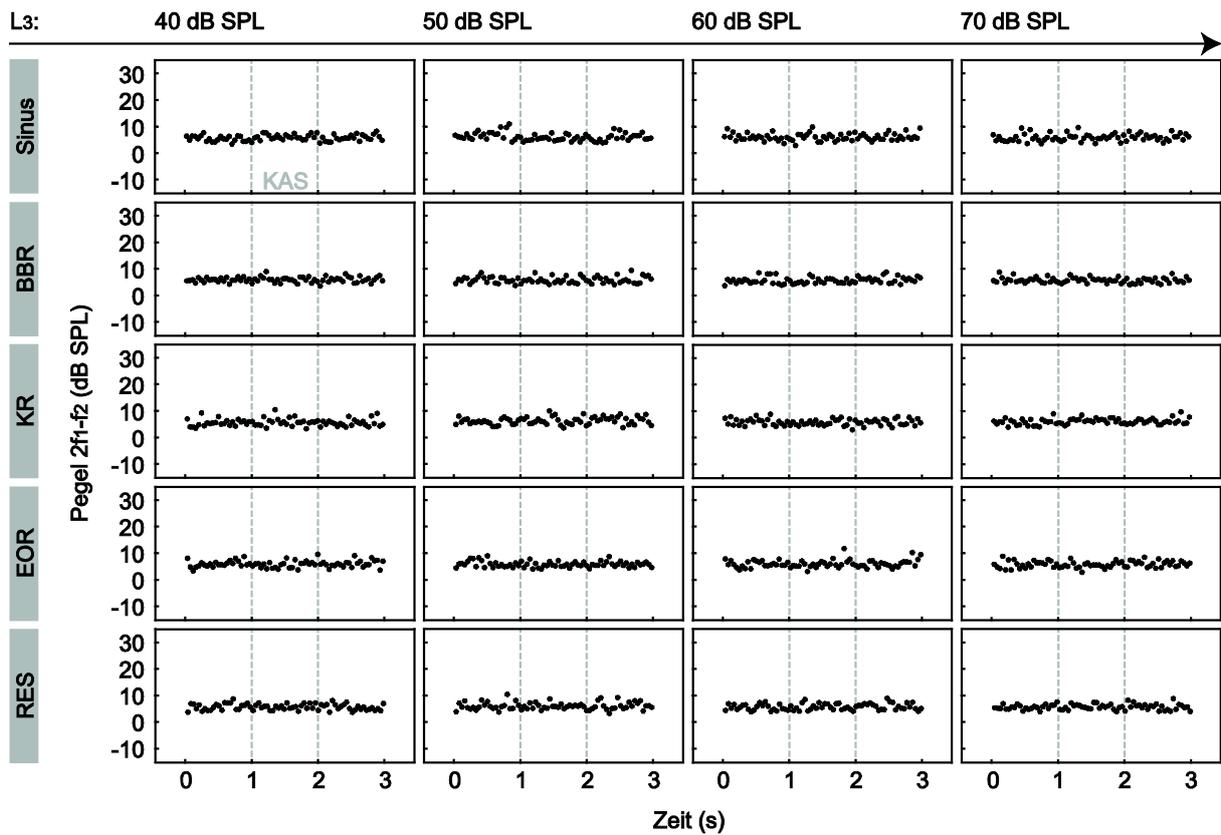


Abbildung 57: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 60 kHz | wach

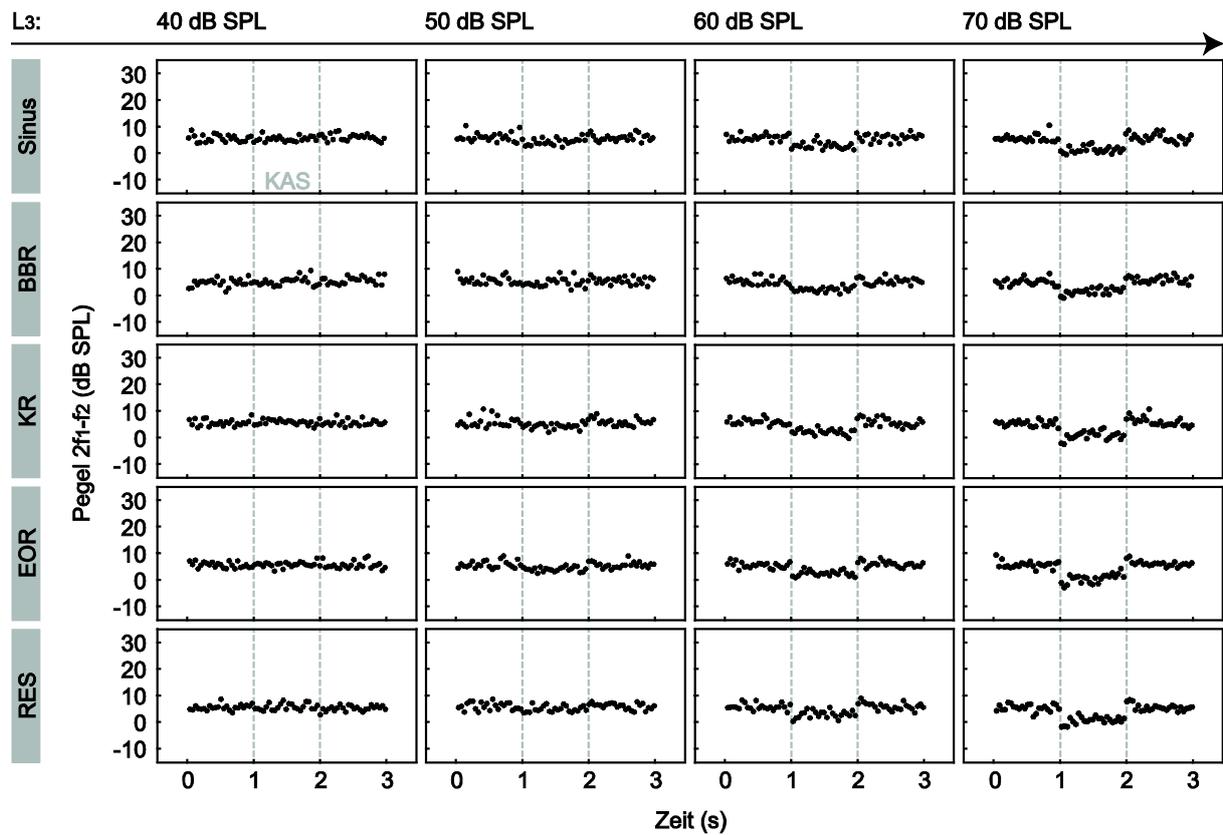


Abbildung 58: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 80 kHz | narkosiert

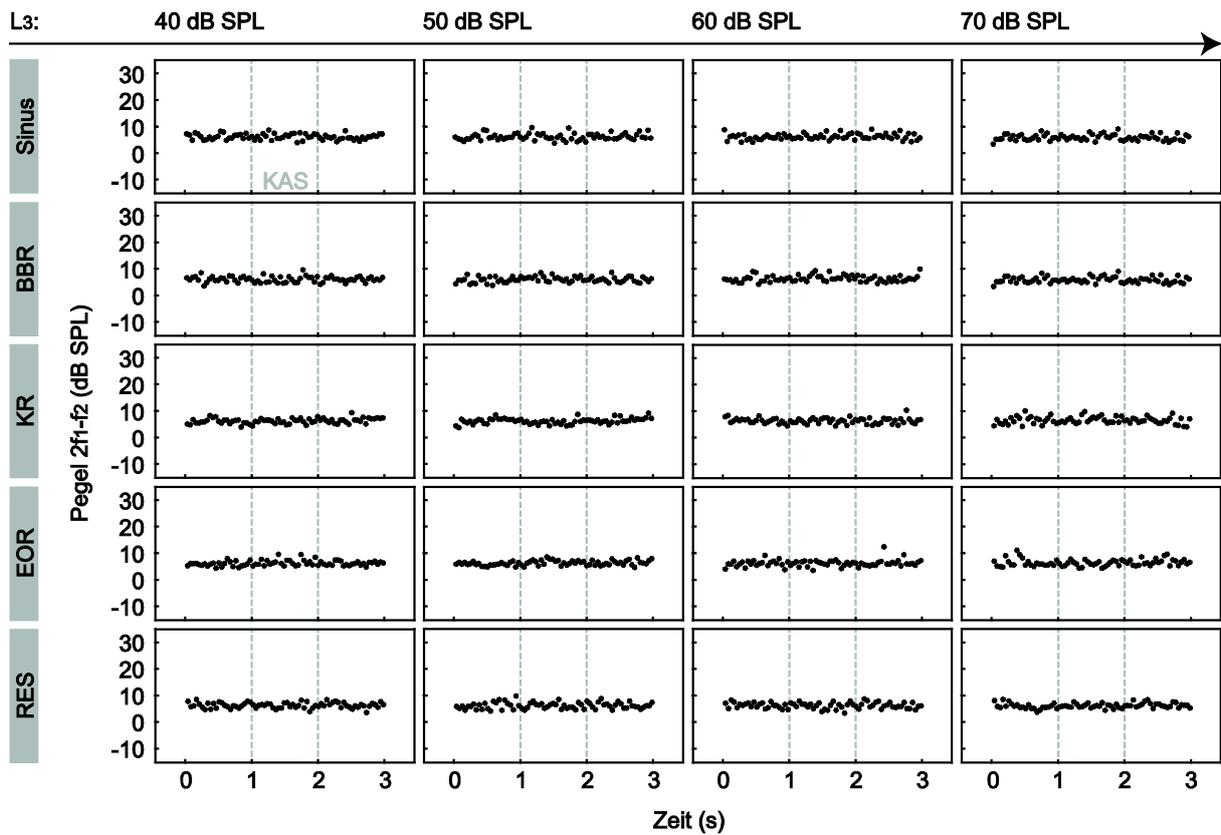


Abbildung 59: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T5 | 80 kHz | wach

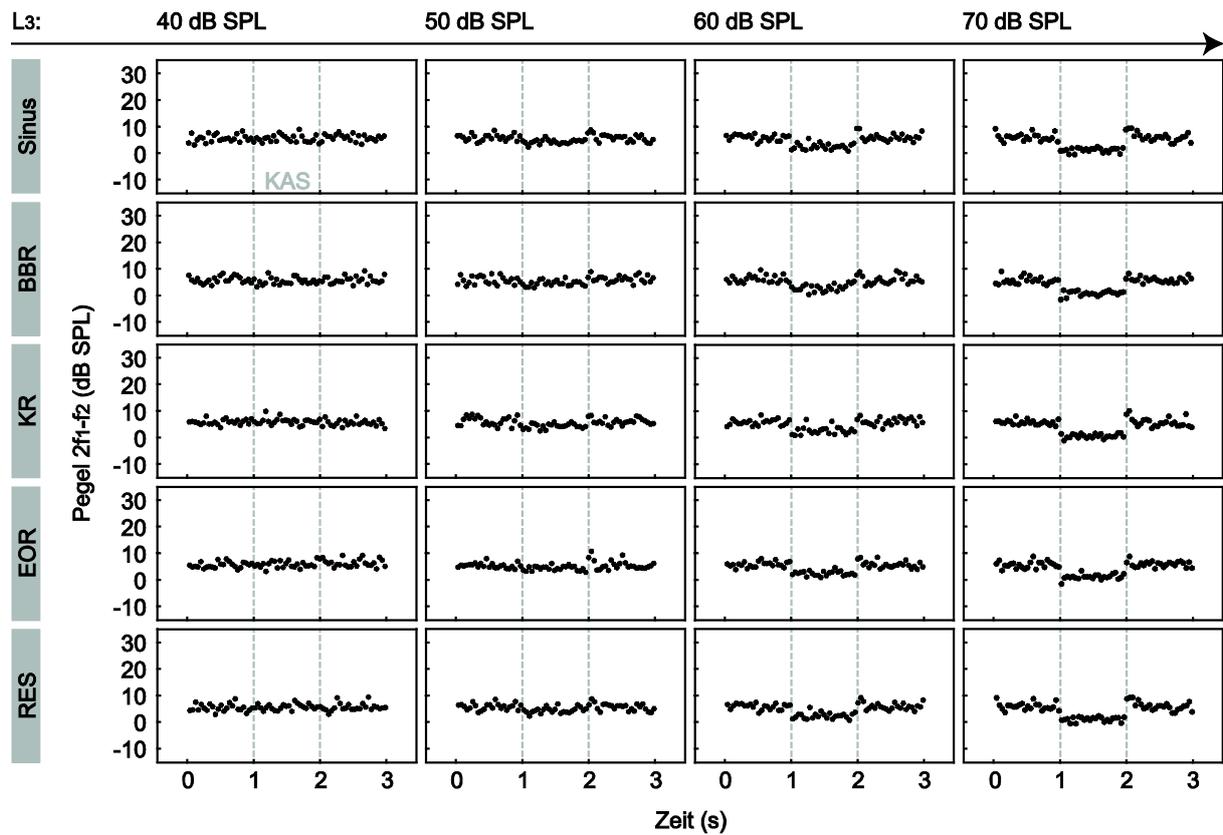


Abbildung 60: Einzelbeispiel (T5) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 20 kHz | narkosiert

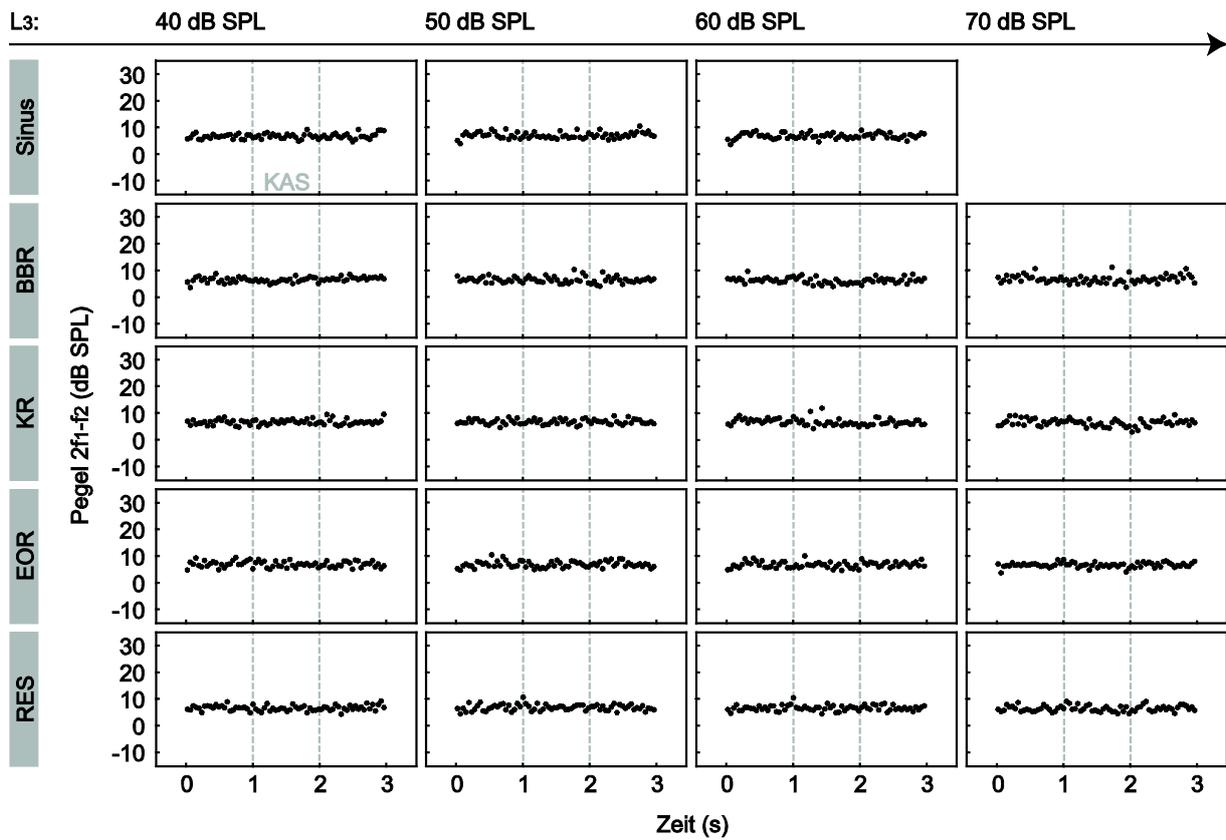


Abbildung 61: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 20 kHz | wach

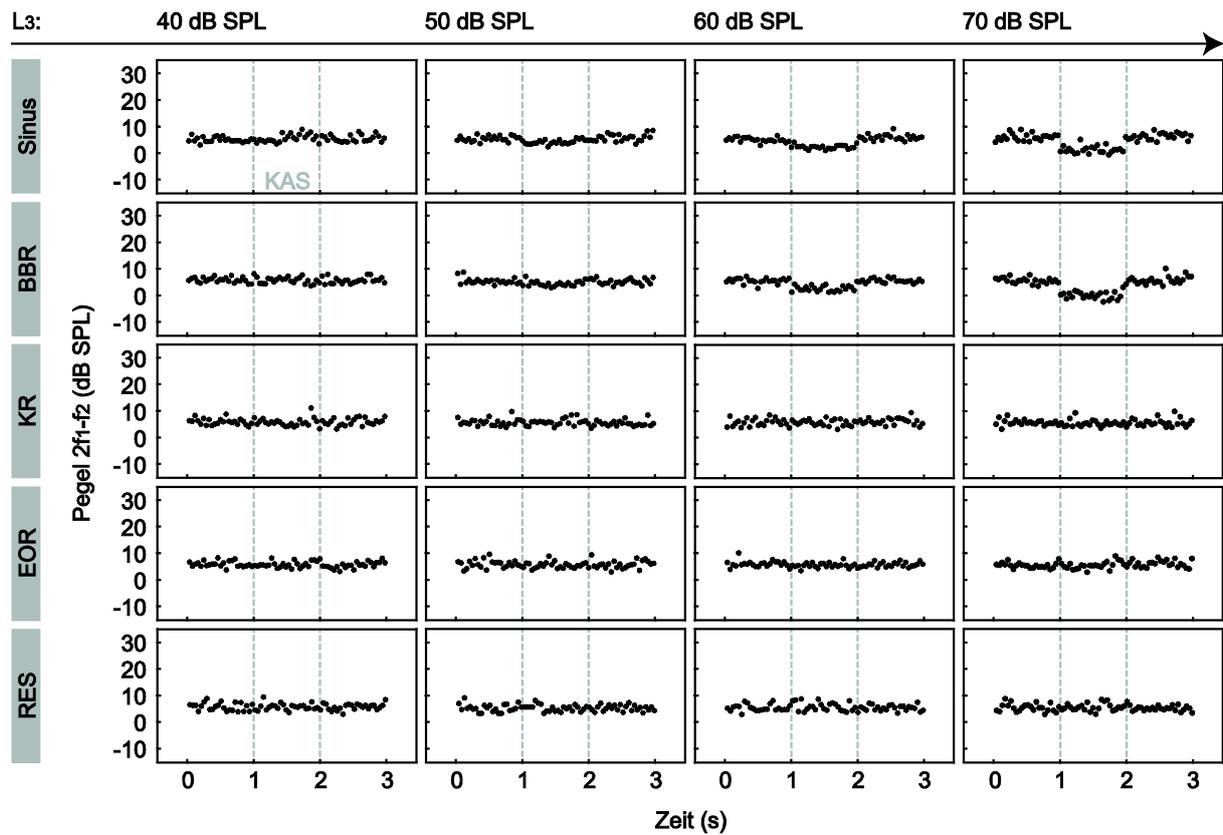


Abbildung 62: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 40 kHz | narkotisiert

