

Universitätsklinik Zürich

ORL-Klinik

Direktor: Prof. Dr. med. Rudolf Probst

---

Betreuung der Masterarbeit: Dr. med. Arianne Monge Naldi

Leitung der Masterarbeit: Prof. Dr. med. Rudolf Probst

**Wirkung von Erythropoietin auf das Gehör von adulten  
transgenen Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen**

Teil des Projekts: Age related hearing loss in erythropoietin overexpressing mice

**MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Medicine (M Med)

der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

Celina Belfrage (06724785)

von Walchwil

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>4</b>
2.1. Das Gehör	4
2.2. Unterschiede zum Gehör der Maus	9
2.3. Methoden für die Hörmessung	10
2.4. Erythropoietin	17
2.5. Zielsetzung	18
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1. Material	19
3.2. Methoden	22
3.3. Statistikverfahren	25
<b>4. Resultate .....</b>	<b>27</b>
4.1. Tabellen und Grafiken	27
4.2. Statistische Auswertungen	31
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Abbildungsnachweis .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>37</b>
<b>8. Lebenslauf .....</b>	<b>41</b>
<b>9. Erklärung .....</b>	<b>42</b>

## 1. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Masterarbeit war die Etablierung der Verhaltensaudiometrie- einer Methode zur Gehörsbestimmung bei Mäusen- um die Wirkung einer konstanten neuronalen Erythropoietin (Epo)-Überexpression auf das Hörvermögen von Mäusen zu untersuchen.

Es wurden 6 wildtyp Kontrollmäuse und 7 transgene Mäuse (TG21) des C57BL6 Stamms im Alter von 80-142 Tage verwendet. Die TG21 Mäuse hatten eine neuronale Epo-Überexpression mit einem 4-fach erhöhten Epo-Spiegel im Gehirn, bei jedoch normalem Epo-Spiegel im Plasma. Mittels der Verhaltensaudiometrie wurden die Hörschwellen für die Frequenzen 1.4, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 50, 64 und 80 kHz nach dem Standardverfahren der konditionierten Unterdrückung von Heffner et al. (2006) eruiert. Die Mäuse wurden darauf konditioniert, mit dem Trinken aus einem Wasserspender zu stoppen sobald ein Ton zu hören war um den nachfolgenden Stromschlag zu vermeiden. Die Versuche wurden in einer schalldichten Box mit einem geräuschtransparenten Testkäfig im Innern und daran befestigtem Wasserspender durchgeführt.

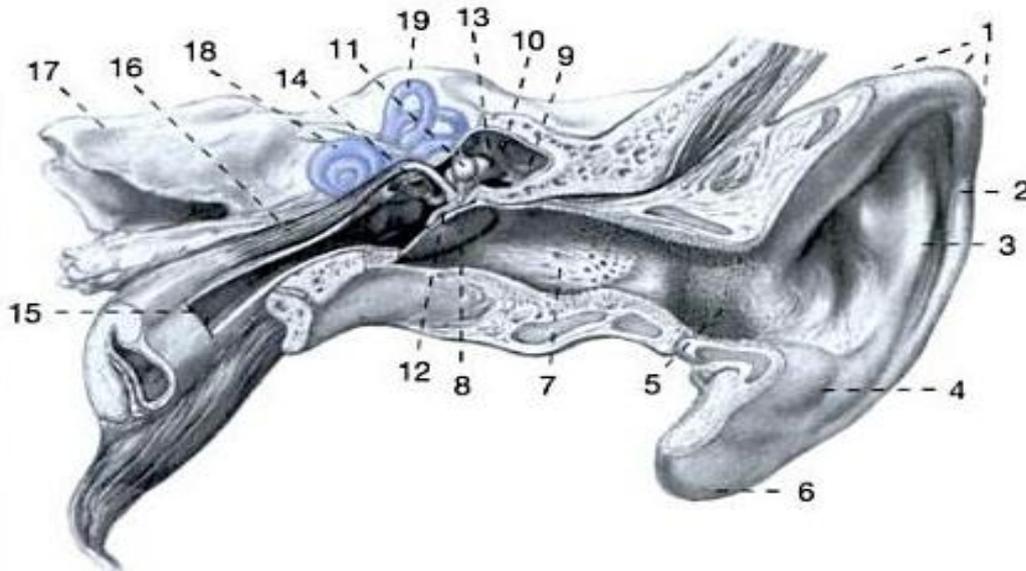
Die Auswertung der Resultate ergab im Mittel über alle Frequenzen keine signifikanten Unterschiede in den Hörschwellen beider Gruppen. Einzige Ausnahme waren die Frequenzen 16 kHz und 50 kHz. Bei diesen Frequenzen waren die Hörschwellen der TG21 Mäuse signifikant besser. Im Vergleich zu den publizierten Werten von Koay et al. (2002) zeigten unsere Mäuse vergleichbare Hörkurven. Die Hörschwellen unserer Mäuse waren jedoch bei allen Frequenzen schlechter. Als Schluss folgern wir, dass bei den adulten TG21 Mäusen die erhöhte Epo-Konzentration im Gehirn keine Auswirkung auf das Hörvermögen im Vergleich zu den wild type Mäusen hat. Die Unterschiede bei 16 kHz und 50 kHz interpretieren wir als zufällig durch eine Verbesserung der Vorgehensweise bei der Handhabung der Mäuse und der Prüferfähigkeiten und –fertigkeiten. Die Methode der Verhaltensaudiometrie nach Heffner et al. (2006) konnte mit dieser Arbeit etabliert werden.

Diese Masterarbeit stellt einen ersten Teil eines Projekts dar, welches die Wirkung von Epo auf den altersbedingten Hörverlust bei Mäusen untersucht. Dies wird im Rahmen einer weiterführenden Dissertation durchgeführt werden.

## 2. Einleitung

### 2.1. Das Gehör

#### Physiologie des Hörens



**Abb.1 Anatomie des Hörorgans** Ansicht von vorne nach Abtragung der ventralen Wand des äusseren Gehörgangs sowie der ventralen Wand des Mittelohrs. Das Innenohr ist in Projektion auf die Felsenbeinoberfläche blau dargestellt (modifiziert nach Drenckhahn & Zenker 2004)

**1 - 7 Äusseres Ohr:** 1 Ohrmuschel (Auricula) mit 2 Helix, 3 Anthelix, 4 Antitragus, 5 Porus acusticus externus 6 Ohrläppchen (Lobulus auriculae), 7 äusserer Gehörgang (Meatus acusticus externus)

**8 - 16 Mittelohr:** 8 Trommelfell, 9 Paukenhöhle (Cavum tympani) mit 10 Recessus epitympanicus.

**11 - 14 Gehörknöchelchenkette,** 11 Hammer mit 12 Hammegriff (Manubrium mallei), 13 Amboss (Incus), 14 Steigbügel (Stapes), 15 Tuba auditiva, 16 M. tensor tympani, dessen Sehne an (12) Manubrium mallei ansetzt.

**17 - 19 Innenohr:** Das in der 17 Felsenbeinpyramide gelegene Innenohr gliedert sich in zwei Anteile: 18 kochleärer Anteil, 19 vestibulärer Anteil.

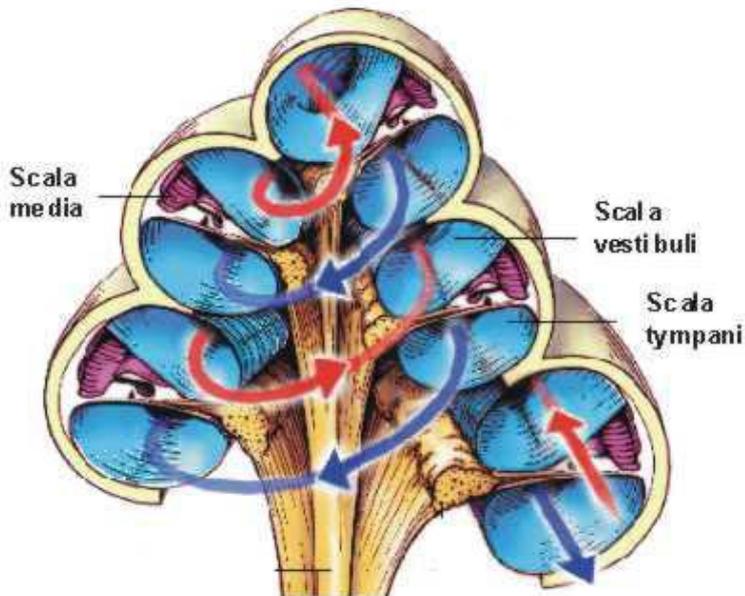
Das Ohr des Menschen besteht aus dem Aussenohr, dem Mittelohr und dem Innenohr. Diese bilden das periphere auditive System. Die Hörbahnen, die im Stammhirn liegenden auditiven Reizverarbeitungszentren sowie die Hörrinde bilden das zentrale auditive System.

Zum äusseren Ohr gehören die Ohrmuschel und der äussere Gehörgang [Abb.1, 1-7]. Das Aussenohr hat vor allem eine Schutzfunktion und bewirkt eine Verstärkung

der Schallwellen - hauptsächlich durch die Resonanzbildung des äusseren Gehörgangs - im mittleren bis hohen Frequenzbereich.

Das Mittelohr besteht aus dem Trommelfell, der Paukenhöhle mit den Gehörknöchelchen Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes) und der Ohrtrompete (Tuba auditiva), durch welche die Paukenhöhle mit dem Rachen verbunden ist [Abb.1, 8-16]. Das Mittelohr dient der möglichst verlustarmen Schallüberleitung von der Luft auf die flüssige Perilymphe im Innenohr. Die Schallübertragung der Gehörknöchelchen wird durch die beiden Mittelohrmuskeln Musculus tensor tympani und Musculus stapedius, die mit ihren Sehnen durch die Paukenhöhle verlaufen, moduliert. Weiter ist das Mittelohr zuständig für den Ausgleich des statischen Luftdruckes, der je nach Wetter- und Höhenänderungen variiert.

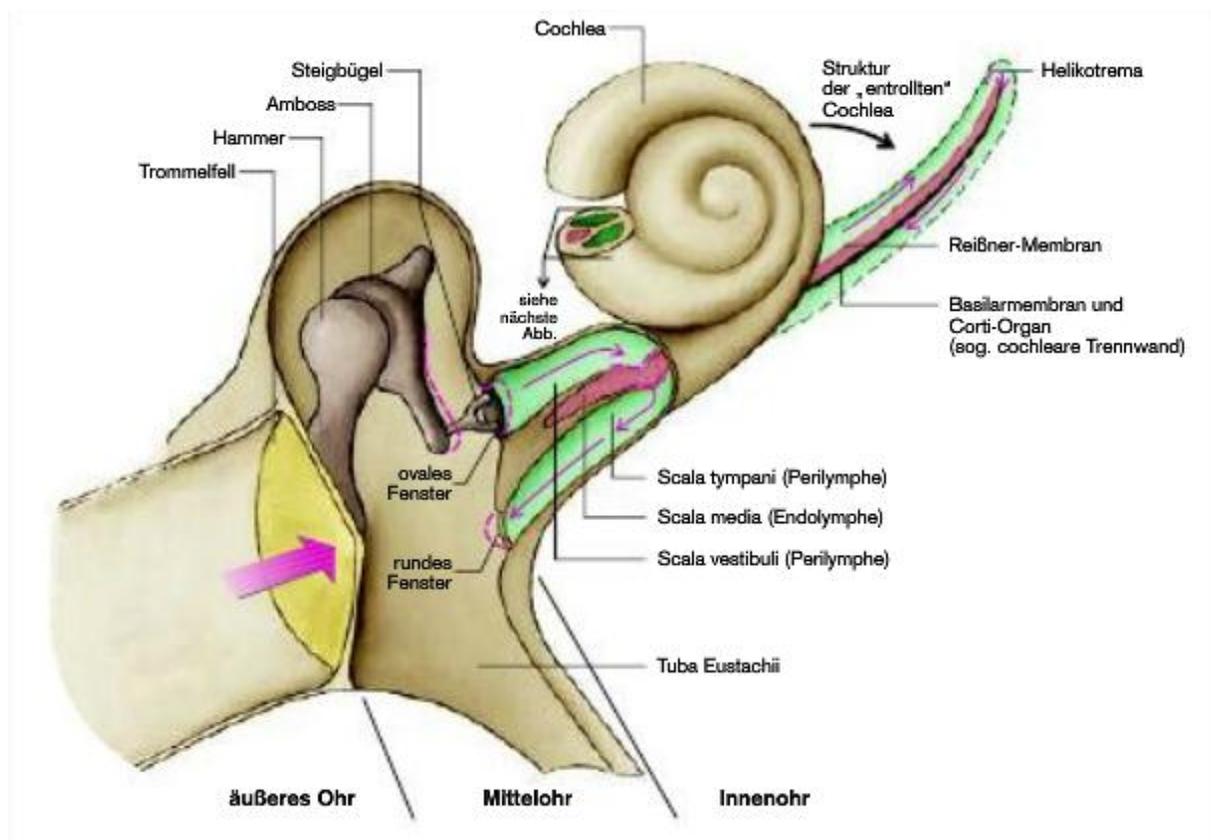
Das Innenohr ist der eigentliche Ort der Sinneswahrnehmung, bestehend aus der Schnecke (Cochlea), welche das Hörorgan mit den Schallrezeptoren enthält, dem Hörnerv und dem Vestibularorgan [Abb.1, 17-19]. Das Vestibularorgan besteht aus dem Sacculus, dem Utrikulus und den drei Bogengängen. Das Vestibularorgan ist das Gleichgewichtsorgan des Körpers und vor allem für die Lage- und Beschleunigungswahrnehmung des Kopfes zuständig. Das Innenohr lässt sich in ein knöchernes und ein membranöses Labyrinth unterteilen. Das membranöse oder auch sogenannte häutige Labyrinth befindet sich innerhalb des knöchernen Labyrinths und ist mit Endolymphe gefüllt. Der Raum zwischen knöchernem und häutigem Labyrinth ist mit Perilymphe gefüllt (Schön 2004, Drenckhahn & Zenker 2004).



**Abb. 2: Querschnitt der Cochlea mit Bewegungsrichtung der Wanderwelle** (Schön 2004)

Die Cochlea bildet einen etwa 30mm langen Kanal und umfasst zweieinhalb Windungen. Sie enthält die mit Perilymphe gefüllten Gänge Scala tympani und Scala vestibuli [siehe Abb.2]. Ein Gang (Scala vestibuli) ist mit dem Vestibulum und dem ovale Fenster verbunden. Hier wird der Schalldruck aufgenommen und bis zur Spitze der Cochlea, dem Helicotrema geleitet. Danach führt eine scharfe Wende in den entgegenlaufenden Gang (Scala tympani). Die Scala tympani grenzt an das runde Fenster des Innenohrs. Diese beiden Gänge sind miteinander offen verbunden. Die dazwischen gelegene Scala media ist mit Endolymphe gefüllt. Abgetrennt wird die Scala media zur Scala vestibuli durch die Reissner-Membran und zur Scala tympani durch die Basilarmembran. Diese enthält das Corti-Organ mit den ca.16'000 als Haarzellen bezeichneten Sinneszellen. Bei Bewegung der Perilymphe im Innenohr werden gleichzeitig auch die Reissner-Membran und die Basilarmembran in Schwingung versetzt. Dies führt zu einer Auslenkung der Sinneshaare (Stereozilien) der äusseren Haarzellen, da diese mit der Tektorialmembran in direktem Kontakt stehen. Die äusseren Haarzellen verstärken das Schallsignal durch eine Längenänderung, welche die lokalen Bewegungen im Corti-Organ bis zu 1000-fach verstärken. Das so verstärkte Schallsignal stimuliert die inneren Haarzellen, die das eigentliche sensorische Signal produzieren. Die Sinneszellen sind mit zahlreichen Nervenfasern an das in der Schneckenachse liegende Ganglion spirale gekoppelt.

Die axonalen Fortsätze des Ganglion spirale bündeln sich zum kochleären Anteil des VIII. Hirnnervs. Dieser leitet die Hörinformation via verschiedene Kerngebiete des Hirnstammes zu den unteren Hügeln der Vierhügelplatte des Mittelhirns und dem Corpus geniculatum mediale des Thalamus. Von hier verläuft die Hörstrahlung zur primären Hörrinde (Gyri temporales transversi im Schläfenlappen) und zur sekundären Hörrinde in der oberen Schläfenwindung (Klinke, Pape, Silbernagl 2005, Trepel 2008).



**Abb.3: Mittelohr und Innenohr.** Um die Skalen besser darstellen zu können, ist die Cochlea auf dem Bild entrollt (Klinke et al. 2005).

### Tonotopie der Cochlea

Töne hoher Frequenzen werden an der Basis der Cochlea wahrgenommen, solche tieferer Frequenzen nahe dem Helikotrema (Schneckenspitze). Der Steigbügel setzt am ovalen Fenster die Perilymphe der Scala vestibuli in Schwingung. Es entsteht eine Druckdifferenz zwischen der Scala vestibuli und tympani, die auf der Basilarmembran eine Wanderwelle hervorruft. Diese läuft von der Schneckensbasis zur Schneckenspitze und zeigt an einer bestimmten Stelle eine maximale Amplitude

[siehe Abb.2 und Abb.3]. Welcher Ort auf der Basilarmembran die maximale Amplitude aufweist ist abhängig von der Frequenz des Schalls. Jede Frequenz hat einen zugeordneten Ort auf der Basilarmembran. Dies hat mit dem Aufbau der Basilarmembran zu tun. Nahe der Schneckenbasis ist sie relativ dick und steif und zeigt erst bei hohen Frequenzen eine Resonanz. Im weiteren Verlauf wird die Basilarmembran dünner und schlaffer und sie reagiert so zunehmend auf Töne mit tieferen Frequenzen. Die Hörbahn hält die tonotopische Gliederung der Cochlea bei, was die Grundlage des Erkennens von Tönen unterschiedlicher Frequenz bildet (Klinke et al. 2005, Schön 2004).

## Physik des Schalls

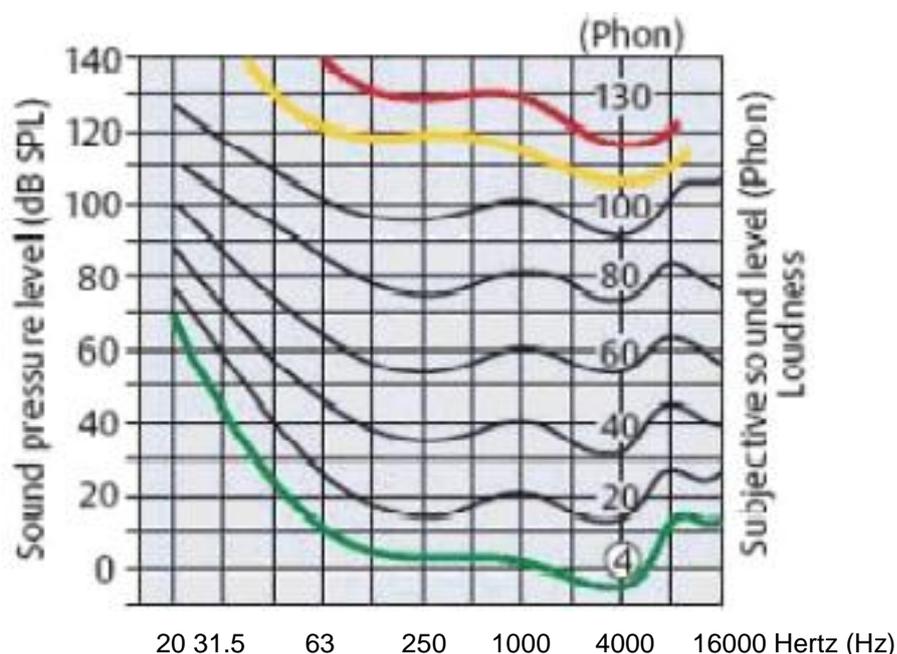
Schwingungsenergien werden von einem schwingenden Körper wie einer Gitarre in Form von Schall über Luft und anderen Medien weitergeleitet. Durch das Schwingen der schallabstrahlenden Fläche (die Gitarrenseite in diesem Beispiel) werden wellenförmige Zonen von Über- respektive Unterdruck erzeugt. Die Moleküle des Mediums werden durch die Schwingungen verdichtet, respektive verdünnt. Dieser Wechseldruck wird Schalldruck genannt. Schalldrücke werden mithilfe von Mikrofonen gemessen und in Pascal ( $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$ ) angegeben. In der Akustik wird jedoch der Schalldruckpegel in Dezibel (dB) angegeben. Das Dezibel wurde zuerst als Dämpfungsmass für die übertragende Schallleistung in der Telefonie angewendet. Es wird auch heute vor allem für im Verhältnis stehende gleichartige Leistungs- und Energiegrößen angewendet. Es ergeben sich im Gegensatz zum Pascal leichter fassbare Zahlenwerte (Maue, Hoffmann & von Lüpke 2003). Es handelt sich beim Dezibel um ein Verhältnismass zu einem festgelegten Bezugsschalldruck  $p_0 = 2 \cdot 10^{-5}$  Pascal. Man dachte früher, dass dies der Schalldruck, welcher die Hörschwelle des menschlichen Gehörs bei der Frequenz von 1kHz bildet, sei. Obwohl dies nicht ganz stimmte, hat man den Bezugspunkt  $p_0$  beibehalten. Laut Definition wird der Schallpegel wie folgt berechnet:

$$L = 20_{10} \log \frac{P_x}{p_0} \text{ [dB]}$$

Wobei  $p_x$  derjenige Schalldruck ist, dessen Pegel  $L$  man berechnen möchte.  $P_x$  und  $p_0$  werden in Pascal angegeben.

Die Dezibel Funktion beschreibt somit keine lineare, sondern eine logarithmische Kurve. Das heisst, wenn der Schallpegel  $L$  von zum Beispiel 40dB (leises Gespräch) auf 80dB (normales Gespräch) verdoppelt wird, nimmt der Schalldruck um das Zehnfache von 100 auf 1'000 Pascal zu. Es gibt in der Physik auch dB-Skalen in anderen technischen Bereichen. Die Werte des Schalldruckpegels werden daher oft als dB SPL für Dezibel Sound Pressure Level angegeben. Die wahrgenommene Lautstärke eines Schalls ist abhängig von seinem Schalldruckpegel und seiner Frequenz. Die Frequenz eines Tones ist bestimmt durch die Schwingungsfrequenz des schwingenden Körpers und wird in Hertz (Hz), also Schwingungen pro Sekunde, angegeben. Definitionsgemäss enthält ein Ton im Gegensatz zu einem Klang oder bei einem Geräusch nur eine Frequenz (Klinke et al. 2005).

## 2.2. Unterschiede zum Gehör der Maus



**Abb.4 Hörbereich des Menschen.** In grün ist die normale Hörschwelle gekennzeichnet. In gelb die Unbehaglichkeitsschwelle und in rot ist die Schmerzgrenze des menschlichen Gehörs markiert. IsoPhonen sind Kurven gleicher subjektiver Lautstärke (vom Menschen als gleich laut empfunden), die Kurven für Dezibel und Phon stimmen nur bei 1'000 Hertz überein, oberhalb und unterhalb dieser Frequenz weichen sie voneinander ab (Behrbohm et al. 2009).

Beim Menschen liegt der normale Hörbereich eines jungen Erwachsenen zwischen 20 Hz und 16 kHz (siehe Abb.4). Kinder können noch Töne oberhalb 16 kHz hören, im Alter nimmt die Empfindlichkeit gegenüber hohen Tönen jedoch ab. Die grösste Empfindlichkeit besitzt das menschliche Gehör im Bereich 2-5 kHz (Behrbohm et al. 2009, Klinke et al. 2006). Das Gehör der Maus zeigt viele Ähnlichkeiten zum Menschen. Daher wird die Maus sehr häufig als Tiermodell für in vivo Studien verwendet. Unterschiede zeigen sich zum Beispiel in der Cochlea, die bei der Maus nur aus  $1\frac{3}{4}$  bis 2 Windungen besteht (Keithley, Canto, Zheng, Fischel-Ghodsian & Johnson 2004). Ausserdem hat die Maus ein anderes Hörspektrum als der Mensch. Es reicht von 2.3 kHz bis 85.5 kHz (H. Heffner & R. Heffner 2007). Die höheren Frequenzen (Ultraschall) sind für den Menschen nicht mehr hörbar.

### **2.3. Methoden für die Hörmessung**

Die Arten der Hörmessung können in subjektive, von den Aussagen des Patienten abhängige, und in objektive, von der Aussage des Patienten unabhängige, Methoden eingeteilt werden.