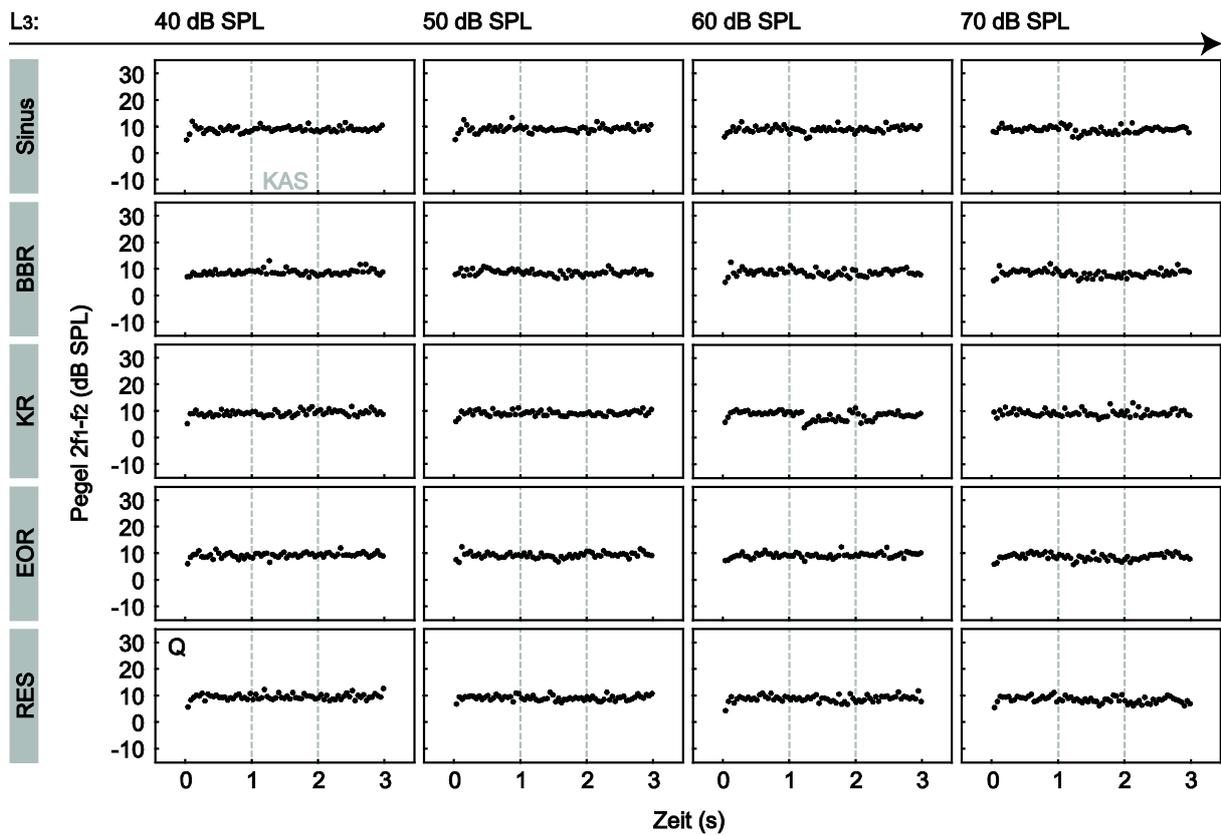


Abbildung 63: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 40 kHz | wach

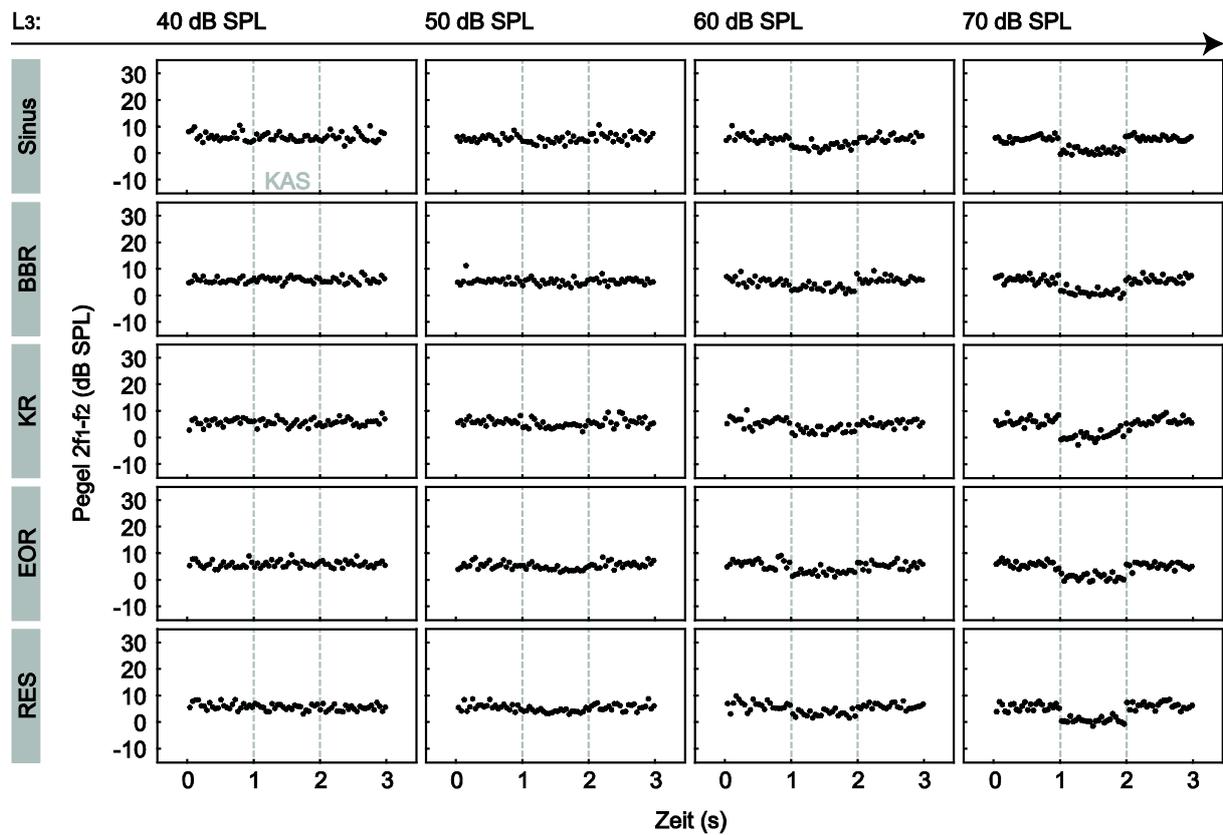


Abbildung 64: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 60 kHz | narkotisiert

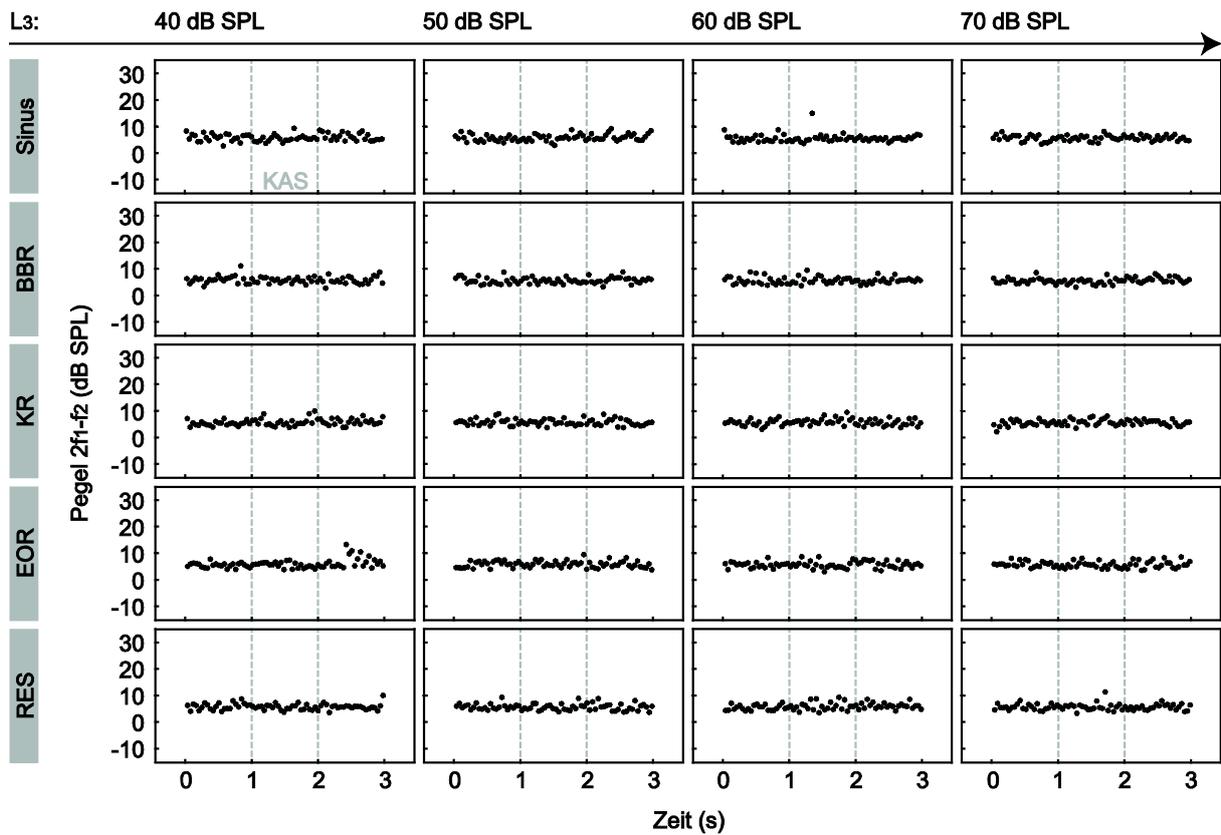


Abbildung 65: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 60 kHz | wach

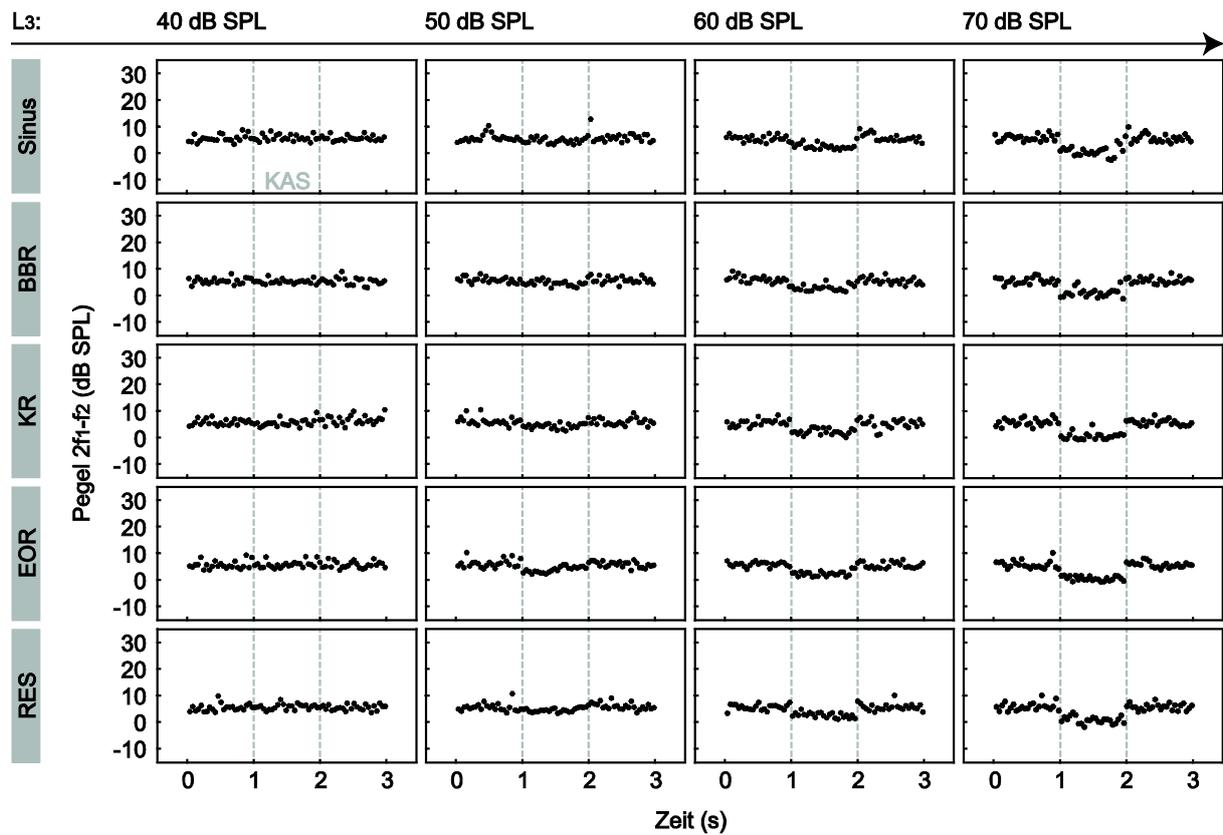


Abbildung 66: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 80 kHz | narkotisiert

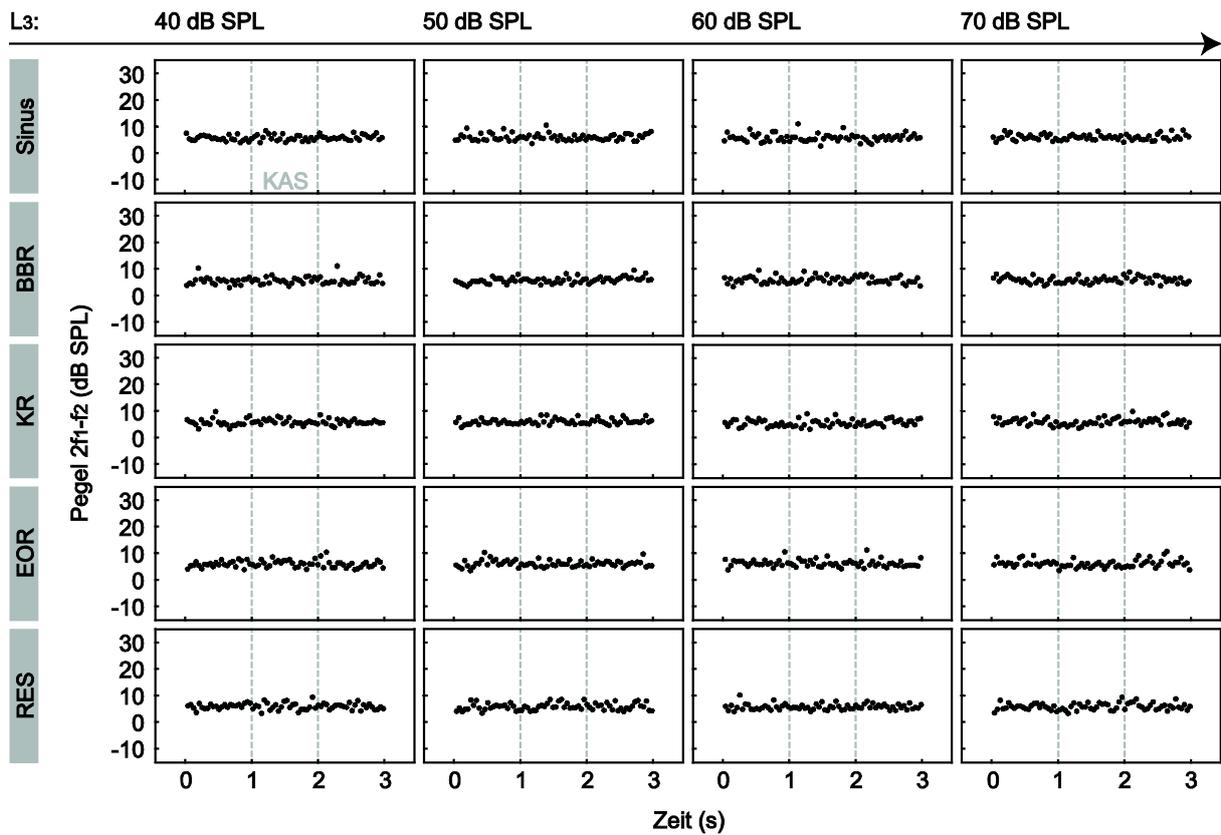


Abbildung 67: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T6 | 80 kHz | wach

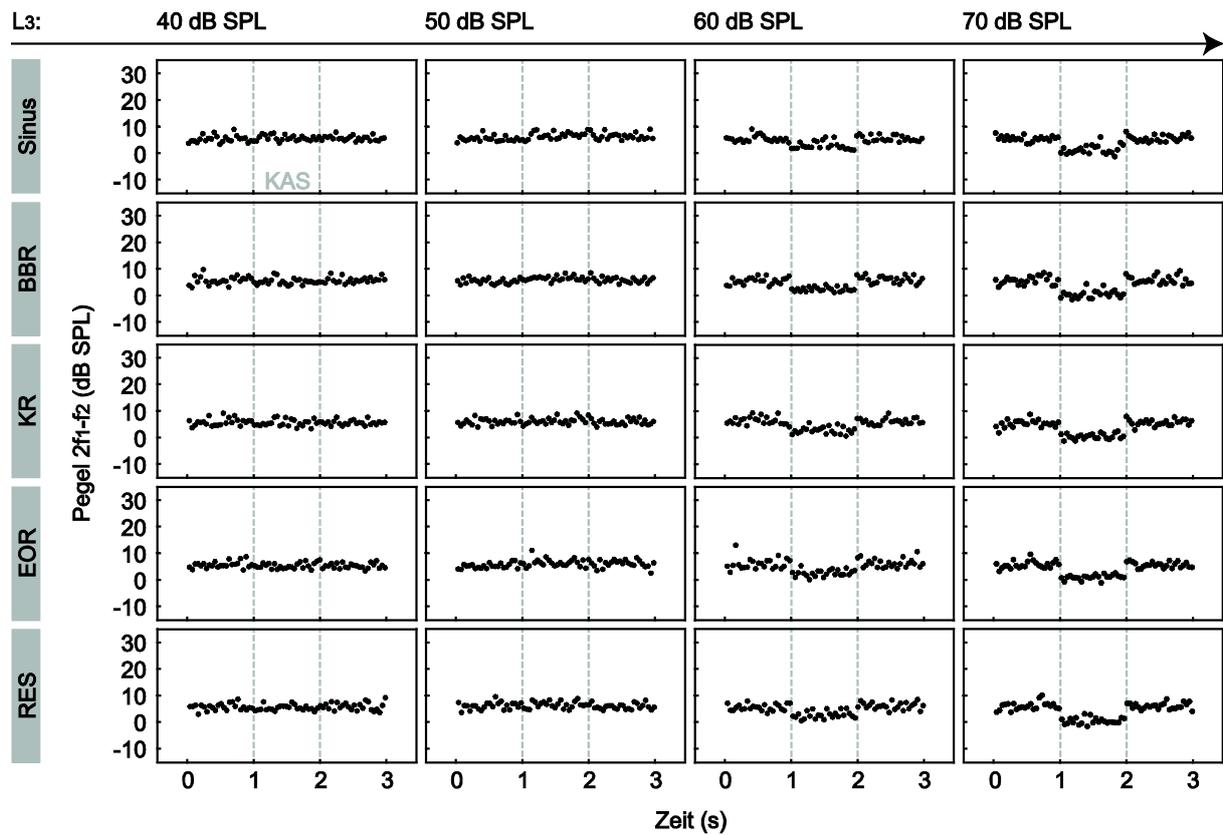


Abbildung 68: Einzelbeispiel (T6) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 20 kHz | narkotisiert

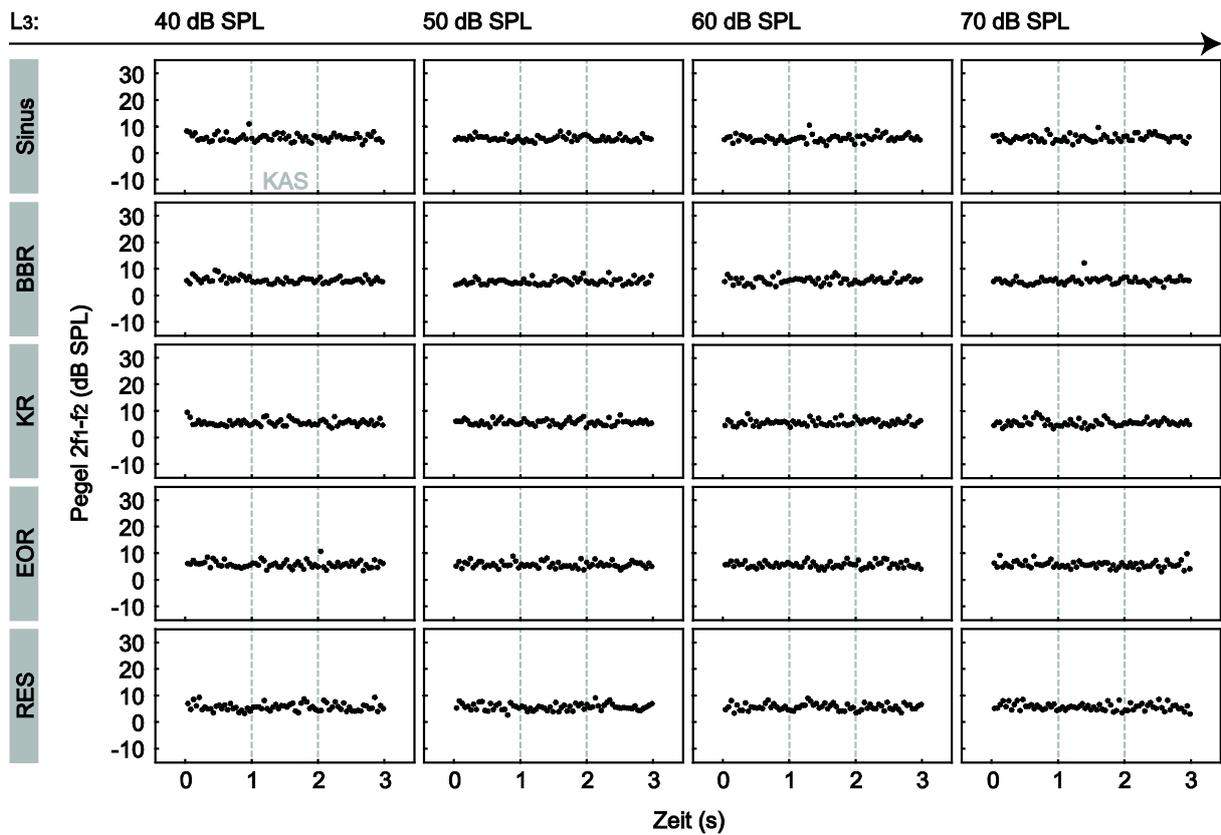


Abbildung 69: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 20 kHz | wach

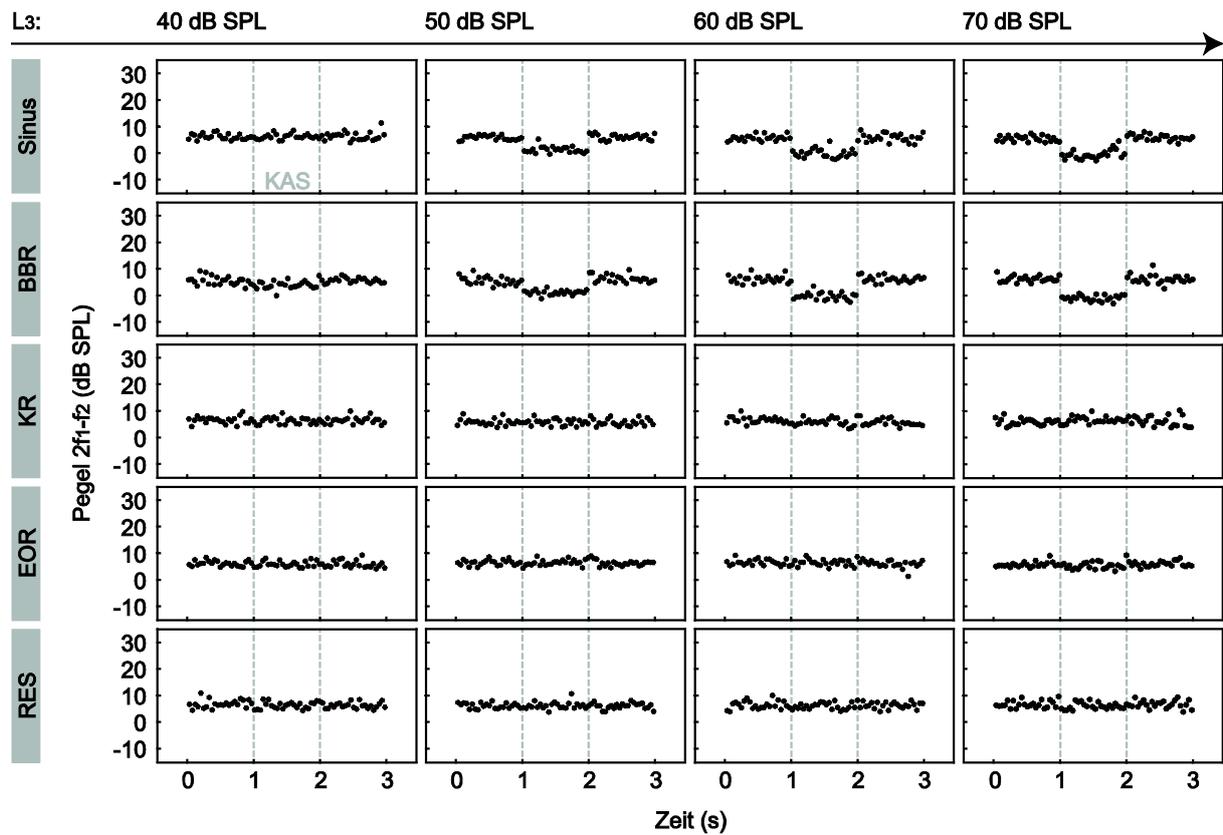


Abbildung 70: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 40 kHz | narkotisiert

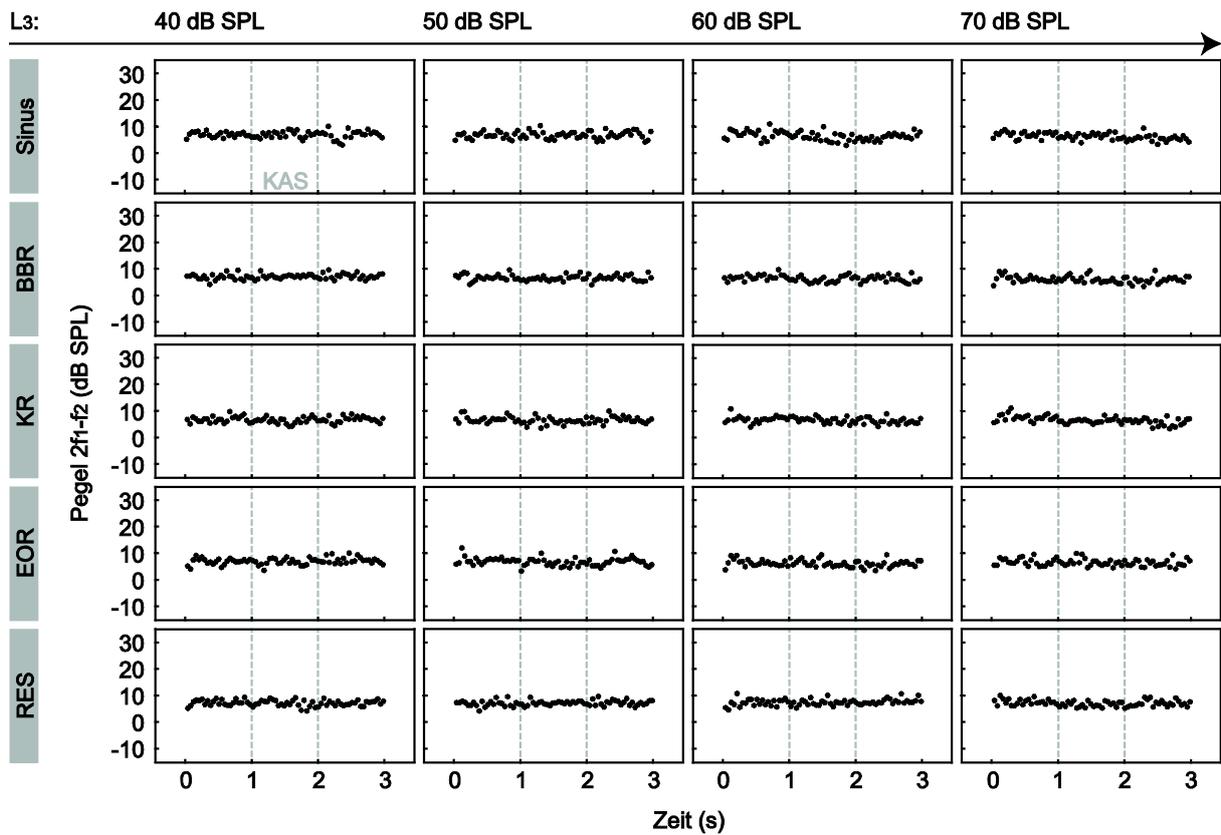


Abbildung 71: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 40 kHz | wach

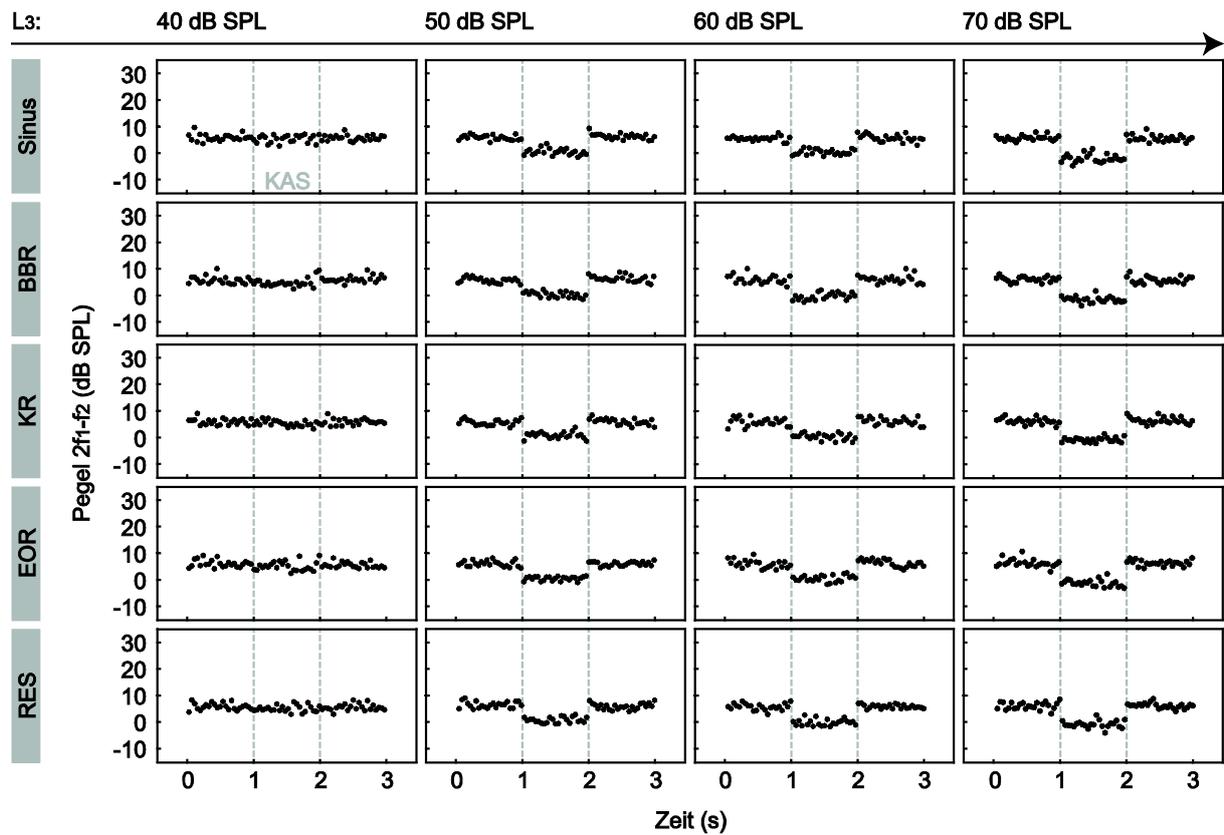


Abbildung 72: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 60 kHz | narkotisiert

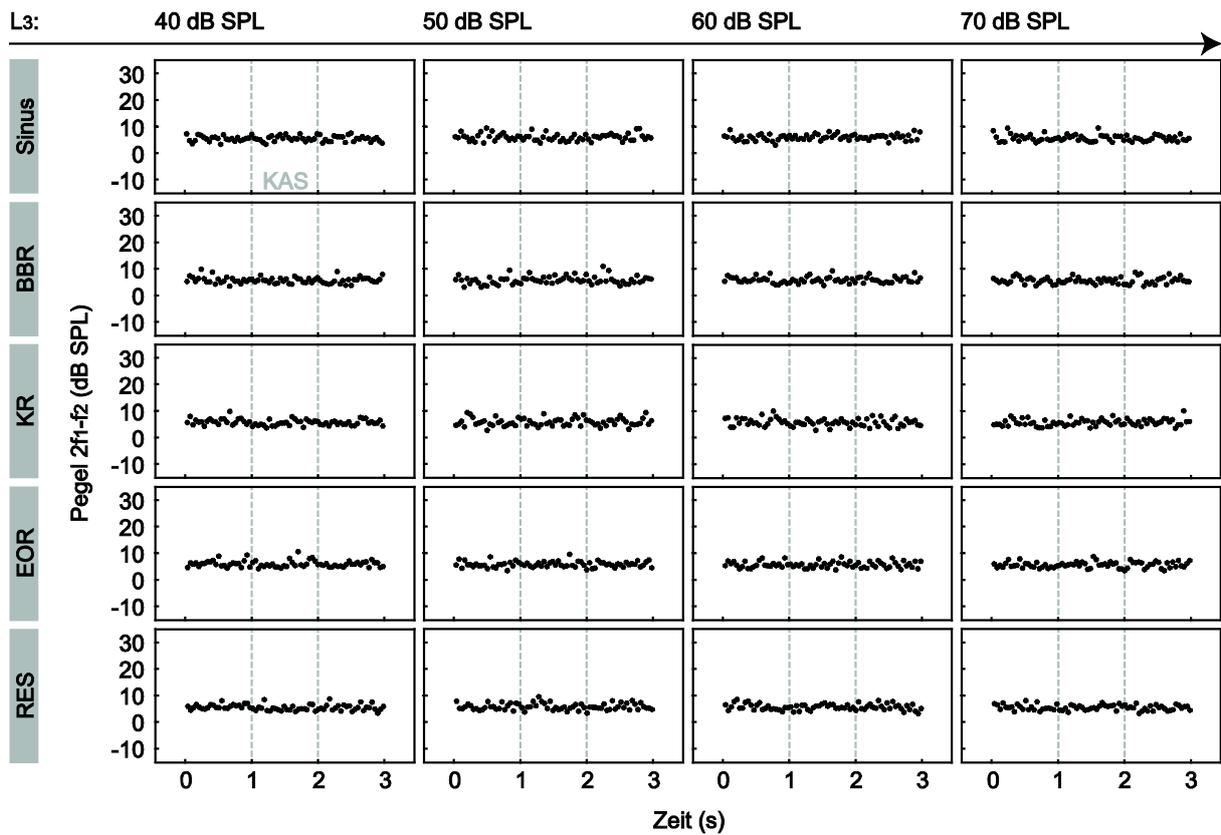


Abbildung 73: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 60 kHz | wach

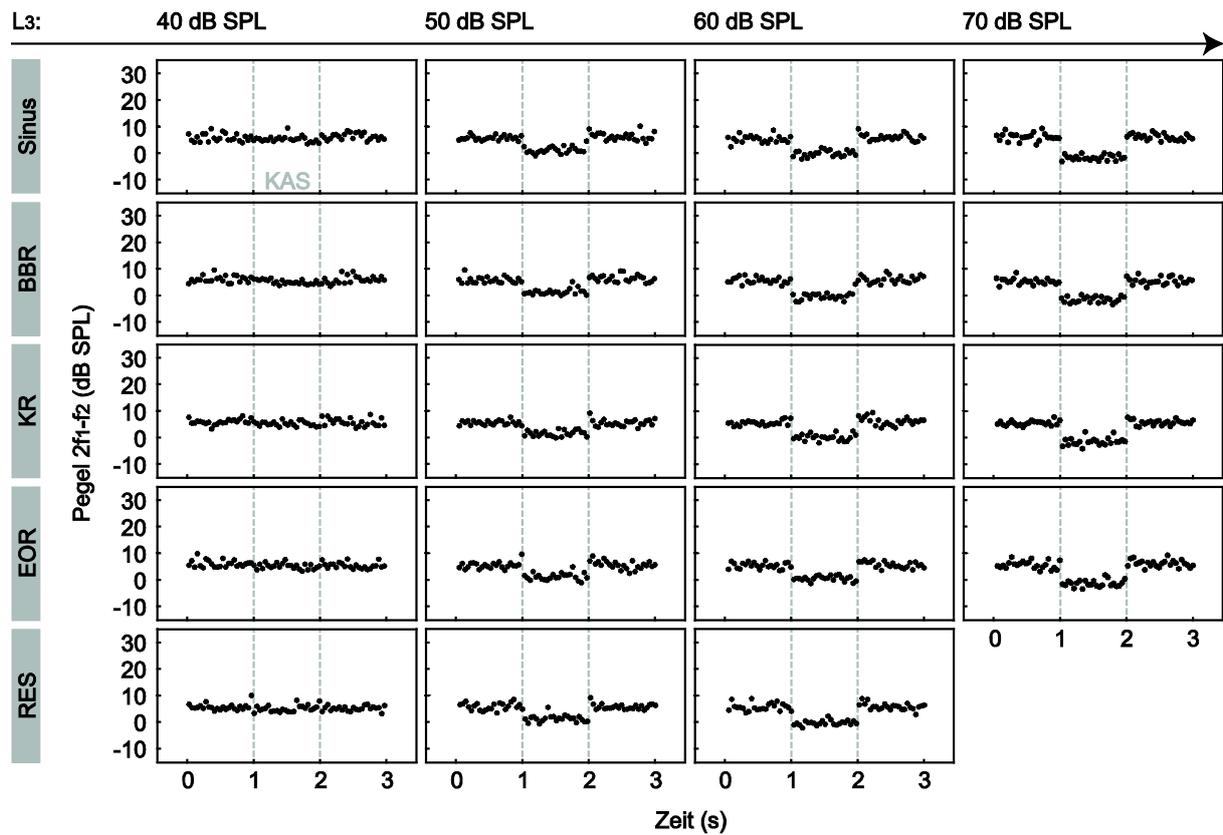


Abbildung 74: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 80 kHz | narkotisiert