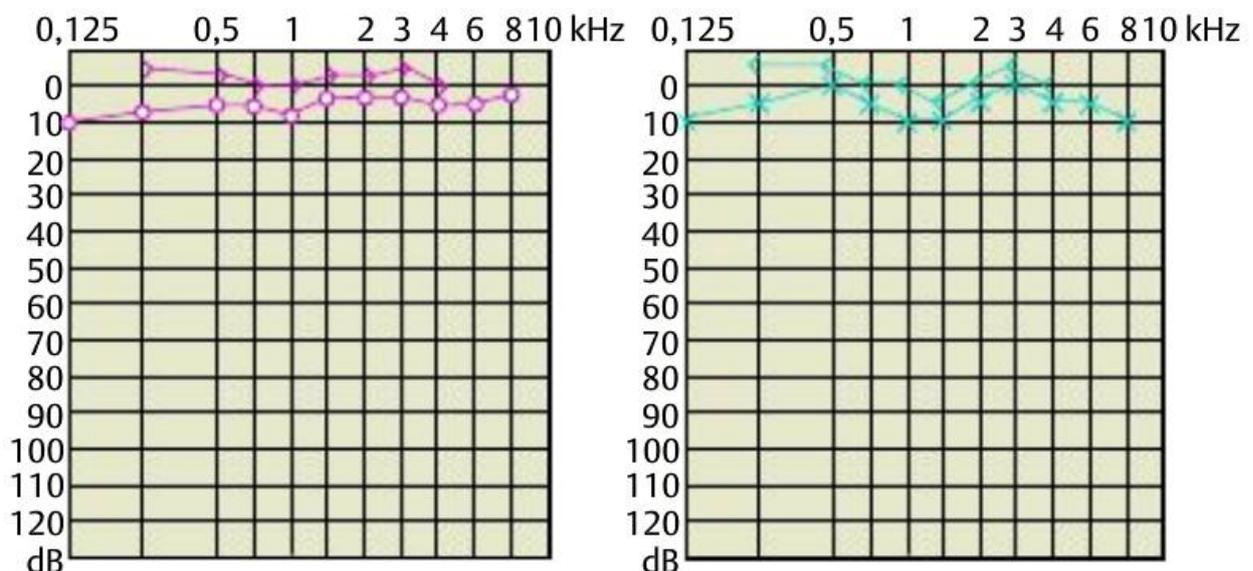
#### **Subjektive Methoden**

**Stimmgabelprüfung:** Sie dient zur Überprüfung der Knochen- und Luftleitung und erlaubt eine orientierende Unterscheidung von Hörschäden in Mittelohrschäden (Schalleitungsstörungen) gegenüber Innenohrschäden und retrocochleären Schäden (Schallempfindungsstörungen). In der Regel werden a1-(440Hz) oder c2-(512Hz) Stimmgabeln benutzt. Beim Rinne-Versuch wird das Knochenleitungshören gegenüber dem Luftleitungshören am gleichen Ohr verglichen, während beim Weber-Versuch die Knochenleitungen beider Seiten gleichzeitig verglichen werden.

**Hörweitenbestimmung:** Als orientierende Hörprüfung wird das Sprachverständnis in einem Abstand von mindestens 6 Meter geprüft. Es werden viersilbige Zahlwörter in normaler Lautstärke zur Prüfung tiefer und mittlerer Frequenzen und Flüstersprache für hohe Frequenzen geprüft. Normalhörige sollten dabei sowohl normal gesprochene, wie auch geflüsterte Zahlenwörter verstanden werden können.

**Tonaudiometrie:** Die Hörschwelle wird mit Hilfe eines Audiometers grundsätzlich in Luft- und Knochenleitung bestimmt. Das Audiometer erzeugt elektrische Wechselströme verschiedenster Frequenzen und Intensitäten. Die Wechselströme sind mit Luftschall- und Knochenschallhörer verknüpft und erzeugen einen reinen und von Oberwellen freien Ton. Bei der audiometrischen Prüfung bezieht man sich auf die menschliche Hörschwelle bei 1'000 Hz. Ein hörbarer 1'000 Hz-Ton hat bei einem hörgesunden Jugendlichen durchschnittlich einen Schalldruck von  $2 \cdot 10^{-4}$  Pa. Dies bildet den Bezugspunkt für die physikalische Bemessung der Hörschwelle in dB SPL (sound pressure level).

In der Audiometrie wird jedoch häufiger die relative Hörschwelle dB HL (hearing level) gebraucht. Hier wird von einer flach verlaufenden Nulllinie ausgegangen (siehe Abb. 5). Der physikalische Schalldruck, d.h. das frequenzabhängige Minimum audible wird demnach vernachlässigt. Als Nullkurve wird stattdessen das jeweils vom Menschen gerade noch Hörbare verwendet. 0 dB von 250 Hz bis 8 kHz gilt dabei als „durchschnittlich“ normal hörend. Überprüft wird meist der Sprachbereich (100 bis 10'000 Hz). Töne unterhalb 125 Hz sind schwierig in genügender Obertonfreiheit und Lautstärke zu erzeugen. Die Audiometer enthalten daher im Allgemeinen eine Tonreihe von 125 Hz aufwärts.



**Abb. 5: dB HL Tonaudiogramm für Knochenleitung und Luftleitung bei Normalhörigkeit für rechts und links.** Die horizontale Achse beschreibt die Frequenz in kHz in einer logarithmischen Skala. Die vertikale Achse stellt eine dB HL Skala dar (Ganzer & Arnold 2005).

Mit der Grundfrequenz C (cirka 125 Hz) beginnend ergeben sich als Testfrequenzen meist 125, 250, 500, 1'000, 2'000, 4'000, 6'000 und 8'000 Hz. Die Oktavenabstände nehmen bei den höheren Frequenzen in Hz immer mehr zu. Daher werden hier nur noch Halboktaven statt ganze Oktaven als Abstände für die Testfrequenzen gewählt. Über Knochenleitung werden meist die Frequenzen zwischen 250 und 4'000 Hz geprüft.

**Sprachaudiometrie:** Um die Gesamtleistung des auditorischen Systems zu beurteilen wird häufig die Sprachaudiometrie benützt. Sie ist auch für die Anpassung von Hörgeräten wichtig. Hier werden über ein Tonband genormte Wörter und leicht verständliche Zahlen abgespielt und deren Verständnis monoaural über Kopfhörer oder binaural über Lautsprecher geprüft. Bei dieser Methode wird vor allem das Sprachverständnis geprüft.

**Reaktionsaudiometrie:** Die Verhaltensaudiometrie beinhaltet eine Stimulation mit Tönen oder Geräuschen von einem definierten Schallpegel. Andere optische und vibrotaktile Reize werden ausgeschlossen. Diese Methode wird vor allem bei Kleinkindern verwendet um ihr Verhalten als Reaktion auf bestimmte Geräusche wie z.B. die Zuwendungsreaktion eines Säuglings oder Kleinkinds auf einen akustischen Reiz zu beobachten. Mithilfe der konditionierten Zuwendungsreaktion können bei Kleinkindern ab etwa dem 6. Lebensmonat auch audiometrische Schwellenmessungen vorgenommen werden. Die Reaktion des Kindes auf einen akustischen Reiz wird konditioniert indem es mit einem bewegten Spielzeug nach Erklingen eines Tons „belohnt“ wird. Eine ähnliche Technik kann bei der subjektiven Gehörprüfung einiger Tiere verwendet werden (Ganzer & Arnold 2005, Probst, Grevers & Iro 2004).

## **Objektive Methoden**

**Trommelfellimpedanzmessungen und Stapediusreflexe:** Bei der Tympanometrie werden die Amplitude und die Phase des vom Trommelfell reflektierten Schallanteils gemessen. Im luftdicht abgeschlossenen äusseren Gehörgang wird die Compliance des Trommelfells bei Druckänderung von +300 bis -400 mmWs (Wassersäule) gemessen. Dies im Gegensatz zur Stapediusreflex-Messung, bei der die Veränderung am Trommelfellwiderstand infolge Kontraktion des Musculus stapedius gemessen wird. Letzteres wird durch ipsilaterale und kontralaterale Beschallung erreicht, da die Musculi stapedii physiologischerweise bei grossen Lautstärken kontrahieren. Es kommt so zu einer Versteifung der Gehörknöchelchenkette, wodurch die Beweglichkeit des Trommelfells reduziert wird. Normalerweise liegt die Stapediusreflex-Schwelle bei 80-90 dB HL. Der Stapediusreflex kann bei einem Paukenerguss fehlen. Es können aber auch andere Ursachen z.B. eine Otosklerose oder eine retrocochleäre Schwerhörigkeit beim Fehlen eines Stapediusreflexes vorliegen (Klinke et al. 2005, Ganzer & Arnold 2005).

**OAE (otoakustische Emissionen):** Otoakustische Emissionen sind Schallaussendungen des Innenohres, die spontan vorhanden sein können oder evoziert, d.h. durch akustische Reize erzwungen werden. Die äusseren Haarzellen wirken dabei als mechanische Verstärker. Dieses Begleitphänomen des Hörvorgangs ermöglicht eine nichtinvasive Diagnostik der Schallverarbeitung auf Ebene der äusseren Haarzellen. Bei einer Dysfunktion dieser Haarzellen nehmen die Trennschärfe und die Empfindlichkeit des Gehörs ab, da der aktive Verstärkungsprozess ausfällt und die Basilarmembran ein passives, lineares Verhalten annimmt.

Bei den unterschiedlichen Formen der OAE unterscheidet man zwischen spontanen otoakustischen Emissionen (SOAE), welche ohne Einwirkung eines akustischen Reizes emittiert werden und evozierten otoakustischen Emissionen, die als Antwort auf ein Schallereignis entstehen. Diese werden weiter in transitorisch evozierte otoakustische Emissionen (TEOAE), simultan evozierte otoakustische Emissionen (SEOAE) und Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) unterteilt. Die Messung geschieht jeweils mit Sonden, die mit dem äusseren Gehörgang einen dichten Abschluss bilden. Zur Registrierung von Emissionen bedarf es

hochempfindlicher und rauscharmer Mikrofone und einer Minimierung des Signal-Störabstandes. Die OAEs sind sehr störanfällig für Schalleitungsstörungen, da sich sowohl der auslösende Reiz, wie auch die nach aussen fortgeleitete Emission über das Mittelohr fortbewegen. So können bei einem Schalleitungshörverlust von über 30 dB in der Regel keine TEOAE mehr gemessen werden.