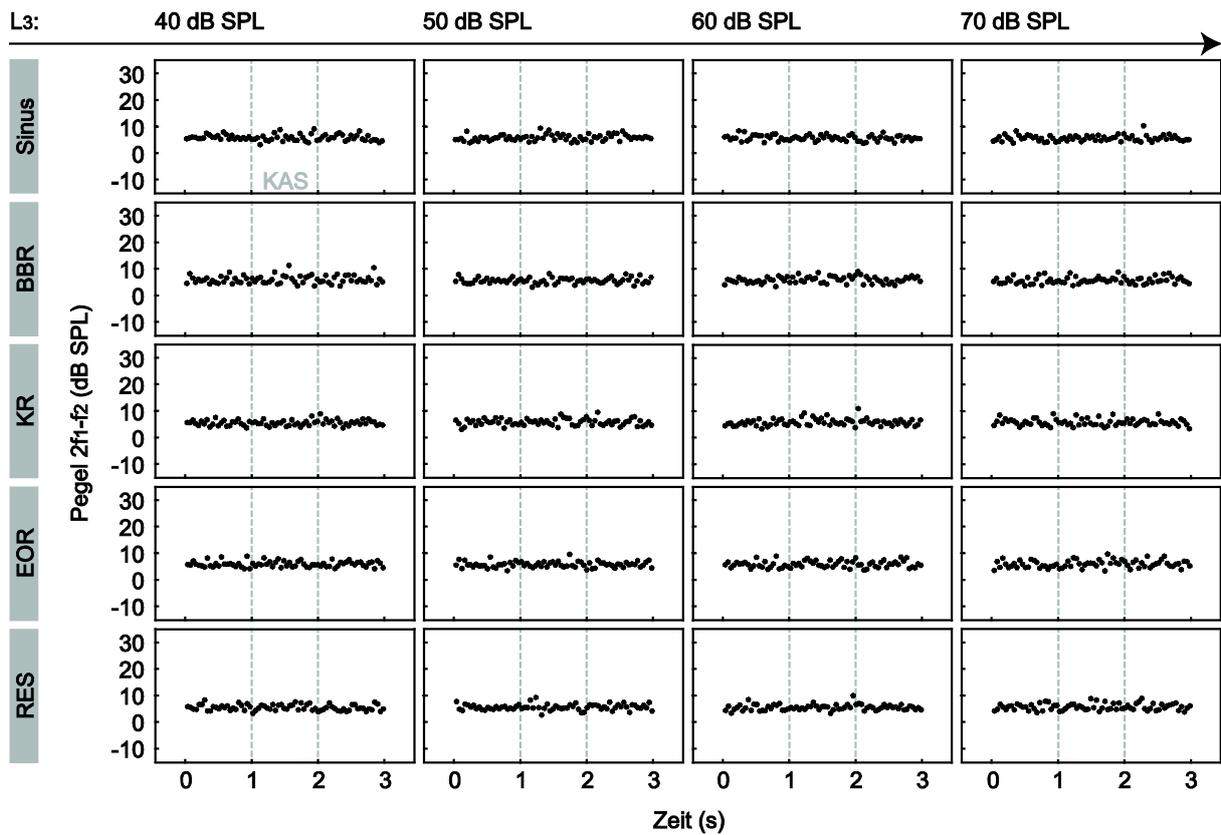


Abbildung 75: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T8 | 80 kHz | wach

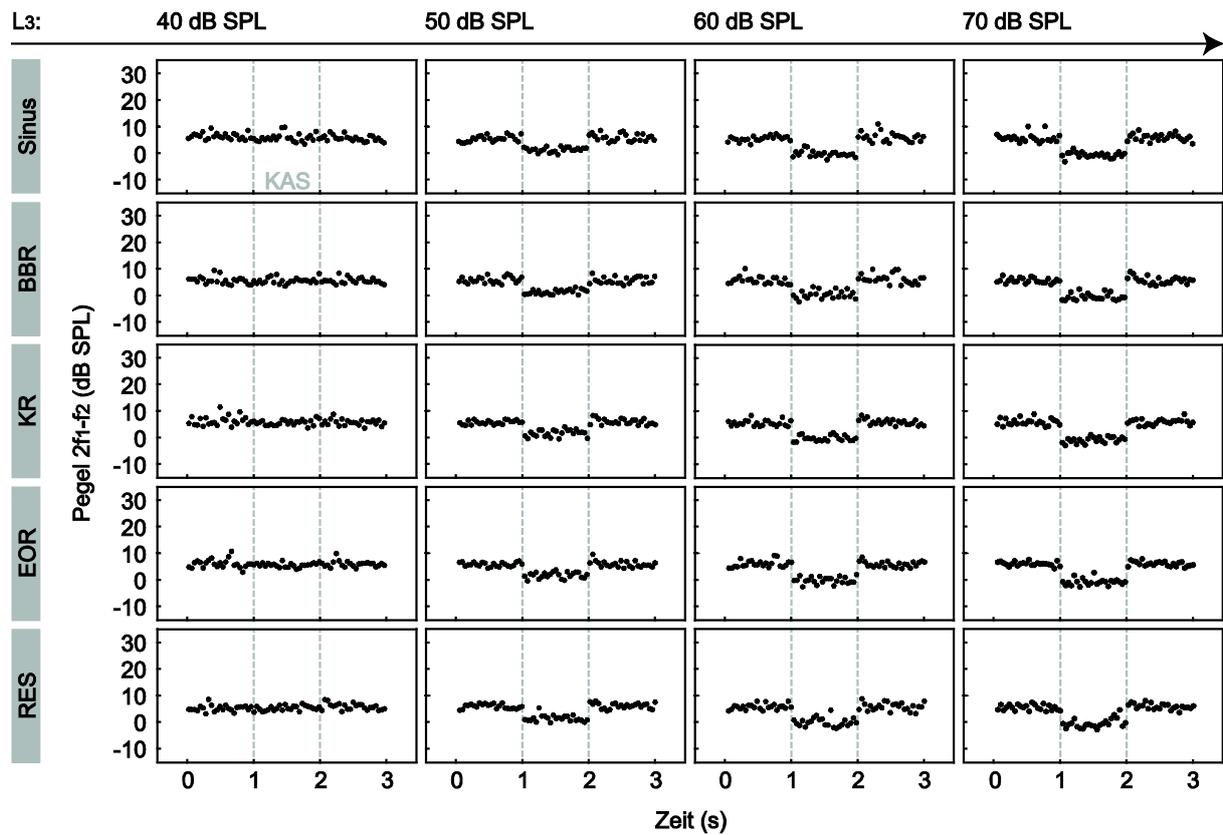


Abbildung 76: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 20 kHz | narkotisiert

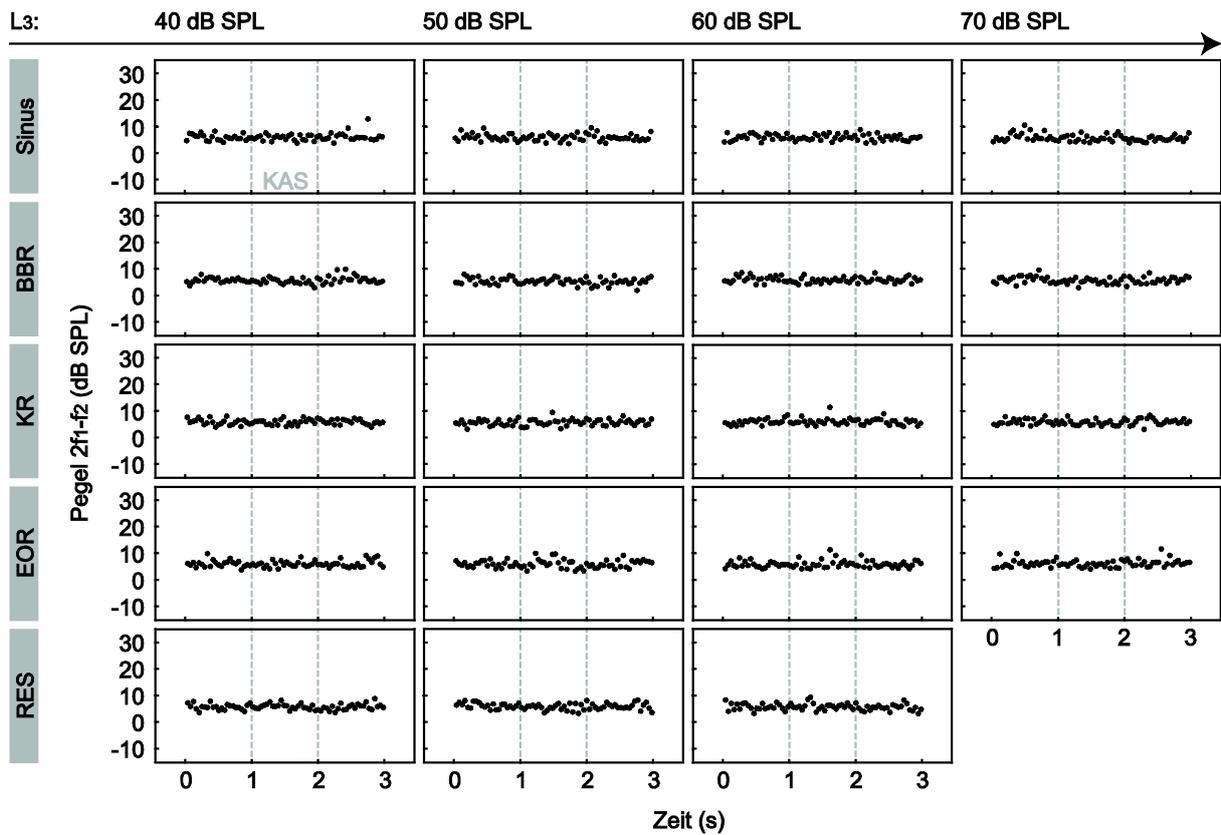


Abbildung 77: Einzelbeispiel (T9) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 20 kHz | wach

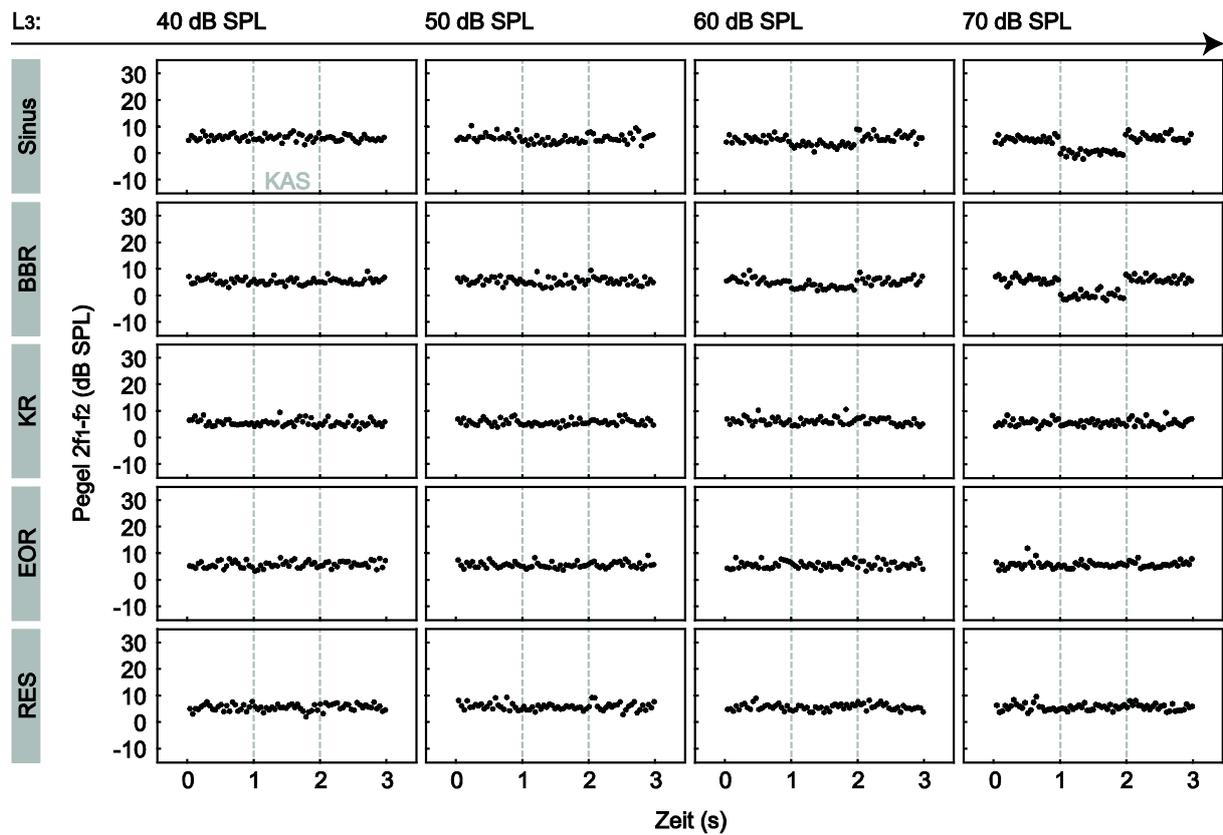


Abbildung 78: Einzelbeispiel (T9) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 20 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 40 kHz | narkotisiert

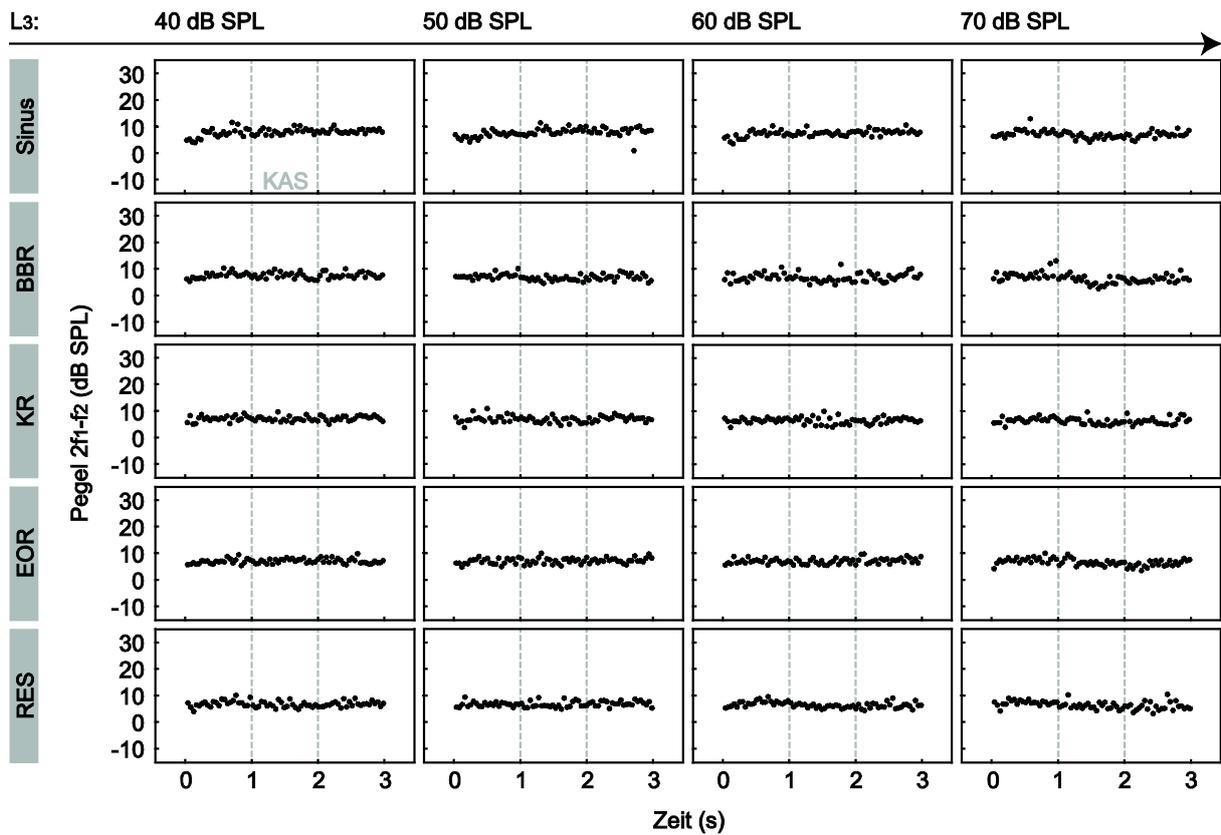


Abbildung 79: Einzelbeispiel (T9) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 40 kHz | wach

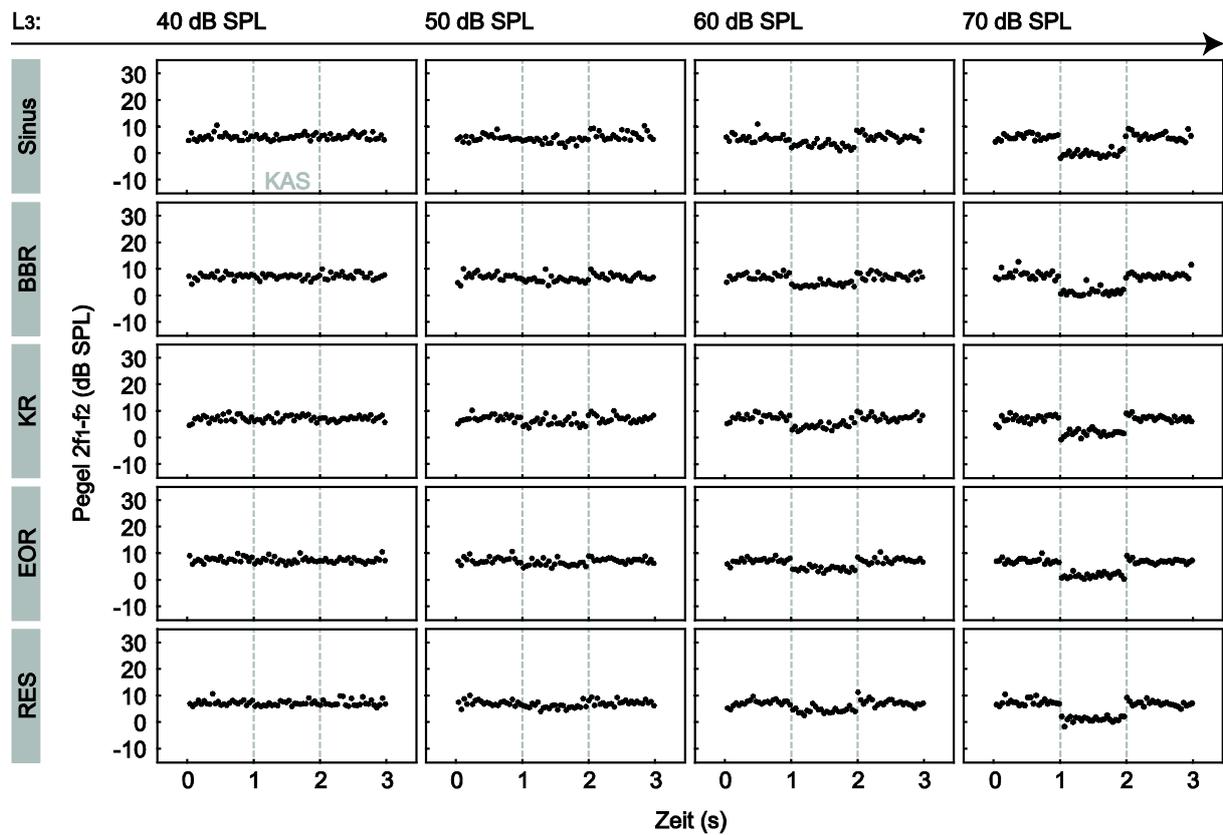


Abbildung 80: Einzelbeispiel (T9) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 40 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 60 kHz | narkotisiert

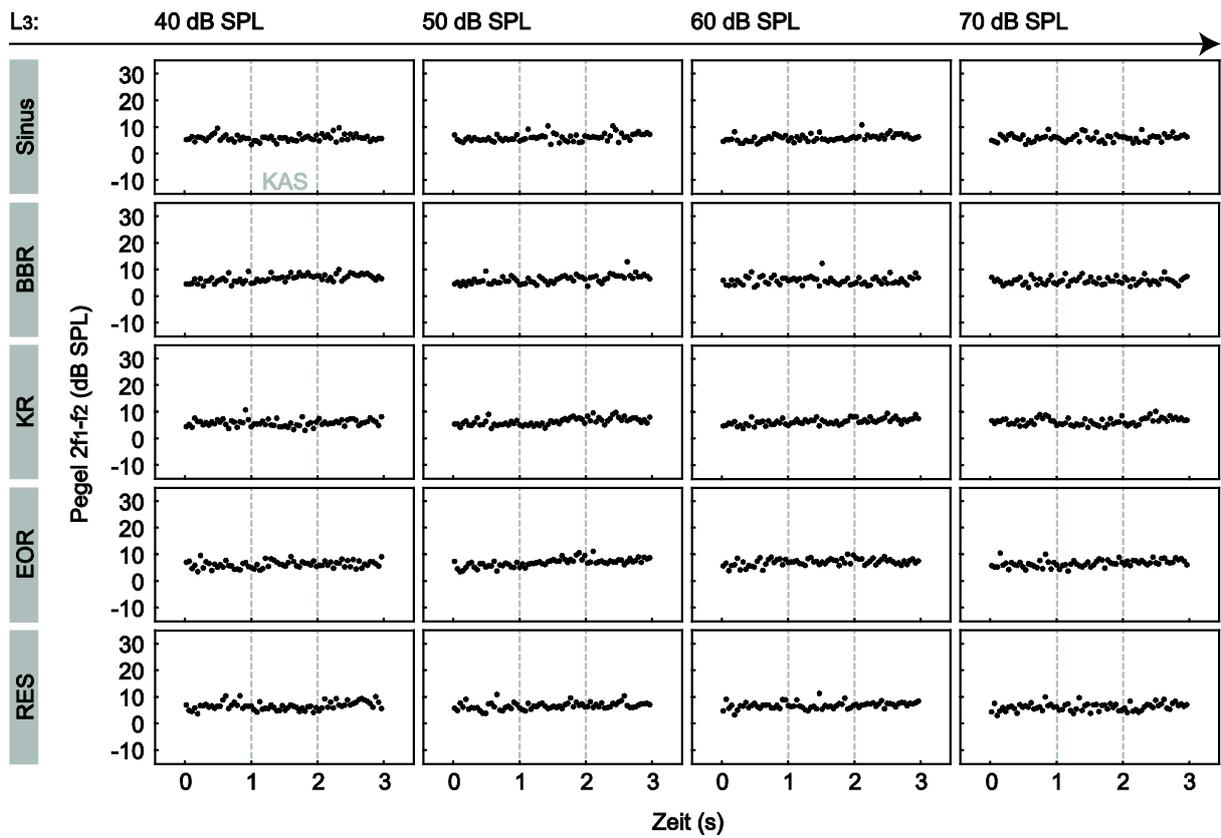


Abbildung 81: Einzelbeispiel (T9) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 60 kHz | wach

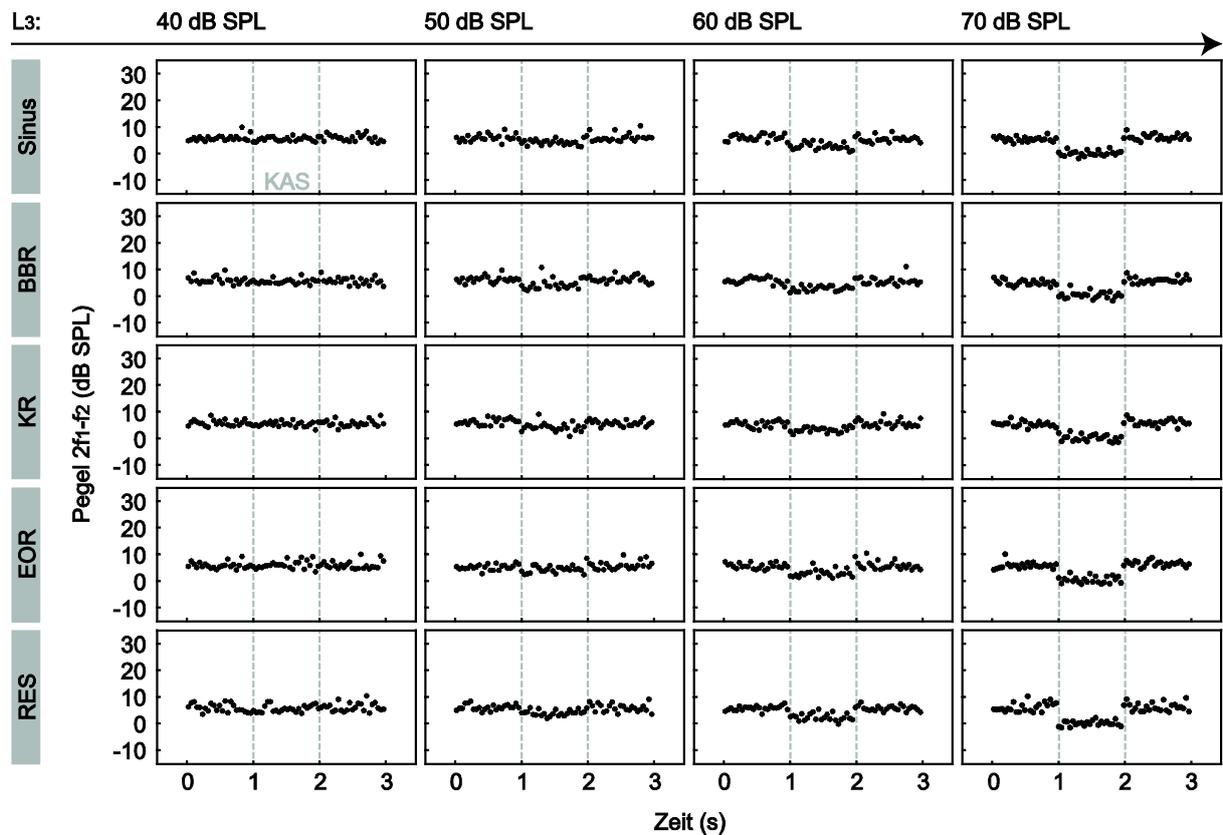


Abbildung 82: Einzelbeispiel (T8) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 60 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 80 kHz | narkotisiert

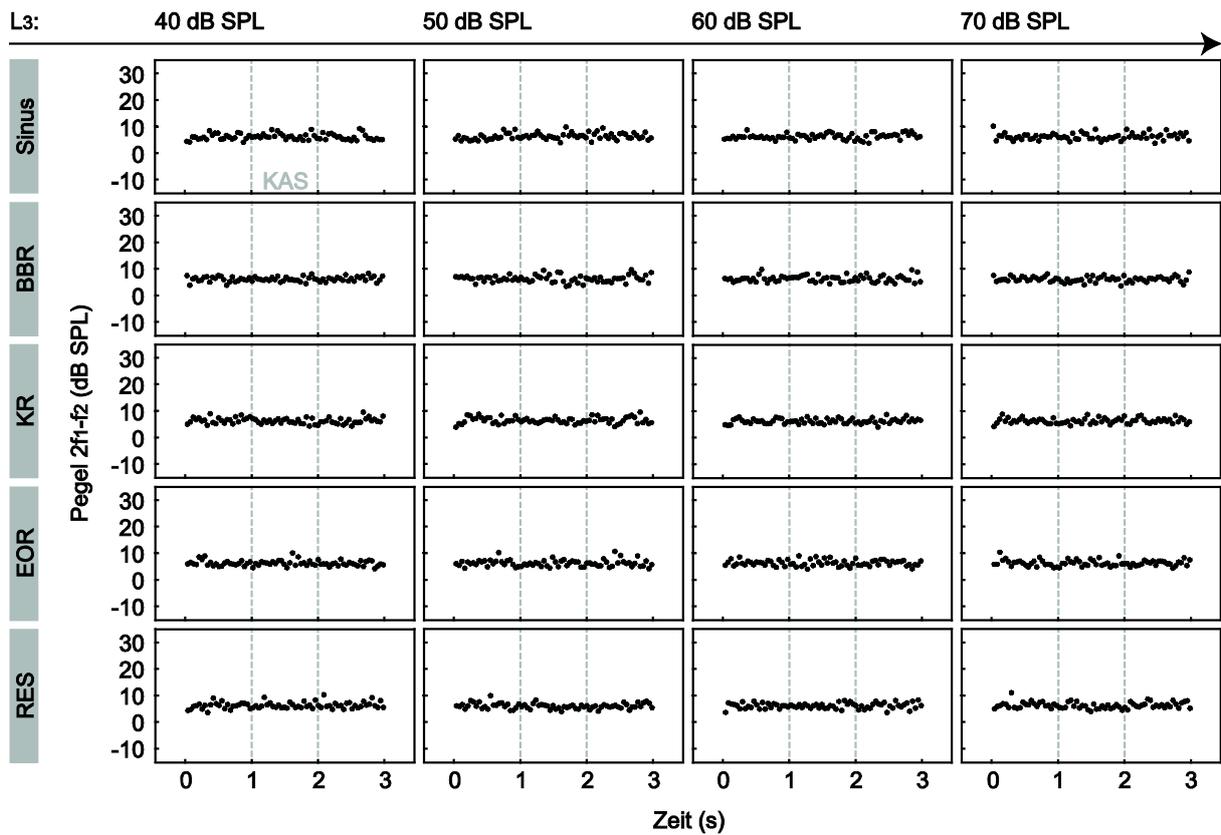


Abbildung 83: Einzelbeispiel (T9) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) unter Narkoseeinfluss bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

T9 | 80 kHz | wach

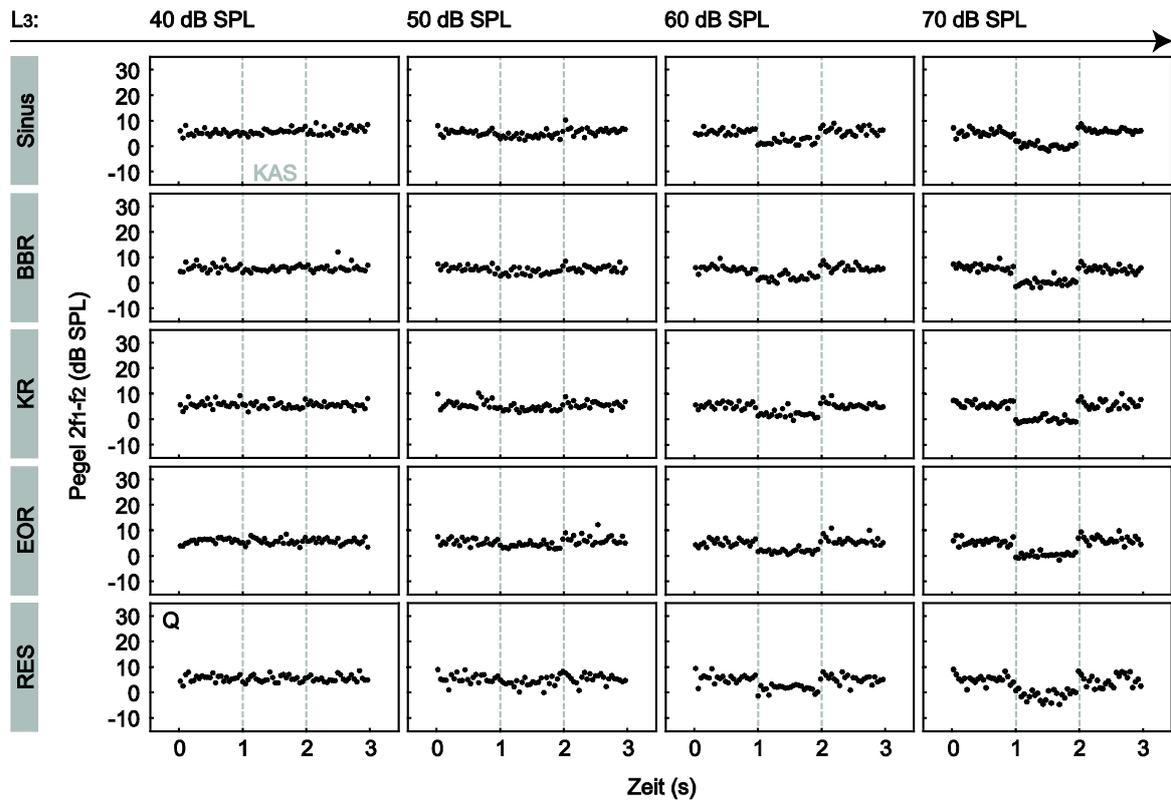


Abbildung 84: Einzelbeispiel (T9) einer DPOAE-Zeitmessung über drei Sekunden bei einer  $f_2$ -Frequenz von 80 kHz und einer einsekündigen KAS (Sinus, BBR, KR, EOR, RES) im wachen Tier bei mehreren kontralateral verwendeten Pegeln (40, 50, 60 und 70 dB SPL). Die gestrichelten Linien markieren den Zeitraum der KAS.

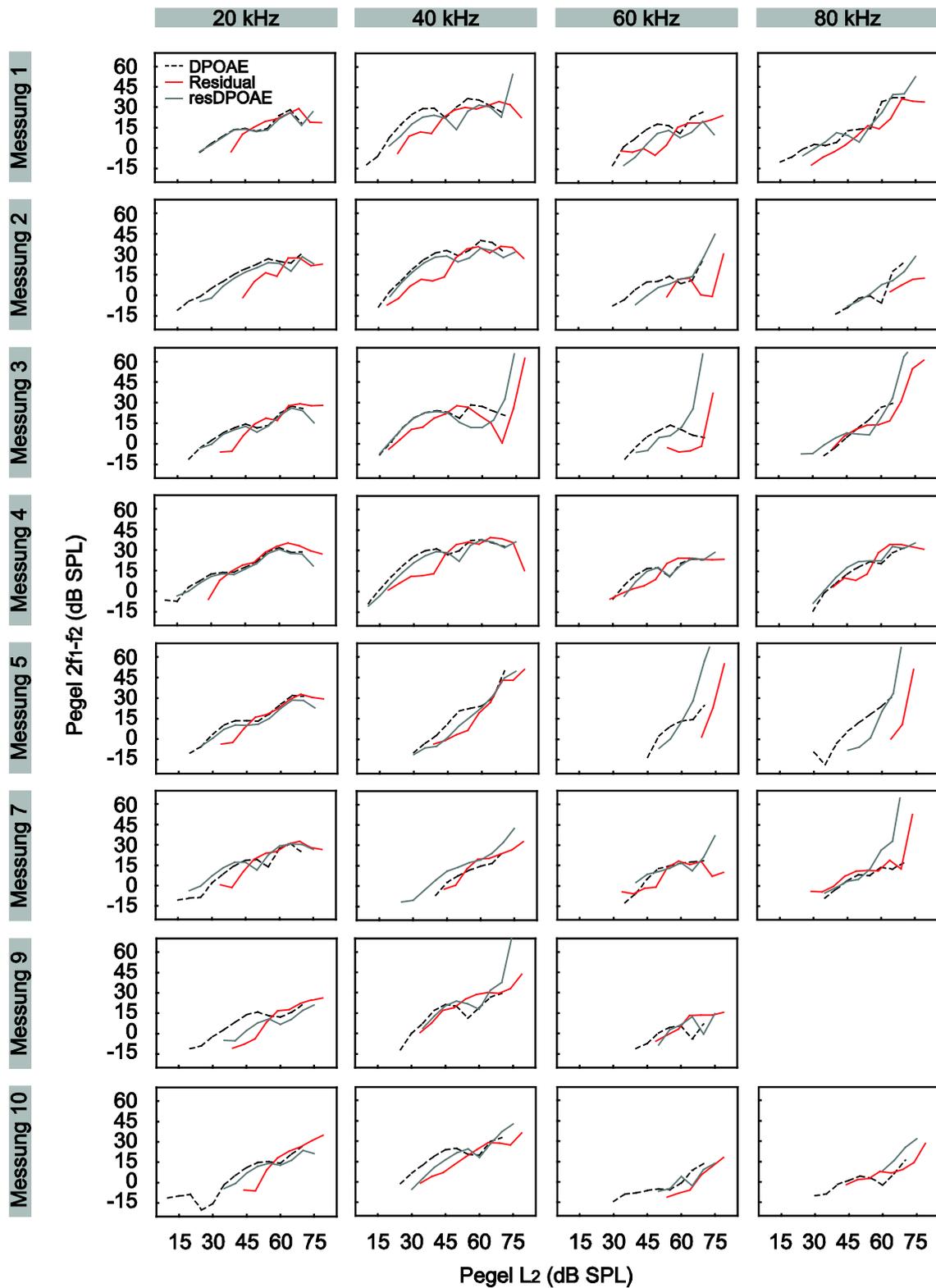


Abbildung 85: OAE-Residualmessung mit Reintonstimulation. Dargestellt sind die Messungen 1-10 jeweils für 20, 40 60 und 80 kHz. Aufgetragen sind alle Messpunkte, die 6 dB über dem Rauschniveau lagen.