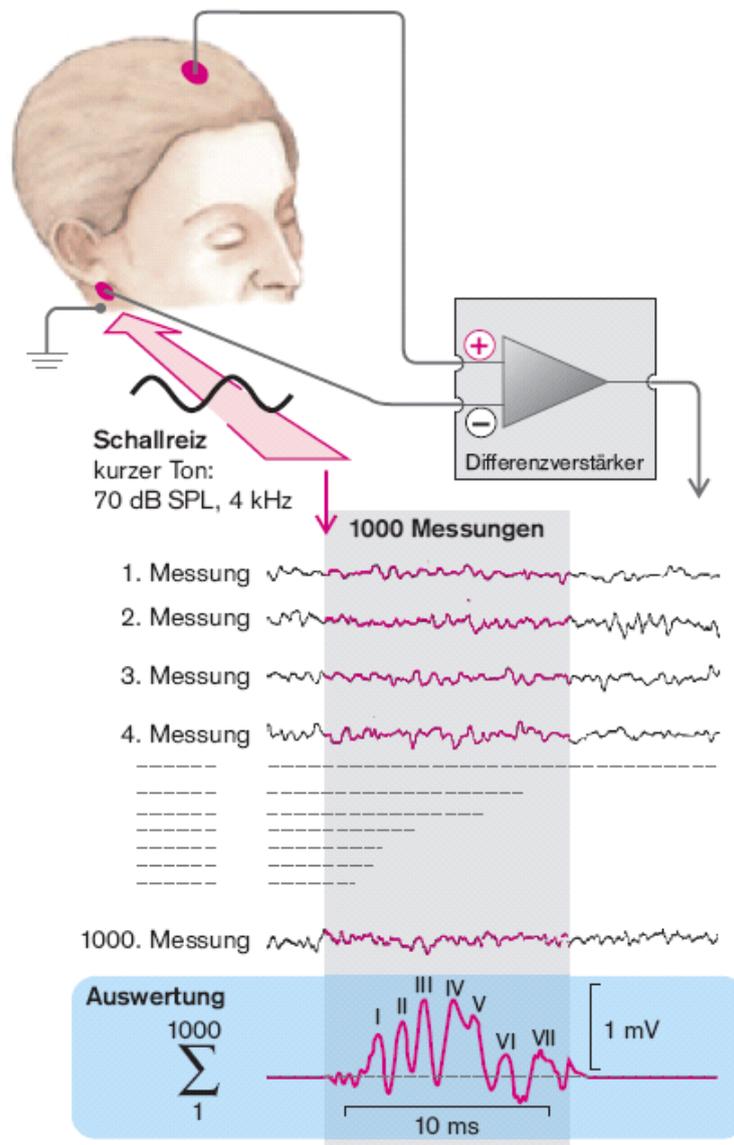
TEOAE: Bei einer breitbandigen Anregung entstehen Wanderwellen entlang der gesamten Basilarmembran. Die äusseren Haarzellen erzeugen dabei Schwingungen, die je nach ihrem Standort in der Cochlea unterschiedliche Antworten auslösen. Diese Stossantworten sind von unterschiedlicher Frequenz und Dauer. Die Summe aller Stossantworten sind die TEOAE. Dabei können die TEOAE-Komponenten je nach Frequenz unterteilt werden. Die hohen Frequenzen entspringen dem basalen Teil der Cochlea und je tiefer die Frequenzen desto apikaler entspringen sie. Ist die Haarzellenfunktion in einem bestimmten Cochlea-Abschnitt gestört, so fehlt hier das entsprechende Schallsignal. Der Vorteil dieser Methode ist, dass mit einem Reiz nahezu alle Haarzellen angestossen werden und ihre Kontraktionsfähigkeit in einem Messvorgang beurteilt werden kann. Die mit Klicks evozierbaren TEOAEs umfassen bei normalhörenden Menschen Frequenzen zwischen circa 600 Hz und 5 kHz. Eine direkte Aussage über frequenzspezifische Störungen lässt sich jedoch nicht machen, da durch die Filterwirkung der Cochlea Phasenänderungen auftreten und auf dem Weg nach aussen einzelne Signalkomponenten ausgelöscht werden. Die TEOAEs haben sich heute vor allem in der Diagnostik der frühkindlichen Hörstörungen als gute Screening Methode erwiesen.

SEOAE: Diese Form der Diagnostik erfasst Emissionen, welche die gleiche Frequenz haben wie der Sinuston, der die Emission auslöste. Hier überlagern sich Schallreiz und Emission. Die SEOAEs haben in der Klinik keine grössere Verwendung.

DPOAE: Als Distorsionsprodukt bezeichnet man hier einen Kombinationston (=Mischprodukt), der bei gleichzeitigem Ertönen von zwei verschiedenen Tonfrequenzen subjektiv wahrgenommen wird. Diese Kombinationstöne entstehen als Folge der nicht linear ablaufenden Schallverarbeitung des Corti-Organes. Die beiden Primärtöne führen zu einer Wanderwelle der Basilarmembran mit zwei nahe bei einander liegenden Ausbauchungen. Der Überlappungsbereich der Ausbauchungen der einzelnen Primärtöne wird von beiden Primärtönen erfasst und

löst infolge der nichtlinearen Übertragung eine zusätzliche Schwingung aus, welche sich dann über die Innenohrflüssigkeit als Dichtewelle, oder auf der Basilarmembran als Wanderwelle, retrograd nach aussen fortsetzt. Diese Schwingung kann im äusseren Gehörgang als DPOAE gemessen werden. Bei hohen Primärtonpegeln können DPOAEs im Frequenzbereich zwischen 500 Hz und 8 kHz ermittelt werden. Entscheidend für die Grösse des Überlappungsbereichs der beiden Wanderwellen sind das Frequenzverhältnis, der Schallpegel und der Pegelunterschied der Primärtöne. Die DPOAEs sind wegen ihrer höheren Sensitivität und Frequenzspezifität besser als die TEOAEs zur Verlaufskontrolle bei Verabreichung von ototoxischen Medikamenten und zur Objektivierung von Hörstörungen geeignet (Lehnhardt & Laszig 2001).

**BERA:** Das Verfahren der Hirnstammaudiometrie wird auch Brainstem Evoked Response Audiometry (BERA) genannt. Durch Schallreize wird in der zentralen Hörbahn eine neurale Aktivität ausgelöst, deren Summe mittels eines Elektroenzephalogramms (EEG) durch Summierung und Heraushebung aus der unspezifischen Hirnaktivität, abgeleitet wird. Es gelingt so eine Topodiagnostik. Die BERA erfasst die frühen akustisch evozierten Potentiale. Als Reiz werden z.B. Klicks von kurzer Dauer mit breitem Frequenzspektrum eingesetzt. Die Ableitung geschieht zwischen Mastoid und Scheitel (siehe Abb. 6). Diese Methode wird vor allem zur objektiven Diagnostik bei frühkindlichen Hörstörungen und bei retrocochleären Schwerhörigkeitsursachen verwendet (Klinke et al. 2005, Ganzer & Arnold 2005).



**Abb. 6 Schematische Darstellung einer Hirnstammaudiometrie (BERA).** Die evozierten Potenziale (rot) addieren sich, während die spontane EEG-Aktivität nach Summation der Antworten auf 1'000 Reize (schwarz) gegen 0 geht (Klinke et al. 2005).

## **2.4. Erythropoietin**

Erythropoietin (Epo) ist ein Glykoprotein-hormon, welches vor allem in den renalen peritubulären Fibroblasten der Niere produziert wird. Epo ist der Hauptregulator der Proliferation und Differenzierung von Erythrozytenvorläuferzellen. Dabei erhöht Epo, ausgelöst durch die Bindung an den Erythropoietin-Rezeptor (Epo-R) unter hypoxischen Bedingungen, durch antiapoptotische Signalkaskaden die Erythrozytenzahl (Jelkmann 2004). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Epo und sein Rezeptor in vielen anderen Organen inklusive dem zentralen Nervensystem vorkommen (Buemi et al. 2003). Der Epo-R wurde im Entorhinalen Cortex, auf Endothelzellen, Neuronen, Astrozyten und weitere Zelltypen gefunden (Anagnostou et al. 1994, S. Genc, Koroglu & K. Genc 2004, Maise, Li & Chong 2004, Maise, Li & Chong 2005). Der Epo-R wurde zudem auch im peripheren Nervensystem auf den Myelinscheiden der Nervenwurzeln entdeckt (Hassan et al. 2004). Die Effekte von Epo im zentralen Nervensystem sind auf dessen antiapoptotische, antioxidative, antiinflammatorische, angiogenetische, neuroprotektive und neurotrophe Wirkung zurückzuführen (Rabie & Marti 2008).

### **Erythropoietin in der Cochlea**

Neuere Forschungen zeigten, dass Epo und Epo-R auch im Innenohr vorkommen (Cayé-Thomasen et al. 2005). In vitro Versuche an den Haarzellen des Corti'schen Organs zeigten einen partiell schützenden Effekt von Epo bei ischämisch (Andreeva et al. 2006) und Gentamycin induzierten Schäden (Monge et al. 2006). In vivo wurde bis anhin nur der Effekt von Epo an Tieren mit Lärm bedingtem Hörverlust getestet. In der Studie von Fredriksen et al. (2007) erwies sich Epo jedoch nicht als protektiv. Das Gehör der Epo-behandelten Tiere war sogar schlechter als dasjenige der Kontrolltiere. Die langfristige Wirkung eines erhöhten Erythropoietinspiegels auf die auditive Funktion von Mäusen wurde bis anhin noch nicht untersucht.

### **Erythropoietin-überexprimierende Mäuse**

Es wurden für die Arbeit transgene (TG) Mäuse gewählt, die aufgrund der genetischen Veränderung eine konstante Epo-Überexpression zeigen. Es existieren

zwei Mäuselinien mit einer Epo-Überexpression, TG6 und TG21. Die Tiere gehören zum C57BL6 Stamm. Es sind bereits einige Studien mit diesen transgenen Mäusen durchgeführt worden. Eine der ersten Arbeiten entstand um die Auswirkungen von Stickstoffmonoxid (NO) zur Verhinderung von Gefäßerkrankungen in vivo zu untersuchen. Dazu wurde eine transgene Mauslinie (TG6) kreiert, welche konstitutiv humanes Erythropoietin in einer Sauerstoff-unabhängigen Weise überexprimiert (Ruschitzka 2000).

Bei diesen Mäusen führen die konstitutive Erythropoietin-Überexpression und die damit verbundene Erhöhung des Hämatokrits jedoch auch zu einer vermehrten Vasokonstriktion. Ferner kommt es durch einen erhöhten NO-Verbrauch und anschließender Erschöpfung des NO-Gehalts, sowie durch die Endothelin-Aktivierung zu einer kardialen Dysfunktion (Ruschitzka et al. 2000, Quaschnig et al. 2003).

Die konstitutive Epo-Überexpression führt zu einer Verdoppelung des Hämatokrits von 40% auf ungefähr 80% (Ruschitzka et al. 2000, Vogel et al. 2003). Die problematische Hämodynamik bei den TG6 Mäusen war der Hauptgrund für die Wahl von TG21 Mäuse für die Arbeit.

Die TG21 Mäuse zeigen nur erhöhte Epo-Spiegel im Gehirn (4-facher Wert im Vergleich zu wildtyp Mäusen), der Epo-Plasmaspiegel und auch der Hämatokrit liegen aber in einem normalen Bereich (Wiessner et al. 2001).

## **2.5. Zielsetzung**

Die Fragestellung lautete: Hat eine konstante Epo-Überexpression einen Effekt auf das Gehör von Mäusen, und falls ja, welchen?

Zur Beantwortung der Fragestellung wurde die Verhaltensaudiometrie von Mäusen am Tierspital Irchel unter der Leitung von Prof. Johannes Vogel etabliert. Die Erstbeschreibung der Verhaltensaudiometrie bei Mäusen erfolgte durch Prof. H. Heffner, siehe Heffner et al. (2006). Die erhobenen Befunde wurden als Kontrolle mit der vorpublizierte Hörkurve von Koay et al. (2002) verglichen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **Tiere**

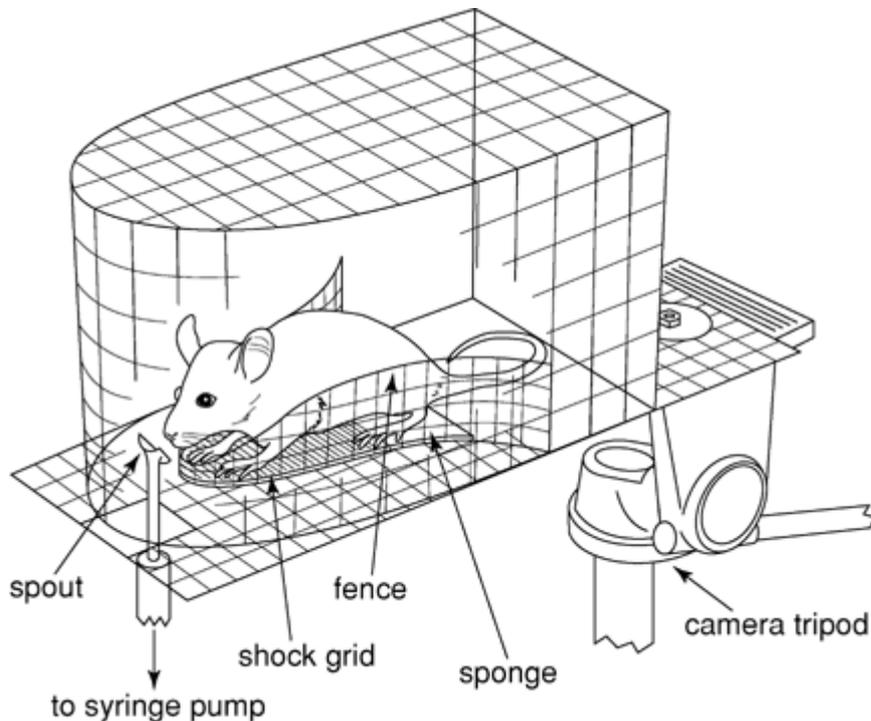
Wir arbeiteten mit 7 transgenen Mäusen (TG21) und 6 wildtyp (WT) Mäusen (Stamm C57BL6). Genauere Angaben zu den transgenen Mäusen können aus der Einleitung Kapitel 2.4.2. *Erythropoietin-überexprimierende Mäuse* entnommen werden.