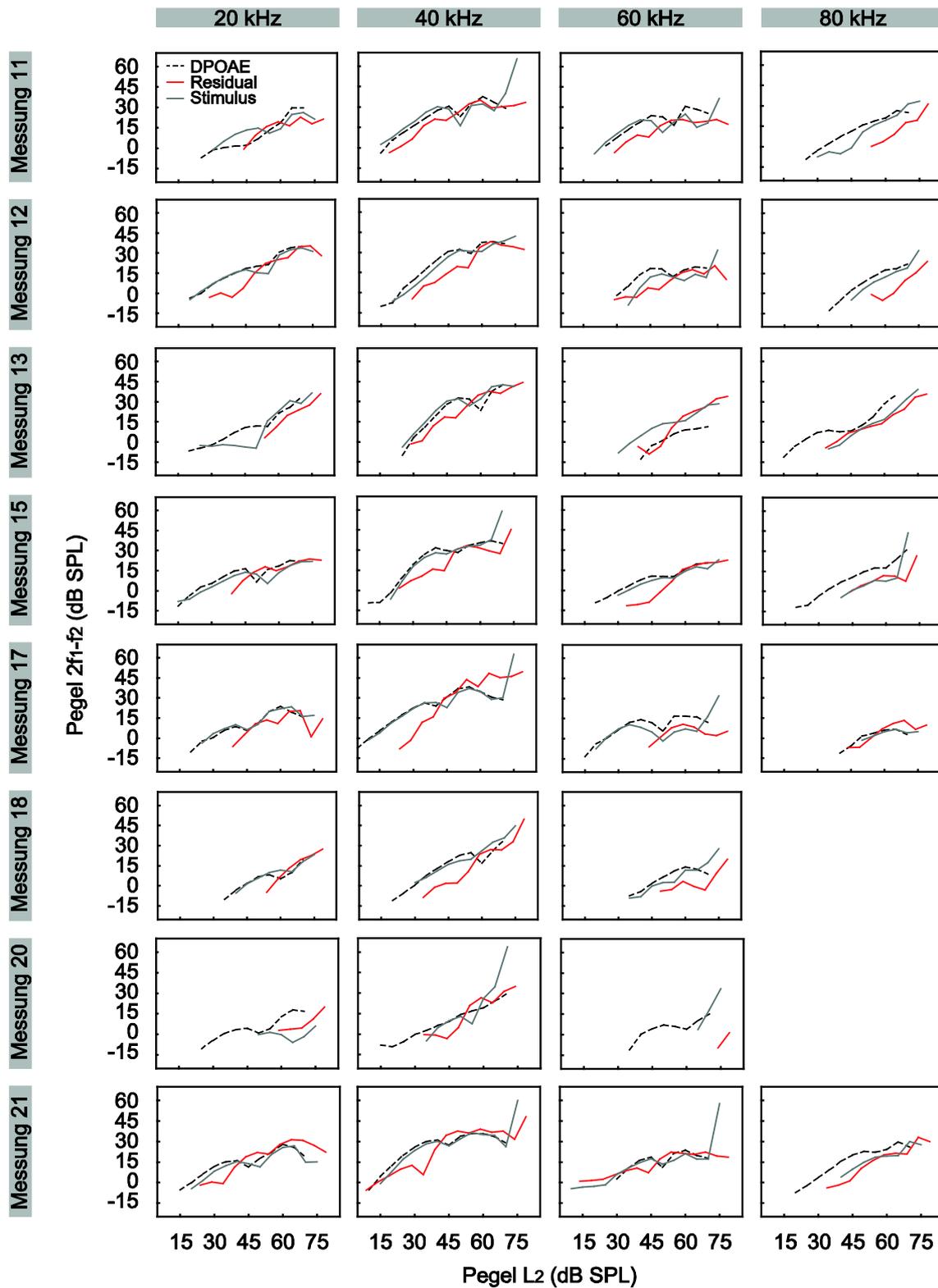


Abbildung 86: OAE-Residualmessung mit Reintonstimulation. Dargestellt sind die Messungen 11-21 jeweils für 20, 40 60 und 80 kHz. Aufgetragen sind alle Messpunkte, die 6 dB über dem Rauschniveau lagen.

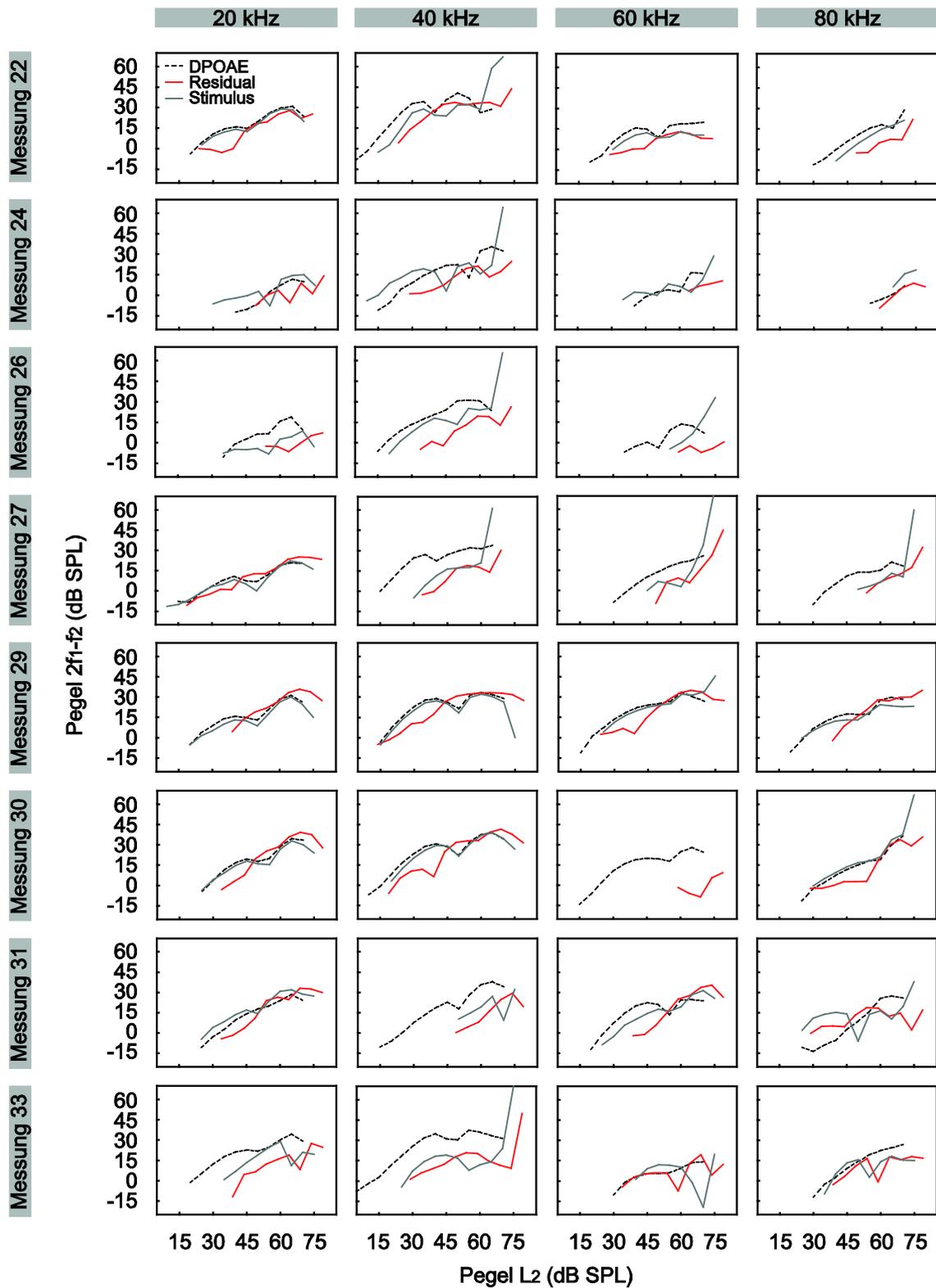


Abbildung 87: OAE-Residualmessung mit Reintonstimulation. Dargestellt sind die Messungen 22-33 jeweils für 20, 40 60 und 80 kHz. Aufgetragen sind alle Messpunkte, die 6 dB über dem Rauschniveau lagen.

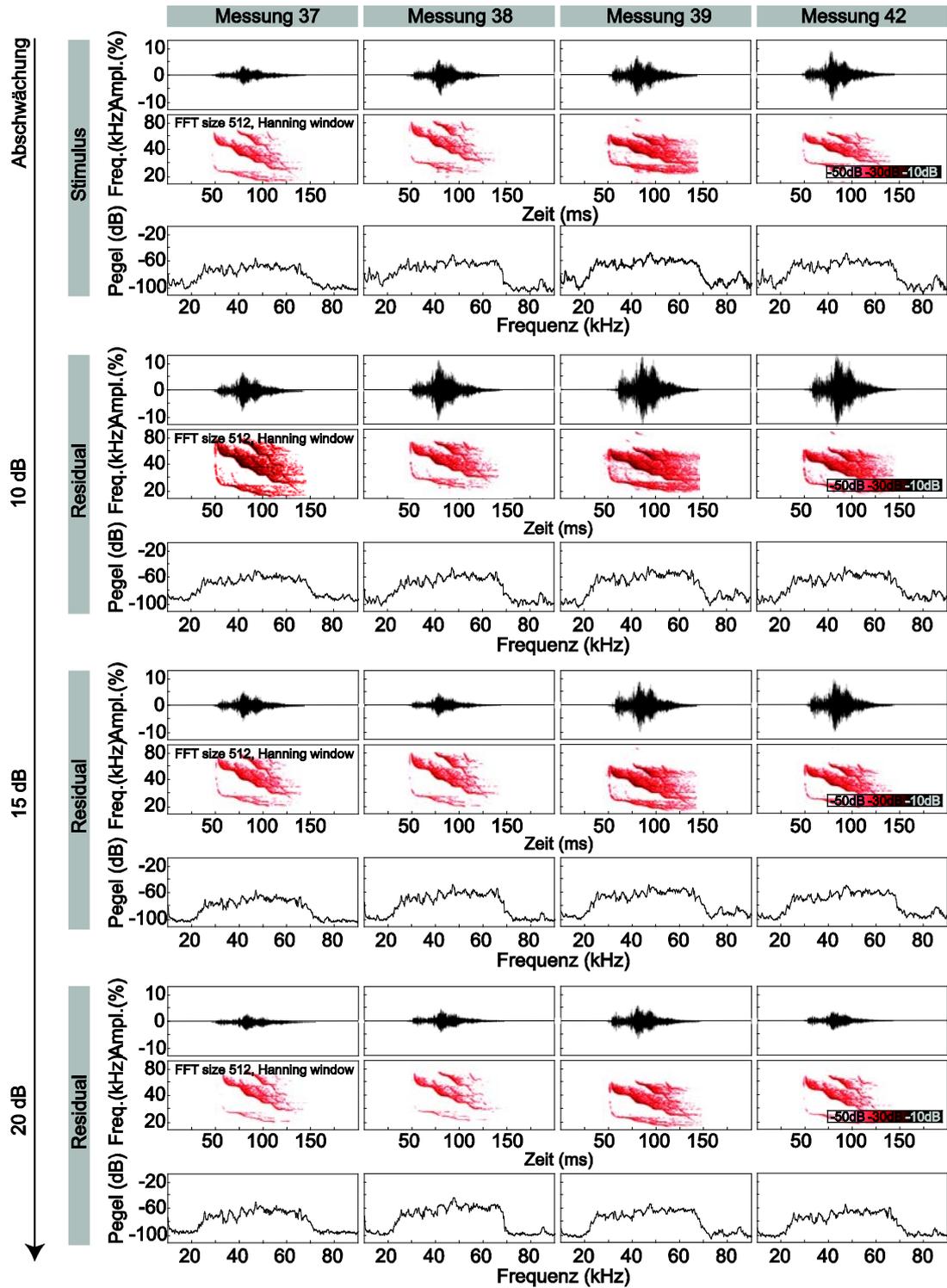


Abbildung 88: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

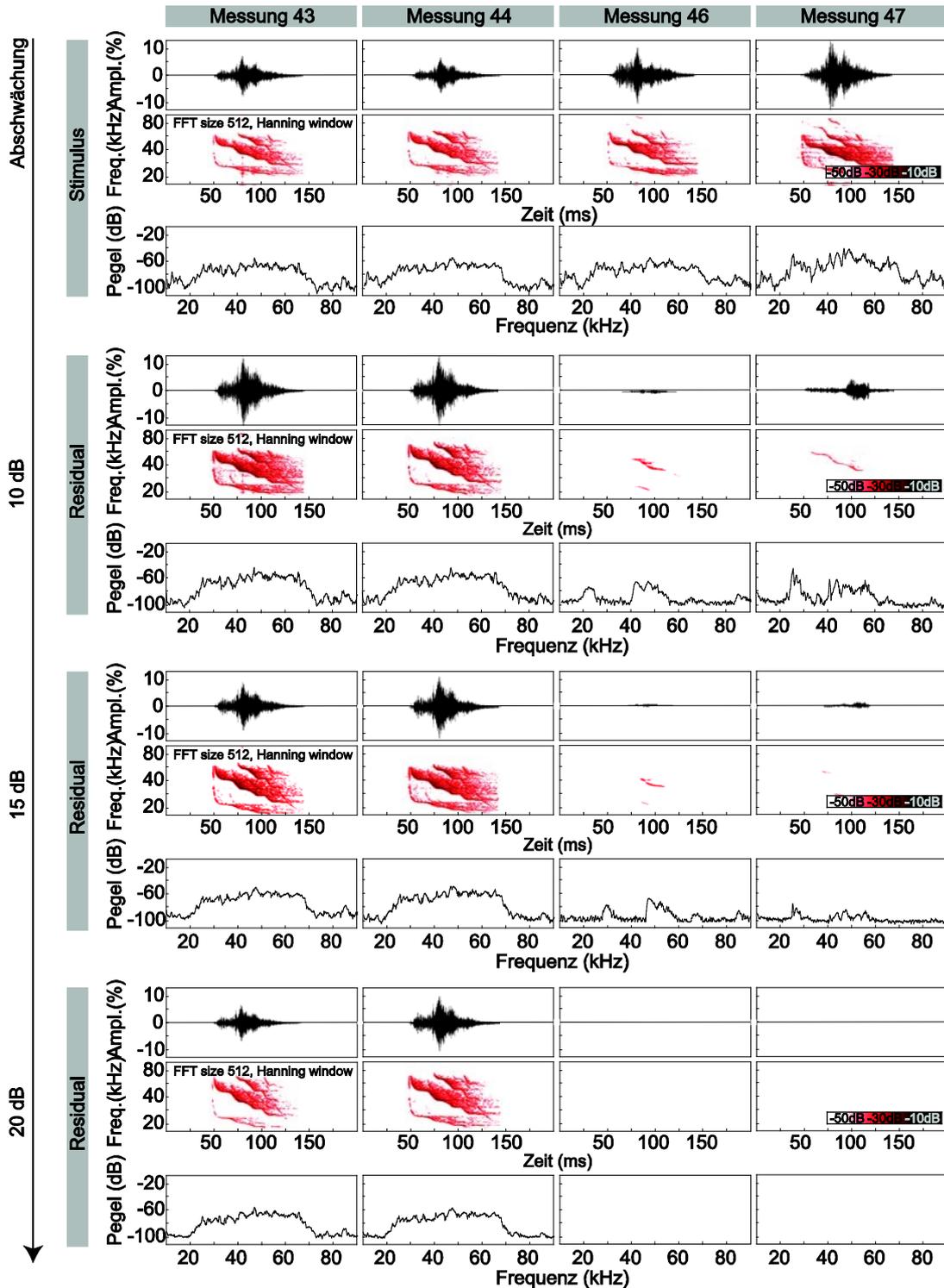


Abbildung 89: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

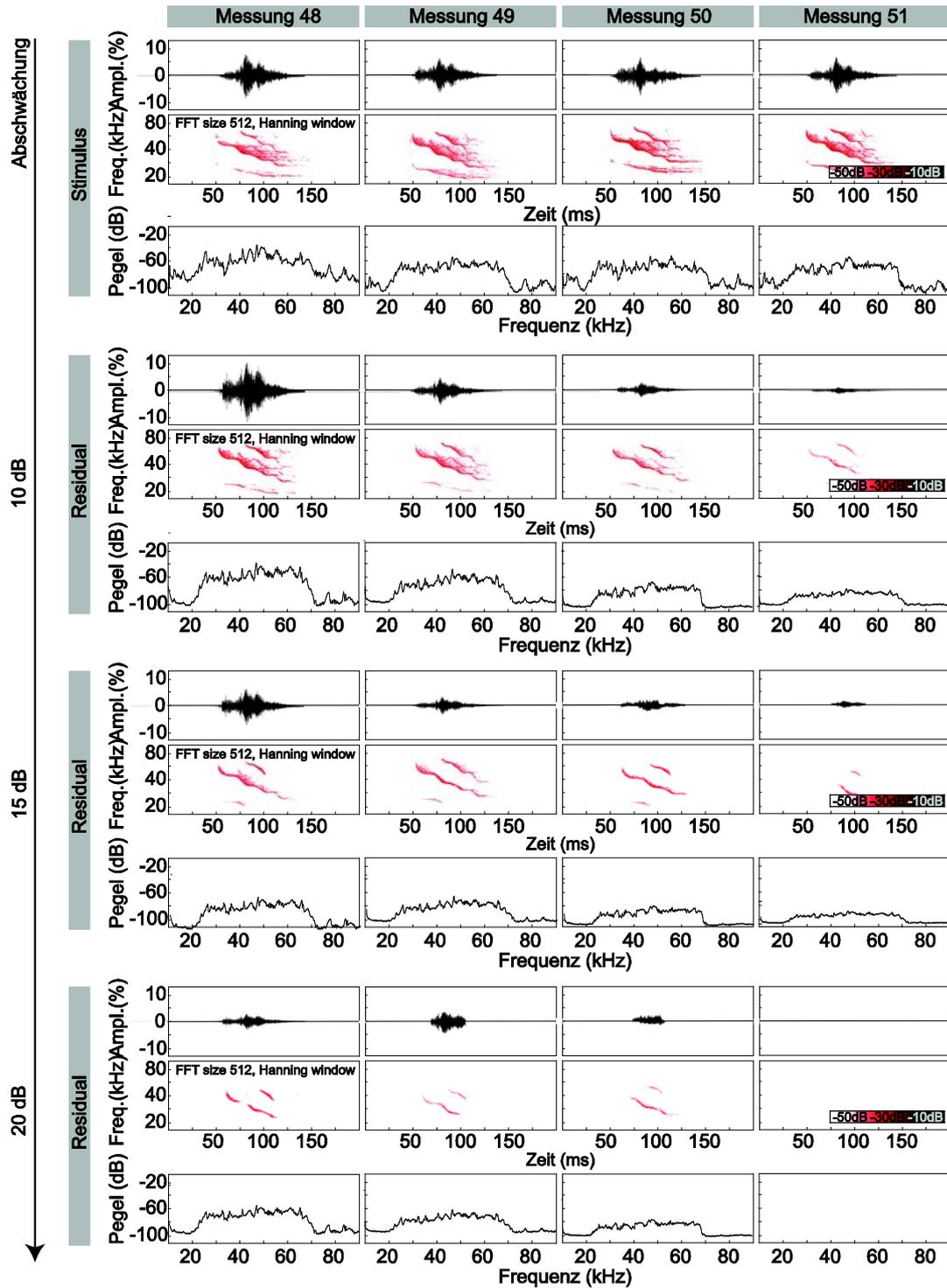


Abbildung 90: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

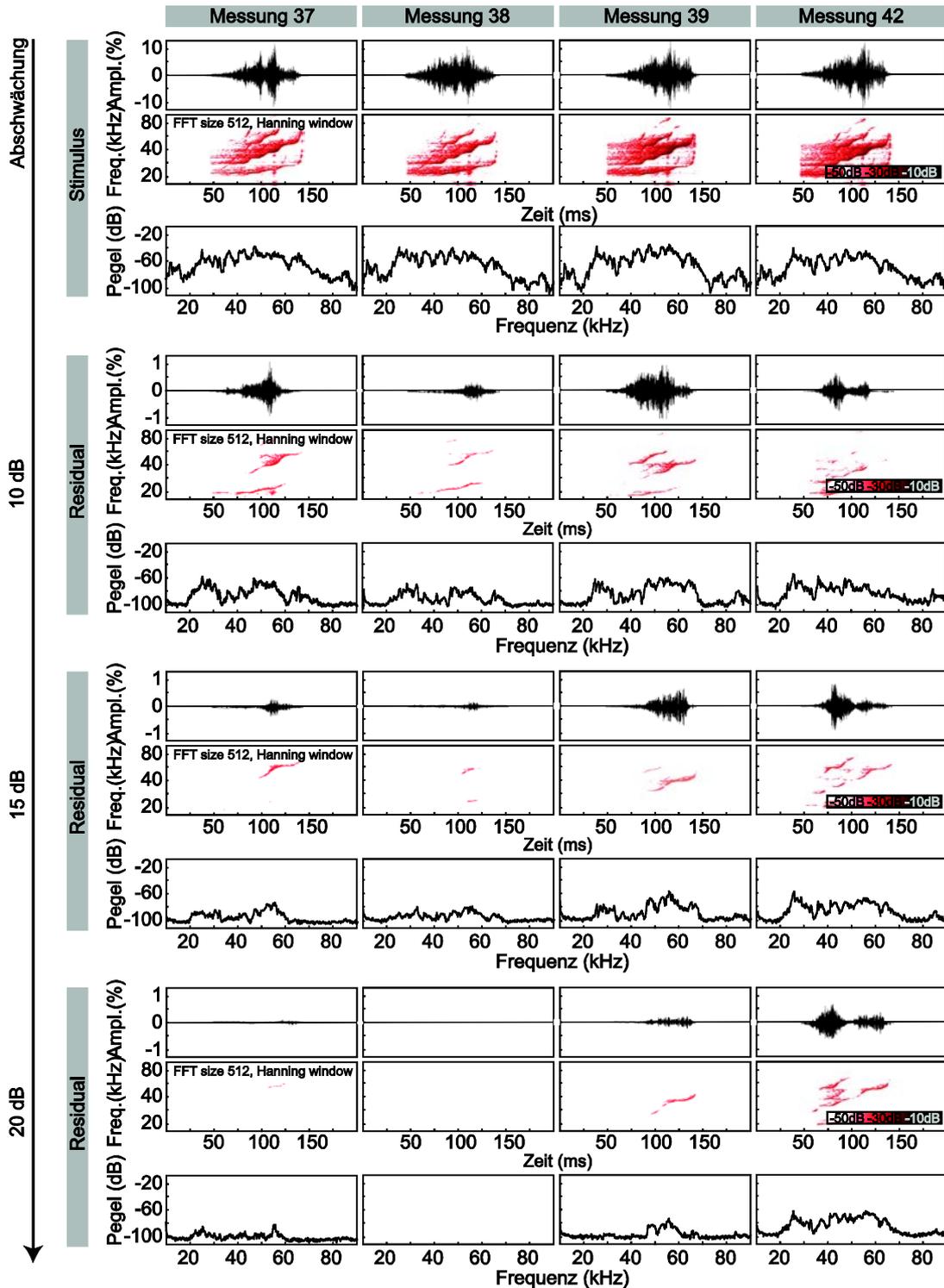


Abbildung 91: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen inversen KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

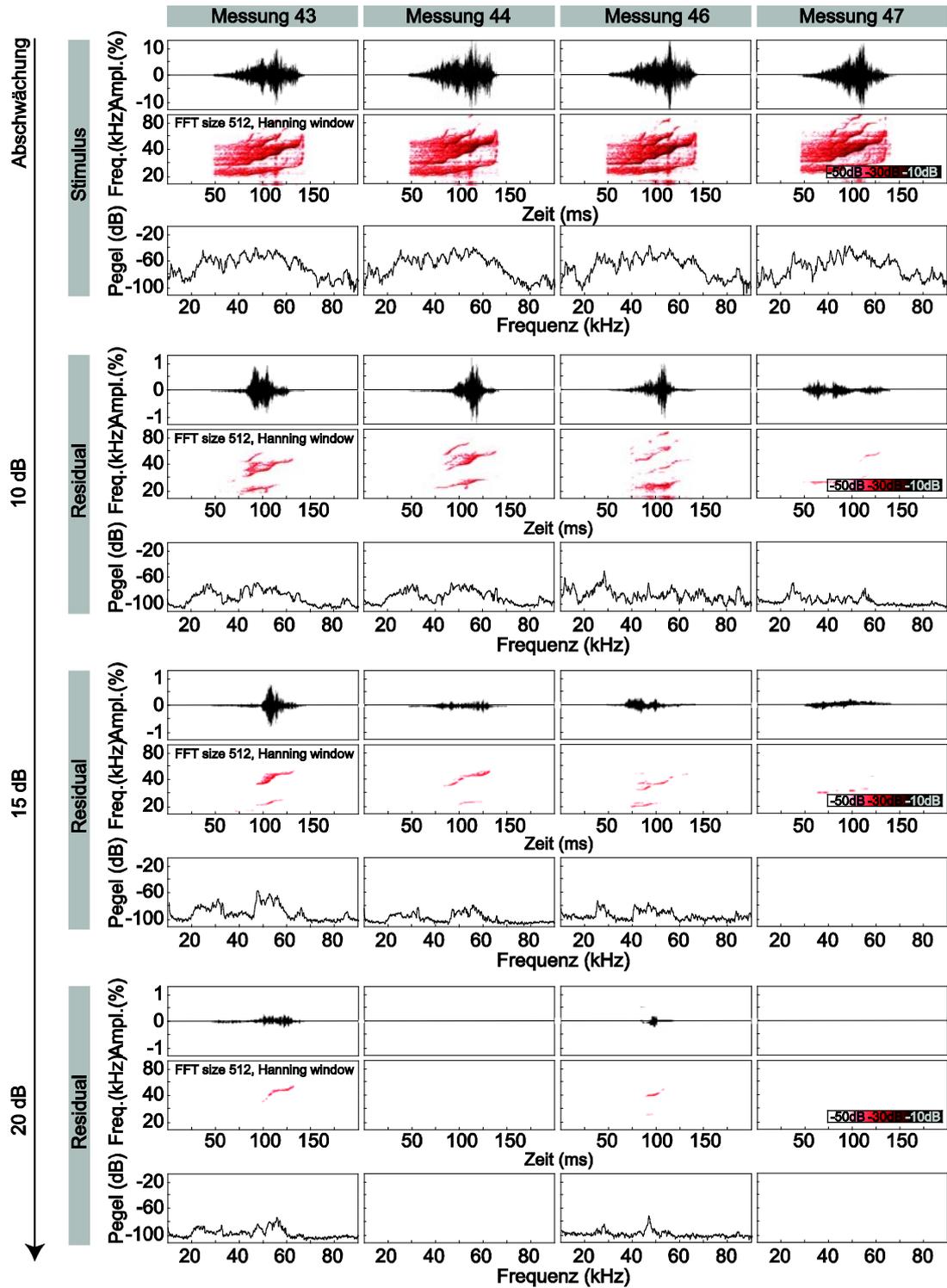


Abbildung 92: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen inversen KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

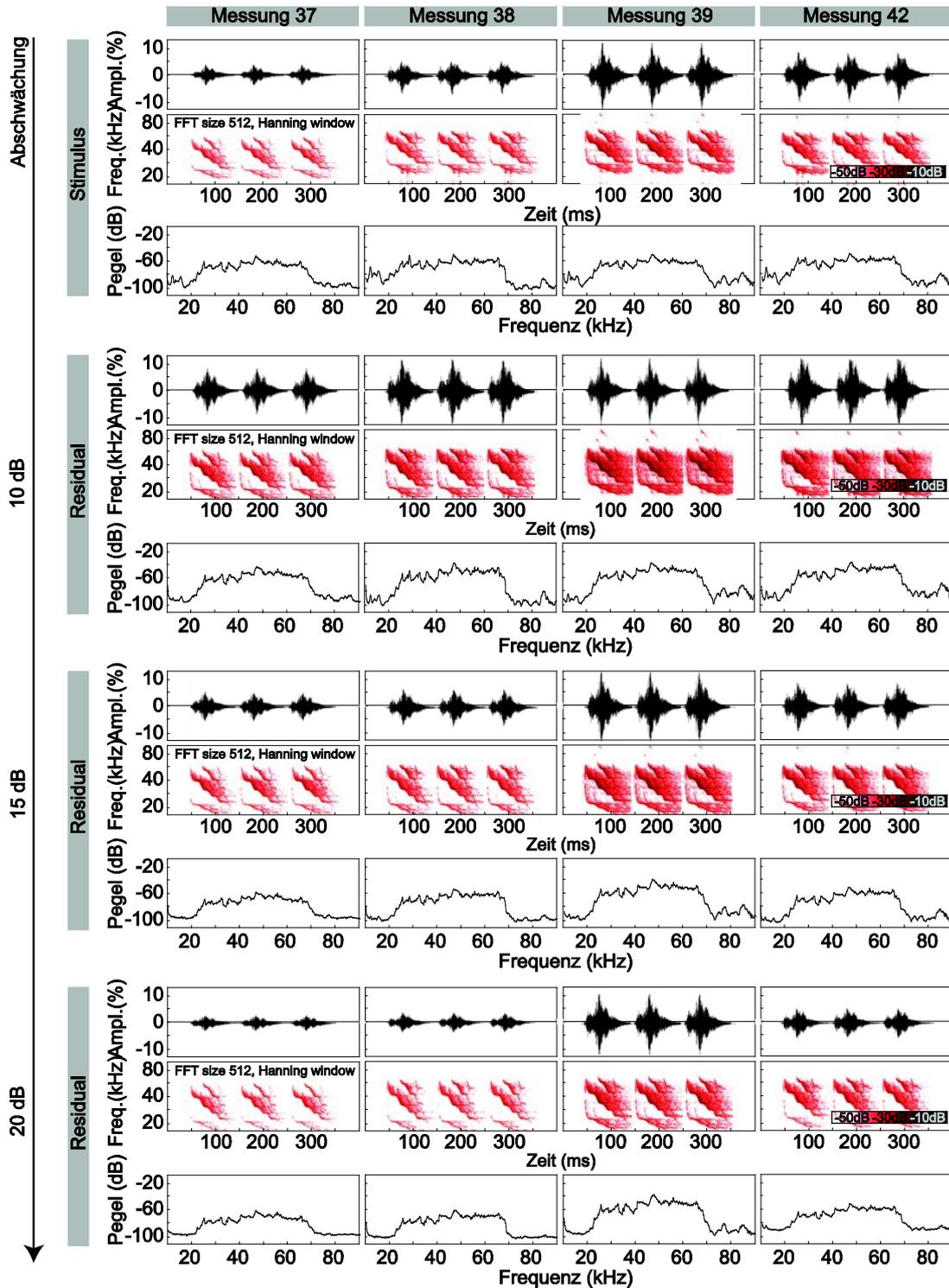


Abbildung 93: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei aneinandergereihten KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

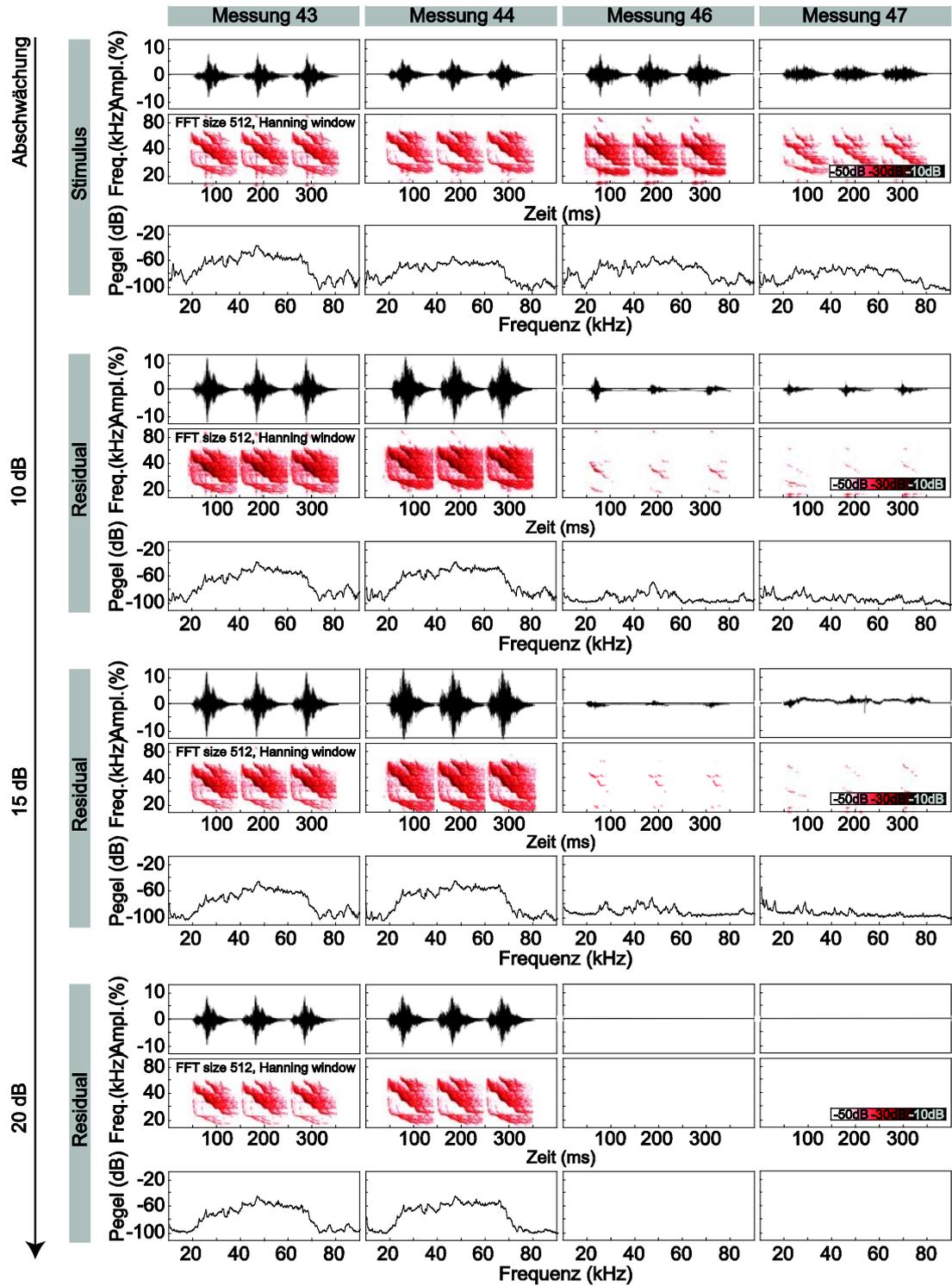


Abbildung 94: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei aneinandergereihten KR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.



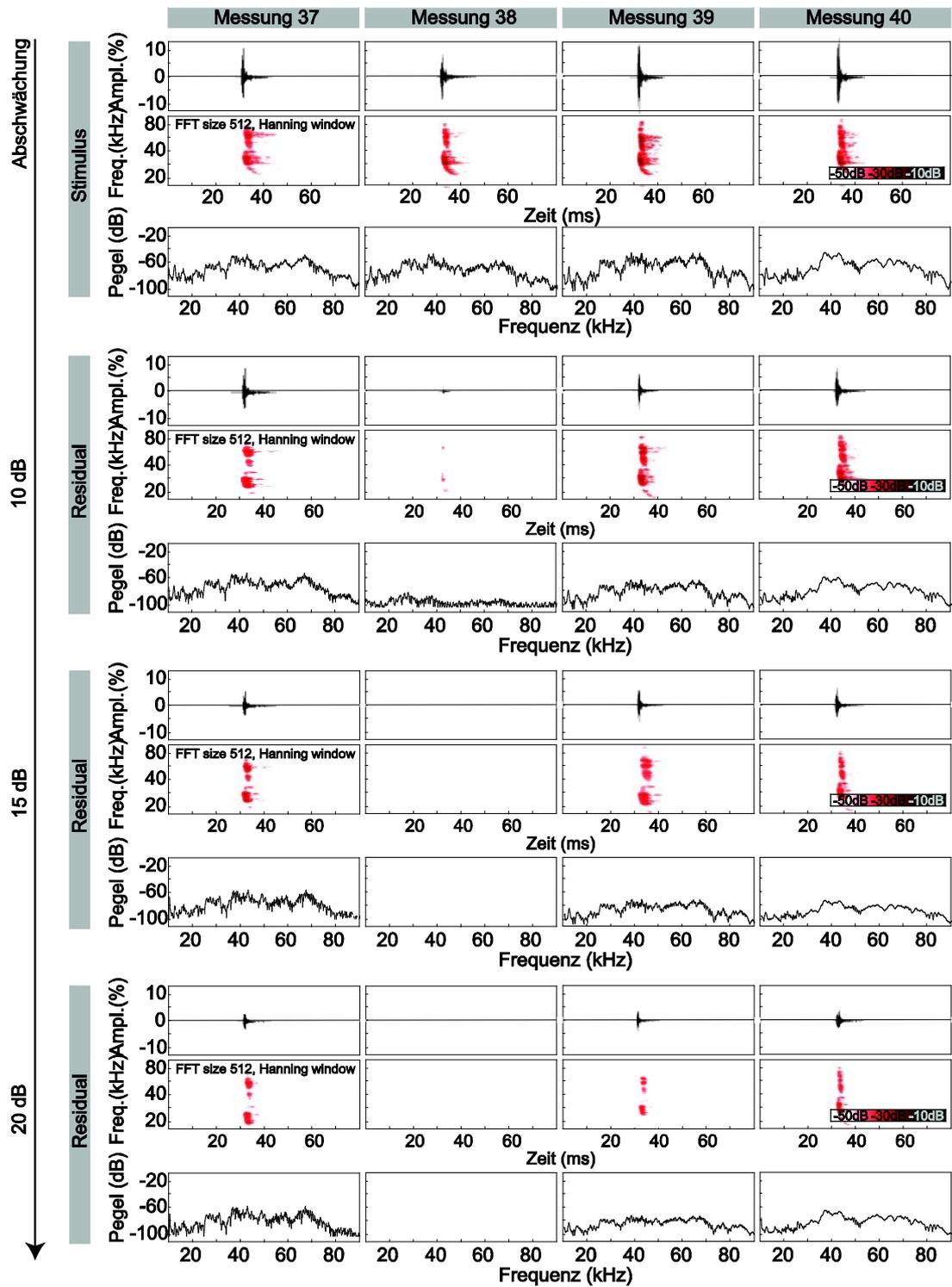


Abbildung 96: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen EOR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

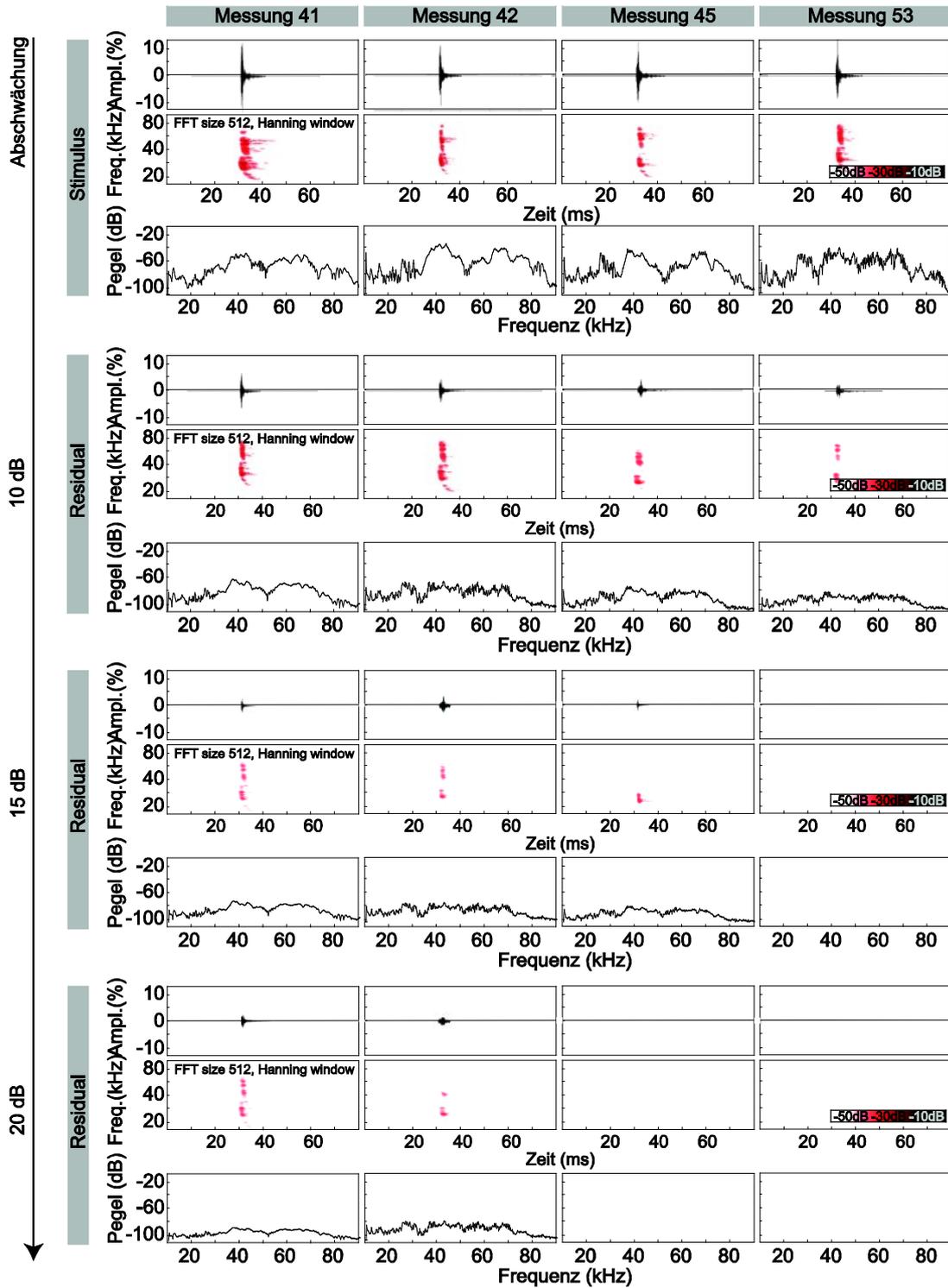


Abbildung 97: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen EOR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.

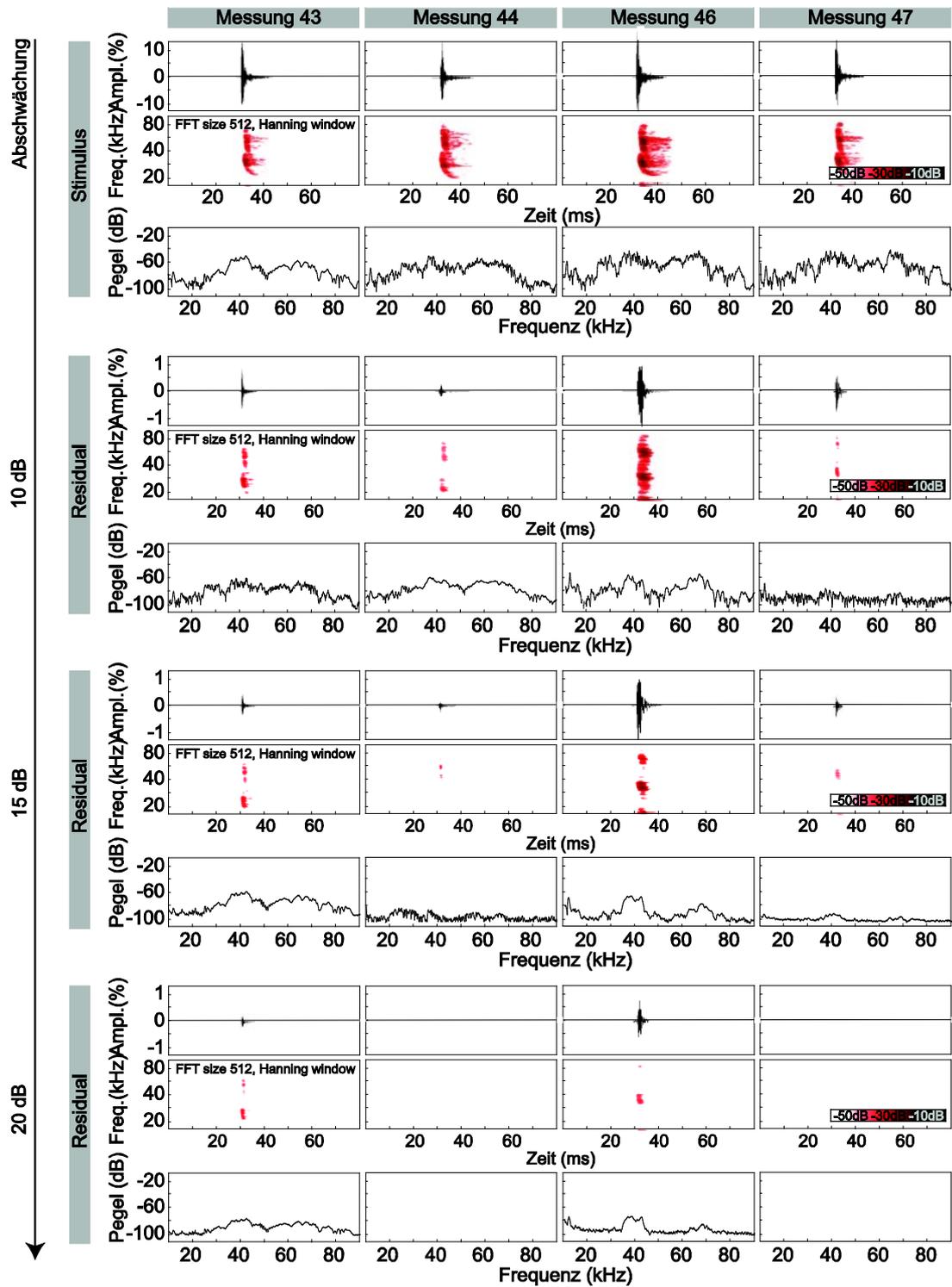


Abbildung 98: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen EOR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.



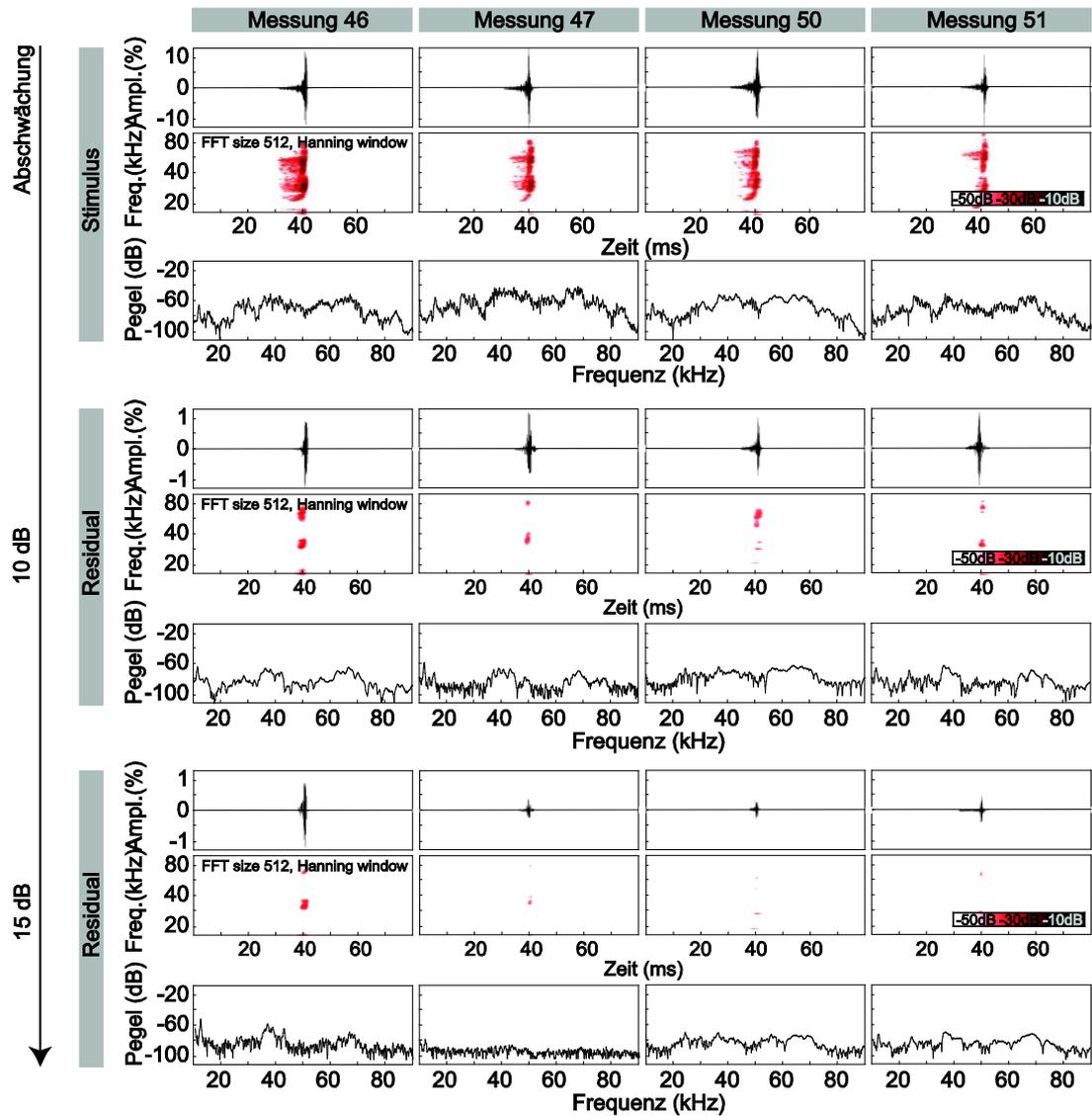


Abbildung 100: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit einem einzelnen inversen EOR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10 und 15 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.



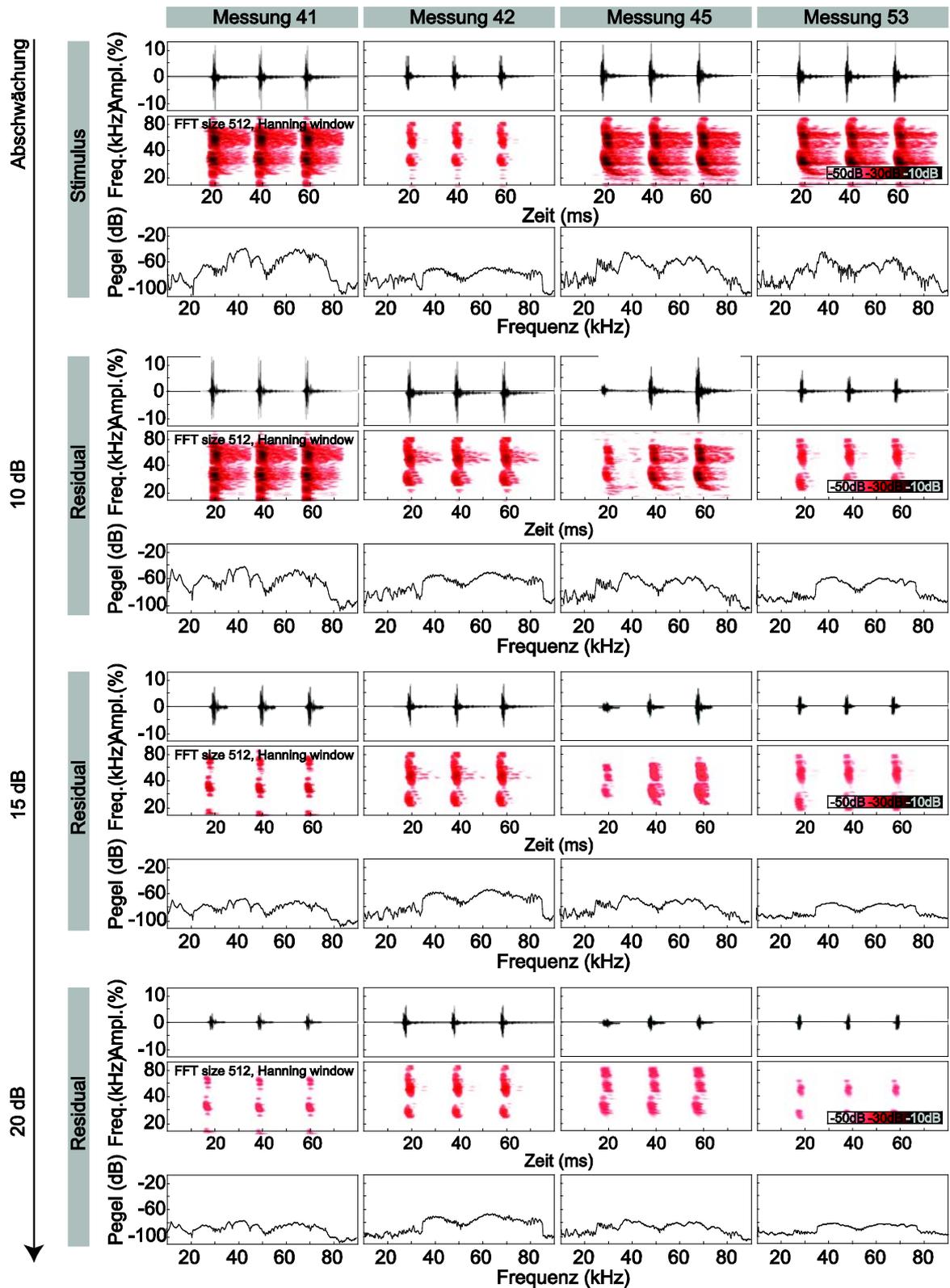


Abbildung 102: OAE-Residual-Messung unter Stimulation mit drei aneinandergereihten EOR der Fledermausspezies *Carollia perspicillata*. Dargestellt sind die Stimulusdaten sowie die Residualdaten bei verschiedenen Abschwächungen (10, 15 und 20 dB) für vier Beispiele gemessen an unterschiedlichen Tieren.