Die Mäuse wurden von 1) - 7) bzw. 1) - 6), ausgehend von Ihren Körpermerkmalen oder Schwanzmarkierungen, nummeriert. Die Tiere waren zu Beginn der Versuche 80 bis 142 Tage alt und wurden in einer standardisierten Tierhaltung gehalten. Sie erhielten Trockenfutter ad libitum, Wasser gab es nur während dem täglichen Training. Die Tiere wurden täglich gewogen. Das Gewicht der Tiere blieb +/- 10% stabil. Alle Versuche und der Unterhalt der Tiere wurden nach den kantonalen Richtlinien des Veterinäramts Zürich durchgeführt und durch dieses genehmigt.

##### **Verhaltensaudiometrie**

Der Versuchsaufbau wurde nach der Vorlage von H. Heffner et al. (2006) [siehe Abb. 8] nachgebaut. Die Versuche fanden in einer schallschützenden Box statt. Aussen bestand die Box aus Holz, innen wurde sie mit Styropor und Noppenschaum ausgekleidet. Ein geräuschtransparenter Testkäfig wurde, wie in Abb. 7 in der Mitte der schalldichten Box montiert. Der Käfig wurde weiter mit einem Wasserspender (spout) ergänzt, welcher mit der Wasserpumpe (syring pump) verbunden war. Eine Lautsprecheranlage für reine Töne von 1 bis 100 kHz wurde ebenfalls in der Box platziert. Bei der Lautsprecheranlage wurde eine Box frontal und zwei seitlich zum Kopf der Maus installiert. Sie wurden etwa einen Meter vor dem Testkäfig auf einer Höhe von 0-15° zum Kopf der Maus platziert [siehe Abb. 8]. Die digital erzeugten Töne hatten eine Dauer von 400 ms und eine Anstiegs- und Abfallzeit von 10 ms. Die Ausrüstung für die Verhaltenskontrolle und Stromerzeugung wurden ausserhalb der Box platziert. Das Tier im Testkäfig wurde via Videokamera, welche seitlich neben dem Testkäfig platziert wurde, auf dem Monitor verfolgt. Für die Überwachung des

elektrischen Signals sorgte ein Oszilloskop. Weiter wurden auch ein Spektrumsanalysator, ein Mikrofon-Kalibrator, und ein Verstärker verwendet.



**Abb. 7: Testkäfig mit Wasserrinne** (Heffner et al. 2006)

Das Drahtgitter wurde an der Oberseite gelenkig verschlossen, so dass man die Tiere gut herausnehmen konnte. Im Testkäfig wurde ein Maschendrahtzaun (fence) etwa auf Höhe der Mausschulter angebracht. Er diente der geraden Ausrichtung der Maus zum Lautsprecher hin. Die Maus stand auf einem Drahtgeflecht (shock grid). Zwischen diesem Drahtgeflecht und dem Boden des Käfigs war ein etwa 2 Millimeter dicker Schwamm (sponge) platziert. Dieser Schwamm wurde täglich befeuchtet um einen guten elektrischen Kontakt zu den Füßen des Tieres zu gewährleisten. Die Wasserpumpe wurde in Funktion gesetzt, wenn ein Kontakt zwischen der Mausschnauze und der Wasserrinne bestand und die Maus zusätzlich in Kontakt mit dem Drahtgeflecht des Bodens war. So wurde sichergestellt, dass die Wasserpumpe nicht fälschlicherweise anging, wenn sich die Maus nur im Käfig bewegte und dabei zufälligerweise an der Wasserrinne ankam. Die Maus konnte folglich nur dann die Wasserpumpe in Gang setzen und trinken, wenn sie korrekt im Käfig positioniert war. Dies war die Voraussetzung dafür, dass sich der Kopf der Maus und folglich auch die Ohren stets optimal zur Lautsprecheranlage ausgerichtet waren. Ein Stromgenerator

wurde ausserhalb der Versuchsbox installiert. Beim Erklingen eines Tons aus der Lautsprecheranlage wurde ein Strom zwischen dem Wasserspender und dem Käfigboden erzeugt. Bestand während dieser Zeit ein Kontakt mit der Wasserrinne, was beim Trinken der Maus der Fall ist, kam es zu einem milden Stromschlag. Es wurden auch kleine Lichter neben dem Käfig in Höhe der Kamera platziert [siehe Abb. 8]. Diese produzierten ein helles Licht, welches während dem Schock an- und nach dem Schock wieder ausging. Die Versuche wurden vom Computer aus gesteuert und auf dem Monitor verfolgt.



**Abb. 8: Bild der Versuchsanordnung.** Der Deckel ist geöffnet. Sichtbar ist die mit Noppenschaum ausgekleidete schalldichte Box und in der Mitte der geöffnete Testkäfig. Weiter sind auch die Kamera mit der Lichtquelle und die Lautsprecher sichtbar.

### 3.2. Methoden

Um die Hörschwelle zu ermitteln wurde ein Standardverfahren zur konditionierten Unterdrückung nach Heffner et al. (2006) verwendet. Das Ziel war, dass die Maus augenblicklich mit dem Trinken aufhörte, sobald sie einen Ton hörte. Falls die Maus weiter aus der Wasserrinne trank während der Ton erklang, floss Strom in der Versuchsanleitung und die Maus erhielt einen milden elektrischen Schock.

Die Wasserflasche wurde 24 Stunden bevor das Training anfing aus dem Käfig entfernt und die Mäuse gewogen. Am ersten Trainingstag wurde die Maus in den Testkäfig gesetzt und durfte ihn 15 bis 20 Minuten lang explorieren und aus der Wasserrinne trinken. Die Wasserpumpe wurde am Anfang auf eine Flussrate von 20 ml/h eingestellt und in den täglichen Trainings schrittweise reduziert bis die Maus für ca. 15 Minuten kontinuierlich am Trinken war. Dies war in der Regel bei einer Flussrate von 7-10 ml/h.

In einem zweiten Schritt wurde die Maus auf die tonbedingte Trinkunterbrechung konditioniert. In unregelmäßigen Abständen wurden dazu Töne erzeugt. Diesen folgte während des Kontakts der Maus mit dem Wasserspender ein milder elektrischer Schock. Das Tier lernte schnell den Schock zu vermeiden, indem es den Kontakt mit dem Wasserspender unterbrach und zurückwich, sobald es einen Ton hörte. Das Versuchsprogramm war so aufgebaut, dass jeder Versuch zur Bestimmung einer Hörschwelle aus mehreren Teilversuchen oder *Trials* bestand. Diese *Trials* waren je 2 Sekunden lang und mit 1 Sekunde Abstand voneinander getrennt. Jeder *Trial* enthielt entweder ein akustisches Signal (**Warnsignal**) mit anschliessendem Schock oder keinen Ton (Stille, **sicheres Signal**) ohne folgenden Schock. 22% des Versuches bestanden aus *Trials* mit einem akustischen Signal, der Rest bestand aus sicheren Signalen. Jeder Teilversuch wurde, abhängig vom Kontakt des Tiers mit dem Wasserspender während der letzten 200 ms, mit 0 bis 10 bewertet. 10 bedeutete stetigen Kontakt mit dem Wasserspender, während 0 keinen Kontakt darstellte. Die dazwischen liegenden Bewertungen zeigten einen intermittierenden Kontakt, d.h. das Tier war nicht stetig am Trinken oder wich zu spät zurück. Unterbrach die Maus den Kontakt mit dem Wasserspender nach einem Warnsignal war dies ein **Treffer**, so wie auch der stetige Kontakt während eines sicheren Signals. Als **Fehlalarm** galt, wenn ein Tier das Warnsignal nicht hörte und

einen Schock bekam (10 Punkte anstatt 0) oder es ein sicheres Signal als Warnsignal falsch deutete (0 Punkte anstatt 10).

Die Leistung des Tieres setzte sich aus der Trefferrate und der Fehlerquote zusammen:

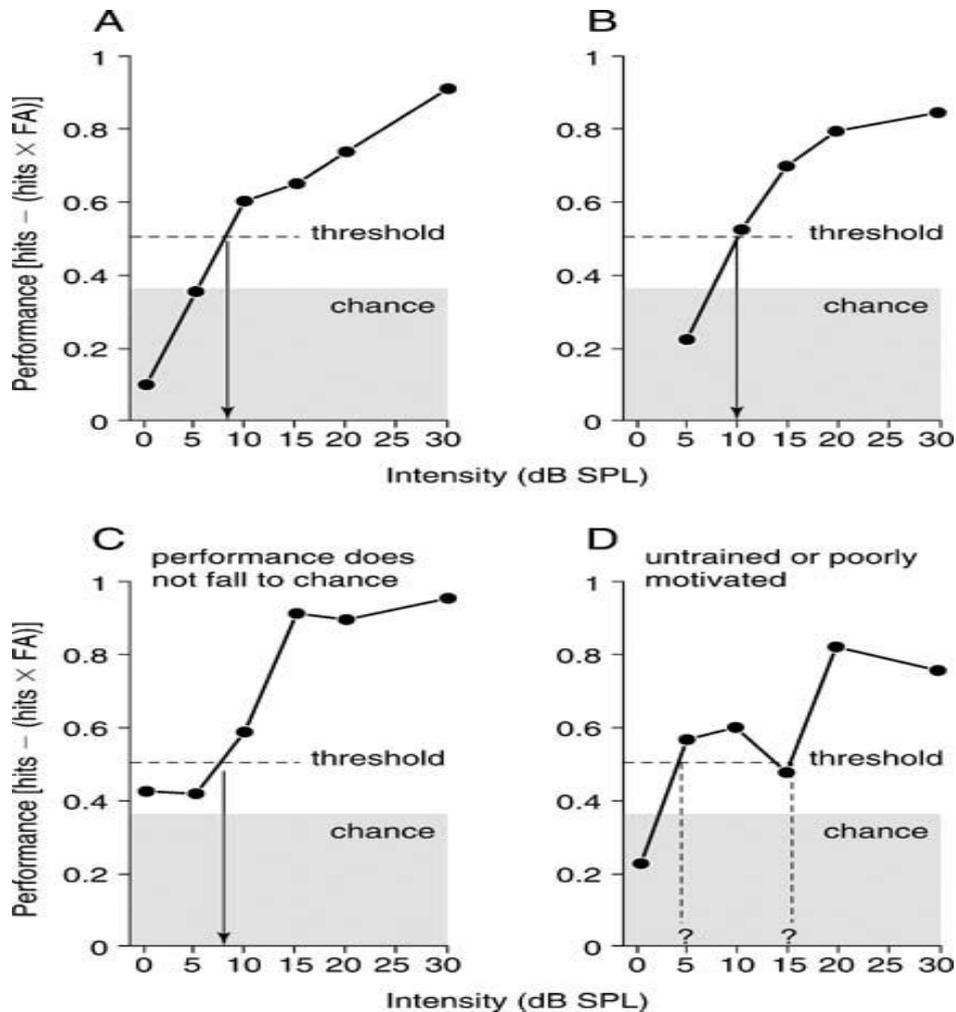
$$\text{Leistung} = \text{Trefferrate} - (\text{Fehlalarmrate} \times \text{Trefferrate})$$

Daraus abgeleitet wurde die Hörschwelle- analog dem Protokoll von Heffner et al. (2006)- als die Lautstärke definiert, die einer Leistung von 0.50 entsprach [siehe Abb. 9]. Gemäss Heffner et al. wurde die 0.50 (oder 50%) Leistungsschwelle (in unserem Fall eine 50% Trefferrate korrigiert mit der Fehlalarmrate) seit längerer Zeit in der Psychophysik als Schwelle definiert und sie scheint stabiler zu sein als höher oder tiefere Leistungsschwellen.

Die Hörschwellen für die getesteten Frequenzen wurden eruiert, indem die Lautstärke eines Tons immer weiter verringert wurde. Die Lautstärke wurde vom Prüfer jeweils in 5 dB Schritten reguliert. Reagierte die Maus adäquat auf 3-4 Warnsignale bei sonst stetigem Kontakt zum Wasserspender, wurde die Lautstärke für das nächste Warnsignal reduziert. Lag die Leistung des Tieres unter der Zufallsschwelle (Leistung < 0.35), konnte, sofern die Maus gut mitarbeitete, davon ausgegangen werden, dass die Maus den Ton nicht mehr hörte [siehe Abb. 9]. Die Lautstärke wurde dann wieder erhöht. Am Ende eines Versuchs wurde die Hörschwelle mittels der Leistungen, welche die Maus bei den geprüften Lautstärken aufwies, errechnet [siehe Abb. 9]. Wenn die Hörschwelle einer Frequenz in den verschiedenen Versuchen stabil blieb und nicht nach oben oder unten variierte, wurde die Hörschwelle für diese Frequenz festgelegt. So wurden in den folgenden Tagen fortlaufend die Hörschwellen für die Frequenzen 1.4, 2, 3, 4, 8, 16, 32, 50, 64 und 80 kHz ermittelt.

Das Trainieren einer Maus auf das kontinuierliche Trinken aus dem Wasserspender und in einem zweiten Schritt auf die tonbedingte Trinkunterbrechung nahm etwa eine Woche in Anspruch. Die anschliessende Hörschwellenbestimmung dauerte je nach Maus unterschiedlich lang, aber in der Regel etwa vier Wochen. Um das Tier nicht zu demotivieren, wurden nicht mehr als für die Hörschwellenbestimmung unbedingt nötige Töne, welche unter der vermuteten Hörschwelle im Zufallsbereich lagen und

von der Maus nicht gehört werden konnten, erzeugt. Ein Versuch wurde zudem immer mit gut hörbaren, lauten Tönen beendet. Diese konnte die Maus mit Sicherheit hören und beendete die Hörschwellenbestimmung so jeweils immer mit mehreren **Treffern**.



**Abb. 9: Eine Auswahl von leistungsabhängigen Hörschwellenbestimmungen.** Schema A und B zeigen gute Leistungen mit Hörschwellen (**threshold**) bei etwa 8 und 10 dB, während bei C und D methodische Probleme vorliegen und keine Hörschwelle bestimmbar ist. Die horizontal gestrichelte Linie liegt bei der halben (0.5) Leistung. Das grau hinterlegte Areal zeigt den Zufallsbereich (**chance**) an. Hier unterscheiden sich die Treffer- und die Fehlalarmraten nicht signifikant (Heffner et al. 2006).

### 3.3. Statistikverfahren

1) Zur statistischen Überprüfung der Mittelwertdifferenzen zwischen den Epo-überexprimierenden Tieren (TG21) und den Kontrolltieren (WT) wurde der t-Test für zwei unabhängige kleine Stichproben verwendet. Da die Mausanzahl  $n$  kleiner als 30 war, wurde der Test für kleine Stichproben verwendet. Die Prüfgröße  $t_{1r}$  wurde wie folgt berechnet:

$$t_{1r} = \frac{D_{\bar{x}} - \delta_0}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

$D_{\bar{x}}$  = Differenz der Hörschwellenmittelwerte,  $\delta_0$  = Differenz der Hörschwellenmittelwerte in der Grundgesamtheit (wird aufgrund der Homogenitätshypothese mit 0 angenommen).

$n_1$  = Anzahl Mäuse in der Stichprobe 1,  $n_2$  = Anzahl Mäuse in der Stichprobe 2,  $\sigma_1$  = Varianz der Stichprobe 1,  $\sigma_2$  = Varianz der Stichprobe 2

Für 11 Freiheitsgrade (laut Definition  $v = n_1 + n_2 - 2 = 11$ ) und einem einseitigen Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  betrug der Rückweisungspunkt 1.796. Falls die Prüfgröße  $t_{1r} < 1.796$  ist, kann die Nullhypothese bestehen bleiben. Der Hörschwellenunterschied zwischen den beiden Gruppen ist dann zufällig. (Billeter 1972, Voss & Tiede 1982)

2) Es wurde weiter auch ein zweiseitiger t-Test verwendet. Die Nullhypothese wurde zu einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  abgelehnt. Wenn der t-Wert also kleiner war als das 2,5%-Quantil oder größer als das 97,5%-Quantil der t-Verteilung mit  $n - 1$  Freiheitsgraden galt die Nullhypothese als abgelehnt.

Der t-Wert wurde wie folgt berechnet:

$$t = \sqrt{n} \frac{\bar{x} - \mu_0}{s}$$

$n$  = Anzahl der Mäuse,  $S$  = Standardabweichung,  $t$  = Prüfwert,  $\mu_0$  = vorgegebener (Mittel-)Wert  
 $\bar{x}$  = erhaltener Hörschwellenmittelwert

Und laut Definition wird die Nullhypothese zum Signifikanzniveau  $\alpha$  abgelehnt, wenn diese Gleichung erfüllt wurde:

$$|t| > t\left(1 - \frac{\alpha}{2}, n - 1\right)$$

$\alpha$  = Signifikanzniveau

Dieses statistische Verfahren wurde verwendet, um die Hörschwellen unserer Mäuse mit den Werten von Koay et al. (2002) zu vergleichen (Bortz 2002).

Tabelle 1: Ermittelte Hörschwellen\*

	1.4kHz	2kHz	3kHz	4kHz	8kHz	16kHz	32kHz	50kHz	64kHz	80kHz
1)	77.35	60.15	43.45	32.49	21.95	23.74	28.2	40.7	37.22	54.17
2)	81.95	64.45	43.62	30.83	23.24	22.78	26.39	26.65	37.08	56.67
3)	83.17	61.52	53.86	40.83	25.95	24.185	28.35	27.39	34.58	52.5
4)	78.05	61.95	44.46	27.75	19.15	26.65	28.6	28.3	39.01	52.92
5)	80.28	60.83	45.28	34.17	21.81	21.39	22.78	24.44	30.97	47.5
6)	78.61	61.67	38.61	33.61	21.81	22.78	28.33	23.61	28.61	41.11
7)	82.22	56.94	43.05	31.38	23.24	18.88	26.8	20	26.67	58.19
8)	81.52	61.8	42.22	32.77	21.39	20.28	21.94	20.56	32.92	50.69
9)	82.22	59.03	42.64	31.67	19.44	24.16	27.64	26.38	34.86	54.16
10)	81.39	63.19	38.61	31.25	20	14.58	27.22	26.53	33.75	57.36
11)	81.25	64.58	44.3	31.8	17.63	21.66	25.41	22.77	34.02	53.61
12)	79.03	60.14	43.19	35	19.87	18.61	22.5	24.16	31.52	51.66
13)	80.56	64.16	40.55	32.64	22.78	23.47	25	19.58	32.64	51.94

#### 4.1. Tabellen und Grafiken

## 4. Resultate

\* Die Werte aus der Tabelle 1 sind Durchschnittswerte der ermittelten Schwellen jeder Maus in dB SPL.

## Legende zu Tabelle 1:

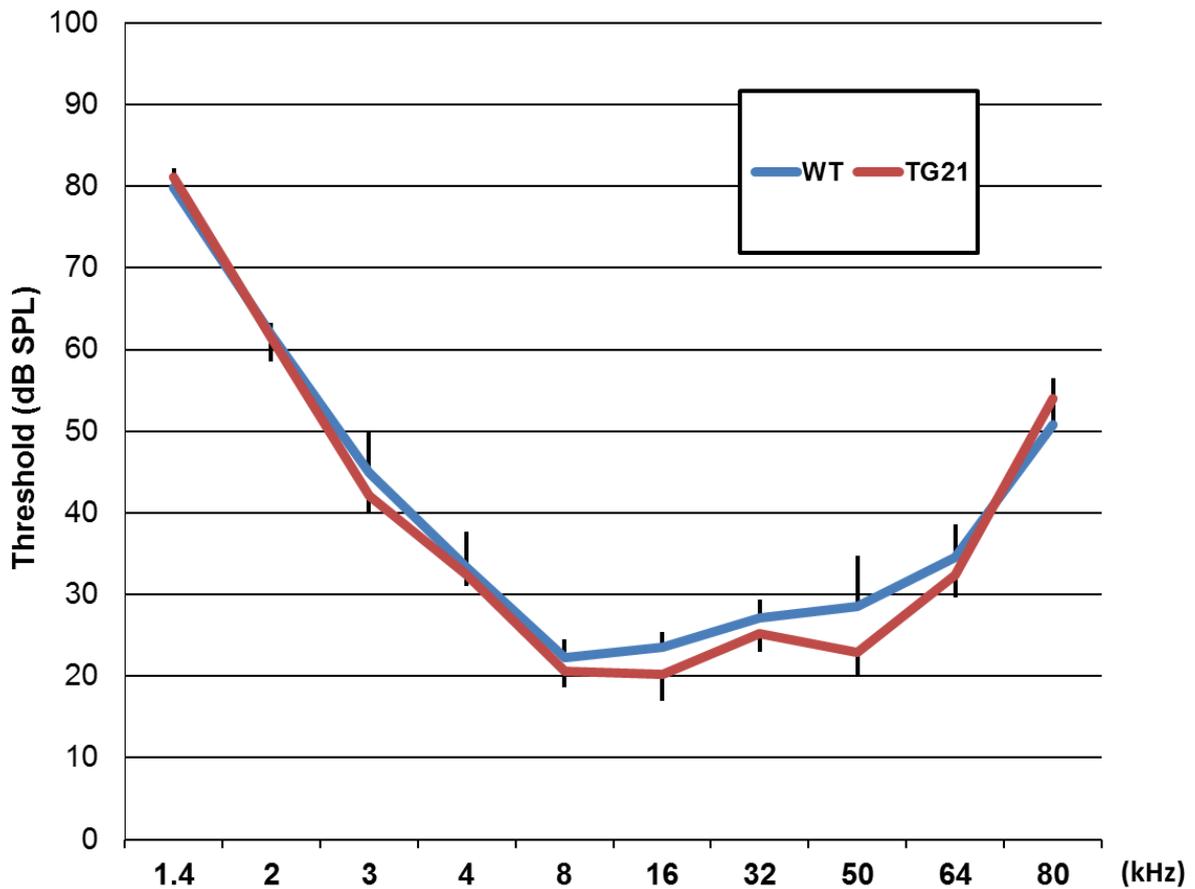
Beschreibung der Mäuse:

- 1) **Weisschwanz**, männlich, wildtyp, geboren 19.04.2010, Gewicht 36.8g
- 2) **Schwarzwurzel**, männlich, wildtyp, geboren 19.04.2010, Gewicht 33.0g
- 3) **Zweistrich**, männlich, wildtyp, geboren 19.04.2010, Gewicht 27.0g
- 4) **Normal**, männlich, wildtyp, geboren 19.04.2010, Gewicht 26.3g
- 5) **Schlitzohr**, männlich, wildtyp, geboren 01.06.2010, Gewicht 26.0g
- 6) **Normal**, männlich, wildtyp, geboren 01.06.2010, Gewicht 28.8
- 7) **Ungezeichnet**, männlich, TG21, geboren 11.03.2010, Gewicht 28.7g
- 8) **Längsstrich**, männlich, TG21, geboren 11.03.2010, Gewicht 31.0g
- 9) **Kreuzschwanz**, männlich, TG21, geboren 11.03.2010, Gewicht 30.9g
- 10) **Weisschwanz**, männlich, Tg21, geboren 03.04.2010, Gewicht 29.0g
- 11) **Normal**, männlich, TG21, geboren 03.04.2010, Gewicht 28.7g
- 12) **Weisspunkt**, männlich, TG21, geboren 22.04.2010, Gewicht 29.9g
- 13) **Normal**, männlich, TG21, geboren 22.04.2010, Gewicht 28.8g

Tabelle 2: Hörschwellenvergleich TG21 vs. WT

Frequenz (kHz)	1.4	2	3	4	8	16	32	50	64	80
Threshold wt (Maus 1-6) in dB SPL	79.9	61.76	44.88	33.28	22.32	23.59	27.11	28.51	34.58	50.81
Standardabweichung	2.31	1.47	4.98	4.36	2.22	1.78	2.27	6.23	4.04	5.62
Threshold tg21(Maus 7-13) in dB SPL	81.17	61.41	42.08	32.36	20.62	20.23	25.22	22.85	32.34	53.94
Standardabweichung	1.11	2.83	1.91	1.30	1.97	3.28	2.26	2.94	2.72	2.88

Grafik 1: TG21 vs. WT

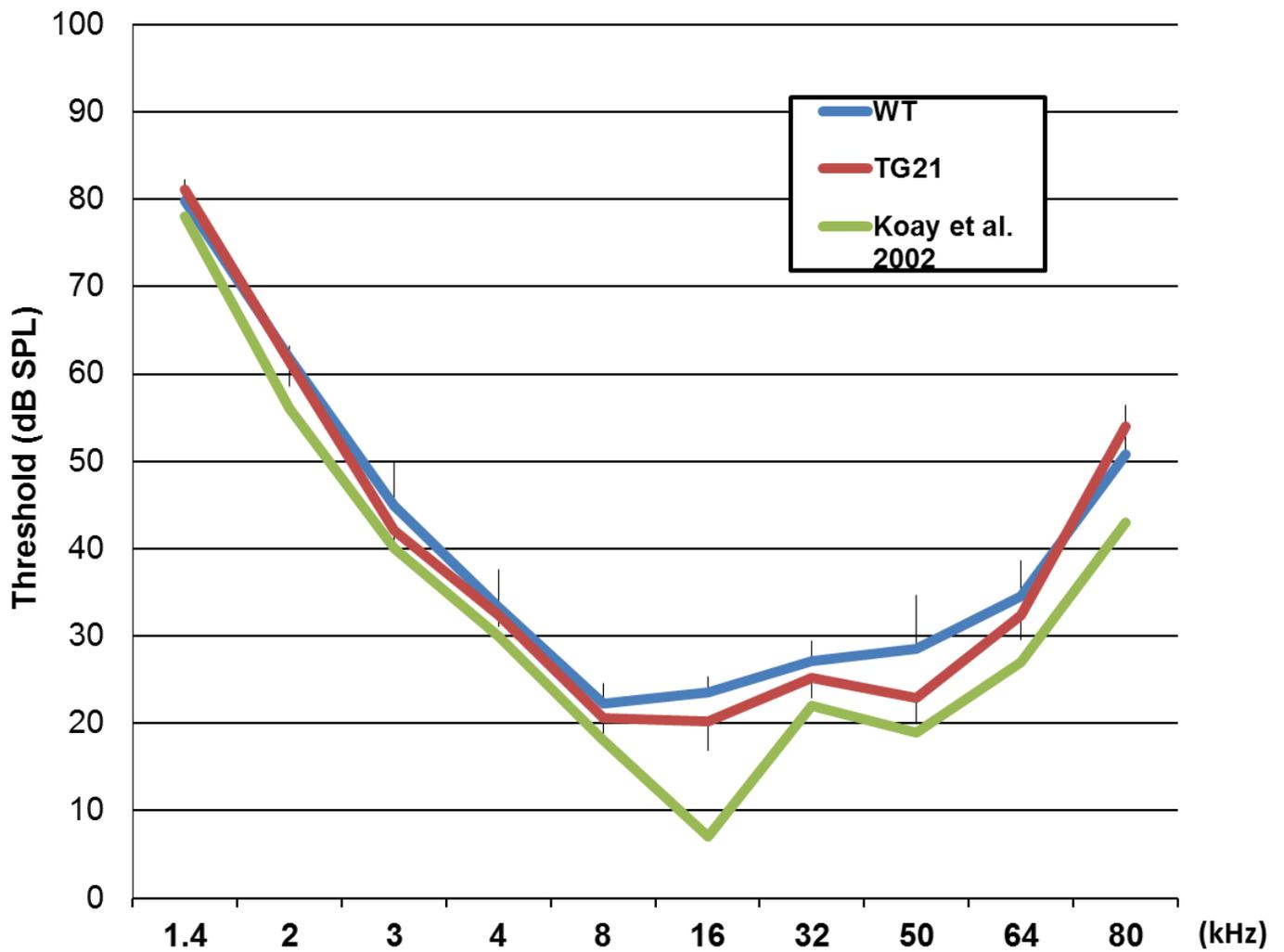


**Legende zu Grafik 1:** Hörschwellenwerte der TG21 und der WT Mäuse als Hörkurvenfunktion der einzelnen Werte mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Tabelle 3: Vorpublizierte Hörschwellen von Koay et al. (2002)

Frequenz (kHz)	1.4	2	3	4	8	16	32	50	64	80
Threshold (dB SPL)	78	56	40	30	18	7	22	19	27	43

**Grafik 2:** Hörschwellenbestimmungen WT, TG21 vs. Koay et al (2002)



**Legende zu Grafik 2:** Werte der TG21 und der WT Mäuse sowie die publizierten Werte von Koay et al. (2002) in dB SPL als Hörkurvenfunktion der einzelnen Frequenzen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

## 4.2. Statistische Auswertungen

1) Die geformte Nullhypothese, dass die Differenz der Hörschwellenmittelwerte der WT und der TG21 Gruppe zufällig sei, wurde nach dem in 3.3. *Statistikverfahren* erwähnte Vorgehen überprüft. Die Auswertung der Resultate ergab, dass das Gehör der adulten Epo-überexprimierenden Tiere im Mittel nicht besser war als das der Kontrolltiere. Die Differenz zwischen dem Hörschwellenmittel der beiden Gruppen war zufällig. Einzige Ausnahme waren die Frequenzen **16 kHz** und **50 kHz**. Bei diesen Frequenzen waren die TG21 Mäuse signifikant besser. Die berechneten Prüfwerte ergaben  $t_{1r(16kHz)} = 2.337$  und  $t_{1r(50kHz)} = 2.039$  und liegen somit beide über dem Rückweisungspunkt von 1.796. Bei den Frequenzen 16 kHz und 50 kHz muss die Nullhypothese demnach abgelehnt werden. Die Differenz zwischen den beiden Hörschwellendurchschnitten ist bei diesen Frequenzen nicht zufällig. Somit liegt die Hörschwelle der TG21 Mäuse bei 16 und 50 kHz signifikant tiefer als bei den WT Tieren.

2) Die zweite aufgestellte Nullhypothese war, dass unsere Mäuse gleich gut hören würden wie die Mäuse von Koay et. al (2002). Der t-Wert konnte in unserem Versuch nicht kleiner als das 2,5%-Quantil sein, da die von Koay et. al ermittelten Hörschwellen zu den jeweiligen Frequenzen immer tiefer waren als unsere Resultate. Der zugehörige t-Wert zu dem 97,5%-Quantil und 12 Freiheitsgrade [siehe Gleichung Seite 24 unten], auch  $t(0,975;12)$  geschrieben, ist aus einer t-Tabelle ablesbar als 2,179. Die errechneten **t-Werte waren alle >2,179**. Die Nullhypothese zum Signifikanzniveau  $\alpha = 5\%$  wurde demnach abgelehnt [siehe Gleichung Seite 25]. Unsere getesteten Mäuse hatten folglich bei allen Frequenzen im Mittel eine höhere Hörschwelle als die publizierten Werte von Koay et al. 2002.

## 5. Diskussion

- Unterscheidet sich das Gehör von Erythropoietin-überexprimierenden Mäusen (TG 21) im Vergleich zu den Kontrolltieren (WT)?

In den meisten Frequenzen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Der Unterschied der Hörschwellen der TG21 Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen (siehe Grafik 1 und 4.2. *Statistische Auswertung*) bei den Frequenzen 16 kHz und 50 kHz könnte auf einer einfacheren Handhabung und die Konditionierung der transgenen Tiere beruhen. Sie waren sehr auf das Trinken und das Hören der Töne fokussiert. Sie wirkten, im Gegensatz zu den Kontrolltieren, konzentrierter und kletterten selten bis gar nicht im Käfig herum. In Studien mit Epo-behandelten Ratten und Mäusen wurde ein steigender Effekt des Epo auf die kognitive Leistungsfähigkeit der Tiere nachgewiesen. Eventuell könnte dies auch für die Erythropoietin überexprimierenden TG21 Mäuse zutreffen (El-Kordi, Radyushkin & Ehrenreich 2009, Mala et al. 2005). Zudem fällt auf, dass bei 16 kHz die Standardabweichung bei der transgenen Gruppe am grössten ist und bei 50 kHz die grösste Standardabweichung der wildtyp Gruppe liegt. Gemäss Graphik 2 liegt der beste Hörbereich bei den Tieren von Koay et al. (2002) und der transgenen Tiere bei 8 kHz, 16 kHz und 50 kHz. Möglicherweise zeigen sich deshalb in diesem Bereich grössere Standardabweichungen als in den anderen Frequenzen. Dass die Unterschiede in den Frequenzen 16 kHz und 50 kHz durch einen möglichen schützenden Effekt von Epo entstanden wären, wie er bereits in vitro gezeigt wurde, (Monge et al. 2006, Andreeva et al. 2006) ist eher unwahrscheinlich. Eine protektive Wirkung wäre einerseits nicht nur in zwei Frequenzen zu erwarten und andererseits würden wir sie eher in den höheren Frequenzen erwarten, da die Haarzellen der basalen Windung am empfindlichsten gegenüber toxischen Einwirkungen sind (Lim 1976). Weiter könnte es auch möglich sein, dass die TG21 Tiere davon profitierten als zweite Gruppe, also erst nachdem die Hörschwelle der WT-Mäuse ermittelt wurde, geprüft worden zu sein. Die Vorgehensweise bei der Handhabung der Mäuse und des Audiometrie-Programms konnten optimiert werden und es bestand so vielleicht eine Verbesserung der Prüferfähigkeiten und -fertigkeiten, welche sich

indirekt auf die Mäuse auswirkten. (Dafür spricht auch die bei allen ausser einer Frequenz höhere SD der Wildtyp-Gruppe)

- Unterscheidet sich das Gehör der einzelnen Tiere untereinander?

Es gab leichte individuelle Unterschiede zwischen den getesteten Mäusen. Zum Beispiel schnitt Maus 1, Bezeichnung Weisschwanz, schlecht bei den hohen Frequenzen ab und Maus 3, Bezeichnung Zweistrich, zeigte eine unterdurchschnittliche Leistung bei den tiefen Frequenzen. Da die Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten, immer zur gleichen Zeit und in gleicher Reihenfolge geprüft wurden, waren äussere Faktoren kaum für diese Unterschiede verantwortlich. Es scheinen hier eher genetische Faktoren für die Gehörsunterschiede verantwortlich zu sein. Obwohl die Tiere alle vom gleichen Stamm abstammten (C57BL6) und somit den gleichen genetischen Hintergrund hatten, zeigten sich bei den einzelnen Tieren individuelle Unterschiede. Weiter spielte hier wohl auch das Wesen, die Dynamik und die Lernfähigkeit der Tiere eine entscheidende Rolle. Aufgefallen ist, dass die Tiere, welche schlechter abschnitten, tendenziell ängstlicher wirkten. In einer Studie von Wang et al. wurde gezeigt, dass Stress, nebst der Beeinträchtigung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses via Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, auch das Arbeitsgedächtnis und das emotionale Gedächtnis aufgrund erhöhter Aktivität der Dopamin D1-Rezeptoren herabsetzt (Wang, Wu, Zhu, Li & Cai 2011). Es wäre möglich, dass ein erhöhtes Stressniveau für das schlechtere Resultat einzelner Mäuse verantwortlich war. Dies ist aber nur am Rande zu erwähnen, da für diesen Rückschluss weitere Beobachtungen und weiterführende Versuche nötig wären.

- Wie waren unsere Resultate im Vergleich zur etablierten Verhaltensaudiometrie von Heffner et. al (2006) und der dazugehörigen publizierten Hörkurve von Koay et al. (2002)?

Die Hörschwellen unserer Mäuse waren immer signifikant höher als diejenigen von Koay et al. (siehe 4.2. *Statistische Auswertung*). Woran dies lag ist schwierig zu beurteilen. Versuchsaufbau und -durchführung waren mit wenigen Ausnahmen dieselben. Abweichend verwendeten wir Wasser, welches den Mäusen über die Wasserrinne angeboten wurde und keine Fruchtsaft-Mischung wie es in der

Anleitung in der von Heffner et. al (2006) etablierten Verhaltensaudiometrie vorgeschlagen wurde. Inwiefern und ob diese Abweichung einen Unterschied in der Hörschwelle der Mäuse bewirkt hat, ist fraglich und nicht mit Sicherheit zu beantworten. Es hätte sich wahrscheinlich eine Änderung des Trinkverhaltens der Mäuse gezeigt. Ob sich deswegen aber etwas am Gehör und an der Reaktion auf das Gehörte geändert hätte bleibt zweifelhaft. Auffällig ist auf jeden Fall die Abweichung der Hörkurve bei 16 kHz (siehe Grafik 2). Weisen die Kurven, wenn auch verschoben, sonst dieselbe Verlaufsform auf, weicht die von Koay et al. (2002) ermittelte Hörkurve bei 16 kHz deutlich nach unten ab. Es ist aber bekannt, dass die einzelnen Stämme bei einzelnen Frequenzen, so z.B. auch bei 16 kHz, unterschiedliche Hörschwellen haben können (Zheng QY et al. 1999). Die getesteten Mäuse in der Studie von Koay et al. (2002) waren durch eine Kreuzung von C57BL6 und C3HeBF entstanden. Sie hatten dadurch eine Kopie des resistenten Scn8a-Allels, welches sie vom C3HBeBF-Elternteil erhielten. Die getesteten Mäuse waren also entweder homozygot für die Mutation medJ/medJ, was in einer reduzierten Anzahl Scn8a Natrium-Kanäle resultierte, oder sie waren phänotypisch normale Mäuse und entweder heterozygot für die Mutation medJ oder homozygot Wildtyp. Die Mäuse sollten sich laut dem Verfasser nur in Bezug auf die medJ-Mutation voneinander unterscheiden. Auf das Gehör der Tiere hatte diese Mutation aber offensichtlich keinen Einfluss, da die Hörkurven bei beiden Gruppen gleich waren. Zu beachten ist jedoch die Tatsache, dass die 7 Mäuse, welche in der Studie von Koay et al. (2002) getestet wurden, etwa 13 Wochen (medJ Mutation) und 7 Wochen (Wildtyp), unsere Mäuse dagegen 80-142 Tage, also etwa 11-20 Wochen alt waren. Die Mäuse von Koay et al. (2002) waren demnach etwas jünger und eventuell hat dies zu den unterschiedlichen Hörkurven beigetragen. Es ist bekannt, dass die Mäuse vom Stamm C57BL6 an einer altersabhängigen Schwerhörigkeit leiden. Allerdings tritt diese erst in fortgeschrittenem Alter auf. Eine Screening-Untersuchung an 80 Mäusestämmen zeigte, dass die C57BL6 Mäuse im Vergleich zu normalhörenden Mäusestämmen im Alter von 33 Wochen noch normale ABR-Schwellen hatten. Erst im Alter von 100 Wochen hatten die Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren eine 60 dB höhere Hörschwelle in der ABR-Messung (Zheng QY et al. 1999). Insofern sollte sich in Bezug auf das Alter der Tiere, die wir verwendet haben,

kein Hörschwellenunterschied zeigen, wenn wir die Daten der ABR-Messung auf unsere Hörmessung mittels konditionierter Unterdrückung übertragen.

Schliesslich ist noch zu erwähnen, dass trotz der Abweichung unserer Hörkurve zu der von Koay et al. (2002) die Methode zur Erfassung von Hörkurven nach dem Standardverfahren der konditionierten Unterdrückung von Heffner et al. (2006) etabliert werden konnte.

Ausblick:

Die Masterarbeit über die Wirkung von Erythropoietin auf das Gehör von adulten, transgenen Epo-überexprimierenden Tieren ist ein Teil eines grösseren Projekts, welches sich mit der altersbedingten Schwerhörigkeit bei transgenen Epo-überexprimierenden Mäusen befasst. Diese weiterführende Arbeit entsteht im Rahmen einer Dissertation. Diese Dissertation baut auf den Erkenntnissen dieser Arbeit auf und befasst sich mit denselben Mäusen.

## 6. Abbildungsnachweis

### **[1] Anatomie des Hörorgans:**

Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.) (2004) *Benninghoff Anatomie*. Band 2, 15. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, S. 707

### **[2] Querschnitt der Cochlea mit Bewegungsrichtung der Wanderwelle:**

Schön, Heike (2004) Subjektive Audiometrie. Praktikum Skript, Giessen URL: [http://homepages.thm.de/~hg11956/Lehrveranstaltungen/AMP03/Anleitung\\_AMP04\\_2004.pdf](http://homepages.thm.de/~hg11956/Lehrveranstaltungen/AMP03/Anleitung_AMP04_2004.pdf) [15.07.2011].

### **[3] Mittelohr und Innenohr:**

Klinke R, Pape H, Silbernagl S (2005) *Physiologie*. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, S.661

### **[4] Hörbereich des Menschen:**

Behrbohm H et. al (2009) *Ear, nose and throat disease*. 3rd edition, Thieme, New York

### **[5] dB HL Reintonaudiogramm für Knochenleitung und Luftleitung bei Normalhörigkeit für Rechts und Links:**

Ganzer U, Arnold W (2005) *Checkliste Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. Thieme, Stuttgart, S. 16

### **[6] Schematische Darstellung einer Hirnstammaudiometrie (BERA):**

Klinke R, Pape H, Silbernagl S (2005) *Physiologie*. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, S.671

### **[7] Testkäfig mit Wasserrinne:**

Heffner H, Koay G, Heffner R (2006) Behavioral Assessment of Hearing in Mice—Conditioned Suppression. *Current Protocols in Neuroscience*. 8.21D.1–8.21D.15.

### **[8] Bild von der Versuchsanordnung:**

Eigenes Foto, 02.02.2011

### **[9] Eine Auswahl von leistungsabhängigen Hörschwellenbestimmungen:**

Heffner H, Koay G, Heffner R (2006) Behavioral Assessment of Hearing in Mice—Conditioned Suppression. *Current Protocols in Neuroscience*. 8.21D.1–8.21D.15.

## 7. Literaturverzeichnis

Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, and Noguchi CT (1994) Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3974–3978.

Andreeva N, Nyamaa A, Haupt H, Gross J, Mazurek B (2006) Recombinant human erythropoietin prevents ischemia-induced apoptosis and necrosis in explant cultures of the rat organ of Corti. *Neurosci. Lett.* 396:86-90.

Behrbohm H, Kaschke O, Nawka T, Swift A (2009) *Ear, nose and throat disease*. 3. Auflage, Thieme, New York

Billeter EP (1972) *Grundlagen der erforschenden Statistik*. 1. Auflage, Springer, Wien

Bortz J (2005) *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 6. Auflage, Springer, Berlin

Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Corica F, Frisina N (2003) The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62:228-236.

Cayé-Thomasen P, Wagner N, Lidegaard Frederiksen B, Asal K, Thomsen J (2005) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in the guinea pig inner ear. *Hear. Res.* 203:21–27.

Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.) (2004) *Benninghoff. Anatomie*, Band 2, 15. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München

El-Kordi A, Radyushkin K, Ehrenreich H (2009) Erythropoietin improves operant conditioning and stability of cognitive performance in mice. *BMC Biol.* 7:37

Fredriksen BL, Cayé-Thomasen P, Lund SP, Wagner N, Asal K, Olsen NV, Thomsen J (2007) Does erythropoietin augment noise induce hearing loss? *Hear. Res.* 223:129-137.

Ganzer U, Arnold W (2005) *Checkliste Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. 4. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 15-25.

Genc, S, Koroglu TF, Genc K (2004) Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor. Neurol. Neurosci.* 22:105–119.

Hassan K, Gross B, Simri W, Rubinchik I, Cohen H, Jacobi J, Shasha S.M., and Kristal B (2004) The presence of erythropoietin receptors in the human peripheral nervous system. *Clin. Nephrol.* 61:127–129.

Heffner H, Heffner R (2007) Hearing Ranges of Laboratory Animals. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46:20-22.

Heffner H, Koay G, Heffner R (2006) Behavioral Assessment of Hearing in Mice Conditioned Suppression. *Current Protocols in Neuroscience.* 8.21D.1–8.21D.15.

Jelkmann W (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern. Med.* 43:649-659.

Keithley EM, Canto C, Zheng QY, Fischel-Ghodsian N, Johnson KR (2004). Age related hearing loss and the ahl locus in mice. *Hear. Res.* 188:21-28.

Klinke R, Pape H, Silbernagl S (2005) *Physiologie*. 5. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 658-672.

Koay G, Heffner R, Heffner H (2002) Behavioral audiograms of homozygous medJ mutant mice with sodium channel deficiency and unaffected controls. *Hear. Res.* 171:111-118.

Lenhardt E, Laszig R (2001) *Praxis der Audiometrie*. 88. Auflage, Thieme, Stuttgart, S.79-104.

Lim DJ (1976) Ultrastructural cochlear changes following acoustic hyperstimulation and ototoxicity. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 85:740-751.

Maiese K, Li F, Chong Z.Z (2004) Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol. Sci.* 25:577–583.

Maiese K, Li F, Chong Z.Z. (2005) New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA.* 293:90–95.

Mala H, Alsina CG, Madsen KS, Sibbesen EC, Stick H, Mogensen J (2005) Erythropoietin improves place learning in an 8-arm radial maze in fimbria-fornix transected rats. *Neural. Plast.* 12:329-340.

Maue J, Hoffmann J, von Lüpke A (2003) *0 Dezibel plus 0 Dezibel gleich 3 Dezibel*. 8. Auflage, Erich Schmidt Verlag, Berlin

Monge A, Nagy I, Bonabi S, Schmid S, Gassmann M, Bodmer D (2006) The effect of erythropoietin on gentamicin-induced auditory hair cell loss. *Laryngoscope.* 116:312–316.

Probst R, Grevers G, Iro H (2004) *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. 2.Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 167-170, 178-180, 203.

Quaschnig T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, Goettsch W, Hermann M, Slowinski T, Theuring F, Hocher B, Luscher TF, Gassmann M (2003) Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J.* 17:259–261.

Rabie T, Marti H (2008) Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda).* 23:263-264.

Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M (2000) Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:11609-13.

Schön, Heike (2004) Subjektive Audiometrie. Praktikum Skript Giessen  
URL:[http://homepages.thm.de/~hg11956/Lehrveranstaltungen/AMP03/Anleitung\\_AM P04\\_2004.pdf](http://homepages.thm.de/~hg11956/Lehrveranstaltungen/AMP03/Anleitung_AM P04_2004.pdf) [15.07.2011].

Tiede M, Voss W (1982) *Prüfverfahren in der Wirtschafts und Sozialstatistik.*  
2. Auflage, Studienverlag Brockmeyer, Bochum

Trepel M (2008) *Neuroanatomie Struktur und Funktion.* 4. Auflage, Urban & Fischer, München, S.358-368.

Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, Vogel O, Aulmann M, Frietsch T, Schmid-Schonbein H, Kuschinsky W, Gassmann M (2003) Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood.* 102:2278–2284.

Wang Y, Wu J, Zhu B, Li C, Cai JX (2012) Dopamine D1 receptors are responsible for stress-induced emotional memory deficit in mice, *Stress.* 15(2):237-42

Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M (2001) Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21:857–864.

Zheng QY, Johnson KR, Erway LC (1999) Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. *Hear. Res.* 130:94-107.

## 8. Lebenslauf

Name, Vorname: Belfrage Celina Ida Maria

Geschlecht: weiblich

Geburtsdatum: 27.10.1987, Zug

Heimatort: Schweden

Ausbildung: Primarschule (1994-2000, Walchwil, Zug)

Gymnasium (2000-2006, Kantonsschule Zug)

Abschluss mit eidgenössischer Matura, Schwerpunktfach  
Biologie und Chemie.

Medizinstudium (2006, Universität Zürich)

## 9. Erklärung

### Originalarbeit

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir im Rahmen des Studiengangs  
*Master of Medicine*

eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel

*Wirkung von Erythropoietin auf das Gehör von adulten transgenen Erythropoietin-  
überexprimierenden Mäusen*

um eine von mir selbst und ohne unerlaubte Beihilfe sowie in eigenen Worten  
verfasste Originalarbeit handelt.

Ich bestätige überdies, dass die Arbeit als Ganzes oder in Teilen weder bereits  
einmal zur Abgeltung anderer Studienleistungen an der Universität Zürich oder an  
einer anderen Universität oder Ausbildungseinrichtung eingereicht worden ist.

### Verwendung von Quellen

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche in der oben genannten Arbeit  
enthaltenen Bezüge auf fremde Quellen (einschliesslich Tabellen, Grafiken u. Ä.) als  
solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich *ausnahmslos*  
und nach bestem Wissen sowohl bei wörtlich übernommenen Aussagen (Zitaten) als  
auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen anderer Autorinnen oder  
Autoren (Paraphrasen) die Urheberschaft angegeben habe.

### Sanktionen

Ich nehme zur Kenntnis, dass Arbeiten, welche die Grundsätze der  
Selbstständigkeitserklärung verletzen – insbesondere solche, die Zitate oder  
Paraphrasen ohne Herkunftsangaben enthalten –, als Plagiat betrachtet werden und  
die entsprechenden rechtlichen und disziplinarischen Konsequenzen nach sich  
ziehen können (gemäss §§ 7ff der Disziplinarordnung der Universität Zürich sowie §§  
51ff der Rahmenverordnung für das Studium in den Bachelor- und Master-  
Studiengängen an der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich).

Ich bestätige mit meiner Unterschrift die Richtigkeit dieser Angaben.

Datum: 5.11.2012

Name: Belfrage

Vorname: Celina

Unterschrift: