

Lehrstuhl für Zoologie der Technischen Universität München

# Ursprung der cochleären Efferenzen im Hirnstamm der Schleiereule (*Tyto alba*)

Tobias Raabe

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. Hans-Rudolf Fries

Prüfer der Dissertation:

1. Priv. - Doz. Dr. Christine Köppl
2. Univ. - Prof. Geoffrey A. Manley, Ph.D., Princeton, M.J./USA
3. Univ. - Prof. Dr. Gerd Schuller, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 06. Februar 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 01. Juli 2004 angenommen.



# Inhalt

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Einführung .....	5
1.2 Motivation für die vorliegende Arbeit .....	8
1.3 Ziel der Arbeit .....	10
<b>2 Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Tierhaltung und Zucht .....	11
2.2 Tracerapplikation .....	12
2.2.1 Narkose: .....	13
2.2.2 Operation .....	14
Hühner .....	14
Schleiereulen .....	15
2.3 Erstellung der Präparate .....	16
2.3.1 Perfusion .....	16
2.3.2 Organentnahme .....	17
2.3.3 Schneiden .....	17
2.3.4 Tracer-Nachweis .....	18
Choleratoxin B -Nachweis .....	18
Fluorogold -Nachweis .....	19
2.3.5 Aufziehen und Eindeckeln .....	20
2.3.6 Kresylviolett färbung .....	20
2.4 Mikroskopische Auswertung .....	21
2.4.1 Fluoreszenzmikroskopie .....	22
2.4.2 Erfassung der Zellpositionen .....	23
2.4.3 Erfassung der Zellformen .....	27
2.5 Datenanalyse .....	27
2.5.1 Statistische Auswertung der Zellpositionen .....	28
2.5.2 Statistische Auswertung der Zellformen .....	29
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1 Lage der cochleären Efferenzen im Stammhirn .....	30
3.1.1 Allgemeine Beschreibung der Lage efferenter Zellkörper .....	30
3.1.2 Quantitative Erfassung und statistische Analyse der Lage efferenter Zellkörper .....	38
Allgemeine Beobachtungen .....	38
Unterscheidung individueller Subpopulationen .....	39
3.2 Zellformen .....	50
3.2.1 Phänomenologische Beschreibung efferenter Zellen .....	50
3.2.2 Morphometrische Daten efferenter Zellen .....	51
3.2.3 Lage und Orientierung einzelner Zelltypen .....	57
3.3 Bilateral projizierende cochleäre Efferenzen .....	59
3.3.1 Lage und Anzahl bilateral projizierender Efferenzen .....	59
3.4 Methodologische Aspekte .....	62

3.4.1 Färbungen nicht cochleär efferenter Strukturen .....	62
Färbungen der aufsteigenden Hörbahn .....	62
Färbungen nicht auditorischer Strukturen .....	63
Allgemeine Beobachtungen .....	66
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1 <i>Bewertung des Färbeerfolgs</i> .....	68
4.1.1 Anzahl der durch die Tracerinjektionen gefärbten cochleären Efferenzen.....	68
4.1.2 Färbungen im Nucleus angularis .....	70
4.1.3 Färbungen nicht auditorischer Strukturen .....	71
4.1.4 Zusammenfassung von 4.1 – Bewertung des Färbeerfolgs.....	72
4.2 <i>Unterscheidung zwischen vestibulären und auditorischen Efferenzen</i> .....	73
4.2.1 Lage vestibulärer Efferenzen.....	73
4.2.2 Anzahl der Zellen in der ventrolateralen und der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen .....	74
4.2.3 Zusammenfassung 4.2 Unterscheidung zwischen vestibulären und auditorischen Efferenzen .....	77
4.3 <i>Lage cochleär efferenter Zellkörper im Stammhirn</i> .....	78
4.4 <i>Morphologie individueller cochleärer Efferenzen</i> .....	81
4.5 <i>Bilateral projizierende auditorische Efferenzen</i> .....	86
<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>90</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>
<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....</b>	<b>94</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>Literaturverzeichnis:.....</b>	<b>96</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

In den Seitenlinienorganen von Fischen und Amphibien sowie in den Innenohren aller Wirbeltiere werden mechanische Reize von hochspezialisierten Zellen, den Haarzellen, in für das Nervensystem nutzbare elektrische Signale umgewandelt. Diese Haarzellen geben nicht nur über aufsteigende (afferente) Verbindungen Informationen über Außenreize zur Verarbeitung an das zentrale Nervensystem weiter sondern werden gleichzeitig über absteigende (efferente) Bahnen von entsprechend spezialisierten Zentren im Zentralnervensystem gesteuert. Entsprechend finden sich im Stammhirn aller Vertebraten einander analoge Gruppen efferenter Zellen, die entweder die Haarsinneszellen selbst oder deren Afferenzen kontaktieren. Diese efferente Innervation ist eine primitive Eigenschaft aller Sinnessysteme, in denen Haarzellen eine Rolle spielen.

Phylogenetisch sind diese Zellen aus Motoneuronen des Fazialisnerven hervorgegangen. Das ursprüngliche Innervationsmuster besteht dementsprechend auf Stammhirnebene aus einigen wenigen efferenten Zellkörpern in räumlicher Nähe zu den Fazialiskernen, die viele Haarsinneszellen, zum Teil über mehrere Modalitäten hinweg, innervieren. So werden bei Fischen Haarzellen in Innenohr und Seitenlinienorgan oft von denselben efferenten Neuronen innerviert (Fritsch 1999; Roberts und Meredith 1992).

Ursprünglich bot das efferente System wahrscheinlich die Möglichkeit zur Kontrolle der Reizempfindlichkeit der verschiedenen Haarzellorgane (des Oktavolateralissystems). Dies kann besonders gut an der schnellen Fluchtreaktion von Fischen gezeigt werden, wo eine Aktivierung der an der Fluchtreaktion maßgeblich beteiligten Mauthner Zellen zu einer Aktivierung efferenter Neurone führt. Das macht sich unter anderem in einer verminderten neuronalen Antwort auf mechanische Reize bemerkbar, wie sie zum Beispiel bei einer schnellen Eigenbewegung auftreten. Die Aktivität durch Schall

aktivierbarer Afferenzen wird bei diesem Vorgang ebenfalls messbar vermindert (Lin und Faber 1988).

Im Zuge der Evolution spezialisierter Hörorgane haben diese efferenten Zellen zunehmend komplexe Aufgaben im auditorischen System übernommen. Diese Entwicklung wird unter anderem in einer Zunahme der Zellzahl und in einer Beschränkung individueller Zellen auf eine Sinnesmodalität sichtbar. Während die Efferenzen verschiedener Haarzellorgane bei „niederen“ Landvertebraten noch innerhalb einer gemeinsamen Gruppe liegen und die Frage, ob exklusiv auditorisch efferente Zellen existieren, weitgehend unbeantwortet ist, finden sich sowohl bei den Vögeln (Übersicht in Code 1997) als auch bei den Säugetieren (Übersicht in Warr 1992) Gruppen rein auditorischer Efferenzen. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle, indem sie Mikromechanik, Reiztransformation und -verarbeitung in der Cochlea gezielt steuern (Übersicht in Guinan 1996). Einen entsprechend großen Einfluss hat dieses System auf den subjektiven Höreindruck. So konnten inzwischen einige bisher zentralnervösen Prozessen zugeschriebene Phänomene mit der Aktivität auditorischer Efferenzen in der Peripherie des Hörsystems korreliert werden (Smith et al. 1999).

Während sich Vögel und Säuger seit etwa 320 Millionen Jahren voneinander unabhängig entwickeln, wurde das Hören von Luftschall in nennenswertem Umfang und damit die Evolution spezialisierter Hörepithelien und der entsprechenden neuronalen Strukturen erst durch das Aufkommen tympanischer Mittelohren vor etwa 250 Millionen Jahren ermöglicht (Manley und Köppl 1998).

Vögel und Säuger haben in der darauffolgenden Zeit für die grundsätzlichen Probleme im Zusammenhang mit der Schallwahrnehmung in vielen Fällen unabhängig voneinander zu ähnlichen Lösungen gefunden. So entwickelten beide Gruppen im Zuge einer Arbeitsteilung zwischen reizverstärkenden/modifizierenden und reizweiterleitenden Zellen spezialisierte Haarzellen mit vorwiegend, im Fall der Vögel sogar ausschließlich, efferenter Innervation: die äußeren Haarzellen der Säuger bzw. die kurzen Haarzellen der Vögel (Manley und Köppl 1998).

Während über das efferente System der Säugetiere eine Vielzahl zum Teil recht detaillierter Arbeiten publiziert sind (für eine Übersicht siehe Guinan 1996; Warr 1992), ist unser Wissen über das efferente System der Vögel bisher vergleichsweise gering.

In dem Hörepithel der Vögel, der Papilla basilaris, können zwei unterschiedliche Typen efferenter Axone unterschieden werden: dünne unmyelinisierte und dicke myelinisierte (Fischer et al. 1994). Während die dünnen Fasern sich vor allem über dem neuralen Limbus verzweigen, wo sie Kontakt zu den langen Haarzellen aufnehmen, ziehen die dicken Fasern über die gesamte Breite der Papilla basilaris, an deren abneuraler (dem Nerv abgewandten) Seite sie sich verzweigen, um kurze Haarzellen und hyaline Zellen zu kontaktieren (Keppler et al. 1994; Zidanic und Fuchs 1996). Entlang der Papilla nimmt die Anzahl efferenter Fasern von apikal (tieffrequent) nach basal (hochfrequent) deutlich zu, erreicht etwa in der Mitte des basalen Drittels ihr Maximum, um dann wieder deutlich abzunehmen (Zidanic 2002). Individuelle Fasern kontaktieren, von wenigen Ausnahmen abgesehen, dabei jeweils nur einen eng begrenzten Bereich der Papilla basilaris (Keppler et al. 1994) und bleiben damit auf ein Frequenzband beschränkt. Die Morphologie efferenter Synapsen in der Vogelpapilla wurde bereits vor mehr als dreißig Jahren von (Takasaka und Smith 1971) sowie etwas später von Tanaka und Smith (1978) beschrieben. Demnach finden sich an den langen Haarzellen kleine knopfförmige und an den kurzen Haarzellen große tassen- bzw. klauenförmige Synapsen. Der Übergang zwischen den beiden Typen ist, ebenso wie der Übergang in der Form der Haarzellen, fließend.

Der an diesen Synapsen ausgeschüttete Transmitter ist Acetylcholin (Übersicht in: Code 1997), weitere Transmitter beziehungsweise Cofaktoren konnten, anders als bei den Säugetieren, bisher nicht nachgewiesen werden (Code 1996; Code und Carr 1995; Code et al. 1996; Zidanic und Fuchs 1996). Eine Acetylcholinausschüttung an den efferenten Synapsen führt über einen nikotinischen Rezeptor zur Öffnung kalziumaktivierter Kaliumkanäle und damit zu einer Hyperpolarisation der Zelle (Fuchs und Murrow 1992; Fuchs und Murrow 1992). Auf der Ebene des Hörnervs führt dies zu einer Reduktion der Reizantwort, sowie zu einer Erhöhung der Antwortschwellen (Desmedt und Delwaide 1963; Desmedt und Delwaide 1965).

Die Zellkörper der efferenten Zellen sind in einer dorsalen und einer ventralen Gruppe entlang des Trakts des Abducensnerven im Stammhirn angeordnet (Cole und Gummer 1990; Schwarz et al. 1992; Strutz 1981; Strutz und Schmidt 1982; Whitehead und Morest 1981). Diese Anatomie ist auf Abbildung 2, Seite 32, anhand von Daten, die im Laufe der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden, exemplarisch dargestellt.

## 1.2 Motivation für die vorliegende Arbeit

Wie unter 1.1 dargelegt, hat sich im Laufe der Evolution das auditorisch – efferente System der Vögel unabhängig von dem der Säugetiere entwickelt. In den Hörepithelien beider Gruppen sind unabhängig voneinander jeweils zwei einander analoge Typen von Haarsinneszellen mit einer unterschiedlichen Spezialisierung und Innervation entstanden (Manley und Köppl 1998). Die Betrachtung des auditorisch efferenten Systems der Vögel (Code 1997) und desjenigen der Säugetiere (Guinan 1996; Warr 1992) legt nahe, dass diese Systeme ebenfalls unabhängig voneinander ähnliche Funktionen übernommen und dabei ähnliche Mechanismen entwickelt haben. Ein direkter Vergleich zwischen dem auditorisch efferenten System der Säuger und dem der Vögel kann demnach einen wichtigen Beitrag zum Verständnis auditorisch efferenter Systeme leisten.

Die bisherigen Arbeiten zum efferenten System der Vögel wurden zum größten Teil an in Bezug auf das auditorische System nicht spezialisierten Tieren wie dem Huhn durchgeführt. Die bisher vorgestellten Daten zur Lage efferenter Zellkörper im Stammhirn stammen ausschließlich vom Huhn.

Dieser Punkt ist besonders kritisch, da sich am Ende des cochleären Ganges aller Nicht – Säugetiere ein Vestibularorgan, die Macula lagena, befindet. Aufgrund dieser Besonderheit führt eine Tracerinjektion in den cochleären Gang, wie sie zur Markierung cochleär efferenter Zellkörper im Stammhirn vorgenommen wird (vergleiche 2.2, Seite 11) immer zu einer Markierung sowohl auditorischer als auch vestibulärer Efferenzen. Dieser Punkt, sowie Möglichkeiten zur Unterscheidung zwischen auditorischen und vestibulären Efferenzen werden unter 4.2, ab Seite 73, ausführlich diskutiert. Da die Macula lagena beim Huhn deutlich stärker ausgeprägt ist (Köppl et al. 2000) und von wesentlich mehr Efferenzen versorgt wird (Köppl 2001) als dies bei anderen Vögeln der Fall ist, fällt die Interpretation der Versuchsergebnisse hier besonders schwer. Hinzu kommt die Tatsache, dass beim Huhn von einer efferenten Faser durchschnittlich 92 Haarsinneszellen versorgt werden, während diese Zahl bei anderen Vögeln (Schleiereule 15; Emu 34) deutlich niedriger liegt (Köppl 2001). Dies mag als Hinweis darauf gedeutet werden, dass das cochleär efferente System des Huhns möglicherweise nicht oder nur begrenzt repräsentativ für die allgemeine Situation bei Vögeln ist.



Die Schleiereule ist als Beutegreifer in besonderem Maße von der Leistungsfähigkeit ihres auditorischen Systems abhängig. So hat sie einen besonders weiten Hörbereich, der vor allem hohe Frequenzen umfasst, die von anderen Vögeln nicht mehr wahrgenommen werden können (Köppl 1997). Da die Dichte der efferenten Innervation in den hochfrequenten Bereichen der Papilla basilaris generell besonders hoch ist (Köppl 2001; Zidanic 2002), sollte sich ihre Funktion hier besonders gut untersuchen lassen.

Bei den Säugetieren wurde die Physiologie auditorischer Efferenzen zum Teil beschrieben, indem die Efferenzen durch die Präsentation eines Schalls an einem Ohr aktiviert und die Effekte dieser Stimulation am gegenüberliegenden Ohr erfasst wurden (Übersicht in Guinan 1996). Da bei den Vögeln beide Ohren durch den interauralen Kanal miteinander verbunden sind, führt eine Beschallung des einen Ohrs in der Regel auch zu einer Reizung des gegenüberliegenden Ohres (Crosstalk), was die Interpretation derartiger Experimente am Vogel stark erschwert. Dieser Crosstalk tritt vor allem bei niedrigen Frequenzen und kleinen Kopfgrößen auf. Die Dämpfung des durch den interauralen Kanal übertragenen Schalls beträgt bei den meisten Vögeln selbst bei hohen Frequenzen maximal 20 dB (Klump und Larsen 1992; Lewald 1990). Bei der Schleiereule mit ihrem guten Hörvermögen bei hohen Frequenzen und dem vergleichbar großen Abstand zwischen beiden Ohren wurde bei Frequenzen von mehr als 4 kHz eine Dämpfung von 40 dB und mehr gemessen (Moiseff und Konishi 1981). Das macht die Schleiereule für zukünftige physiologische Experimente am efferenten System besonders interessant.

Eine Spezialisierung der Schleiereule besteht in der sogenannten auditorischen Foeva, einer massiven Überrepräsentation hoher Frequenzen sowohl in Bezug auf den Raum, den diese auf dem Hörepithel einnehmen, als auch in Bezug auf die Dichte der afferenten und efferenten Innervation dieser Bereiche (Köppl 2001; Köppl et al. 1993; Köppl et al. 2000). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, in wie weit hier eine über die bloße Dichte der Innervation hinausgehende Spezialisierung des efferenten Systems vorliegt, die die Schleiereule zu einem geeigneten Modell für das Verständnis des auditorisch efferenten Systems machen könnte.

Die Betrachtung eines ausgesprochenen Hörspezialisten kann somit helfen, neue Einsichten in Struktur und Funktion des efferenten Systems nicht nur der Vögel zu gewinnen.

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Eine genaue Kenntnis der Anatomie eines neuronalen Systems ist in der Regel eine unabdingbare Voraussetzung für die Planung und Interpretation physiologischer Experimente, sowie für das Verständnis seiner Funktion.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in erster Linie darin, Lage und Anzahl cochleärer Efferenzen im Stammhirn der Schleiereule so zu beschreiben, dass sie zum Beispiel während eines elektrophysiologischen Experiments sicher aufgefunden werden können. Neben dieser allgemeinen Aufgabenstellung wurden folgende Fragen gesondert betrachtet:

1.) Wie auf Seite 67 ausführlich beschrieben, führt eine Injektion von Markierungssubstanzen, wie sie zum Nachweis cochleär efferenter Zellen im Stammhirn verwendet werden, beim Vogel immer auch zu einer Markierung vestibulärer Efferenzen. Gibt es eine Möglichkeit in derartigen Experimenten sicher zwischen auditorischen und vestibulären Efferenzen zu unterscheiden?

2.) Bei den Säugetieren lassen sich zwei Subpopulationen auditorischer Efferenzen unterscheiden (Warr 1992). Die Anatomie der auditorischen Efferenzen in der Papilla basilaris der Vögel legt den Schluss nahe, dass beim Vogel ebenfalls zwei unterschiedliche Subpopulationen existieren (Code 1997). Lassen sich unter den auditorisch efferenten Zellkörpern im Stammhirn der Schleiereule entsprechend unterscheidbare Zelltypen nachweisen?

3.) Innerhalb der auditorischen Efferenzen der Säuger gibt es eine kleine Anzahl von Zellen, die nicht nur ein, sondern beide Ohren kontaktieren (Warr 1992). Die Existenz derartiger Zellen beim Vogel war zu Beginn dieser Arbeit umstritten, siehe 4.5, Seite 86. Finden sich solche bilateral projizierenden auditorischen Efferenzen im Stammhirn der Schleiereule ?

## 2 Methoden

### 2.1 Tierhaltung und Zucht

Die für diese Arbeit verwendeten Hühnerküken stammen von einem kommerziellen Züchter (Brütereier Hölzl, Moosburg), von wo sie einen Tag nach dem Schlupf abgeholt wurden. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Hühner in mit Wärmelampen beheizten Käfigen mit ausreichend Auslauf und Sitzstangen gehalten. Wasser sowie eine Futtermischung aus Haferflocken und in der Landwirtschaft gebräuchlichem Hühnerfutter standen unbegrenzt zur Verfügung.

Die Versuche wurden an Küken im Alter zwischen 3 und 75 Tagen nach dem Schlupf durchgeführt.

Die Schleiereulen für die hier vorgestellten Versuche stammen teils aus einer eigenen, am Lehrstuhl für Zoologie etablierten Zucht und teils aus der Schleiereulenzucht des Instituts für Zoologie an der Rheinisch-Westfälischen-Technischen-Hochschule Aachen. Diese Tiere wurden freundlicherweise vom Direktor des Institutes, Herrn Professor Dr. H. Wagner, zur Verfügung gestellt. Bei den in Garching gezüchteten Schleiereulen handelt es sich um die europäische Rasse *Tyto alba gutatta*, die aus Aachen übernommenen Tiere gehören der nordamerikanischen Rasse *Tyto alba alba* an.

Alle Schleiereulen wurden in Garching in artgerecht ausgestatteten Volieren mit einem wettergeschützten Innen- und einem Freiluftbereich gehalten. Den Tieren wurden an 6 Tagen in der Woche tote Mäuse angeboten, wobei die Menge ständig dem Bedarf der Tiere angepasst wurde.

Für die hier vorgestellten Versuche wurden ausschließlich erwachsene Tiere im Alter von mehr als 6 Monaten verwendet.

## 2.2 Tracerapplikation

Um efferente Zellkörper sichtbar zu machen, wurden den Vögeln spezielle Marker (Tracer) in den cochleären Gang injiziert. Diese wurden von efferenten Neuronen des Höreithels aufgenommen und aktiv entlang der Axone bis zu den Zellkörpern dieser Neurone im Hirnstamm transportiert, wo sie mit den unter 2.3 beschriebenen Techniken nachgewiesen wurden. Als Tracer wurden Fluorogold (FG, Fluorochrome, USA) und Cholera toxin Untereinheit B (CtB, Produktnr. 104, List Biological Laboratories, USA) verwendet. Beide Tracer ließen sich fünf bis acht Tage nach der Applikation gut in den cochleär efferenten Zellen im Stammhirn nachweisen.

Artspezifische Unterschiede zwischen Schleiereule und Huhn in der Anatomie der Mittelohrhöhle und der relativen Lage des runden Fensters erzwangen einen jeweils anderen Zugang zum cochleären Gang. So konnte die bei der Schleiereule angewandte, schonendere Operationsmethode beim Huhn nicht durchgeführt werden. Der bei der Schleiereule gewählte Weg zum runden Fenster von einer Position hinter dem Gehörgang konnte beim Huhn nicht beschriftet werden, da in diesem Fall die Neigung des runden Fensters nach frontal den Zugang unmöglich macht.

Von den in dieser Arbeit aufgeführten Tieren erhielten vier Schleiereulen Injektionen eines Tracers in ein Ohr. Bei drei Hühnern und fünf Schleiereulen wurde Cholera toxin B in den rechten und Fluorogold in den linken cochleären Gang injiziert.

Zur Etablierung der Methode wurden insgesamt 61 Vorversuche mit unterschiedlichen Tracern und Operationstechniken an Hühnern durchgeführt. Die Operation nahm bei beiden Arten im Normalfall zwischen 30 und 50 Minuten pro Ohr in Anspruch.

Alle Operationen wurden in Vollnarkose unter einem Operationsmikroskop (OPMI 1-P, Zeiss, Jena) bei wechselnden Vergrößerungen von 6,2 bis 25fach durchgeführt. Um ein präzises Arbeiten zu erleichtern, wurde der Kopf der Tiere für die Dauer der Operation in einem für diesen Zweck angepassten Kopfhalter aus Styropor fixiert. Bei der Schleiereule dienten zwei in die Gehörgänge eingeführte, mit Kautschuk überzogene Metallstangen der zusätzlichen Stabilisierung.

### 2.2.1 Narkose:

Um den Speichelfluss unter der Narkose zu reduzieren, erhielten die Hühner 5 Minuten vor Beginn der Narkose eine subkutane Injektion von 0,65 mg Atropinsulfat (Atropinum Sulfuricum 0,5 mg, Eifelfango Chem-Pharm Werke, Bad Neuenahr-Ahrweiler) pro Kilogramm Körpergewicht (kgKG). Bei den Schleiereulen war eine derartige Vorbereitung nicht notwendig.

Zur Einleitung der Narkose wurde den Hühnern 3 mg/kgKG Xylazin (Rompun, Bayer AG) sowie 5 Minuten später 20 mg/kgKG Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Pharmacia & Upjon, Erlangen) intramuskulär injiziert. Den Schleiereulen wurden zur Einleitung 10 mg/kgKG Ketamin und 3 mg/kgKG Xylazin ebenfalls intramuskulär und in der gleichen Abfolge gegeben.

Diese Initialdosis führte bei beiden Arten innerhalb von 5 bis 10 Minuten nach der Ketamingabe zu einer für die Operation ausreichenden Narkosetiefe. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während längerer Operationen wurden nach Bedarf, in der Regel alle 30 bis 50 Minuten, weitere Ketamin/Xylazin Injektionen mit der oben beschriebenen Dosierung verabreicht.

Vor Beginn der Operation wurde jeweils eine Nadelelektrode unter die Haut des linken Flügels sowie des rechten Oberschenkels gelegt, um während der gesamten Operation die Herztätigkeit über ein Elektrokardiogramm zu überwachen. Die Atmung wurde per Augenschein kontrolliert, die Körpertemperatur über einen in die Kloake eingeführten Temperatursensor und eine thermoregulierte Heizdecke beim Huhn konstant bei 40°C, bei der Schleiereule konstant bei 39°C gehalten.

Mit dem Ziel die Belastung der Tiere zu minimieren, wurden die Schleiereulen sofort nach der Operation in ihre jeweiligen Volieren zurückgebracht. Um zu verhindern, dass die von der Narkose benommenen Tiere sich bei eventuellen Flugversuchen verletzen, wurden sie in Tonröhren gelegt, aus denen sie sich erst in wachem Zustand wieder befreien konnten.

Die Hühner wurden zum Schutz vor Übergriffen durch Artgenossen während ihrer Aufwachphase separat gehalten und erst nach Abklingen der Narkose, in der Regel zwei

bis drei Stunden nach der letzten Narkotikainjektion, in den gemeinsamen Käfig zurückgesetzt.

### 2.2.2 Operation

#### Hühner

Der Zugang zum Innenohr erfolgte bei den Hühnern durch den Gehörgang. Hierzu wurde das Trommelfell von der Wandung des Gehörgangs abgelöst und das Gehörknöchelchen, die Columella, exponiert. Anschließend wurde die Columella dicht über der das ovale Fenster verschließenden Fußplatte durchtrennt und der an der Columella ansetzende Mittelohrmuskel an seiner Basis abgeschnitten. Das Trommelfell mit dem äußeren Teil der Columella sowie dem Mittelohrmuskel wurden herausgenommen, während die Fußplatte auf dem ovalen Fenster verblieb. Durch die auf diese Weise exponierte Membran des runden Fensters wurde mit Hilfe eines entsprechend angepassten Mikromanipulators eine dünne Glaskanüle gestochen, um mit Hilfe eines Nanoliter-Injektors (UMP2-A, WPI, USA) die jeweiligen Tracersubstanzen in die Scala tympani zu injizieren.

Pro Ohr wurden 3  $\mu$ l 1% Cholera toxin Untereinheit B in 0,2 M Natriumphosphatpuffer (CtB, Produktnr. 104, List Biological Laboratories, USA) beziehungsweise 2  $\mu$ l 5% Fluorogold (FG, Fluorochrome, USA) in destilliertem Wasser mit einer Geschwindigkeit von etwa 1  $\mu$ l/min appliziert. Nach der Injektion verblieb die Kanüle weitere 2 bis 3 Minuten in der Einstichstelle, um einen Druckausgleich im Lymphgang abzuwarten und so einem Austreten der Tracerlösung durch die Einstichstelle entgegenzuwirken.

Nach Entfernung der Kanüle wurde die Einstichstelle in der Membran des runden Fensters mit einem etwa 1 mal 1,5 mm großen Plättchen Haushaltsgelatine (Dr.A.Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld) abgedeckt. Bei der hohen Körpertemperatur des Vogels schmolz die Gelatine und dichtete das Innenohr innerhalb kurzer Zeit gegen das Mittelohr ab.

Um Blutungen vorzubeugen wurde der Gehörgang mit einem Gelatineschwämmchen (Gelastyp D1/2, Hoechst AG, Frankfurt/Main) verschlossen. Nach Abschluss der Operation wurden die Wunden jeweils mit einem leichten Lokalanästhetikum (Lidocainhydrochlorid Salbe, 5%) behandelt.

## Schleiereulen

Bei den Schleiereulen wurde die Haut rund 5 mm kaudal des Gehörgangs und etwa 7 mm lateral der Mittellinie auf einer Länge von circa 15 mm eingeschnitten und die Nackenmuskulatur freigelegt. Die Nackenmuskulatur wurde mit zwei stumpfen Pinzetten entlang der Muskelfasern auseinandergedrängt, um Zugang zum Schädelknochen zu erhalten. Die Wunde wurde mit zwei jeweils durch Haut und Muskel geführten und seitlich am Kopfhalter befestigten Fäden offen gehalten. Anschließend wurde in das Os squamosum ein Loch von etwa 3 bis 4 mm Durchmesser geschnitten, durch das die Mittelohrhöhle sowie die Membran des runden Fensters zugänglich wurden. Die Injektion des Tracers erfolgte wie für die Hühner beschrieben. Um dem größeren Volumen des Perilymphraumes der Schleiereule Rechnung zu tragen, wurden hier 3  $\mu$ l FG beziehungsweise 5  $\mu$ l CtB injiziert.

Anschließend wurde die Einstichstelle im runden Fenster, wie für das Huhn beschrieben, mit Gelatine (Dr.A.Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld) abgedichtet und die Öffnung im Schädelknochen zur Förderung der Wundheilung mit einem Gelatineschwämmchen (Gelastyp D1/2, Hoechst AG, Frankfurt/Main) verschlossen. Nach Entfernung der Fäden zur Wundspreizung kehrten die Muskeln in ihre ursprüngliche Position zurück. Der Hautschnitt wurde mit drei bis vier Stichen genäht. Zur Schmerzbekämpfung wurden die Wunden nach Abschluss der Operation jeweils mit einem leichten Lokalanästhetikum (Lidocain-hydrochlorid Salbe, 5%) behandelt.

## 2.3 Erstellung der Präparate

Fünf bis acht Tage nach der Tracerinjektion wurden die Tiere getötet und perfusionsfixiert. Das Gehirn wurde zur Untersuchung entnommen und für die histologische Auswertung aufbereitet.

### 2.3.1 Perfusion

Für die Perfusion erhielten die Tiere eine tödliche Dosis Natriumpentobarbiturat (Nembutal, Sanofi, Ceva) intramuskulär. Eine Dosierung von 160 mg/kgKG führte in der Regel zu sofortiger Bewusstlosigkeit sowie nach etwa 10 Minuten zum Atemstillstand. Nach Eintritt des Atemstillstands wurde der Brustkorb mit einem langen Schnitt durch Brust- und Schlüsselbein eröffnet und der nun gut zugängliche Herzbeutel zügig aufgetrennt. Eine starke Perfusionskanüle wurde in die den Körperkreislauf versorgende linke Herzkammer eingeführt und mit Hilfe einer Arterienklemme in ihrer Position fixiert. Um ein Abfließen von Blut und Perfusionslösungen zu ermöglichen, wurde der rechte Vorhof, in dem sich das aus dem Körperkreislauf zurückfließende Blut sammelt, mit einem Skalpell aufgestochen. Zunächst wurde das Blut mit einer auf rund 40°C erwärmten 0,9 %igen Kochsalzlösung, angereichert mit 1000 Internationalen Einheiten (IE) Heparin (Heparin, Braun Melsungen AG, Melsungen) pro 100 ml aus dem Kreislauf ausgespült. Hierzu waren beim Huhn durchschnittlich 60 ml, bei der Schleiereule in der Regel 100 ml Lösung erforderlich. Die Fixierung erfolgte bei Raumtemperatur durch jeweils 500 ml einer 4 %igen Paraformaldehyd (PFA, Produkt Nummer 76240, Fluka Chemie GmbH, Steinheim) - Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,4 über einen Zeitraum von rund zwei Stunden. Nach Abschluss der Fixierung wurde die PFA-Lösung mit circa 250 ml 0,1 M Phosphatpuffer ausgewaschen und das Gehirn, die Mittelohrknochen und das Hörepithel für weiterführende Untersuchungen entnommen. Die vorliegenden Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen am Stammhirn. Die übrigen Organe wurden zum Teil an andere Arbeitsgruppen im In- und Ausland weitergeleitet.



### 2.3.2 Organentnahme

Um das Gehirn entnehmen zu können, wurde bei beiden Arten zunächst die Mittelohrhöhle weiträumig eröffnet und der knöcherne Anteil des cochleären Ganges sowie Teile des knöchernen Labyrinthes vorsichtig abgetragen. Nachdem der Knochen entfernt und die Nerven freipräpariert waren, konnten das Tegmentum vasculosum von dem Höreithel abgehoben, der Hörnerv sowie die zu den verschiedenen Vestibularorganen des Innenohrs ziehenden Nerven durchtrennt und die Knorpelspange (Limbus) der Cochlea mit Papilla und Lagena basilaris entnommen werden. Alle weitere Hirnnerven und das Rückenmark wurden ebenfalls durchtrennt.

Anschließend wurde die Schädelkapsel über Klein- und Vorderhirn mit einer spitzen Schere aufgetrennt, so dass das Gehirn frei lag. Wurde der Schädel jetzt nach dorsal gedreht, hing das Gehirn, lediglich von den Sehnerven gehalten, locker in der Schädelkapsel. Die Sehnerven wurden nun durchtrennt und das Gehirn in einer Schale mit Phosphatpuffer aufgefangen.

Um das Stammhirn zu isolieren, wurde zunächst das Vorderhirn direkt rostral der Sehnervenkreuzung senkrecht zur rostrokaudalen Achse des Stammhirns abgetrennt und anschließend das Kleinhirn vom Stammhirn abgehoben beziehungsweise in seinem rostralen Bereich abgeschnitten. Die dadurch entstandene Schnittkante ist auf den Abbildungen 2 bis 4, Seite 32 ff, gut zu erkennen. Anschließend wurden die Hirnhäute entfernt, um die weitere Behandlung, im besonderen das Eindringen der Zuckerlösung, bei der folgenden Inkubation zu erleichtern.

### 2.3.3 Schneiden

Für die mikroskopische Auswertung wurden von den Stammhirnen auf einem Gefriermikrotom (Kryostat 1720, Leitz Wetzlar) ohne vorherige Einbettung jeweils 50 µm dicke Querschnitte angefertigt. Um Gefrierartefakte zu vermeiden, wurden die herauspräparierten Stammhirne für drei Tage bei 4°C in einer 30 %igen Saccaroselösung in 0,1 M Phosphatpuffer vorinkubiert. Nach Abschluss der Inkubationsphase wurde die rechte Seite des Stammhirns auf Höhe der cochleären Kerngebiete mit einer Kanüle durchstoßen. Diese Markierung diente der eindeutigen Orientierung der fertig behandelten Schnitte. Anschließend wurde das Stammhirn mit der Schnittfläche rostral des optischen Chiasmus (siehe 2.3.2) auf einen auf circa -20° C vorgekühlten

Objekthalter aufgefroren und in gefrorenem Kohlendioxid durchgefroren. Die Schnitte wurden bei einer Präparattemperatur von  $-20$  bis  $-30$  °C mit warmem (Raumtemperatur) Stahlmesser angefertigt. Die Schnittebene lag senkrecht zur Längsachse des Stammhirns und parallel zur Ebene der Hörnerven. Dies entspricht der Schnittebene, wie sie in dem zur Identifizierung einzelner Strukturen im Stammhirn herangezogenen Hirnatlas des Huhns (Kuenzel und Masson 1988) verwendet wurde. Die Schnitte wurden mit einem weichen Pinsel aufgefangen und zur weiteren Verarbeitung in der anatomisch korrekten Reihenfolge in 0,1 M Phosphatpuffer gesammelt.

#### 2.3.4 Tracer-Nachweis

In den meisten Präparaten wurde die Eigenfluoreszenz von Fluorogold (FG) genutzt, um diesen Tracer direkt nachzuweisen. Die hierzu verwendete Methode ist unter 2.4.1, Seite 22, beschrieben. Leider ist die direkte Fluoreszenz nicht geeignet, um die genaue Morphologie einzelner FG-markierter Zellen zu erfassen. Aus diesem Grund wurde Fluorogold bei einer Schleiereule indirekt über einen photostabilen Diaminobenzidin (DAB)-Nachweis dokumentiert.

Choleratoxin B (CtB) ist im mikroskopischen Bild nicht direkt sichtbar und wurde bei den hier vorgestellten Experimenten jeweils über einen antikörpervermittelten Fluoreszenznachweis detektiert. Durch die Kombination beider Fluoreszenznachweise konnten beide Tracer unabhängig voneinander in demselben Tier nachgewiesen werden. Alle Nachweise wurden an freischwimmenden Schnitten in für diesen Zweck modifizierten Lochplatten durchgeführt. Da die FG-Fluoreszenz unter Beleuchtung schnell ausbleicht, wurden die Präparate bei diesen Versuchen während aller Arbeitsschritte vor Licht geschützt.

#### Choleratoxin B -Nachweis

Nach dem Schneiden wurde zunächst der als Frostschutzmittel zugegebene Zucker durch fünfmaliges Waschen in 0,1 M Phosphatpuffer (PP) entfernt. Anschließend wurden die Schnitte für drei Stunden in 0,1 M PP mit 5% Eselserum (SE 30, Chemicon Int. Inc. Temecula, USA) und 1% t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton x-100, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PP wurden die Schnitte drei Tage bei 4°C mit einem Antikörper gegen

CtB (goat-anti-choleraagenoid, List Laboratories, Großbritannien) in einer Verdünnung von 1:20000 in der Vorinkubationslösung behandelt. Überschüssige Antikörper wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen mit 0,1 M PP bei Raumtemperatur entfernt. Der nun an das CtB gebundene primäre Antikörper wurde mit Hilfe eines sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers sichtbar gemacht. Dazu wurden die Schnitte weitere zwei Stunden mit dem Antikörper Alexa-Fluor 546 donkey-anti-goat (a-1105, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einer Verdünnung von 1:2000 in 0,1M PP bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen von ungebundenem Antikörper befreit.

#### Fluorogold –Nachweis

Nach dem Schneiden wurde zunächst der als Frostschutzmittel zugegebene Zucker durch gründliches Waschen in 0,1 M Phosphatpuffer (PP) entfernt. Anschließend wurden die Schnitte durch eine dreistündige Vorinkubation in 0,1 M PP mit 5% Ziegen Serum (S26, Chemicon Int. Inc. Temecula, USA) und 0,2% Triton X-100 (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) bei Raumtemperatur für den eigentlichen Nachweis vorbereitet. Nach einem weiteren Waschschriff in PP wurden die Schnitte drei Tage bei 4°C mit einem Antikörper gegen FG (Rabbit-anti-goat, Chemicon Int. Inc. Temecula, USA) in einer Verdünnung von 1:20000 in der Vorinkubationslösung behandelt. Überschüssige Antikörper wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen mit 0,1 M PP bei Raumtemperatur entfernt. Danach wurden die Schnitte weitere zwei Stunden in einer Verdünnung von 1:1000 des sekundären Antikörpers (Biotin-Goat-antiRabbit, Zymed, Berlin) in 0,1 M PP bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen in PP von ungebundenem sekundärem Antikörper befreit. Die Biotin-Markierung des zweiten Antikörpers wurde über eine Avidin-Biotin-Koppelung nachgewiesen. Für diesen Nachweis wurden die Schnitte eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit einer Lösung kommerziell erhältlichen peroxidase markierten Avidins (Vectastain ABC-Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim; Verdünnung 1:100 in PP) behandelt. Überschüssiges Reagenz wurde wieder durch mehrere Waschschriffe in 0,1 M PP beseitigt. Anschließend wurden die Schnitte zur Intensivierung der Färbung in Trispuffer (TP, Trizma Base, Tris[hydroxymethyl]aminomethan, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt und für eine Stunde mit einer Lösung von 5,26 g NiSO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> und

2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Fluka Chemie, Steinheim) in 200 ml 0,1 M Trispuffer vorbehandelt. Nach mehreren Waschschritten erst in 0,1 M TP und anschließend in 0,1 M PP wurden die Schnitte für 20 Minuten in 0,05% Diaminobenzidin (DAB, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 1% DMSO in 0,1 M PP inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet. Nachdem die Färbung eine zufriedenstellende Intensität erreicht hatte, wurde die Reaktion durch mehrmaliges gründliches Waschen in 0,1 M PP beendet.

#### 2.3.5 Aufziehen und Eindeckeln

Nach Abschluss der Nachweisreaktionen wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, wo sie bei Raumtemperatur über Nacht trockneten. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 30 Sekunden in 70, 95 und zweimal für ebenfalls 30 Sekunden in 100 %igem Ethanol) entwässert und anschließend zweimal für jeweils mindestens fünf Minuten in Xylol inkubiert. Die so vorbereiteten Schnitte wurden mit einem Polystyrol-Einbettmedium (DPX, Fluka Chemie GmbH, Steinheim) eingedeckelt. Das Einbettmedium war nach zwei bis drei Tagen soweit ausgehärtet, dass die Präparate mikroskopisch ausgewertet werden konnten.

#### 2.3.6 Kresylviolett-färbung

Da ein wesentliches Ziel dieser Arbeit darin bestand, die Lage einzelner efferenter Zellkörper relativ zu bekannten Kerngebieten im Stammhirn zu beschreiben und diese Kerngebiete in den hier beschriebenen Fluoreszenzpräparaten nicht befriedigend dargestellt werden konnten, wurde die folgende Technik eingesetzt, um derartige Strukturen in den Schnitten sichtbar zu machen. Nach der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Präparate (siehe 2.4.1, Seite 22) wurden die Objektträger mit den einzelnen Schnitten für mehrere Tage aufrecht in Xylol gestellt, bis das Einbettmedium aufgelöst und das Deckglas abgefallen war. Um letzte Reste des Einbettmediums zu entfernen, folgten drei jeweils 30-minütige Waschschriffe in Xylol. Anschließend wurden die Schnitte rehydriert und zwar für zwei Minuten in 100 %igem Ethanol, gefolgt von jeweils 30 Sekunden in 95- und 70 %igem Ethanol sowie dreimal 30 Sekunden in

destilliertem Wasser. Die so vorbereiteten Schnitte wurden nun leicht bewegt mit Kresylviolett (0,5% Kresylviolett in Essigsäure 0,085 M/L plus Na-Acetat 0,015 M/L) behandelt. Die optimale Dauer der Kresylviolettfärbung wurde jeweils vor Behandlung der die cochleären Efferenzen enthaltenden Schnitte an einigen außerhalb dieses Bereichs liegenden Schnitten der gleichen Serie ermittelt. Eine Kresylviolettbehandlung von etwa fünf Minuten erwies sich dabei in der Regel als optimal. Zur Differenzierung der Färbung wurden die Schnitte anschließend für 15 Sekunden mit 95%igem, mit etwas Eisessig versetzten Ethanol behandelt, bevor sie wie unter 2.3.5 beschrieben erneut entwässert und eingedeckelt wurden.

## **2.4 Mikroskopische Auswertung**

Zur Dokumentation der hier vorgestellten Präparate wurde im Wesentlichen ein mit einer analogen Foto- und einer digitalen Videokamera sowie mit einem speziell angefertigten Messsystem zur Erfassung der genauen Zellpositionen ausgerüstetes Epifluoreszenzmikroskop (Diaphot TDM-EF, Nikon GmbH, Düsseldorf) eingesetzt. Als Lichtquelle diente dabei eine Quecksilberdampflampe (Omron H7ET, Nikon GmbH, Düsseldorf). Die halbautomatische Erfassung der Zellpositionen in individuellen Schnitten erfolgte über ein für diesen Zweck in Qbasic geschriebenes Computerprogramm. Übersichtszeichnungen von einzelnen Schnitten wurden an einer mit Zeichenspiegel ausgerüsteten Stereolupe (Wild M10, Leica, Heerburg, Schweiz), Zeichnungen von individuellen Zellen an einem ebenfalls mit Zeichenspiegel ausgestatteten Durchlichtmikroskop (Dialux 20, Leitz, Wetzlar) angefertigt. Die quantitative Auswertung der im Lauf der Untersuchungen gewonnenen Bilder wurde rechnergestützt mit einem kommerziell erhältlichen Programm zur Bildanalyse (AnalySIS, Soft Imaging Software GmbH, Münster) vorgenommen.

Es wurden alle Schnitte in dem Bereich von 1 mm kaudal bis 2 mm rostral des kaudalen Abschnitts des Hörnervs systematisch ausgewertet. In den Fällen, in denen in den Schnitten am Ende dieses Bereiches markierte Zellen beobachtet werden konnten, wurde der systematisch untersuchte Bereich soweit ausgedehnt, dass jeweils mindestens sechs Schnitte kaudal beziehungsweise rostral der letzten markierten Zelle in den untersuchten Bereich mit einbezogen wurden. Die Zellzahlen wurden direkt im Präparat ermittelt.

Kriterien zur Unterscheidung cochleärer Efferenzen von anderen, möglicherweise unbeabsichtigt gefärbten Zellen sind unter 4.2, Seite 73ff diskutiert. Die Zuordnung einzelner Zellen, aufgrund ihrer Lage zu Subpopulationen cochleärer Efferenzen ist unter 3.1, Seite 30 ff, ausführlich beschrieben.

#### 2.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

FG wurde mit einer Wellenlänge von 360 nm angeregt, die Fluoreszenz über einen Langpassfilter von 460 nm beobachtet. Für die Darstellung der CtB-Markierung wurde ein Anregungsfilter von 546 nm und ein Emissionsfilter von 580 nm verwendet. Die Filtersets waren so gewählt, dass beide Tracer unabhängig voneinander detektiert werden konnten.

Zusätzlich zu der direkten Beobachtung wurde das mikroskopische Bild über die angeschlossene Videokamera auf einem Monitor des Bildverarbeitungssystems angezeigt. Standbilder für die Dokumentation, beziehungsweise für eine spätere Auswertung wurden, wenn nötig, an diesem System über eine Framegrabberkarte aufgezeichnet und auf der Festplatte des Messrechners gespeichert.

Um Zellen zu identifizieren, die nach einer Injektion der unterschiedlichen Tracer in jeweils ein Ohr beide Farbstoffe enthielten, das heißt mit beiden Cochleae in Verbindung standen, wurde jeweils eine Schwarzweißaufnahme des in Frage kommenden Bildausschnittes mit den beiden oben genannten Filtersets aufgenommen. Jedem dieser Bilder wurde nun ein Farbkanal zugewiesen und die einzelnen Farbkanäle zu einem neuen Bild kombiniert. Das Resultat war eine Darstellung aller markierten Zellen in dem jeweiligen Hirnareal, wobei die einzelnen Tracer aufgrund des Farbcodes voneinander unterscheidbar blieben. Beispiele für die so gewonnenen Bilder finden sich auf der Abbildung 12, Seite 61. Dieses Verfahren wurde bereits während der Datenerhebung am Mikroskop durchgeführt, wobei die optische Vergrößerung am Mikroskop jeweils so weit erhöht wurde, bis eine Kolokalisation beider Tracer in den jeweiligen Zellen mit Sicherheit bestätigt oder ausgeschlossen werden konnte.

#### 2.4.2 Erfassung der Zellpositionen

Die unspezifische Hintergrundfärbung in den Fluoreszenzpräparaten reichte nicht aus, um die Position einzelner markierter Zellen relativ zu bekannten Kerngebieten direkt zu bestimmen, beziehungsweise hinreichend genaue Zeichnungen der Präparate anzufertigen. Deshalb musste zunächst eine Methode entwickelt werden, um die Position der Zellen präzise erfassen zu können. Ziel dabei war es, die genaue Position der fluoreszenzmarkierten Zellen relativ zu identifizierbaren Strukturen des Stammhirns zu vermessen. Die Zellpositionen wurden anschließend in Zeichnungen von den zu einem späteren Zeitpunkt mit Kresylviolett gefärbten (siehe 2.3.6) Schnitten übertragen.

Um die geforderte Messgenauigkeit von weniger als 5  $\mu\text{m}$  zu erreichen, wurde auf hochpräzise Messuhren (Messuhr Modell S229, Sylvac S.A., Crissier, Schweiz) aus dem Maschinenbau zurückgegriffen. Diese wurden parallel zu den in der Fokusebene liegenden Achsen des Kreuztischs des Mikroskops montiert, so dass sie dessen Position exakt wiedergaben. Das fertig montierte Messsystem, bestehend aus den beiden Messuhren und zwei Ausgleichsgewichten, die die von den Uhren auf den Kreuztisch ausgeübte Kraft neutralisieren, ist in Abbildung 1a dargestellt. Die in dem Aufbau verwendeten Aluminiumhalter wurden in der universitätseigenen Mechanikwerkstatt von Herrn Metz hergestellt. Für die Messungen wurde ein Fadenkreuz in den Strahlengang des Mikroskops gebracht, der Objektisch so ausgerichtet, dass die zu messende Struktur genau in dem Fadenkreuz lag und die Position des Objektisches abgelesen.

Um die Messgenauigkeit zu überprüfen, wurde vor Beginn der Auswertung ein Eichobjekt (100\*0,01= 1mm, Graticules LTD, England) vermessen. Das hier vorgestellte System erlaubt es, die Position des Objektisches mit einer Genauigkeit von 1,4  $\mu\text{m}$  zu erfassen. Die Ergebnisse einer Testmessung am Eichobjekt sind ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt.

Da die in dem Aufbau verwendeten Messuhren über einen seriellen Datenausgang verfügen, lag es nahe, die Messwerterfassung zu automatisieren. Dazu wurde ein Qbasic-Programm erstellt, das auf die entsprechende Eingabe hin die aktuellen Messwerte der beiden Uhren über die seriellen Schnittstellen des Messrechners auslas und in einem für die spätere Datenanalyse mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Corporation, USA) geeigneten Format abspeicherte.

#### Abbildung 1 a)

Die Abbildung zeigt eine stark vereinfachte Skizze des Messsystems zur Erfassung der Position einzelner Zellen im fluoreszenzmikroskopischen Präparat. Ursprünglich am Mikroskop vorhandene Bauteile sind dunkelgrau schraffiert, im Laufe dieser Arbeit angebrachte Bauteile hellgrau punktiert, beziehungsweise weiß dargestellt.

Der Kreuztisch (KT) des Mikroskops besteht aus zwei übereinander montierten Platten (X und Y), die unabhängig voneinander auf jeweils einer Achse parallel zur Objektebene bewegt werden können.

An der unteren dieser beiden Platten (Y) wurde der Geräteträger (GT) fest montiert. Die in diesen Träger eingelassenen Messuhren (MU X und MU Y) vollziehen damit jede Bewegung des Kreuztisches in Y-Richtung exakt nach.

Der Fühler der parallel zu dieser Bewegungsrichtung montierten Messuhr (MU Y) ruht auf einem Widerlager (WL), und misst so die Stellung des Kreuztisches auf der mit Y bezeichneten Achse.

Die zweite Messuhr (MU X) steht rechtwinklig zu der Bewegungsrichtung des Geräteträgers (GT). Ihr Messfühler ruht auf der dem Geräteträger zugewandten Seite der oberen Platte des Kreuztisches und liefert damit Informationen über Bewegungen des Kreuztisches entlang der mit X bezeichneten Achse.

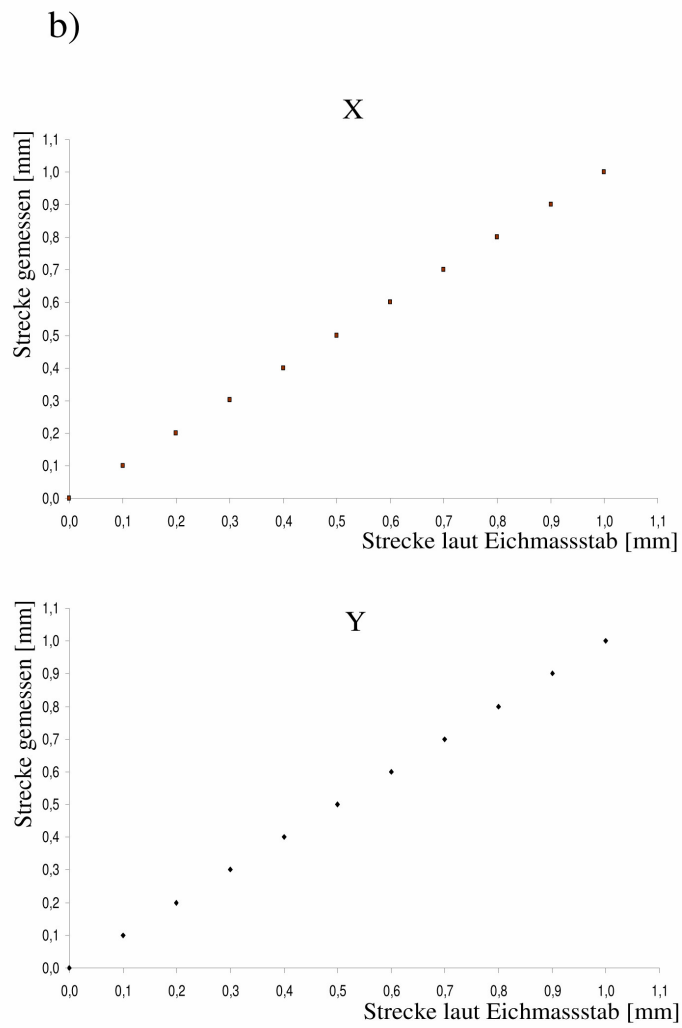
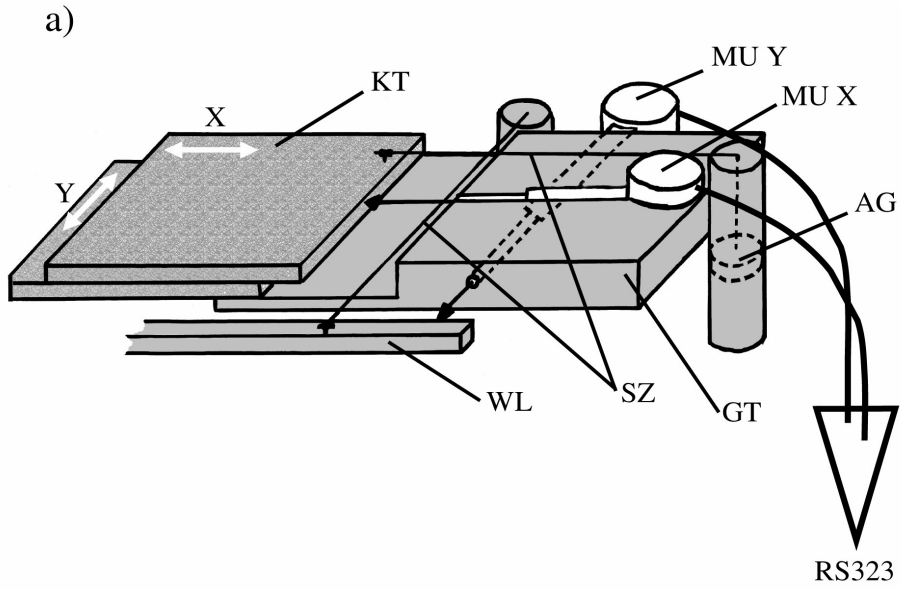
Die von den Messuhren (MU X und MU Y) erfassten Koordinaten wurden über jeweils eine serielle Schnittstelle (RS323) des Messrechners erfasst und zur späteren Auswertung auf der Festplatte gespeichert.

Um die durch die Messuhren auf das Widerlager (WL) beziehungsweise den Kreuztisch (KT) ausgeübte Kraft zu kompensieren, wurden jeweils parallel zu jeder Messuhr ein Seilzug (SZ) installiert. Die an diese Zügen befestigten Ausgleichsgewichte (AG) wurden so dimensioniert, dass die Summe aller auf den Kreuztisch wirkenden Kräfte gleich Null ist, was für die  $\mu\text{m}$  – genaue Positionierung des Präparates unerlässlich ist.

#### Abbildung 1 b)

In den Graphen ist für jeweils eine der beiden Messrichtungen die über die jeweilige Messuhr erfasste Strecke gegen die zuvor am Eichobjekt eingestellte Position des Objektisches aufgetragen. Die Kennzeichnung mit X beziehungsweise Y verweist auf die jeweilige Messuhr beziehungsweise Achse. Alle Punkte wurden mehrfach und aus verschiedenen Richtungen angefahren. Die Abweichung zwischen der am Eichobjekt eingestellten, und der über die Messuhren erfassten Strecke lag unterhalb der Anzeigegenauigkeit der Messuhren ( $1\mu\text{m}$ ). Eine Hysterese konnte nicht beobachtet werden.





Zur Messung der Zellpositionen wurde zunächst unter der mit Zeichenspiegel ausgestatteten Stereolupe eine Umrisszeichnung jeden Schnittes erstellt. Anschließend wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgerichtet und die genauen Positionen von vier in der Zeichnung festgehaltenen Referenzpunkten sowie der jeweils markierten Zellen erfasst. Zur Vereinfachung der späteren Auswertung wurde der Schnitt so ausgerichtet, dass seine Mittelachse senkrecht im Koordinatensystem der Positionserfassung stand.

Der erste Referenzpunkt lag, wie zum Beispiel in Abbildung 2, Seite 32, gezeigt, jeweils genau medial am ventralen Rand des Stammhirns, die Lage der weiteren Referenzpunkte wurde in jedem Schnitt entsprechend den anatomischen Gegebenheiten individuell festgelegt.

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Dokumentation der gesamten Schnittserie wurden die Präparate wie unter 2.3.6 beschrieben mit Kresylviolett behandelt, um Kerngebiete und Fasertrakte sichtbar zu machen. Diese wurden anschließend in die zuvor angefertigten Umrisszeichnungen eingetragen.

Zur Übertragung der Messwerte in diese Zeichnungen wurde der erste Referenzpunkt jeden Schnittes als Ursprung eines kartesischen Koordinatensystems definiert, in das alle weiteren in diesem Schnitt gemessenen Punkte relativ zu diesem Ursprung eingetragen wurden. Die grafische Darstellung dieser Punkte konnte jetzt, auf den richtigen Maßstab skaliert, auf die jeweilige Zeichnung projiziert und die zuvor vermessenen Zellen somit an der anatomisch korrekten Position eingezeichnet werden. Zur Berechnung und Ausgabe dieser maßstabsgetreuen Grafiken erstellte die Firma Picture Factory ein Programm (Coordinate to Pixel, Picture Factory, Hamburg), das für die Dauer der vorliegenden Arbeit kostenlos genutzt werden konnte.

Das Ergebnis dieser Arbeitsschritte ist beispielhaft in den Abbildungen 2 bis 4, Seite 32 ff, dargestellt.

Da dieses Verfahren erst im Laufe der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, konnten nur einige ausgewählte Präparate mit der hier beschriebenen Technik vermessen werden. Bei der Mehrzahl der Präparate konnte die Position der einzelnen Zellen lediglich subjektiv beschrieben werden (siehe 3.1, Seite 30 ff).

### 2.4.3 Erfassung der Zellformen

Um die Frage zu beantworten, ob anhand der Morphologie efferenter Zellkörper verschiedene Subtypen cochleärer Efferenzen unterschieden werden können, wurde der Tracer FG in einem Präparat mit Hilfe eines photochemisch stabilen DAB-Nachweises dargestellt (siehe 2.3.4, Seite 19). Von den so markierten Zellen wurden an einem mit Zeichenspiegel ausgestatteten Durchlichtmikroskop (Dialux 20, Leitz, Wetzlar) bei 100facher Objektivvergrößerung Zeichnungen angefertigt. Diese Zeichnungen wurden mit einem Flachbettscanner (ScanJet II CX/T, Hewlett Packard, USA) digitalisiert und anschließend mit einem Programm zur Bildanalyse (AnalySIS, Soft-Imaging Software GmbH, Münster) vermessen. Um einer Beeinflussung der Messergebnisse durch unvollständige Färbung einzelner Zellen entgegenzuwirken, wurden lediglich Zellen ausgewertet, deren Fortsätze sich über eine Strecke von mehr als der anderthalbfachen Länge des Zellkörpers verfolgen ließen. Dabei wurden Länge, Breite, Umfang und Fläche des Zellkörpers sowie Länge und Anzahl der Verzweigungen der einzelnen Fortsätze, außerdem Fläche und Umfang des von den Fortsätzen überspannten Bereichs erfasst.

### **2.5 Datenanalyse**

Aufgrund der kleinen Stichprobengröße und der Tatsache, dass eine Normalverteilung der hier vorgestellten anatomischen Daten nicht sicher vorausgesetzt werden konnte, kamen bei der Analyse dieser Daten bevorzugt nichtparametrische Testverfahren zum Einsatz. Dabei wurden die stärksten auf das jeweilige Problem anwendbaren Verfahren genutzt. Die Auswahl der Verfahren stützte sich auf ein Lehrbuch von Siegel (1987).

Für die Analyse der Zellpositionen im Stammhirn wurde zusätzlich ein parametrisches Verfahren, die Diskriminanzanalyse, eingesetzt. Die in diesem Verfahren bearbeiteten Daten wurden zuvor mit dem Shapiro Wilks Test und dem Kolmogorov Smirnov Test auf mögliche Abweichungen von der Normalverteilung untersucht.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Statistiken und Analysen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms Statgraphics plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., USA) gerechnet.

### 2.5.1 Statistische Auswertung der Zellpositionen

Aus den Abbildungen 2 bis 4, Seiten 32 bis 34, wird ersichtlich, dass im Stammhirn zwei subjektiv von einander unterscheidbare Populationen cochleärer Efferenzen dargestellt werden können: Eine ventrolateral liegende Gruppe, medial der Olive, und eine dorsomedial liegende Gruppe, ventral des Abducens-Motorkerns. Um die Frage zu klären, ob innerhalb der cochleären Efferenzen tatsächlich signifikant unterscheidbare Subpopulationen vorkommen und, gegebenenfalls, inwieweit sich die aufgrund von Lageberechnungen gemachten Unterscheidungen mit der subjektiven Einteilung beim Betrachten der Präparate decken, wurde zunächst eine im Zusammenhang mit der gleichen Fragestellung von (Kaiser 1993) am Huhn entwickelte Methode angewandt:

Aus den Abbildungen 2 bis 4 wird ebenfalls ersichtlich, dass alle efferenten Zellkörper einer Hemisphäre entlang einer Ebene parallel zum Trakt des Abducens-Nerven liegen. Projiziert man alle Zellen eines Hirns auf dieselbe Ebene und zieht eine Ausgleichgerade durch die Punktwolke jeder Hemisphäre, bietet die Entfernung des jeweiligen Datenpunktes vom Schnittpunkt dieser Geraden mit der Senkrechten durch den Nullpunkt ein zur Unterscheidung der beiden subjektiv erkannten Gruppen geeignetes Maß.

Da die mit dieser Methode ausgewerteten Tiere Tracerinjektionen in beide Ohren erhielten und angenommen werden kann, dass die beiden oben beschriebenen efferenten Gruppen bilateralsymmetrisch ausgebildet sind, wurden in der Auswertung alle Datenpunkte der linken Hirnhälfte auf die Rechte gespiegelt, um nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate einen linearen Fit für alle Datenpunkte berechnen zu können.

Die Entfernungen der Zellen zu dem oben beschriebenen Referenzpunkt wurde in einem Histogramm grafisch dargestellt. In dieser Darstellung ließen sich, wie in den Abbildungen 5 bis 7 illustriert, zwei Cluster von Entfernungsklassen unterscheiden sowie eine Grenze zwischen den beiden Clustern definieren. Abschließend wurden die zwei per Augenschein definierten Subgruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests daraufhin untersucht, ob es sich hierbei um Stichproben derselben Population handelte oder nicht.

Zusätzlich wurde mit Hilfe der linearen Diskriminanzanalyse nach Fischer eine Grenze zwischen der dorsomedialen und der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen berechnet.

Beide Verfahren erlauben eine eindeutige Zuordnung jeder Zelle zu einer der beiden Subpopulationen. So konnte das Ergebnis dieser Berechnungen für jede Zelle mit der zuvor getroffenen subjektiven Zuordnung zur ventrolateralen, beziehungsweise dorsomedialen Zellgruppe verglichen werden.

### 2.5.2 Statistische Auswertung der Zellformen

Die in den hier vorgestellten Versuchen beobachteten Zellformen lassen sich spontan verschiedenen Subtypen zuordnen, wobei diese Zuordnung jedoch oft nicht eindeutig ist. Um zu überprüfen, inwieweit sich einzelne Subpopulationen aufgrund morphometrischer Daten statistisch signifikant gegeneinander abgrenzen lassen, wurde das folgende Verfahren gewählt.

Zunächst wurde die Häufigkeitsverteilung einzelner gemessener Parameter, wie zum Beispiel die Länge des Somas, sowie aus diesen Werten errechnete Formfaktoren, wie beispielsweise das Längen-Breiten-Verhältnis, grafisch dargestellt (siehe Abbildung 9, Seite 52). Eine tabellarische Auflistung aller auf diese Weise untersuchten Parameter findet sich unter Tabelle 2, Seite 58. Ließen sich auf der Grundlage dieser Histogramme, analog zu dem unter 2.5.1 vorgestellten Verfahren, Subpopulationen abgrenzen, wurde zunächst mit Hilfe der Ein-Weg-Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis (H-Test) geprüft, ob die so vorgenommene Einteilung statistisch abzusichern sei. Für den Fall, dass dieser Test auf das Vorhandensein statistisch unterscheidbarer Subpopulationen hinwies, wurden die einzelnen auf der Grundlage des Histogramms definierten Untergruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests jeweils gegeneinander getestet.

Da in einige der erhobenen Maße sowohl die Anzahl der Fortsätze als auch deren räumliche Anordnung eingeht, ist der jeweilige Färbeerfolg für die Aussagekraft dieser Statistik entscheidend. Als objektives Maß zur Beurteilung des Färbeerfolgs wurde die Strecke, über die sich einzelne Zellfortsätze im Präparat verfolgen ließen, gewählt. Lediglich Zellen, deren Fortsätze sich über mehr als das anderthalbfache der Somalänge verfolgen ließen, wurden für die Analyse zugelassen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lage der cochleären Efferenzen im Stammhirn

Eine erste Beschreibung der Lage efferenter Zellkörper beim Huhn findet sich in der Arbeit von Whitehead und Morest (1981). In dieser Arbeit wird zwischen zwei Populationen cochleärer Efferenzen unterschieden: Einer dorsomedialen, in der Nähe des Abducens - Motorkerns gelegenen Gruppe (DM) und einer ventrolateralen, medial der oberen Olive gelegen Gruppe (VL). Diese Einteilung wurde in späteren Arbeiten (Übersicht in Code 1997) bestätigt. Versuche, diese per Augenschein vorgenommene Einteilung durch ein quantitatives Maß zu stützen, führten bislang zu keinem reproduzierbaren Ergebnis (Kaiser 1993).

#### 3.1.1 Allgemeine Beschreibung der Lage efferenter Zellkörper

Die hier vorgestellten Daten beruhen auf der Auswertung von 14 Tracerinjektionen bei neun Eulen und sechs Tracerinjektionen bei drei Hühnern. Es wurde für beide Zellgruppen (DM und VL) die Anzahl der mit dem jeweiligen Tracer markierten Zellen sowohl in der ipsilateral als auch in der kontralateral zu der Tracerinjektion gelegenen Stammhirnhemisphäre getrennt ermittelt. Zellen, die nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zugeordnet werden konnten, wurden gesondert erfasst.

Mit Hilfe der Tracerapplikationen konnten neben den ebenfalls gefärbten cochleär afferenten Strukturen vor allem efferente Zellkörper angefärbt werden. Diese efferenten Zellkörper lagen auf beiden Seiten des Stammhirns jeweils auf einer Ebene, die parallel und lateral zum Trakt des Abducens - Nerven verlief. Entlang der rostrokaudalen Achse erstreckten sich die cochleären Efferenzen vom kaudalen Ende der oberen Olive bis zum rostralen Ende des Trigemini - Motorkerns. Das entspricht einer Strecke von etwa 2500 µm sowohl bei der Eule als auch beim Huhn.

Innerhalb des Bereiches der Zellkörper cochleärer Efferenzen ließen sich zwei Subpopulationen unterscheiden:

Eine ventrolaterale Gruppe lag medial der oberen Olive und lateral des Trakts des Abducens - Nerven. Sie erstreckte sich auf der im vorhergehenden Absatz beschriebenen Ebene parallel zum Trakt des Abducens - Nerven über den gesamten Bereich cochleärer Efferenzen. Eine dorsomediale Gruppe lag ventrolateral des Abducens – Motorkerns und reichte in der rostrokaudalen Richtung vom Trakt des Abducens – Nerven bis zum rostralen Drittel des Trigeminus - Motorkerns.

In Vorversuchen am Huhn konnten bei 3 von 61 Tieren ebenfalls auf der oben beschriebenen Ebene, allerdings weiter kaudal liegende Zellen gefärbt werden. Dieselbe Beobachtung wurde bei einer Eule (Eu 15) gemacht.

Eine Übersicht über die hier beschriebenen Verhältnisse geben die Abbildungen 2 bis 4 auf den folgenden Seiten.

Bei der Eule waren die ventrolaterale und die dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen deutlich voneinander getrennt. Die Unterscheidung beider Gruppen bereitete keinerlei Probleme.

In Gegensatz dazu war der Übergang zwischen der ventrolateralen und der dorsomedialen Gruppe beim Huhn fließend, und die Zuordnung einzelner Zellen zu einer der beiden Gruppen schien oft nicht eindeutig. Diese Beobachtung lässt sich anhand der Abbildungen 2 bis 4 gut nachvollziehen.

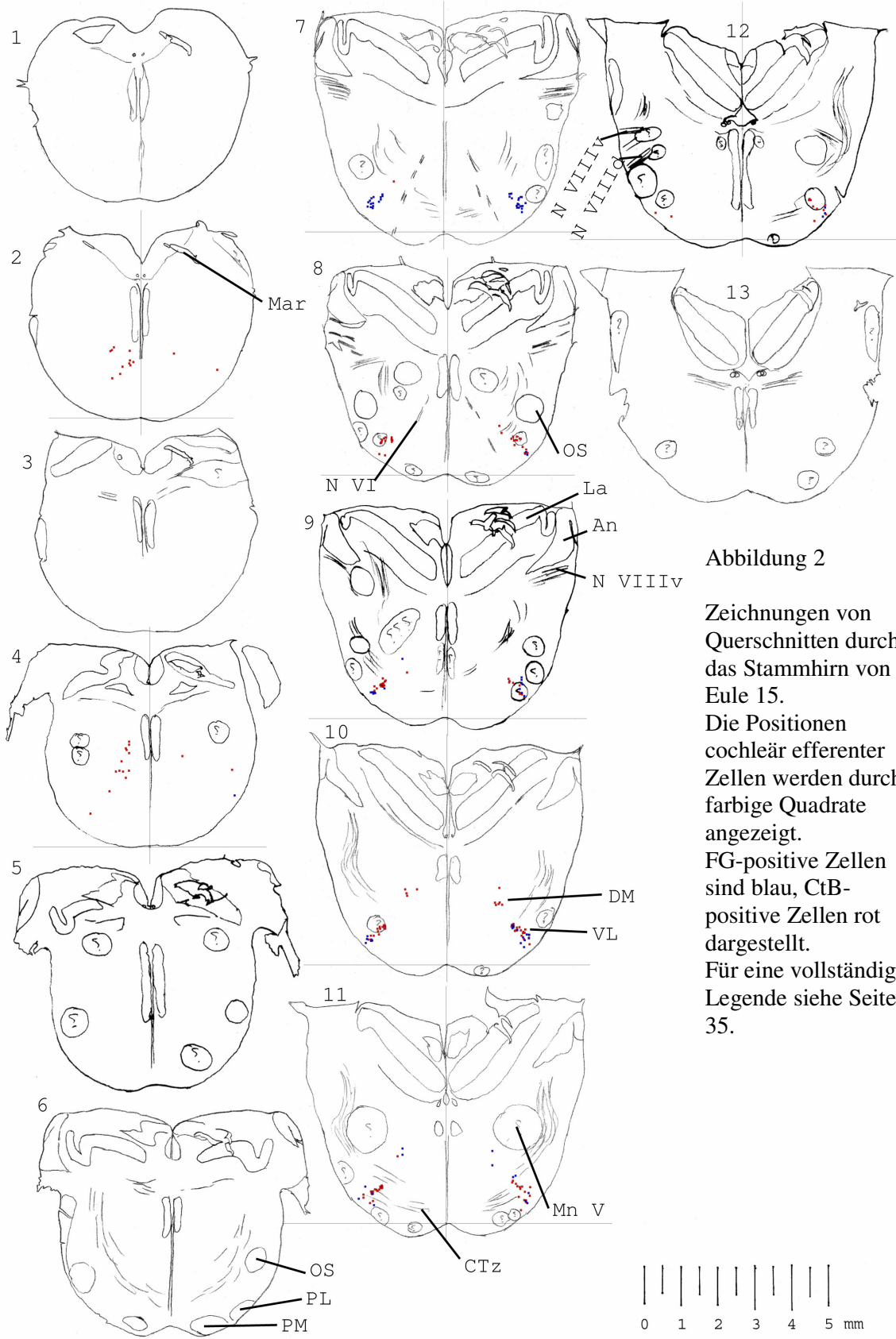


Abbildung 2

Zeichnungen von Querschnitten durch das Stammhirn von Eule 15.

Die Positionen cochleär efferenter Zellen werden durch farbige Quadrate angezeigt. FG-positive Zellen sind blau, CtB-positive Zellen rot dargestellt.

Für eine vollständige Legende siehe Seite 35.



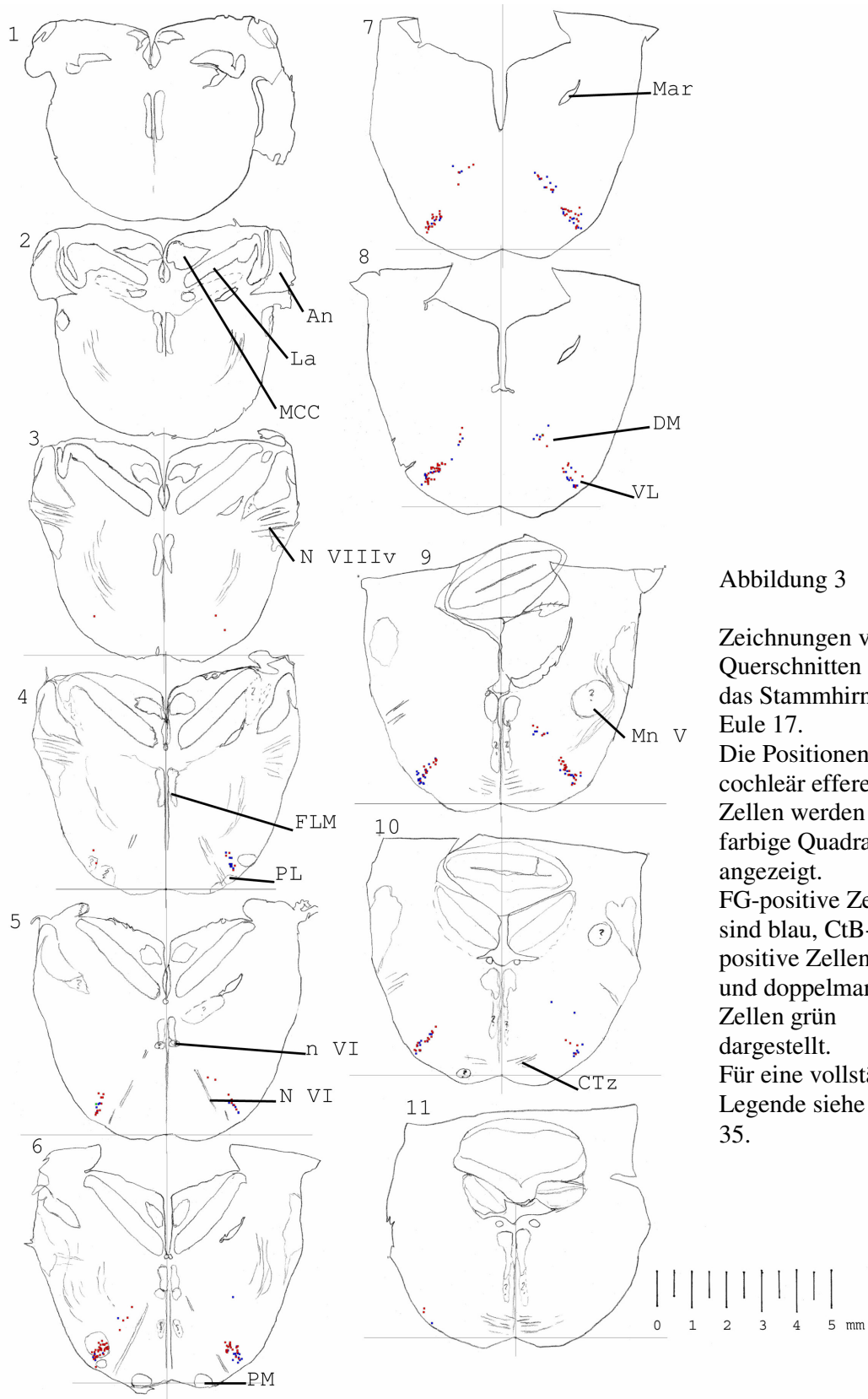


Abbildung 3  
 Zeichnungen von Querschnitten durch das Stammhirn von Eule 17. Die Positionen cochleär efferenter Zellen werden durch farbige Quadrate angezeigt. FG-positive Zellen sind blau, CtB-positive Zellen rot und doppelmarkierte Zellen grün dargestellt. Für eine vollständige Legende siehe Seite 35.

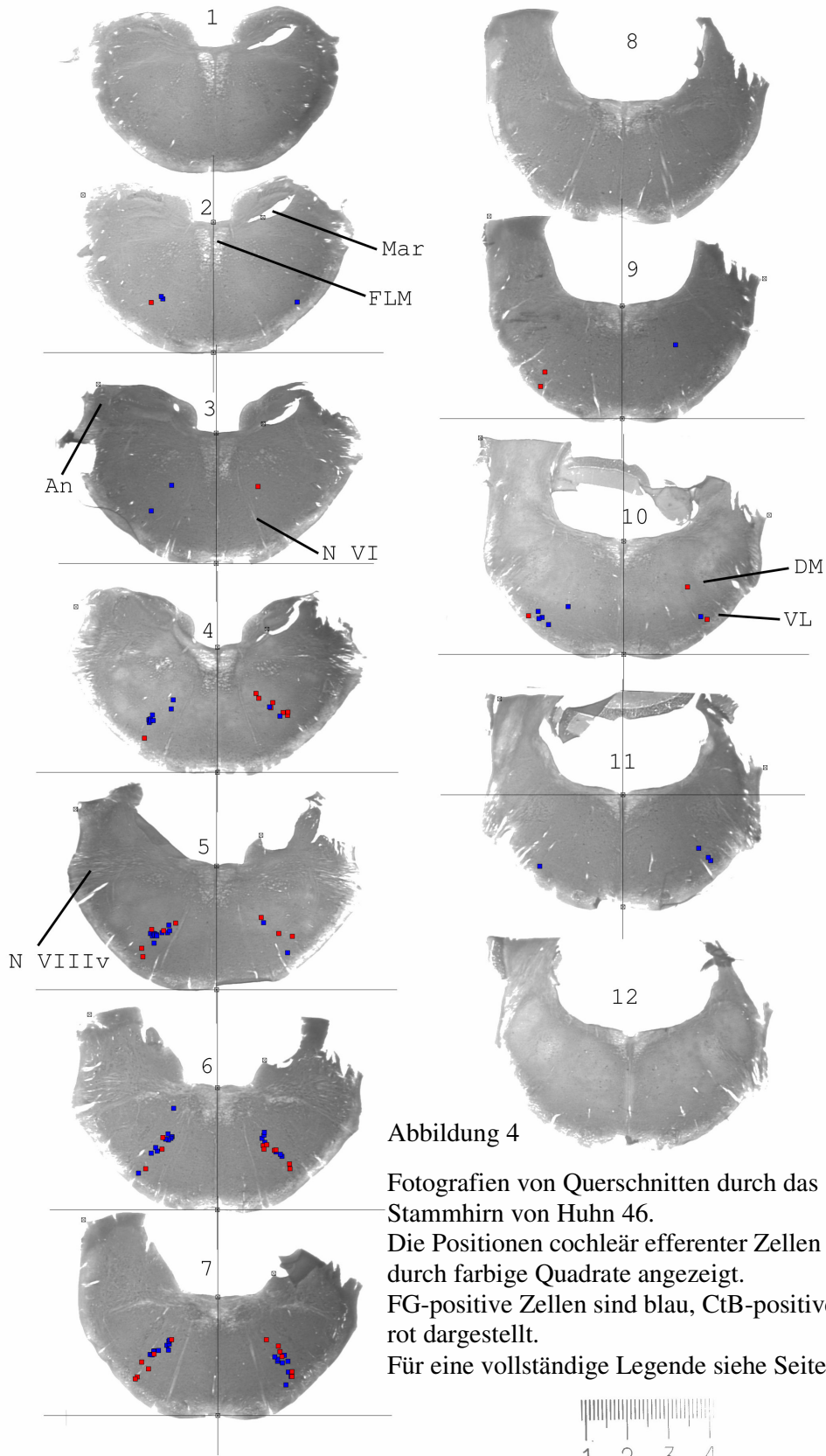


Abbildung 4

Fotografien von Querschnitten durch das Stammhirn von Huhn 46.

Die Positionen cochleär efferenter Zellen werden durch farbige Quadrate angezeigt. FG-positive Zellen sind blau, CtB-positive Zellen rot dargestellt.

Für eine vollständige Legende siehe Seite 35.

Legende zu den Abbildungen 2 bis 4:

Die Abbildungen geben einen Überblick über die Lage cochleär efferenter Zellkörper, wie sie unter 3.1.1, Seite 30 ff, beschrieben ist.

Abbildung 2 und 3 zeigen anhand von mit Kresylviolett gefärbten Querschnitten durch das Stammhirn zweier Eulen angefertigte Zeichnungen, in die die anatomisch korrekten Positionen einzelner markierter Efferenzen eingetragen wurden.

In Abbildung 4 sind die Positionen cochleärer Efferenzen in Fotografien von mit Kresylviolett behandelten Querschnitten des Stammhirns eines Huhns eingezeichnet.

Alle drei Abbildungen sind nach folgendem Schema aufgebaut:

Die im Stammhirn durch Injektionen von Choleratoxin - B in die rechte Cochlea markierten Zellen sind rot, die durch Fluorogold - Injektionen in die linke Cochlea markierten Zellen sind blau dargestellt. Mit beiden Tracern markierte Zellen sind als grüne Quadrate in die Zeichnungen eingetragen.

Die fortlaufende Nummerierung der einzelnen Schnitte entspricht der rostrokaudalen Position des jeweiligen Schnitts, wobei Schnitt 1 am weitesten kaudal liegt. Jede der folgenden Schnittebenen liegt um jeweils 250 µm weiter rostral. In allen Abbildungen liegt die ventrale Seite des Schnitts unten, die rechte Seite rechts.

Die Bezeichnung der im Stammhirn identifizierten Strukturen entspricht der Nomenklatur, wie sie von Kuenzel und Masson (1988) verwendet wird.

An	Nucleus angularis
CTz	Corpus trapezoideum
DM	dorsomediale Efferenzen
FLM	Fasciculus longitudinalis medialis
La	Nucleus laminaris
Mar	Markierung, rechte Hemisphäre
MCC	Nucleus magnocellularis cochlearis
Mn V	Nucleus motorius nervi trigemini
N V	Nervus trigeminus
N VI	Nervus abducens
n VI	Nucleus nervi abducentis
N VIIIc	Nervus octavus, pars cochlearis
N VIIIv	Nervus octavus, pars vestibularis
OS	Nucleus olivaris superior
PL	Nucleus pontis lateralis
PM	Nucleus pontis medialis
TD V	Nucleus et tractus descendens nervi trigemini
VeD	Nucleus vestibularis descendens
VL	ventrolaterale Efferenzen

Tabelle 1 a

Beobachtete Zellzahlen in den einzelnen Gruppen cochleärer Efferenzen bei Eule und Huhn

Tier	Tracer	VL			DM			Summe
		ipsilateral	contralateral	gesamt	ipsilateral	contralateral	gesamt	
Eu 5	CtB	203	390	593	9	6	15	617
Eu 8	CtB	195	165	360	38	74	112	493
Eu 9	CtB	210	254	464	97	104	201	749
Eu 12	CtB	250	633	883	42	93	135	1121
	fg	304	245	549	6	7	13	569
	doppel			19			0	
Eu 13	CtB	91	152	243	32	51	83	326
Eu 14	CtB	272	346	618	79	45	124	759
	fg	316	317	633	28	18	46	691
	doppel			15			0	15
Eu 15	CtB	495	457	952	76	81	157	1109
	fg	13	22	35	169	125	294	329
	doppel			0			2	2
Eu 16	CtB	299	533	832	4	37	41	677
	fg	184	270	454	120	95	215	875
	doppel			3			1	3
Eu 17	CtB	494	564	1058	54	50	104	1162
	fg	74	55	129	275	251	526	655
	doppel			5			1	6
Hu 43	CtB	110	114	224	151	84	235	515
	fg	45	43	88	171	89	260	397
	doppel			0			1	1
Hu 42	CtB	116	81	197	45	44	89	309
	fg	48	120	168	21	64	85	621
	doppel			2			0	2
Hu 46	CtB	103	56	159	73	103	176	335
	fg	112	139	251	127	153	280	531
	doppel			0			0	0

In Tabelle 1a ist die in den einzelnen Versuchen ermittelte Zellzahl in den beiden unter 3.1.1, Seite 30, beschriebenen cochleär efferenten Zellgruppen, DM und VL jeweils getrennt für die ipsilateral, beziehungsweise kontralateral zur jeweiligen Tracerinjektion (CtB oder FG) gelegene Stammhirnhemisphäre dargestellt. Versuche an Eulen wurden mit Eu, Versuche an Hühnern mit Hu abgekürzt, die Zahlen kennzeichnen die individuellen Tiere. Zellen, die sich bei der Betrachtung des jeweiligen Präparats nicht eindeutig einer der beiden Gruppen zuordnen ließen, wurden der Gesamtsumme in der letzten Spalte hinzugezählt. In diesen Fällen ist die Zellzahl in der Spalte „Summe“ größer als die Summe der Spalten „VL – gesamt“ und „DM – gesamt“. Da mit beiden

Tracern markierte Zellen bezogen auf den einen Tracer als ipsi-, bezogen auf den anderen Tracer als kontralateral anzusprechen sind, werden diese Zellen (doppel) in dieser Darstellung lediglich in der Spalte „gesamt“ ihrer jeweiligen Gruppe aufgeführt.

Tabelle 1 b

Deskriptive Statistik für die in der Tabelle 1a aufgeführten Werte

<b>Eule</b>	Mittel	Median	Minimum	Maximum
VL	557,35714	571	35	1058
DM	147,57143	118	13	526
Gesamt	723,71429	684	326	1162

<b>Huhn</b>	Mittel	Median	Minimum	Maximum
VL	181,16667	182,5	88	251
DM	187,5	205,5	85	280
Gesamt	451,33333	456	309	621

Tabelle 1b zeigt das arithmetische Mittel, den Median, sowie die größte und die kleinste in VL beziehungsweise DM beobachtete Zellzahl. Die diesen Maßen zugrunde liegenden Einzelwerte sind in Tabelle 1a aufgeführt. Eine Unterscheidung zwischen ipsi- und kontralateral zur Tracerinjektion beobachteten Zellen wurde hier nicht vorgenommen.

Tabelle 1 c

Verhältnisse der Größen einzelnen efferenten Zellgruppen sowie der Stammhirnhemisphären zueinander.

<b>Huhn</b>	
VL ipsi/kontra	0,96
DM ipsi/kontra	1,09
ipsi/kontra	0,49
VL/DM ipsi	0,90
VL/DM kontra	1,96
VL/DM alles	0,97

<b>Eule</b>	
VL ipsi/kontra	0,77
DM ipsi/kontra	0,99
ipsi/kontra	0,81
VL/DM ipsi	3,30
VL/DM kontra	4,24
VL/DM alles	3,79

In Tabelle 1c sind die Verhältnisse der ipsi- und der kontralateralen Zellpopulationen sowie der einzelnen Gruppen zueinander aufgeführt. Bei dem Verhältnis VL/DM ist sowohl das Verhältnis in der jeweiligen Stammhirnhälfte, als auch das Verhältnis aller in DM zu allen in VL beobachteten Zellen angegeben.

### 3.1.2 Quantitative Erfassung und statistische Analyse der Lage efferenter Zellkörper

In dieser Arbeit wurden für zwei Eulen und zwei Hühner die exakten Positionen der durch Tracerinjektionen markierten, cochleär efferenten Zellen im Stammhirn vermessen. Für diese Messungen wurden diejenigen Tiere ausgewählt, bei denen nach einer Tracerinjektion in beide Ohren pro Tracer möglichst viele Zellen gefärbt werden konnten. Während dieser Messungen wurde für beide Eulen und ein Huhn neben der Position der Zellen im Stammhirn auch ihre per Augenschein am Präparat vorgenommene Zuordnung zu der ventrolateralen beziehungsweise der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen erfasst. Für das zuerst untersuchte Huhn (Hu 42) wurde diese Zuordnung noch nicht vorgenommen. Im Gegensatz zu den unter 3.1.1, Seite 30, beschriebenen Zellzählungen wurde für die quantitative Auswertung eine Zuordnung individueller Zellen zu DM beziehungsweise VL in jedem Fall durchgeführt. Um die spätere Analyse der Daten zu vereinfachen, wurde auf eine dritte Gruppe für nicht eindeutig identifizierbare Zellen verzichtet. Auf diese Weise ist es möglich, die Koordinaten jeder individuellen Zelle mit ihrer Gruppenzugehörigkeit zu vergleichen.

#### Allgemeine Beobachtungen

Bei der Eule wurden durch jeweils eine Tracerapplikation durchschnittlich 724 Zellen, beim Huhn durchschnittlich 451 Zellen markiert. Die Zahl der maximal mit einer Tracerinjektion bei einem Tier markierten Zellen lag bei der Eule bei 1162, beim Huhn bei 621. Der geringste Färbeerfolg lag bei der Eule bei 326 beim Huhn bei 309 markierten Zellen.

Die ventrolaterale Gruppe cochleärer Efferenzen war bei der Eule durchschnittlich 557 Zellen stark, während die Gruppe dorsomedialer Efferenzen mit durchschnittlich 148 Zellen deutlich kleiner ausfiel. Beim Huhn waren diese beiden Gruppen mit durchschnittlich 91 (VL) beziehungsweise 94 (DM) Zellen in etwa gleich groß.

Das durchschnittliche Verhältnis der Zellzahlen von VL zu DM lag für die Eule ipsilateral zum injizierten Ohr bei 3,30, kontralateral bei 4,25. Das Verhältnis VL/DM beider Hemisphären betrug 3,79.

Beim Huhn wurde ipsilateral zum behandelten Ohr ein VL/DM-Verhältnis von 0,91 gefunden. Der entsprechende Wert für die kontralaterale Seite betrug 1,96. Das Verhältnis VL/DM beider Hemisphären betrug 0,97.

Für die einzelnen Zellgruppen (DM und VL) bestand ein ausgeprägter Unterschied in der Anzahl markierter Zellen zwischen der ipsilateral und der kontralateral zur Tracerinjektion gelegenen Stammhirnhälfte lediglich für die ventrolaterale cochleär efferente Gruppe der Eule. Hier betrug das Verhältnis von der ipsilateralen zu der kontralateralen Seite 0,76.

Einen Überblick über die Zahlenverhältnisse in beiden Versuchstieren bietet Tabelle 1 a, b und c, Seite 36.

#### Unterscheidung individueller Subpopulationen

Das in dieser Arbeit vorgestellte Messverfahren zur genauen Erfassung einzelner Zellpositionen im Stammhirn (siehe 2.4.2, Seite 22) erlaubt es, die per Augenschein vorgenommene Einteilung der cochleären Efferenzen in eine dorsomediale und eine ventrolaterale Untergruppe anhand quantitativer Positionsangaben zu überprüfen.

Dazu wurden die Positionen der einzelnen Zellen zunächst auf jeweils eine Ebene projiziert. Auf diese Weise konnten die Zellpositionen in allen drei Ebenen als zweidimensionale Punktwolken dargestellt werden. Die erste Projektionsebene lag parallel zur Schnittebene, die zweite parallel zur Längsachse des Stammhirns und die dritte entspricht einer Aufsicht auf das Stammhirn. Die per Augenschein vorgenommene Zuordnung der einzelnen Zellen wurde in diesen Grafiken mit Hilfe einer Farbcodierung sichtbar gemacht.

Die so gewonnenen dreiseitigen Darstellungen sind in den Abbildungen 5 bis 7, Seite 41 ff, gezeigt. In diesen Abbildungen sind die zu den jeweiligen Subpopulationen cochleär efferenter Zellen gehörigen Punktwolken, wie auch im Präparat selbst, verhältnismäßig gut zu unterscheiden. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurde jeweils der

Abstand der Zellen zu der Mittelachse des Stammhirns (Laterale Abweichung,  $l$ ) und die Höhe der Zellen über dem ventralen Rand des jeweiligen Schnittes (Höhe über ventral,  $h$ ) ermittelt. In der Ebene parallel zur Schnittebene wurde für jede der beiden Hemisphären eine Ausgleichsgerade durch die Positionen aller Zellen berechnet. Die Entfernung der individuellen Zellen zu dem Schnittpunkt dieser Geraden mit der Senkrechten durch den Mittelpunkt des Stammhirns (Vektorlänge,  $v$ ) diente in dieser Ebene zur Unterscheidung beider Zellpopulationen.

Die Häufigkeitsverteilungen dieser drei Strecken weist bei Huhn und Schleiereule jeweils eine ausgeprägte Zweigipfligkeit auf, die sich im Kolmogorov – Smirnov - Test signifikant ( $p < 10^{-25}$ ) von einer Normalverteilung unterscheidet.

Die Häufigkeitsverteilung ist in den Abbildungen 5 bis 7 dargestellt. Wie sich aus den Grafiken ergibt, lassen sich bei der Eule alle drei Strecken zur Unterscheidung zwischen der ventrolateralen und der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen heranziehen.

Beide per Augenschein definierten Populationen unterscheiden sich im Mann–Whitney–U - Test in allen drei Strecken bei beiden getesteten Eulen sowie bei Huhn 46 signifikant ( $p < 10^{-4}$ ). Damit kann die per Augenschein vorgenommene Klassifizierung als statistisch abgesichert gelten.



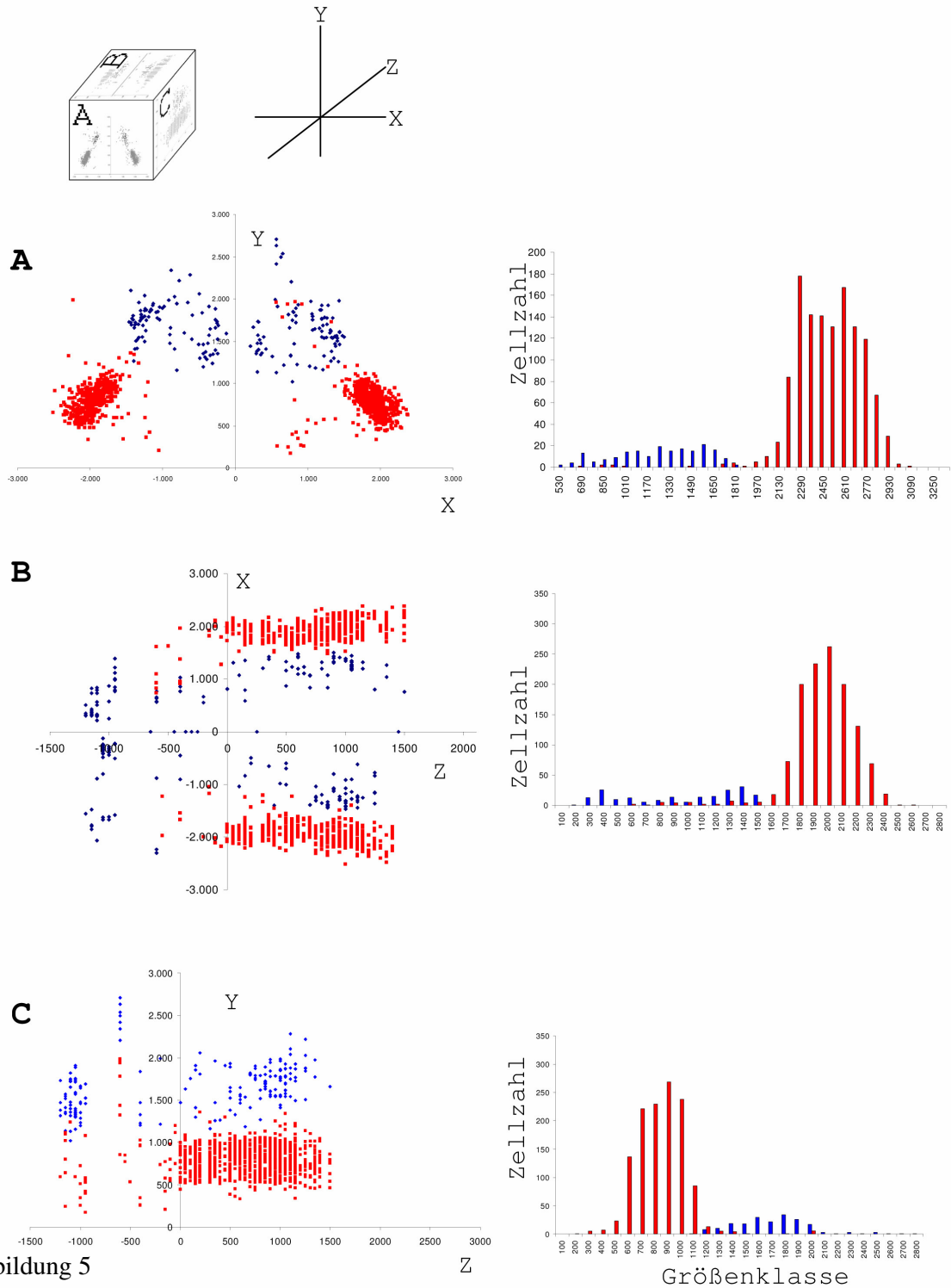


Abbildung 5

Übersicht über die Lage cochleärer Efferenzen im Stammhirn von Eule 15. Die Koordinaten der einzelnen Zellen sowie die Obergrenzen der verwendeten Größenklassen sind jeweils in  $\mu\text{m}$  angegeben. Zellen die während der Messung per Augenschein VL zugeordnet wurden sind rot, solche die per Augenschein DM zugeordnet wurden sind blau dargestellt.

Die vollständige Legende findet sich auf Seite 44

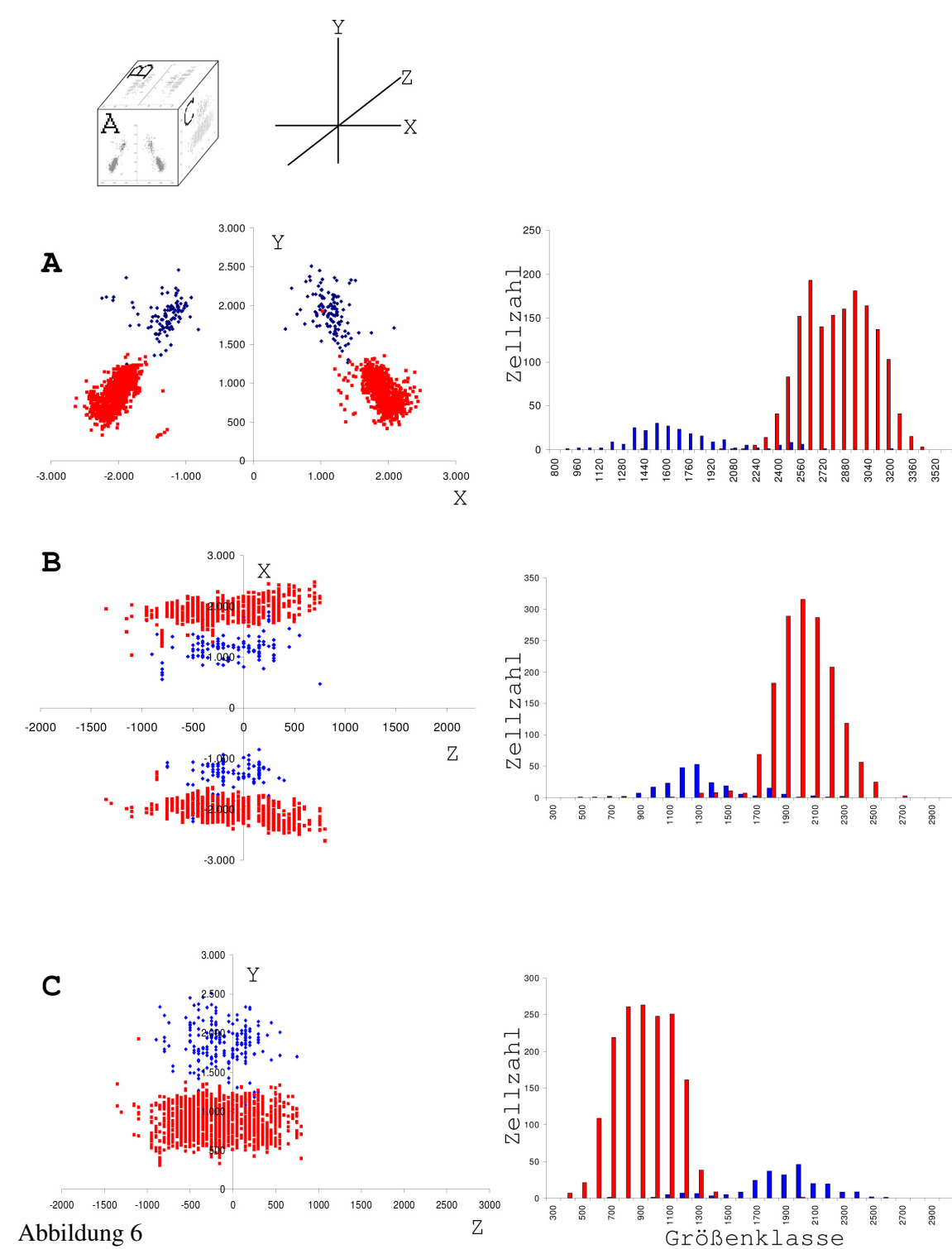


Abbildung 6

Übersicht über die Lage cochleärer Efferenzen im Stammhirn von Eule 17. Die Koordinaten der einzelnen Zellen sowie die Obergrenzen der verwendeten Größenklassen sind jeweils in  $\mu\text{m}$  angegeben. Zellen die während der Messung per Augenschein VL zugeordnet wurden sind rot, solche die per Augenschein DM zugeordnet wurden blau dargestellt. Die vollständige Legende findet sich auf Seite 44

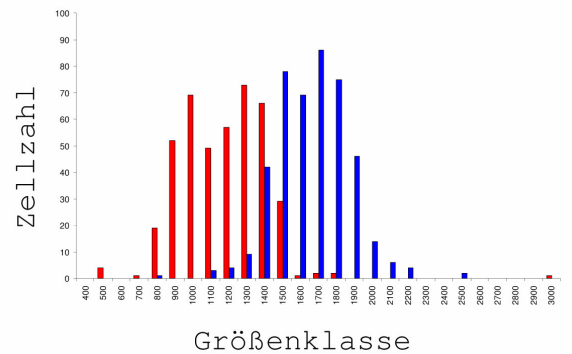
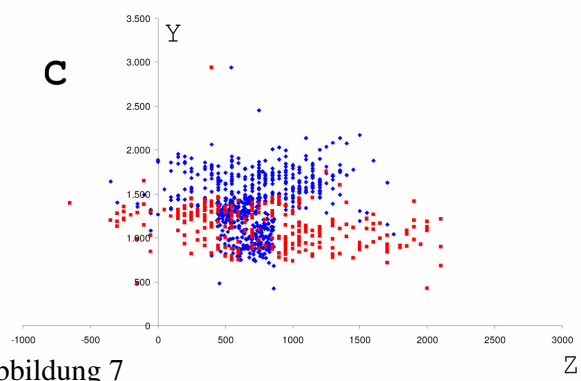
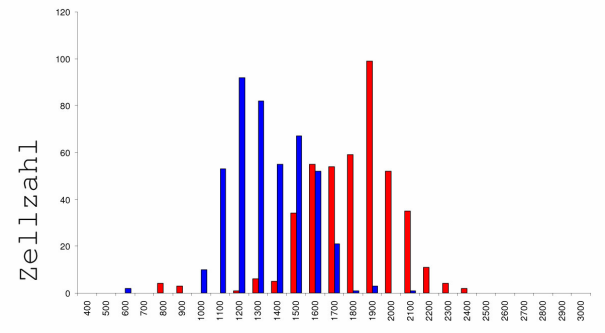
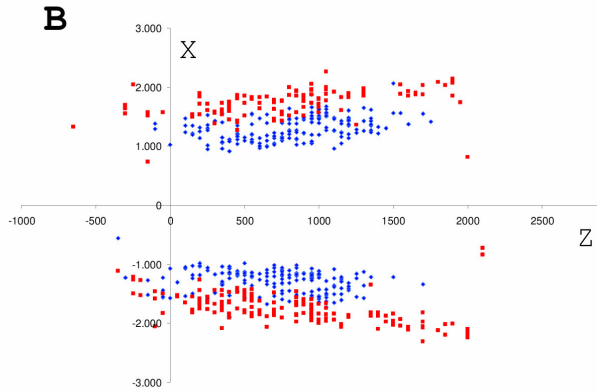
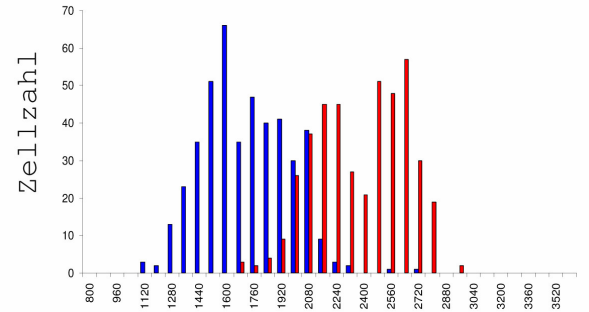
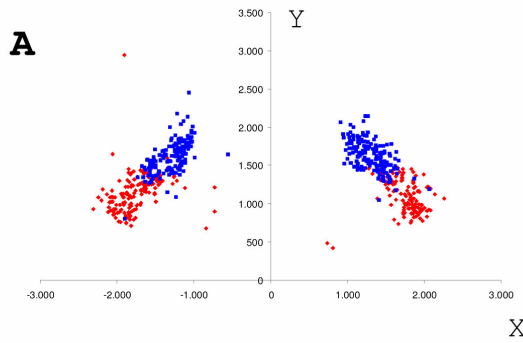
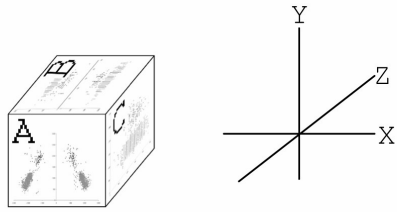


Abbildung 7

Übersicht über die Lage cochleärer Efferenzen im Stammhirn von Huhn 46. Die Koordinaten der einzelnen Zellen sowie die Obergrenzen der verwendeten Größenklassen sind jeweils in  $\mu\text{m}$  angegeben. Zellen die während der Messung per Augenschein VL zugeordnet wurden sind rot, solche die per Augenschein DM zugeordnet wurden blau dargestellt. Die vollständige Legende findet sich auf Seite 44

## Abbildungen 5, 6 und 7

Die Abbildungen 5 bis 7 zeigen die Lage aller für das jeweilige Tier nachgewiesenen cochleären Efferenzen, sowie die Häufigkeitsverteilungen für die zur Klassifizierung der dorsomedialen und der ventrolateralen Gruppe herangezogenen Abstände.

In den Grafiken auf der linken Seite der Abbildungen sind alle cochleären Efferenzen auf jeweils eine von drei senkrecht aufeinander stehenden Ebenen projiziert.

Ebene A entspricht einem Querschnitt durch das Stammhirn wie in den Abbildungen 2 bis 4, Seite 32 ff, dargestellt. Ebene B stellt eine Aufsicht, Ebene C eine Seitenansicht des Stammhirns dar. Die rostrokaudale Achse des Stammhirns ist in den Grafiken mit Z gekennzeichnet. Y bezeichnet die ventrodorsale, X die mediolaterale Achse. Die Achsen X und Y sind auch in die Darstellungen einzelner Schnitte (Abbildung 2 bis 4) eingezeichnet.

Diese Verhältnisse werden durch den oben links in der Grafik dargestellten Würfel veranschaulicht. Das neben dem Würfel dargestellte Achsensystem dient der korrekten Zuordnung der einzelnen Achsen. Die Koordinaten und damit die Achsenbeschriftungen sind jeweils in  $\mu\text{m}$  angegeben.

Auf der rechten Seite der Abbildungen ist die Häufigkeitsverteilung für die Entfernung der Zellen zu dem jeweiligen Bezugspunkt angegeben. Für Darstellung A wurde die Entfernung zum Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden durch die Punktwolke jeder Stammhirnhemisphäre mit der Senkrechten durch den Nullpunkt gewählt. Auf der rechten Seite von Darstellung B ist der horizontale Abstand zur z-Achse, auf der rechten Seite von Darstellung C der vertikale Abstand zur y-Achse aufgetragen.

Die Obergrenzen der Größenklassen sind jeweils in  $\mu\text{m}$  angegeben.

Die während der Positionsmessungen per Augenschein vorgenommene Zuordnung einzelner Zellen zu der dorsomedialen (DM) beziehungsweise der ventrolateralen (VL) Gruppe cochleärer Efferenzen ist in den Abbildungen mit Hilfe einer Farbcodierung sichtbar gemacht. VL zugeordnete Zellen sind rot, DM zugeordnete Zellen sind blau dargestellt. Diese Farbcodierung bezieht sich sowohl auf die linke wie auch auf die rechte Seite der Abbildung

Um eine Zuordnung von bisher nicht klassifizierten Zellen zu der ventrolateralen, beziehungsweise der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen allein aufgrund der gemessenen Lage zu ermöglichen, wurde eine Diskriminanzanalyse mit den Gruppen VL und DM, sowie den Merkmalsvariablen „Höhe über ventral“ (h), und „Laterale Abweichung“ (l) durchgeführt. Die Variable „Vektorlänge“ (v) wurde von der Analyse ausgeschlossen, da sie sich als lineare Kombination von h und l darstellen lässt. Aufgrund der in den Abbildungen 5 bis 7 dargestellten Verteilung der cochleär efferenten Zellen im Stammhirn ist davon auszugehen, dass sich die dorsomediale und die ventrolaterale Gruppe cochleärer Efferenzen durch eine einfache Ebene (im zweidimensionalen Raum durch eine Gerade) voneinander trennen lassen. Aus diesem Grund wurde der Diskriminanzanalyse ein lineares Modell zugrunde gelegt.

Die Verteilungen von l und h unterschied sich mit wenigen Ausnahmen im Saphiro Wilks Test signifikant ( $p > 0,05$ ) von einer Normalverteilung. Dies kann auf eine Schiefe in den Datensätzen zurückgeführt werden, auf die Güte der Klassifikationsfunktion hat dies keinen Einfluss. Aus der Diskriminanzanalyse abgeleitete Aussagen über die statistische Signifikanz einer Abgrenzung beider Gruppen gegeneinander können durch die beobachteten Abweichungen von der Normalverteilung ihre Gültigkeit verlieren. Da die Unterscheidung beider Gruppen schon vor Beginn der Diskriminanzanalyse mit Hilfe des, eine Normalverteilung nicht voraussetzenden, Mann – Whitney – U - Tests auf ihre Signifikanz untersucht wurde, fällt diese Einschränkung bei der gegebenen Fragestellung nicht weiter ins Gewicht.

Die standardisierte Klassifikationsfunktion für Eule 15 lautet:

$$D = 0,556708 * l - 0,700831 * h$$

Alle Zellen, für die die Funktion kleiner als 0 wird, sind der ventrolateralen, alle Zellen für die die Funktion größer als 0 wird, sind der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen zuzuordnen. Für den Fall, D gleich 0, ist eine Zuordnung nicht möglich.

Die aufgrund der oben angeführten Klassifikationsfunktion berechnete Gruppenzugehörigkeit stimmt für 99,2% aller Zellen mit der per Augenschein vorgenommenen Einteilung überein.

Die standardisierte Klassifikationsfunktion für Eule 17 lautet

$$D = 0,285077 * l - 0,820526 * h$$

Auch hier gilt: Alle Zellen, für die die Funktion kleiner als 0 wird, sind der ventrolateralen, alle Zellen, für die die Funktion größer als 0 wird sind der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen zuzuordnen.

Bei Eule 17 stimmt die aufgrund der Klassifikationsfunktion berechnete Gruppenzugehörigkeit für 98,8% aller Zellen mit der per Augenschein vorgenommenen Einteilung überein.

Um zu einer auf zukünftige Daten anwendbaren Klassifikationsfunktion zu kommen, wurden nun die Daten beider Tiere in einer Datei zusammengefasst und die Diskriminanzanalyse für die gepoolten Daten wiederholt.

Die standardisierte Klassifikationsfunktion für diesen Datensatz lautet:

$$D = 0,467926 * l - 0,747652 * h$$

Für diese Form stimmen 98,9 % aller Klassifizierungen mit der per Augenschein vorgenommenen Einteilung überein.

Beim Huhn überlappen sich die Abstände der beiden per Augenschein definierten Gruppen (VL und DM) zu den Achsen des Koordinatensystems, beziehungsweise dem wie unter 3.1.2, Seite 38, beschrieben definierten Referenzpunkt stark (siehe Abbildung 7, Seite 43).

Legt man die per Augenschein vorgenommene Einteilung zugrunde, lassen sich die ventrolaterale und die dorsomediale Gruppe im Mann-Whitney-U-Test in l, h und v auf einem Signifikanzniveau von  $p < 10^{-4}$  unterschiedlichen Populationen zuordnen.

Für Huhn 46 wurde die folgende standardisierte Klassifikationsfunktion berechnet:

$$D = 0,525745 * l - 0,6659 * h$$

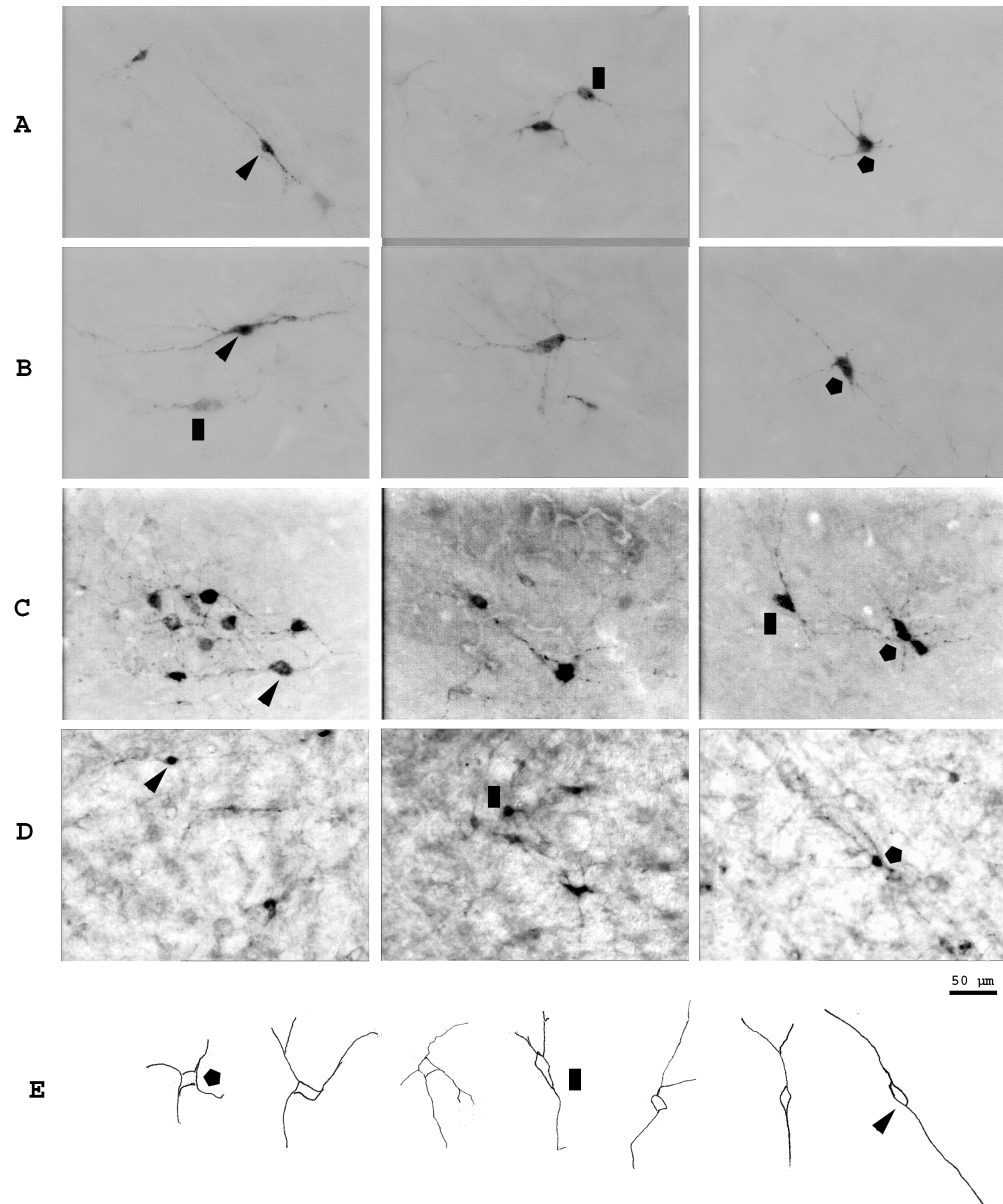
Die Klassifizierung anhand dieser Funktionen stimmt für 90% der Zellen mit der per Augenschein vorgenommenen Einteilung überein.

Für die Zellen des zuerst untersuchten Huhns (Hu 42) wurden die Angaben über die Zugehörigkeit einzelner Zellen zu der dorsomedialen beziehungsweise der ventrolateralen Gruppe cochleär efferenter Zellen während der Positionsmessungen noch nicht erfasst. Legt man das für Huhn 46 ermittelte Diskriminanzmodell zugrunde, werden 105 Zellen DM, und 247 Zellen VL zugeordnet. Das entspricht einem DM-VL-Verhältnis von 0,43. Diese Einteilung wurde mit dem Man – Whitney – U - Test auf ihre Signifikanz untersucht. Für alle drei Parameter, l, h und v, wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-4}$  ermittelt.

Eine zuvor am selben Präparat durchgeführte Klassifizierung per Augenschein ergab ein DM – VL - Verhältnis von 0,47. Da zwischen der ersten Durchsicht des Präparats (Zahlen siehe Tabelle 1a und der Positionsmessung einige Monate lagen und in dieser Zeit die Fluoreszenzmarkierung der Zellen stark ausgebleicht war, konnten bei der hier vorgestellten Messung nicht mehr alle im ersten Durchgang gezählten Zellen wiedergefunden werden. Unter der Annahme, dass alle Zellen gleich stark von dem Bleichprozess betroffen sind, sollte sich das Verhältnis der dorsomedialen und der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen zueinander nicht geändert haben. Die Abweichung zwischen den bei der ersten Durchsicht und bei der Analyse der zu einem späteren Zeitpunkt erhobenen Messwerte beträgt 10%. Dieselbe Abweichung zwischen per Augenschein definierter und errechneter Gruppenzugehörigkeit wurde bei Huhn 46 beobachtet.

Abbildung 8

Form cochleär efferenter Zellen im Stammhirn von Eule und Huhn





## Abbildung 8

Diese Abbildung zeigt einige typische Beispiele für die verschiedenen bei cochleären Efferenzen beobachteten Zellformen. Alle hier dargestellten Zellen wurden durch Fluorogoldinjektionen in die Scala tympani markiert. Beispiele für beim Huhn beobachtete Zellen finden sich in den Zeilen A und B, bei Eulen beobachtete Zellen sind in den Zeilen C, D und E dargestellt.

Die Aufnahmen in den Zeilen A bis C stammen aus Fluoreszenzpräparaten und wurden zur besseren Darstellung im Druck invertiert. Die Aufnahmen in Zeile D wurden anhand eines DAB-reagierten Präparates erstellt.

In Zeile E sind einige der anhand des DAB-Präparates angefertigte Zeichnungen dargestellt.

Um die Interpretierbarkeit im Ausdruck weiter zu verbessern, wurden alle Fotografien nachträglich geschärft und in ihrem Kontrast maximiert.

Pro Zeile sind jeweils eine spindelförmige (Dreieck), eine sternförmige (Fünfeck) und eine intermediäre (Rechteck) Zelle gesondert gekennzeichnet.

Der Eichbalken unten links unter den Fotografien bezieht sich auf alle gezeigten Zellen, Fotografien wie Zeichnungen. Bei den Fotografien stehen der obere und untere Bildrand jeweils senkrecht auf der Mittelachse des Stammhirns wobei dorsal oben liegt.

### **3.2 Zellformen**

Eine erste Beschreibung der Morphologie efferenter Zellkörper beim Huhn findet sich in der Arbeit von Whitehead und Morest (1981), wo zwischen Zellen mit langgestreckter, beziehungsweise rundlicher Form der jeweiligen Dendritenfelder unterschieden wird. Obwohl diese qualitative Beobachtung unter anderem von Schwarz et al. (1992) bestätigt werden konnte, ist in der Literatur bisher kein morphometrisches Maß beschrieben, das diese Einteilung stützen würde.

In einer von Kaiser (1993) durchgeführten quantitativen Analyse der Morphometrie efferenter Zellkörper konnte gezeigt werden, dass Länge, Breite und Fläche der untersuchten Somata unimodal verteilt und damit für eine Klassifizierung der Zellen nicht geeignet sind.

#### 3.2.1 Phänomenologische Beschreibung efferenter Zellen

In den im Laufe dieser Arbeit angefertigten Präparaten lassen sich Zellen mit unterschiedlich angeordneten Fortsätzen unterscheiden. Neben sternförmigen Zellen mit drei oder mehr sternförmig angeordneten, oft mehrfach verzweigten Fortsätzen und einem kreisrunden bis leicht ovalen Einzugsbereich fanden sich spindelförmige Zellen mit zwei einander gegenüberliegenden, entlang einer gemeinsamen Achse verlaufenden, in der Regel unverzweigten Fortsätzen. In einigen Fällen stehen die Fortsätze der spindelförmigen Zellen in einem stumpfen Winkel aufeinander.

Die von Whitehead und Morest (1981) für das Huhn beschriebenen Zellformen konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl bei der Eule als auch beim Huhn gefunden und voneinander unterschieden werden. Beispiele für derartige Zellen finden sich in den Abbildungen 8 und 11. Neben Zellen, die eindeutig einer der beiden Gruppen zuzuordnen sind, sind auch Beispiele für intermediäre Formen dargestellt, die sich nicht eindeutig einer dieser beiden Typen zuordnen lassen.

### 3.2.2 Morphometrische Daten efferenter Zellen

Die Markierung in den Fluoreszenzpräparaten fiel lediglich bei 9 Zellen einer Schnittserie am Huhn für die Vermessung der Zellfortsätze ausreichend kräftig aus. Da in einer Fotografie jeweils nur eine Schärfeebene optimal wiedergegeben werden kann, können Zellen mit Hilfe der aus einer Kombination vieler Schärfeebenen entstandenen Zeichnungen genauer dargestellt werden, als das mit Hilfe eines Fotos möglich wäre.

Die folgenden quantitativen Maße wurden deshalb anhand von Zeichnungen von 37 Zellen eines photostabilen Dauerpräparats (Eule 8) erhoben.

Neben der Position der individuellen Zelle im Stammhirn wurde jeweils Länge, Breite, Umfang und Fläche sowohl des Zellkörpers als auch des von den Fortsätzen überspannten Bereichs, sowie die Zahl der vom Zellkörper ausgehenden Fortsätze erfasst. Die Häufigkeitsverteilungen für die einzelnen Messwerte bei der Eule sowie für einige abgeleitete Faktoren, wie zum Beispiel das Verhältnis von Länge zu Breite oder von Umfang zu Fläche sind in Abbildung 9 a und b auf den folgenden Seiten zusammengefasst.

Beim Huhn konnten lediglich neun fluoreszenzmarkierte Zellen erfolgreich vermessen werden. Die Messwerte für diese Zellen sind in Tabelle 2, Seite 58, aufgeführt und lagen vollständig und mit ähnlicher Verteilung im Bereich der an der Eule erhobenen Daten.

Die Länge der Zellen lag beim Huhn zwischen 19,9 und 50,8  $\mu\text{m}$  und bei der Eule zwischen 9,9 und 64,0  $\mu\text{m}$ . Beim Huhn waren die Zellen zwischen 9,6 und 17,3  $\mu\text{m}$  breit, bei der Eule lag dieser Wert zwischen 7,7 und 27,2  $\mu\text{m}$ .

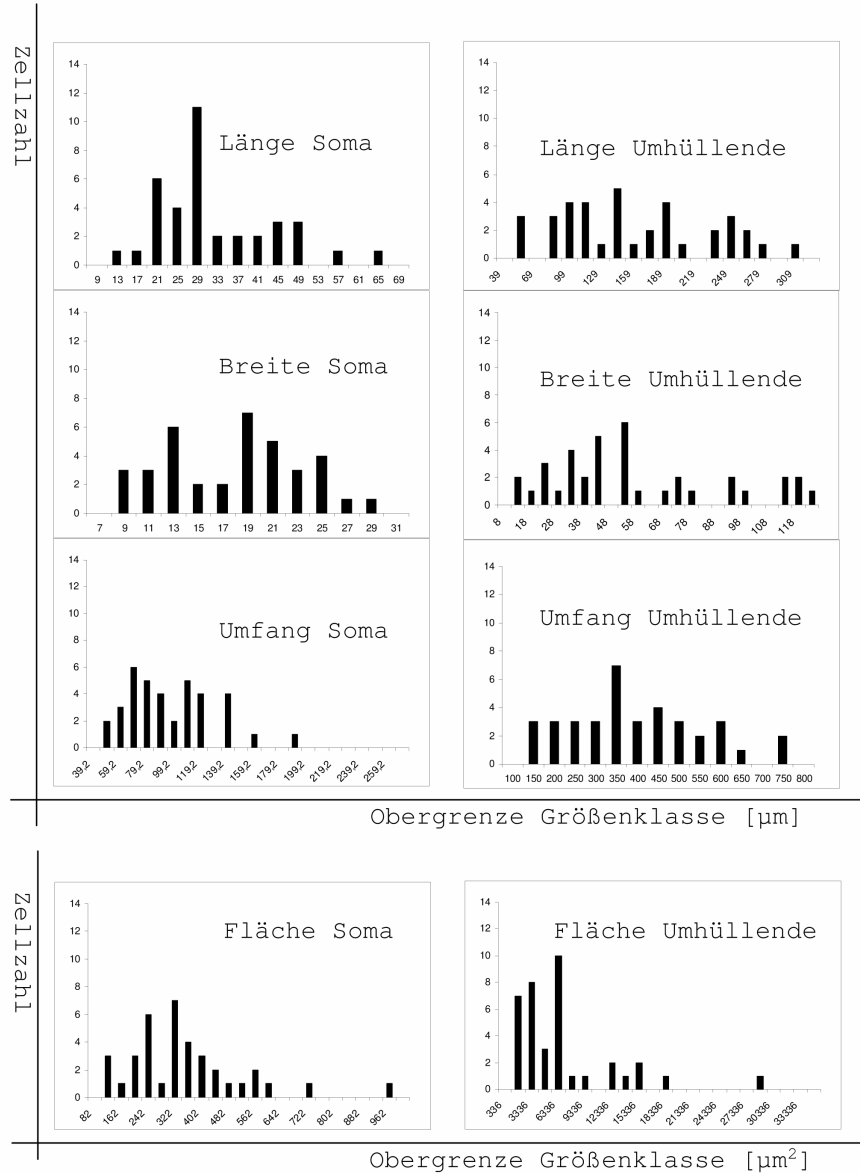
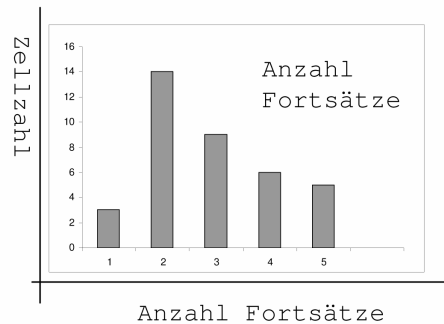


Abbildung 9 a

Die Abbildung stellt die Häufigkeitsverteilung für alle an den Zeichnungen von cochleären Efferenzen direkt erfassten Parameter dar. Es wurden 37 Zellen von Eule 8 ausgewertet. Die Ordinate ist bei allen Zellen zur besseren Vergleichbarkeit gleich skaliert. Abbildungen gleicher Maße, wie Strecken oder Flächen, wurden jeweils zusammengefasst.



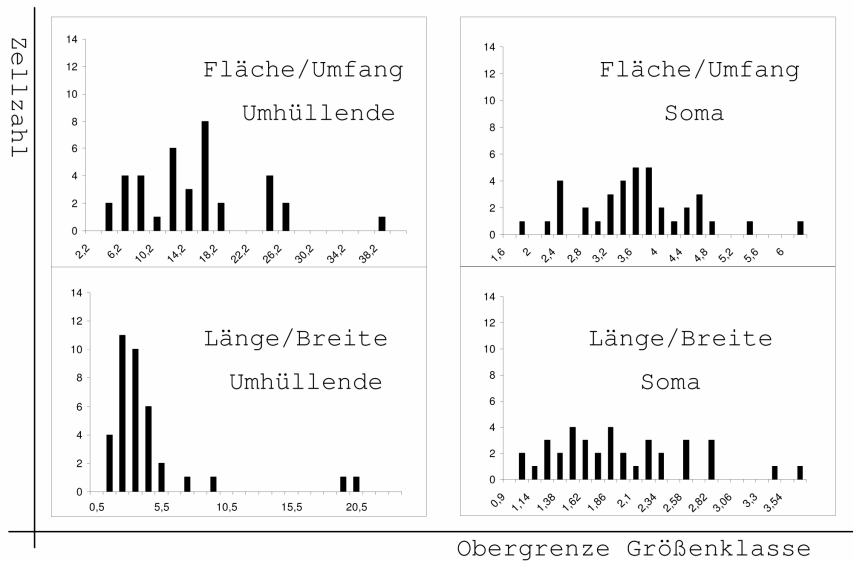


Abbildung 9 b

Die Abbildung stellt die Häufigkeitsverteilung für die Längen-Breiten-Verhältnisse der Zellkörper, sowie der Umhüllenden aller Fortsätze cochleärer Efferenzen dar.

Es wurden 37 Zellen von Eule 8 ausgewertet. Die Ordinate ist bei allen Zellen zur besseren Vergleichbarkeit gleich skaliert.

Aus Abbildung 9 a und b ergibt sich, dass lediglich das Längen-Breitenverhältnis des durch die Zellfortsätze überspannten Bereichs eine Einteilung der Zellen in verschiedene Klassen erlaubt. Zwar zeigen sich auch in anderen Parametern, wie zum Beispiel der Fläche des von den Fortsätzen überspannten Bereiches, einzelne Ausreißer, die sich jedoch durch eine überdurchschnittlich vollständig gefärbte Zelle erklären lassen, deren Fortsätze sich über außergewöhnlich weite Strecken (mehr als das fünffache der Somalänge) verfolgen ließen.

Die Häufigkeitsverteilung für das Längen-Breitenverhältnis ist in Abbildung 10 noch einmal vergrößert dargestellt. Zusätzlich ist die Abbildung um Beispiele für die jeweilige Größenklasse typischer Zellen erweitert worden. Aus dieser Darstellung lässt sich eine gute Übereinstimmung zwischen phänomenologischer Beschreibung und morphometrischen Daten ablesen. Dabei lassen sich Zellen mit einem Längen-

Breitenverhältnis des Dendritenfeldes von 5,5 oder größer aufgrund der Häufigkeitsverteilung als spindelförmig klassifizieren. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße lässt sich diese Aussage statistisch nicht absichern.

Gestützt wird diese Klassifizierung allerdings dadurch, dass sich für die 9 beim Huhn vermessenen Zellen ein sehr ähnliches Bild abzeichnet. Hier würde eine Zelle mit einem Längen-Breitenverhältnis des von Ihren Fortsätzen überspannten Bereichs von 4,5 oder weniger als sternförmig klassifiziert werden. Soweit sich das bei dem gegebenen Stichprobenumfang überhaupt beurteilen lässt, scheinen die relativen Anteile beider Zelltypen an der Gesamtpopulation bei Huhn und Eule ebenfalls ähnlich zu sein.

Zellen mit zwei in einem stumpfen Winkel zueinander stehenden Fortsätzen lassen sich mit ihrem relativ kleinen Längen-Breitenverhältnis mit diesem Maß alleine allerdings nur unzureichend beschreiben:

So würde die in Abbildung 11, Seite 56, gezeigte Zelle mit einem Längen-Breitenverhältnis von 4,4 als sternförmig beschrieben werden, während ihr phänomenologisches Erscheinungsbild eher für eine spindelförmige Zelle spräche. Dieses Beispiel zeigt, dass vereinzelt Zellen auftreten, bei denen die Klassifizierung anhand des allgemeinen Erscheinungsbildes und die anhand des Längen-Breitenverhältnisses voneinander abweichen.

Dies deutet darauf hin, dass eine sichere mathematische Klassifizierung erst durch ein kombiniertes Maß, in das zusätzlich zu dem Längen-Breitenverhältnis der Fortsätze weitere Faktoren, wie zum Beispiel die Anzahl der Fortsätze, deren Winkel zueinander oder das periphere Verzweigungsmuster, eingehen, erreicht werden kann. Eine statistische Analyse mit dem Ziel, derartige Merkmalshäufungen nachzuweisen ist aufgrund der relativ kleinen Stichprobe nicht sinnvoll.

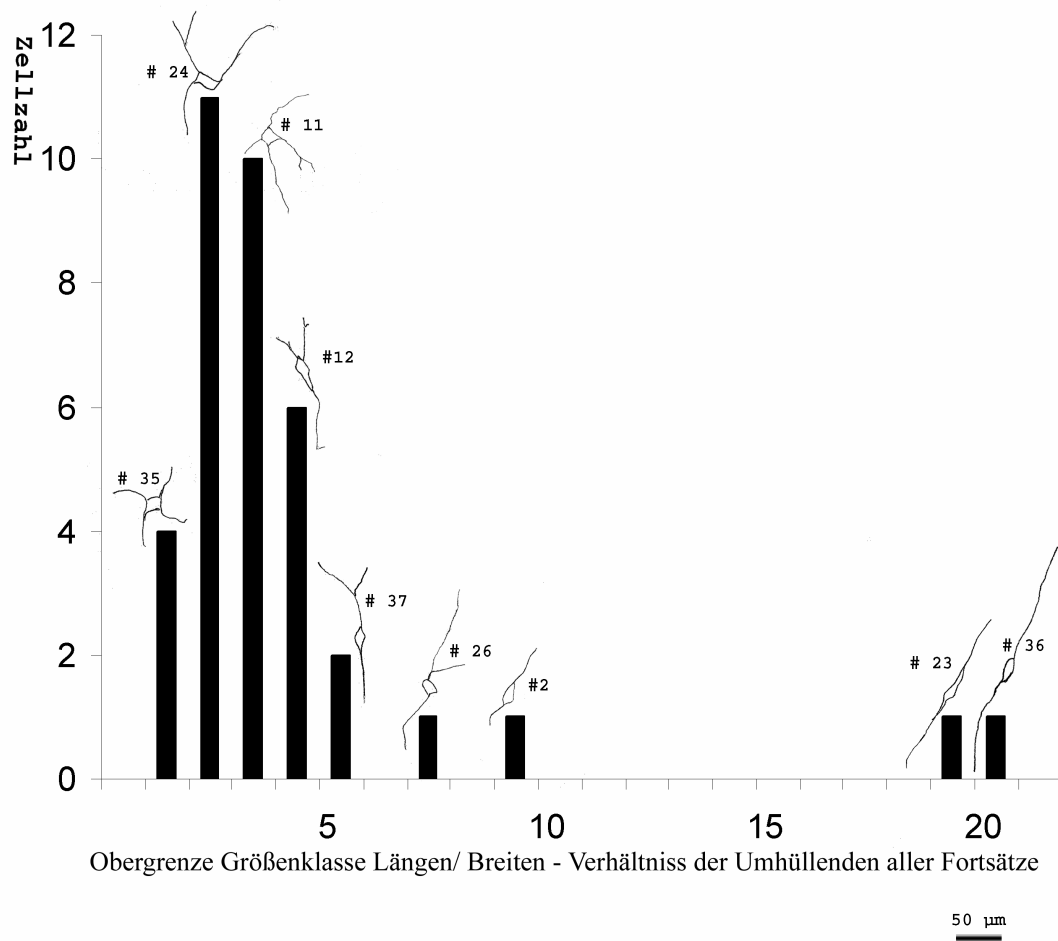


Abbildung 10

Häufigkeitsverteilung des Längen-Breiten-Verhältnisses der Umhüllenden aller Zellfortsätze, der nach der unter 2.3.4, Seite 19, beschriebenen DAB-Reaktion bei der Eule ausgewerteten Zellen. Die einzelnen Größenklassen haben jeweils eine Breite von 1. Über jeder Säule wird die Zeichnung einer für die jeweilige Größenklasse typischen Zelle gezeigt. Einen Eindruck von der Größe der Zellen vermittelt der Maßstab unten rechts. Die Ziffern neben den Zellen entsprechen der fortlaufenden Nummerierung, wie sie bei den Messungen vergeben wurden.

Zur Darstellung der Umhüllenden wurden jeweils die äußeren Punkte der Zelle beziehungsweise deren Fortsätze durch Geraden miteinander verbunden. Es wurde jeweils die längste Ausdehnung dieser Umhüllenden sowie ihre größte Ausdehnung rechtwinklig zu dieser Längsachse erfasst.

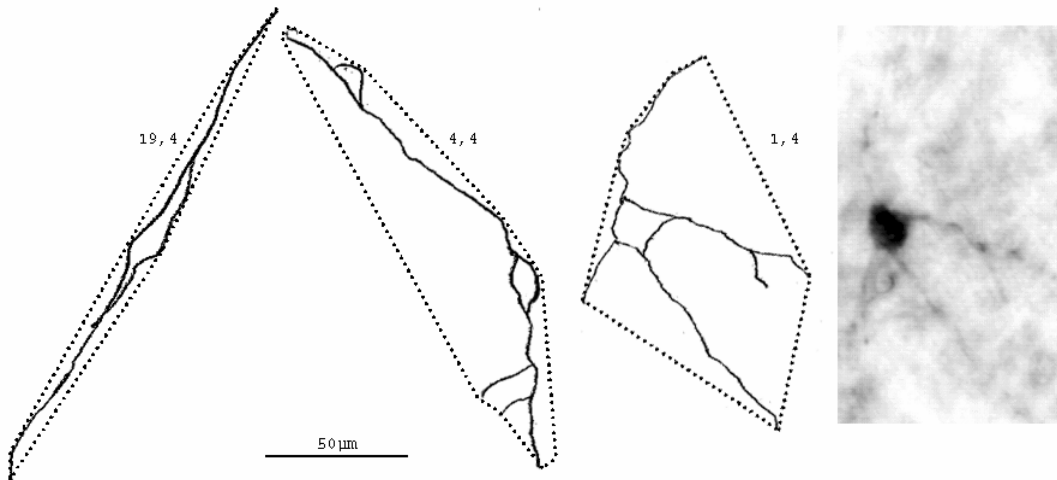


Abbildung 11

Diese Abbildung zeigt drei Beispiele für jeweils unterschiedliche Formen der durch die Zellfortsätze überspannten Fläche cochleär efferenter Zellen der Schleiereule. Die Umhüllende ist als gestrichelte Linie in die Zeichnung eingetragen, das Längen-Breitenverhältnis dieser Umhüllenden jeweils neben der entsprechenden Zelle angegeben. Die drei Zeichnungen wurden mit Hilfe eines Zeichenspiegels von dem DAB-Präparat (Eu 8) angefertigt, die rechte Zelle wurde zum Vergleich zusätzlich als digitale Fotografie abgebildet. Der 50 µm lange Eichbalken bezieht sich auf Zeichnungen und Fotografie.

Während der fotografischen Aufnahme wurde eine für die optimale Darstellung der Fortsätze geeignete Schärfenebene gewählt, der Zellkörper liegt in dieser Aufnahme außerhalb der Focusebene und ist deshalb, wie auch Teile der Fortsätze, nur unscharf wiedergegeben.

Nach der in Abbildung 10, Seite 55, gezeigten Häufigkeitsverteilung für das Längen-Breitenverhältnis der Umhüllenden würde die links dargestellte Zelle mit einem Verhältnis von 19,4 als spindelförmig, die rechts dargestellte Zelle mit einem Verhältnis von 1,4 als sternförmig klassifiziert werden. Die mittlere Zelle würde aufgrund des Längen-Breitenverhältnis von 4,4 ebenfalls als sternförmig angesehen werden.



### 3.2.3 Lage und Orientierung einzelner Zelltypen

In den Fluoreszenzpräparaten konnten sowohl stern- als auch spindelförmige Zellen in beiden efferenten Zellgruppen, VL und DM (siehe 3.1, Seite 30), beobachtet werden. Während sternförmige Zellen in beiden Gruppen etwa gleich häufig gefunden wurden, ließen sich spindelförmige Zellen außerhalb der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen nur in wenigen Einzelfällen (in denen die Zuordnung zu VL beziehungsweise DM zudem unsicher war) beobachten. Bei den durch morphometrische Messungen am Dauerpräparat erfassten Zellen ließen sich spindelförmige Zellen lediglich ventrolateral nachweisen, während sternförmige Zellen wiederum in beiden Gruppen zu finden waren. Nachdem bei diesen Messungen allerdings insgesamt nur 37 von den durchschnittlich 1068 cochleären Efferenzen (Köppl 2001) erfasst werden konnten, ist dieser Beobachtung keine große Bedeutung beizumessen.

Nach der Beschreibung von Whitehead und Morest 1981 liegen die spindelförmigen Zellen im Bereich der von dem Nucleus angularis zu der oberen Olive ziehenden Trapezfasern (vergleiche Abbildungen 2 bis 4, Seite 32 ff) und sind jeweils so orientiert, dass ihre Längsachse rechtwinklig zur Zugrichtung des Trakts liegt. Diese Aussage wird durch die vorliegenden Ergebnisse dahingehend relativiert, dass sie zwar auf die überwiegende Mehrzahl der spindelförmigen Zellen zutrifft, dass sich aber vereinzelt auch Beispiele für spindelförmige Zellen mit anderer Orientierung oder Lage finden.

Zelle	Länge Soma $\mu\text{m}$	Breite Soma $\mu\text{m}$	Fläche Soma $\mu\text{m}^2$	Umfang Soma $\mu\text{m}$	Fortsätze Anzahl	Fläche Fortsätze $\mu\text{m}^2$	Umfang Fortsätze $\mu\text{m}$	Länge Fortsätze $\mu\text{m}$	Breite Fortsätze $\mu\text{m}$	Länge/Breite Soma	Fläche/Umfang Soma	Länge/Breite Fortsätze	Fläche/Umfang Fortsätze
1	44,45	13,56	288,22	101,93	3	9058,46	638,66	290,80	54,10	3,28	2,83	5,38	14,18
2	39,28	14,51	302,40	85,56	2	9798,37	638,15	286,35	44,60	2,71	3,53	6,42	15,35
3	33,29	16,62	353,94	85,85	4	2868,65	289,98	120,56	43,67	2,00	4,12	2,76	9,89
4	50,76	16,04	564,22	129,56	5	13656,29	570,09	242,12	99,93	3,16	4,35	2,42	23,95
5	38,44	12,06	386,24	112,29	4	23532,73	801,36	336,55	138,25	3,19	3,44	2,43	29,37
6	32,13	13,77	334,60	89,65	6	12518,65	604,96	260,33	90,76	2,33	3,73	2,87	20,69
7	19,87	17,33	266,97	70,51	5	8119,81	406,13	133,49	77,11	1,15	3,79	1,73	19,99
8	22,81	9,59	129,95	56,55	2	2157,73	346,33	158,88	20,55	2,38	2,30	7,73	6,23
9	23,17	13,23	210,50	63,14	3	2343,26	246,05	76,80	61,00	1,75	3,33	1,26	9,52

Tabelle 2

In dieser Tabelle sind die Messwerte, sowie die daraus errechneten Verhältnisse für alle am Fluoreszenzpräparat vom Huhn morphometrisch ausgewerteten Zellen zusammengefasst. Die fortlaufende Nummerierung in der ersten Spalte wurde während der Messungen vergeben.

### **3.3 Bilateral projizierende cochleäre Efferenzen**

Die meisten auditorischen Efferenzen kontaktieren nur eines der beiden Innenohren. Die zu einem Ohr projizierenden Zellen sind annähernd gleichmäßig auf die ipsi- und die kontralaterale Seite des Stammhirns verteilt, wobei die Zellzahl auf der kontralateralen Seite geringfügig höher ist als auf der ipsilateralen Seite (siehe Tabelle 1, Seite 36).

Zellen, die in direktem Kontakt zu beiden Ohren stehen, sind selten. Während Cole und Gummer (1990) diese Zellen im Huhn nicht nachweisen konnten, gelang es Schwarz et al. (1992) zwei Jahre später, ebenfalls im Huhn, solche bilateral projizierenden Zellen anzufärben. Daten über bilaterale auditorische Efferenzen von anderen Archosauriern als dem Huhn waren zu Beginn dieser Arbeiten nicht verfügbar.

Die in diesem Kapitel dargestellten Daten wurden bereits veröffentlicht (Raabe und Köppl 2003).

Beispiele für bilateral projizierende Zellen der Eule sind in Abbildung 12, Seite 61 dargestellt.

#### 3.3.1 Lage und Anzahl bilateral projizierender Efferenzen

Von den durchschnittlich 451 pro Tracerinjektion beim Huhn gefärbten Zellen enthielt durchschnittlich eine Zelle beide Tracer. In einem Huhn (Hu 42) waren zwei Zellen der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen jeweils ipsilateral zur Cholera-toxin B (CtB) – und kontralateral zur Fluorogold (FG) – Injektion mit beiden Farbstoffen markiert. Bei einem weiteren Huhn (Hu 43) wurde eine doppelmarkierte Zelle ipsilateral zum CtB – und kontralateral zum FG – behandelten Ohr in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen nachgewiesen. Beim dritten untersuchten Huhn (Hu 46) konnten keine bilateral projizierenden Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil bilateral projizierender Zellen an den im jeweiligen Tier maximal mit einem Tracer markierten Zellen betrug für alle drei Tiere zusammengefasst durchschnittlich 0,28%.

Bei den fünf daraufhin untersuchten Eulen konnten bilateral projizierende Zellen in allen Präparaten nachgewiesen werden. Der Anteil doppelmarkierter Zellen an der maximal mit

einem Tracer markierten Zellpopulation betrug im Durchschnitt 0,9%, wobei der minimale Anteil 0,25% (Eu 16) und der maximale Anteil 1,95% (Eu 14) betrug.

Bilateral projizierende Zellen wurden in der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen (VL) aller Tiere gefunden. Die dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen (DM) enthielt dagegen lediglich bei zwei der fünf Tiere mit beiden Tracern markierte Zellen. Damit wurden pro Versuch in VL durchschnittlich 8,2 bilateral projizierende Zellen gefunden. DM enthielt durchschnittlich 0,4 mit beiden Tracern markierte Zellen..

Eine Übersicht über die Zahlen bilateral projizierender Efferenzen in den cochleär efferenten Gruppen aller Tiere bietet Tabelle 3.

Tier	Anzahl FG-markierte Zellen	Anzahl CtB-markierte Zellen	Anzahl doppelmarkierte Zellen			Relativer Anteil doppelmarkierter Zellen [% der zu einem Ohr projizierenden Zellen]
			VL	DM	Gesamt	
Eu 12	569	1121	19	0	19	1,69
Eu 14	691	759	15	0	15	1,98
Eu 15	329	1109	0	2	2	0,18
Eu 16	875	677	3	1	4	0,46
Eu 17	655	1162	5	1	6	0,52
Hu 42	621	309	2	0	2	0,32
Hu 43	397	515	0	1	1	0,19
Hu 46	531	335	0	0	0	0,00

Tabelle 3:

Zellzahlen cochleärer Efferenzen aller auf bilateral projizierende Zellen untersuchter Tiere. Die Zahlen sind für jede einzelne Tracerinjektion separat angegeben (Spalten 2 und 3). Fluorogold (FG) wurde jeweils in den linken, Cholaratoxin B (CtB) jeweils in den rechten cochleären Gang injiziert. Die Anzahl der doppelmarkierten Zellen wurde jeweils für die ventrolaterale (VL) und die dorsomediale (DM) Gruppe cochleärer Efferenzen getrennt angegeben. Der Berechnung des Anteils bilateral projizierender Zellen (letzte Spalte) liegt jeweils die größere Zahl der im jeweiligen Tier mit einem der beiden Tracer markierten Zellen zugrunde. Bezogen auf den jeweils anderen Tracer liegt der Anteil bilateral projizierender Zellen mit bis zu 3,3% deutlich höher.

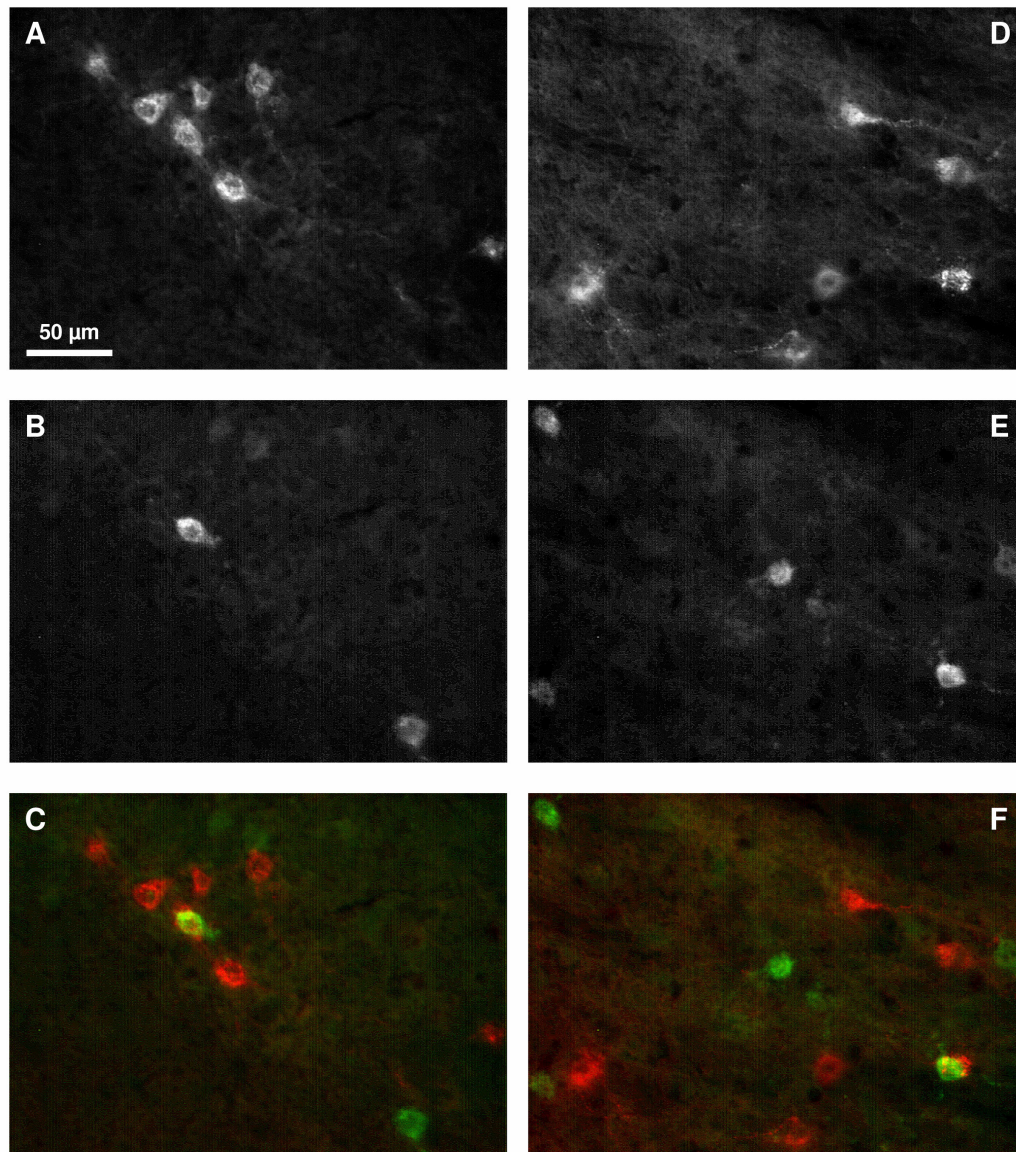


Abbildung 12

Hier werden zwei Beispiele (A bis C und D bis F) für doppelmarkierte Zellen im Stammhirn der Eule gezeigt. Die Tafeln A und D zeigen auf digital durch entsprechende Fluoreszenzfilter fotografierten Schwarzweißbildern Choleratoxin B (CtB) – markierte Zellen. Die Tafeln B und E zeigen Fluorogold (FG) – markierte Zellen für jeweils den gleichen Ausschnitt wie in A beziehungsweise B. Auf den Tafeln C und F sind die Darstellungen der unterschiedlichen Tracer kombiniert. In dieser Darstellung wurde CtB rot und FG grün codiert. Bei allen Aufnahmen wurden Schärfe, Kontrast und Helligkeit auf eine bestmögliche Druckqualität hin optimiert. Der in A gezeigte Eichbalken bezieht sich auf alle hier dargestellten Tafeln.

### **3.4 Methodologische Aspekte**

#### 3.4.1 Färbungen nicht cochleär efferenter Strukturen

Ein in den cochleären Gang injizierter Tracer markiert neben den in dieser Arbeit behandelten cochleär efferenten Zellen weitere neuronale Strukturen. In erster Linie sind in diesem Zusammenhang cochleäre Afferenzen zu erwähnen, wobei aber auch andere Strukturen im Stammhirn angefärbt werden können.

#### Färbungen der aufsteigenden Hörbahn

Die Färbung in den Axonen des Hörnervs und in den primären auditorischen Kerngebieten, Nucleus angularis und Nucleus magnocellularis, fielen mit Cholera-toxin B in allen Präparaten deutlich schwächer aus als die entsprechenden Färbungen mit Fluorogold.

Besonders deutlich wurde dieser Unterschied im Hörnerv. Während im Nerven des mit Fluorogold behandelten Ohres stets eine deutliche Markierung beobachtet wurde, lag die entsprechende Färbung des Nerven, der das mit Cholera-toxin behandelte Ohr versorgt, stets nahe an der Grenze zur Nachweisbarkeit. Ein Beispiel für mit Fluorogold markierte Axone im Hörnerv ist in Abbildung 13 C, Seite 65, gezeigt.

In einigen Fällen gelang es, das cochleäre Ganglion bei der Präparation zu erhalten. In diesen Fällen war bei beiden Tracern eine deutliche Färbung der afferenten Zellkörper zu beobachten

Die Synapsen der auditorischen Afferenzen ließen sich mit beiden Tracern jeweils im gesamten, ipsilateral zur Tracerinjektion gelegenen Nucleus angularis anfärben. Bei zwei der fünf in dieser Arbeit vorgestellten mit Fluorogold behandelten Eulen (Eu 15 und Eu 17) war die Dichte der mit Fluorogold gefärbten afferenten Synapsen im ventralen Teil des Nucleus angularis geringfügig höher als im übrigen Kerngebiet. In diesen Fällen waren im ventralen Teil des Nucleus angularis zusätzlich Zellkörper markiert. Beispiele für diese Färbungen werden in Abbildung 13 A und B gezeigt. Die gleiche Beobachtung wurde bei einigen der in Vorversuchen getesteten Hühnern gemacht.

Die Färbungen im zweiten, direkt von den cochleär afferenten Zellen kontaktierten Kerngebiet, dem Nucleus magnocellularis, fiel stets deutlich schwächer aus.

Afferente Axone konnten mit beiden Tracern jeweils im gesamten Kerngebiet nachgewiesen werden. Die für den Nucleus magnocellularis charakteristischen großen, becherförmigen Synapsen konnten jedoch nur in einer Eule (Eu 15) und einem Huhn (Hu 42), und nur mit dem Cholera-toxin – Nachweis dargestellt werden. Gefärbte Zellkörper konnten im Nucleus magnocellularis nicht beobachtet werden. Ein Beispiel für Färbungen der Synapsen im Nucleus magnocellularis zeigt Abbildung 13 D.

In den Synapsen und Zellen des Nucleus laminaris, der direkten Eingang von den Zellen des Nucleus magnocellularis erhält, konnte keiner der beiden Tracer zweifelsfrei nachgewiesen werden.

In der oberen Olive, zu der die Zellen des Nucleus angularis projizieren, wurden bei Huhn 42 und bei den Eulen 12 und 14 vereinzelt mit Fluorogold beziehungsweise mit Cholera-toxin B gefärbte Axone beobachtet. Ob diese Axone zu Zellen der aufsteigenden Hörbahn gehören oder ob es sich hierbei um Fortsätze cochleär efferenter Zellen handelt, konnte nicht festgestellt werden. Gefärbte Synapsen wurden hier nicht beobachtet.

#### Färbungen nicht auditorischer Strukturen

In etwa der Hälfte aller Versuche führte die Cholera-toxin B – Injektion zu einer Markierung von Zellen im Motorkern des Abducens - Nerven.

In den Fällen, in denen sich eine Färbung im Motorkern des Abducens – Nerven beobachten ließ, waren stets Zellen im gesamten Kerngebiet deutlich gefärbt. Während sich die Färbung im Motorkern des Abducens - Nerven in der Regel auf die ipsilateral zur Injektion gelegene Stammhirnhälfte beschränkte, war bei einer Eule (Eu 15) der kontralaterale Abducens - Motorkern ebenfalls gefärbt. Ein Beispiel für diese Färbungen wird in Abbildung 13 F gezeigt.

Bei den Eulen 15 und 17 sowie bei einem in den Vorversuchen getesteten Huhn wurden Choleratoxin B - positive Zellen in dem ipsilateral zu Injektion gelegenen Nucleus vestibularis dorsolateralis gefunden. Ein bei Eule 15 fotografiertes Beispiel für diese Markierungen ist in Abbildung 13 E dargestellt.

Zellen der in der Nähe der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen gelegenen Facialiskerne schienen nicht gefärbt zu sein. Die Abgrenzung gegenüber auditorischen Zellen erfolgte zum einen über die Größe der Zellkörper (Facialis- Motorneurone sind deutlich größer als cochleär efferente Zellen) und zum anderen wurde versucht die Lage der Facialiskerne in dem jeweiligen Präparat zu identifizieren und festzustellen ob sich markierte Zellen innerhalb dieser Kerngebiete befanden. Dies war aufgrund der unzureichenden Allgemeinfärbung in den Fluoreszenzpräparaten jedoch nicht in allen Fällen möglich.

Fluorogold führte in keinem Fall zu Färbungen nicht auditorischer Kerngebiete im Stammhirn.



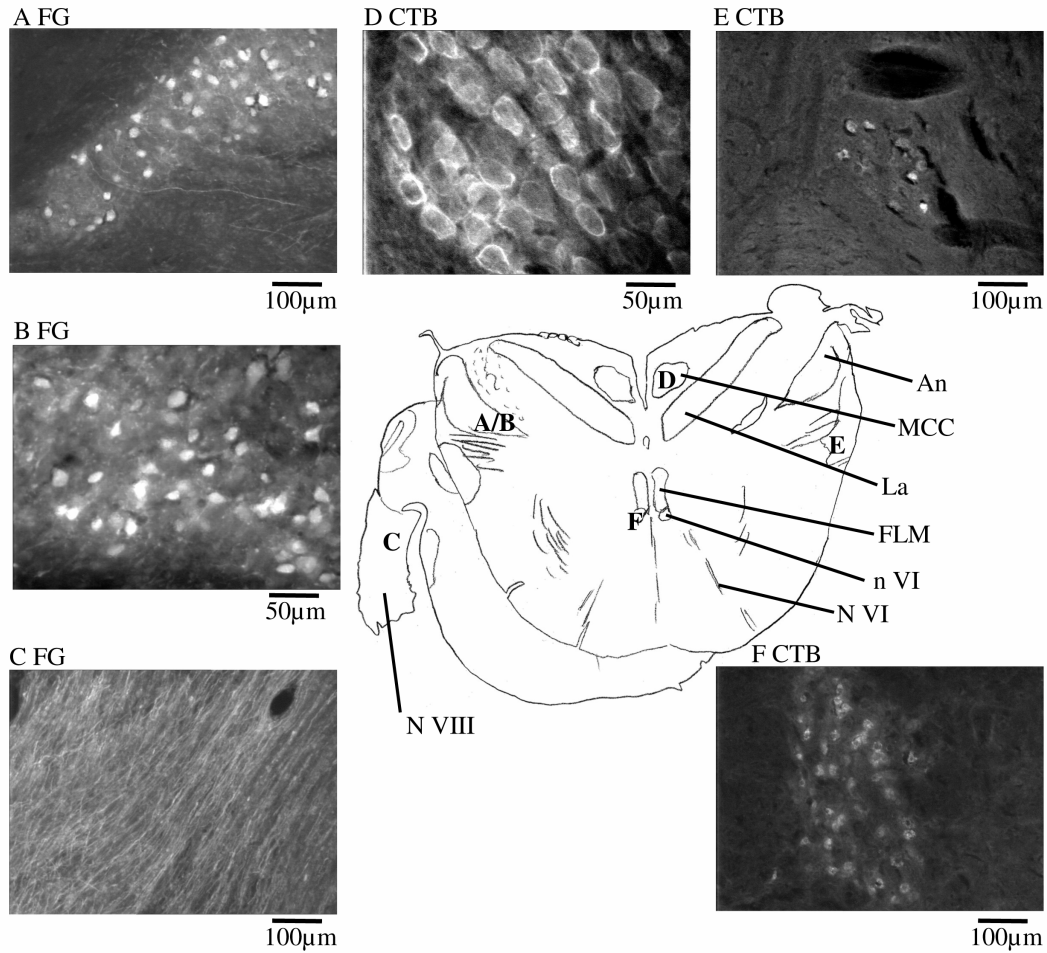


Abbildung 13

Die Abbildung zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von durch eine Tracerinjektion in den cochleären Gang der Eule angefärbten nicht efferenten Strukturen.

Alle hier gezeigten Aufnahmen stammen aus Eule 15. Der jeweils verwendete Tracer ist oben links, der Abbildungsmaßstab unten rechts neben der jeweiligen Fotografie angegeben. Die Schemazeichnung in der Mitte der Abbildung gibt Auskunft über die ungefähre Position im Stammhirn. Für einen detaillierteren Überblick über die Anatomie des Stammhirns siehe Abbildung 2 und 3, Seite 32 f. Die in die Schemazeichnung eingetragenen Buchstaben A bis F geben die ungefähre Position wieder, an der die mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnete Fotografie aufgenommen wurde. Tafel C zeigt mit Fluorogold (FG) angefärbte Axone im ipsilateral zur Injektion gelegenen Hörnerven. Im Nucleus angularis angefärbte Axone und Zellkörper sind auf den Tafeln A und B wiedergegeben. Der Nachweis von Cholera toxin B (CtB) in den Synapsen des ipsilateralen Nucleus magnocellularis ist auf Tafel D dargestellt. Tafel F zeigt CtB-positive Zellen im Motorkern des Abducens - Nerven, Tafel E CtB-positive Zellen im Nucleus vestibularis dorsolateralis. Bei allen Aufnahmen wurden Schärfe, Kontrast und Helligkeit auf eine bestmögliche Druckqualität hin optimiert.

An – Nucleus angularis, FLM – Fasciculus longitudinalis medialis, La Nucleus laminaris, MCC – Nucleus magnocellularis cochlearis, nVI – Nervus abducens, NVI – Nucleus nervi abducentis

## Allgemeine Beobachtungen

In Vorversuchen zur Etablierung der Methode wurde eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Ototoxizität von Fluorogold festgestellt. Bei Hühnern, denen mehr als drei  $\mu\text{l}$  einer fünfprozentigen Fluorogoldlösung in den cochleären Gang injiziert wurde, traten schwere Beeinträchtigungen des Gleichgewichtssinnes auf. Diese Tiere waren nicht mehr in der Lage, eine aufrechte Haltung einzunehmen oder auf einer Sitzstange zu balancieren. Bei der Präparation dieser Tiere fiel auf, dass das mit Fluorogold behandelte Ohr mit Blut gefüllt und das Tegmentum vasculosum stark beschädigt sowie unzureichend fixiert war. Das bei der Präparation im cochleären Gang gefundene Blut ist höchstwahrscheinlich auf die Schäden am Tegmentum vasculosum zurückzuführen. Für Cholaratoxin B konnten diese Nebenwirkungen nicht beobachtet werden.

## 4 Diskussion

Um die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten interpretieren zu können, sind zwei grundlegende Fragen zu klären, ohne deren Beantwortung die weiterführende Deutung der in dieser Arbeit vorgestellten Daten mit einer großen Unsicherheit behaftet bleibt:

1.) Die Anzahl der in Tracingversuchen markierten Zellen ist zunächst einmal abhängig von der Aufnahme des Tracers in die jeweiligen Zellen und dessen Transport in den einzelnen Neuronen. Ein weiteres Problem stellt die Detektion des Tracers dar. Ungeeignete oder unempfindliche Methoden können hier zu einem nur unvollständigen Nachweis führen. Entsprechend groß ist die bei diesen Versuchen auftretende Unsicherheit bezüglich der Anzahl der tatsächlich vorhandenen Zellen. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode wurden jeweils wenige Mikroliter Tracer-Lösung in die Scala tympani des Innenohrs injiziert. Eine gleichmäßige Verteilung des Tracers im gesamten cochleären Gang ist die Voraussetzung für eine gleichmäßige Markierung aller cochleären Efferenzen. Deshalb muss in diesem Zusammenhang zunächst geprüft werden, ob die vorgefundenen Zellzahlen und -positionen die Anatomie der cochleären Efferenzen korrekt widerspiegeln oder ob die Befunde durch die gewählte Methodik wesentlich beeinflusst wurden.

2.) Bei allen Nicht - Säugetieren befindet sich am Ende des cochleären Ganges ein Vestibularorgan: die Macula lagena. Es existieren keine Strukturen, die das Hörepithel und die Macula lagena voneinander trennen. Deshalb führt eine Tracerinjektion in den cochleären Gang zwangsläufig zu einer Markierung sowohl der die Macula lagena versorgenden vestibulären als auch der die Papilla basilaris versorgenden auditorischen Efferenzen. Efferenzen, die sowohl die Papilla basilaris als auch die Macula lagena kontaktieren, scheint es beim Vogel nicht zu geben (Kaiser und Manley 1996). Das in der vorliegenden Arbeit gewählte experimentelle Vorgehen erlaubt es also nicht, direkt zwischen auditorischen und vestibulären Efferenzen zu unterscheiden. Hier ist zu klären,

in wieweit eine Zuordnung der in dieser Arbeit beschriebenen cochleären Efferenzen zu dem auditorischen, beziehungsweise dem vestibulären efferenten System möglich ist.

## **4.1 Bewertung des Färbeerfolgs**

### 4.1.1 Anzahl der durch die Tracerinjektionen gefärbten cochleären Efferenzen

In den hier vorgestellten Experimenten wurden mit einer Tracerinjektion in die Scala tympani beim Huhn durchschnittlich 451, bei der Eule durchschnittlich 724 cochleär efferente Zellen markiert.

In einer von Tracingversuchen unabhängigen Studie (Köppl 2001) wurden im Hörnerv der Schleiereule pro Ohr zwischen 1003 und 1420, durchschnittlich 1200 cochleär efferente Axone gezählt. Im Hörnerv des Huhns zählte Köppl (2001) zwischen 274 und 420 im Durchschnitt 343 cochleär efferente Axone. Diese Zählungen erfassen alle im Hörnerv vorhandenen Efferenzen und stellen daher ein verlässliches Maß für die Anzahl cochleärer Efferenzen in beiden Arten dar.

Die bei der Eule beobachteten Zellzahlen entsprachen lediglich bei drei von 14 Tracerinjektionen dem nach den Axonzählungen im Hörnerv (Köppl 2001) zu erwartenden Wert zwischen 1003 und 1420 Zellen. In den übrigen elf Fällen wurden zum Teil deutlich weniger Zellen markiert. Das zeigt, dass in diesen Fällen lediglich ein Teil der cochleär efferenten Zellen markiert werden konnte.

Die drei Tracerinjektionen, die zu der erwarteten Anzahl markierter Zellen führten, geben demnach die Lage, die Anzahl und die relative Größe der einzelnen Gruppen cochleär efferenter Zellen am verlässlichsten wieder. Diese Injektionen sind an den Tieren Eu 12, Eu 15 und Eu 17 vorgenommen worden.

Beim Huhn lag die Anzahl der markierten Zellen bei drei der sechs Tracerinjektionen in dem nach den Axonzählungen im Hörnerv zu erwartenden Bereich. Die übrigen drei Tracerinjektionen am Huhn führten zu erheblich höheren Zellzahlen. In Huhn 42 wurden mit einer Fluorogold – Injektion in ein Ohr 621 Zellen markiert. In diesen Fällen muss

davon ausgegangen werden, dass Tracer aus dem cochleären Gang in das Labyrinth gelangt ist, wo Neurone der Statolithen – und Bogengangs – Organe gefärbt wurden. Die Efferenzen dieser Vestibularorgane liegen in dem von den cochleären Efferenzen im Stammhirn beanspruchten Gebiet innerhalb des Hirnstamms. Ein Ansatz zur Unterscheidung zwischen auditorischen und vestibulären Efferenzen wird unter 4.2, Seite 73 ff, diskutiert.

Tatsächlich führte bei Vorversuchen zur Etablierung der Methode eine Injektion von mit Meerrettichperoxidase gekoppeltem Weizenkeimagglutinin in die Scala tympani zu einer deutlichen Färbung in Axonen und Synapsen des Utrikulus und der Ampullen aller drei Bogengänge. Inwieweit sich diese Beobachtung auf die letztendlich in dieser Arbeit verwendeten Tracer übertragen lässt, bleibt allerdings spekulativ.

Die unerwartet hohe Zahl markierter Zellen bei den Hühnern ist insofern problematisch, als an Taube und Huhn durchgeführte Tracingversuche (Dickman und Correia 1992; Dickman und Fang 1996; Schwarz et al. 1978; Schwarz et al. 1981; Strutz und Schmidt 1982) zeigen, dass die Efferenzen verschiedener Vestibularorgane in der in dieser Arbeit beschriebenen dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen liegen.

Da sich die Zellkörper der Efferenzen der Bogengänge und die Zellkörper der cochleären Efferenzen in den Schnitten durch das Stammhirn nicht sicher unterscheiden lassen, ist davon auszugehen, dass die Zahl der cochleären Efferenzen in der dorsomedialen Gruppe, zumindest in den Fällen, in denen die Anzahl der insgesamt gefärbten Zellen über dem nach den Axonzählungen im Hörnerv (Köppl 2001) zu erwartenden Wert liegt, deutlich überschätzt wurde.

Aufgrund der bei der Eule beobachteten Zellzahlen kann davon ausgegangen werden, dass unfreiwillige Färbungen vestibulärer Efferenzen bei der Eule eine weit geringere Rolle spielen als beim Huhn.

Der insgesamt schlechtere Färbeerfolg bei der Eule lässt sich wahrscheinlich auf eine wesentlich größere Papilla basilaris zurückführen. So beträgt die Länge des Hörepthels im lebenden Huhn etwa 4,9 mm (Gleich und Manley 2000) während es bei der Eule etwa 12 mm misst (Fischer et al. 1988).

#### 4.1.2 Färbungen im Nucleus angularis

Neben dem Vergleich zwischen der Anzahl der in den einzelnen Versuchen markierten Efferenzen und der von der Zählung efferenter Axone im Hörnerv bekannten Gesamtzahl cochleärer Efferenzen bietet auch die Färbung cochleär afferenter Strukturen eine Möglichkeit, den Erfolg der einzelnen Tracerinjektionen abzuschätzen. Als besonders hilfreich hat sich in diesem Zusammenhang die Betrachtung afferenter Synapsen im Nucleus angularis erwiesen.

Sowohl die Papilla basilaris als auch der Nucleus angularis sind streng tonotop organisiert. Tiefe Frequenzen sind auf dem apikalen Ende der Papilla basilaris, hohe auf deren basalen Ende repräsentiert (Gleich und Manley 2000). Diese Repräsentation bleibt auf der Ebene des Nucleus angularis erhalten. Hohe Frequenzen sind im dorsolateralen, tiefe Frequenzen im ventromedialen Teil des Nucleus angularis repräsentiert (Köppl 2001). Die Verteilung der mit der jeweiligen Tracerinjektion markierten afferenten Synapsen im Nucleus angularis lässt demnach Rückschlüsse auf die Verteilung des Tracers über dem Hörepithel zu.

Transsynaptisch gefärbte Zellkörper konnten nur bei einigen Tieren und nur in den tieffrequenten Regionen des Nucleus angularis beobachtet werden. Diese Beobachtung kann dahingehend interpretiert werden, dass die Tracerkonzentration am tieffrequenten (apikalen) Ende der Papilla basilaris geringfügig höher war als in den übrigen Bereichen des cochleären Ganges. Dies würde auf einen Transport des Tracers von dem basal gelegenen Ort der Tracerinjektion in Richtung auf das apikale Ende der Cochlea hindeuten.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, darauf hinzuweisen, dass die Zellen in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen in einigen Präparaten kräftiger gefärbt schienen als in der ventrolateralen Gruppe. Efferenzen, die zur Macula lagena, einem Vestibularorgan am apikalen Ende der Papilla basilaris projizieren, liegen ebenfalls in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen (Code 1995; Kaiser und Manley 1996). Die Möglichkeiten, in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen zwischen vestibulären und auditorischen Efferenzen zu unterscheiden, sind unter 4.2, Seite 72 ff,

ausführlich diskutiert. In wieweit ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der anscheinend leicht erhöhten Tracerkonzentration am apikalen Ende der Cochlea und der Intensität der Markierungen in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen besteht, kann an Hand der vorliegenden Daten allerdings nicht abschließend geklärt werden.

Da sowohl bei der Eule als auch beim Huhn stets Synapsen im gesamten Nucleus angularis gefärbt waren, ist davon auszugehen, dass sich die verwendeten Tracer in der gesamten Scala tympani verteilt haben. Eine auf bestimmte Regionen der Cochlea beschränkte Markierung efferenter Zellen kann demnach ausgeschlossen werden. Allerdings sollte nach dem im vorherigen Absatz Gesagten beachtet werden, dass eine Überrepräsentation apikaler und lagenärer Efferenzen in den Versuchen in denen lediglich ein Teil der zu erwartenden Efferenzen dargestellt werden konnte wahrscheinlich ist.

#### 4.1.3 Färbungen nicht auditorischer Strukturen

Neben den nach einer Tracerinjektion in die Scala tympani zu erwartenden Färbungen afferenter und efferenter auditorischer Strukturen wurden mit Cholera-Toxin B in etwa der Hälfte aller Fälle Neurone des Abducens – Kerns, und bei zwei Eulen Neurone des Nucleus vestibularis dorsolateralis angefärbt.

Für Säugetiere ist eine Projektion utrikulärer Afferenzen in den Abducens - Kern beschrieben (Übersicht in Büttner-Ennever 1999). Obwohl eine derartige Verbindung bei Vögeln bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ist deren Existenz wahrscheinlich (Dickman und Fang 1996). Die im Motorkern des Abducens - Nerven beobachtete Färbung wäre demnach darauf zurückzuführen, das Tracer aus der Scala tympani in den Utriculus gelangt ist, wo er von afferenten Neuronen aufgenommen und in Richtung Abducens – Kern transportiert wurde.

Der Nucleus vestibularis dorsolateralis wird von den Afferenzen aller drei Bogengänge, des Sacculus, des Utriculus und zu einem kleinen Teil auch der Lagena kontaktiert (Dickman und Correia 1992; Dickman und Fang 1996). Auf welche der genannten vestibulären Afferenzen die im Nucleus vestibularis dorsolateralis beobachtete Färbung

zurückzuführen ist, kann bestenfalls indirekt beantwortet werden: Alle vestibulären Efferenzen liegen in demselben Gebiet innerhalb des Stammhirns, wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen (Dickman, und Fang 1996; Schwarz et al. 1978; Schwarz et al. 1981; Strutz und Schmidt 1982).

Zu Beginn dieser Diskussion wurde darauf hingewiesen, dass eine Tracerinjektion in den cochleären Gang zwangsläufig zu einer Markierung sowohl auditorischer als auch lagenärer Efferenzen führen muss. Aufgrund von Zählungen cochleär efferenter Axone im Hörnerv (Köppl 2001), ist bekannt, dass bei der Schleiereule etwa 131 lagenäre und 1069 auditorische Efferenzen zu erwarten sind. Unter 4.2 wird ausführlich begründet, dass es sich bei der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen (DM) mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine rein vestibuläre, bei der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen (VL) um eine rein auditorische Zellpopulation handelt. Beschränkt sich die Markierung bei den Tieren auf den cochleären Gang und ist die Färbung weitgehend vollständig, sollten die Zellzahlen in DM und VL in etwa der Anzahl der im Hörnerv gezählten lagenär (131) beziehungsweise auditorisch (1069) efferenten Axone entsprechen. Liegt die Zellzahl in DM deutlich über dem zu erwartenden Wert von circa 130 Zellen, deutete dies auf eine Färbung zusätzlicher (z.B. utrikulärer) vestibulärer Efferenzen hin. In den Eulen, in denen gefärbte Zellen im Nucleus vestibularis dorsolateralis beobachtet wurden, lag die Zellzahl in DM bei 104 (Eu 17), beziehungsweise 157 (Eu 15). Die Zellzahl in VL betrug 952 (Eu15) und 1058 (Eu 17). Aufgrund dieser Zahlenverhältnisse kann davon ausgegangen werden, dass die im Nucleus vestibularis dorsolateralis gefärbten Zellen über lagenäre Afferenzen markiert wurden.

#### 4.1.4 Zusammenfassung von 4.1 – Bewertung des Färbeerfolgs.

Die Frage inwieweit die vorgestellten Ergebnisse durch die gewählte Methode systematisch beeinflusst wurden, lässt sich folgendermaßen beantworten:

Beide in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Tracer haben sich über die gesamte Papilla basilaris ausgebreitet und wurden über die ganze Länge des Hörepithels von afferenten Zellen aufgenommen. Eine selektive Färbung einer bestimmten Population auditorischer Efferenzen kann demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.



Bei der Schleiereule muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Tracerinjektionen zu einer vollständigen Färbung aller cochleär efferenten Zellen geführt haben. Die tatsächlichen anatomischen Verhältnisse werden durch die Versuche in denen mit einer Tracerinjektion mehr als 1000 Zellen markiert wurden am zuverlässigsten wiedergegeben. Eine unfreiwillige Markierung nicht cochleärer Efferenzen scheint bei der Schleiereule keine wesentliche Rolle zu spielen.

Beim Huhn kann davon ausgegangen werden, dass mit jeder Tracerinjektion alle cochleär efferenten Zellen markiert werden konnten. Die unfreiwillige Markierung nicht cochleärer Efferenzen führt beim Huhn in einigen Fällen zu Ergebnissen die die Anzahl cochleärer Efferenzen in der dorsomedialen Gruppe massiv überschätzen. Hier empfiehlt es sich die Anzahl cochleär efferenter Zellen in der dorsomedialen Zellgruppe entsprechend nach unten zu korrigieren.

## **4.2 Unterscheidung zwischen vestibulären und auditorischen Efferenzen**

Wie bereits erwähnt, kann eine Färbung lagenärer (vestibulärer) Efferenzen bei der hier verwandten Methode zum Nachweis auditorischer Efferenzen im Stammhirn nicht verhindert werden. Eine weitere Ausbreitung des Tracers in das Labyrinth, und damit die Markierung weiterer vestibulärer Efferenzen kann, wie unter 4.1 gezeigt, ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Im folgenden soll nun geklärt werden, inwieweit eine Unterscheidung der in den vorgestellten Experimenten markierten auditorischen von den ebenfalls markierten vestibulären Efferenzen möglich ist.

### 4.2.1 Lage vestibulärer Efferenzen

Aus Tracingversuchen mit dem Farbstoff DiI an fixierten Hühnerembryonen (Code 1995; Kaiser und Manley 1996) ist bekannt, dass die vestibulären Efferenzen zur Macula lagena ausschließlich in der dorsomedialen und niemals in der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen liegen. Die Efferenzen anderer Vestibularorgane, wie zum Beispiel der Ampullen der Bogengänge, liegen ebenfalls ausschließlich in dem für die dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen beschriebenen Areal des Stammhirns (Dickman und

Correia 1992; Dickman und Fang 1996; Schwarz et al. 1978; Schwarz et al. 1981; Strutz und Schmidt 1982).

Efferente Axone, die sowohl Zellen der Papilla basilaris als auch der Macula lagena kontaktieren, scheint es nicht zu geben (Kaiser und Manley 1996).

Aufgrund dieser Beobachtungen muss davon ausgegangen werden, dass sich die ventrolaterale Gruppe cochleärer Efferenzen ausschließlich aus auditorischen Efferenzen zusammensetzt. Ob, beziehungsweise in wie weit, die dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen neben vestibulären auch auditorische Efferenzen enthält, kann allein aufgrund des bisher Gesagten nicht abschließend beantwortet werden.

Um diese Frage zu klären ist es sinnvoll, die Anzahl efferenter Neurone in der ventrolateralen und der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen zu betrachten.

#### 4.2.2 Anzahl der Zellen in der ventrolateralen und der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen

Axonzählungen in Querschnitten des Hörnervs haben ergeben, dass die Macula lagena der Eule von etwa 131, die Papilla basilaris der Eule von etwa 1069 efferenten Axonen innerviert wird (Köppl 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen (DM) durchschnittlich 148, in der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen (VL) durchschnittlich 557 Zellen gefunden (siehe Tabelle 1, Seite 36).

Nimmt man an, dass die Färbungen vestibulärer Efferenzen sich auf Efferenzen der Macula lagena beschränken und dass es sich bei der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen (DM) ausschließlich um vestibuläre Efferenzen handle, wäre zu erwarten, dass die Zahl der in DM gefärbten Efferenzen der im Hörnerv beobachteten Zahl lagenärer Efferenzen entspricht. Eine Färbung weiterer, zum Beispiel utrikulärer, Efferenzen würde in diesem Szenario zu höheren Zellzahlen in DM führen. Die in der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen (VL) beobachtete Zellzahl müsste in diesem Fall idealerweise der von Köppl (2001) beschriebenen Anzahl auditorisch efferenter Axone entsprechen.

Bei den hier vorgestellten Versuchen wurden in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen im Durchschnitt geringfügig höhere Zellzahlen gefunden als unter der oben gemachten Annahme zu erwarten gewesen wäre.

Unter der selben Annahme fielen die in VL beobachteten Zellzahlen deutlich geringer aus als erwartet (siehe Tabelle 1, Seite 36).

Die in der ventrolateralen und der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen der Schleiereule gefundenen Zellzahlen lassen sich dennoch gut mit der Vorstellung einer rein vestibulären dorsomedialen Gruppe vereinbaren. Der in DM gefundene Unterschied zwischen der in der Arbeit von Köppl (2001) präsentierten Zahl für die Anzahl lagenärer Efferenzen und den in dieser Arbeit vorgestellten Zellzahlen in DM ist angesichts der in beiden Arbeiten zu beobachtenden Streuung der Daten nicht signifikant, besonders wenn unbeabsichtigte Färbungen nicht lagenärer vestibulärer Efferenzen ebenfalls mit berücksichtigt werden.

Der Unterschied in der Anzahl auditorisch efferenter Axone im Hörnerven und der Anzahl der in VL gefundenen efferenten Zellkörper lässt sich gut mit einer unvollständigen Markierung dieser Zellen in den Tracingversuchen erklären, wie unter 4.1 ausgeführt. Zieht man für den Vergleich lediglich die Tracerinjektionen, bei denen jeweils mehr als 1000 Zellen markiert wurden, heran, lässt sich auch zwischen der Anzahl auditorisch efferenter Axone im Hörnerv und den in VL beobachteten Zellzahlen kein signifikanter Unterschied mehr erkennen.

Damit kann die Existenz auditorischer Efferenzen in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen der Schleiereule zwar nicht sicher ausgeschlossen werden, erscheint aber als sehr unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu der Situation bei der Schleiereule sind die Verhältnisse im Huhn nicht so eindeutig. Die bei der Schleiereule festgestellte Beziehung zwischen der Anzahl auditorisch, beziehungsweise vestibulär efferenter Axone im Hörnerven und der Anzahl der in VL beziehungsweise DM beobachteten efferenten Zellkörper, lässt sich anhand der in dieser Arbeit ermittelten Zellzahlen nicht eindeutig nachvollziehen:

Bei Axonzählungen im Hörnerven des Huhns fand (Köppl 2001) 223 vestibuläre und 120 auditorische Efferenzen.

Demgegenüber wurden bei den hier vorgestellten Experimenten beim Huhn DM durchschnittlich 188, VL durchschnittlich 181 Zellen gezählt. In einer Tracingstudie an fünf Hühnern fand Kaiser (1993) durchschnittlich 237 dorsomedial und 112 ventrolateral gelegene cochleär efferente Zellen. Diese von Kaiser präsentierten Zahlen liegen wiederum nahe den im Falle einer vollständigen räumlichen Trennung von vestibulären und auditorischen Efferenzen zu erwartenden Werten.

Beim Huhn lassen sich beide Gruppen cochleärer Efferenzen (VL und DM) nur schlecht gegeneinander abgrenzen (Strutz und Schmidt 1982), so dass die Zuordnung für einzelne Zellen zwangsläufig unsicher bleiben muss (siehe auch 3.1.2, Seite 38). Unterschiedliche Ansätze zur Unterscheidung zwischen VL und DM führen demnach beim Huhn fast zwangsläufig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Dieser Aspekt wird unter 4.3 ausführlich besprochen. Hinzu kommt, dass die in dieser Arbeit erhobenen Daten beim Huhn einer außergewöhnlich großen Streuung unterliegen, ein Phänomen das bei (Kaiser 1993) nicht in dem Maße auftrat. Legt man die von (Kaiser 1993) ermittelten Zellzahlen in der dorsomedialen und der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen zugrunde, kann mit den unter 4.3 gemachten Einschränkungen auch beim Huhn von einer räumlichen Trennung vestibulärer und auditorischer Efferenzen ausgegangen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auditorische und vestibuläre Efferenzen bei der Eule räumlich deutlich voneinander getrennt zu sein scheinen. Die ventrolaterale Gruppe cochleärer Efferenzen (VL) ist dabei als rein auditorisch, die dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen (DM) als rein vestibulär anzusprechen.

Beim Huhn kann eine Unterteilung der Efferenzen hinsichtlich ihrer Lage im Stammhirn in eine vestibuläre und eine auditorische Gruppe prinzipiell ebenfalls nachvollzogen werden. Die räumliche Trennung bleibt jedoch unscharf, da beide Gruppen ohne eine klar zu definierende Grenze ineinander übergehen, sich möglicherweise sogar überlappen. Eine Zuordnung individueller Zellen zu DM beziehungsweise VL und damit zu den vestibulären beziehungsweise den auditorischen Efferenzen ist beim Huhn nur für weit ventrolateral, beziehungsweise weit dorsomedial liegende Zellen zweifelsfrei möglich.

Zellen in dem Bereich, in dem VL und DM ineinander übergehen, können beim Huhn nicht zweifelsfrei einer der beiden Gruppen zugeordnet werden.

In der Evolution des auditorischen Systems ist ein deutlicher Trend von wenigen Efferenzen die mehrere Haarzellorgane über verschiedene Modalitäten (Gehör, Gleichgewichtssinn und Seitenlinienorgan) hinweg versorgen, hin zu einer zunehmend größeren Zahl auf jeweils eine Sinnesmodalität spezialisierter (z.B. auditorischer) Efferenzen zu beobachten (Fritzsche 1999; Roberts und Meredith 1992). Im Zuge dieser Entwicklung sind aus einem ursprünglich zu allen Haarzellorganen projizierenden efferenten Kerngebiet unterschiedliche, den einzelnen Sinnesmodalitäten zuzuordnende Kerngebiete hervorgegangen (Roberts und Meredith 1992). Vor diesem Hintergrund erscheint es zumindest plausibel, dass diese Trennung bei einem Hörspezialisten wie der Schleiereule deutlicher zu Tage tritt, als das bei einem in Bezug auf sein Gehör nicht nennenswert spezialisiertem Vogel wie dem Huhn.

Um diese Hypothese testen zu können, wären allerdings Daten über die Lage cochleärer efferenter Zellen im Stammhirn weiterer Vogelarten von Nöten.

#### 4.2.3 Zusammenfassung 4.2 Unterscheidung zwischen vestibulären und auditorischen Efferenzen

Die Frage ob beziehungsweise in wieweit sich auditorische Efferenzen im Stammhirn der untersuchten Vögel von vestibulären Efferenzen unterscheiden lassen, kann wie folgt beantwortet werden:

Bei der Schleiereule liegen die Zellkörper der auditorischen und der vestibulären Efferenzen in zwei deutlich voneinander getrennten Gruppen. Die ventrolaterale Gruppe cochleärer Efferenzen ist als rein auditorisch, die dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen als rein vestibulär anzusehen. Eine eindeutige Zuordnung jeder cochleärer efferenten Zelle zu einer der beiden Gruppen ist problemlos möglich.

Beim Huhn kann die für die Eule beschriebene räumliche Trennung auditorischer und vestibulärer Efferenzen tendenziell ebenfalls nachvollzogen werden. Da die ventrolaterale und die dorsomediale Gruppe cochleärer Efferenzen beim Huhn jedoch ohne eine klar zu definierende Grenze ineinander übergehen (verleiche auch 4.3, folgende Seite) ist eine

vollkommen zweifelsfreie Zuordnung individueller cochleärer Efferenzen zu einer der beiden Sinnesmodalitäten nur für besonders weit ventrolateral gelegene Zellen möglich.

#### **4.3 Lage cochleär efferenter Zellkörper im Stammhirn**

Die in dieser Arbeit dargestellten cochleär efferenten Zellen lassen sich per Augenschein in zwei Untergruppen unterteilen, eine dorsomediale Gruppe (DM), die sich ventrolateral des Abducens – Motorkerns befindet, und eine ventrolaterale Gruppe (VL), die zwischen dem Trakt des Abducens – Nerven und der oberen Olive liegt. Die genaue Lage dieser Gruppen sowie die Anzahl der in diesen Gruppen markierten Zellen ist unter 3.1, Seite 39, detailliert dargestellt.

Die bereits in früheren Arbeiten am Huhn vorgenommene Unterscheidung beider Gruppen cochleärer Efferenzen (Code 1997; Code und Carr 1994; Cole und Gummer 1990; Kaiser 1993; Schwarz et al. 1992; Strutz 1981; Strutz und Schmidt 1982; Whitehead und Morest 1981) kann anhand der hier vorgestellten Ergebnisse ebenso bestätigt werden wie die Existenz vergleichbarer Gruppen im Stammhirn der Schleiereule.

Leider schlägt lediglich die Arbeit von Kaiser (1993) ein objektivierbares Maß für die Zuordnung einzelner Zellen zu einer der beiden Gruppen cochleärer Efferenzen (DM und VL) vor. Angaben über die in den jeweiligen Zellgruppen gefundenen Zellzahlen werden ebenfalls nur bei Kaiser (1993) gemacht.

Dem von Kaiser vorgeschlagenen Maß zur Unterscheidung zwischen der dorsomedialen und der ventrolateralen Gruppe cochleär efferenter Zellen liegt die in den Abbildungen 5 bis 7 A, Seite 41 ff, dieser Arbeit dargestellte Strecke zugrunde.

Zellen, deren Abstand zu dem Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden durch die Zellpositionen einer Stammhirnhälfte mit der Senkrechten durch den Nullpunkt des Koordinatensystems diesen einen bestimmten Grenzwert überschritten wurden als VL, Zellen die diesen Grenzwert unterschritten als DM klassifiziert.

Dieser Grenzwert wurde von Kaiser (1993) folgendermaßen ermittelt: In der Häufigkeitsverteilung der Strecken aller Zellen beider Gruppen konnte ein lokales Minimum beobachtet werden. Dieses Minimum wurde zur Grenze zwischen dorsomedialer und ventrolateraler Zellgruppe erklärt. Der Grenzwert wird mit 2250  $\mu\text{m}$  angegeben. Über die statistische Signifikanz dieser Trennung konnte bedingt durch die zur Grenzziehung verwendete Methode keine Aussage gemacht werden.

Die durchschnittlich Zellzahl in DM betrug bei Kaiser (1993) 237, die durchschnittliche Zellzahl in VL 112 Zellen. Über die Beziehung der so vorgenommenen Einteilung zu einer Gruppenbildung per Augenschein wurden keine Angaben gemacht.

Bei Anwendung derselben Methode auf die im Verlauf der vorliegenden Arbeit am Huhn erhobenen Daten konnte kein nachvollziehbarer Grenzwert ermittelt werden (siehe Abbildung 7, Seite 43). Setzt man dennoch den von Kaiser (1993) ermittelten Grenzwert für die in dieser Arbeit vermessenen Zellen ein, errechnet sich für die Hühner 42 und 46 eine durchschnittliche Anzahl von 215 Zellen in DM und 90 Zellen in VL.

Der Übergang zwischen beiden Zellgruppen ist, zumindest beim Huhn, fließend, die Zuordnung individueller Zellen zu einer der beiden Gruppen oft nicht eindeutig (Strutz und Schmidt 1982). Vor diesem Hintergrund kann es nicht überraschen, dass die Grenzziehung von Kaiser (1993) hier nicht nachvollzogen werden konnte (siehe auch Abbildung 7 A).

Die Abbildungen 5 A und 6 A, Seite 41 f, legen jedoch nahe dass die von Kaiser (1993) vorgeschlagene Methode, auf die cochleären Efferenzen der Schleiereule angewandt, durchaus sinnvoll erscheint. Dies ist auf eine schärfere räumliche Trennung beider Zellcluster im Stammhirn der Schleiereule zurückzuführen.

Mit Hilfe der linearen Diskriminanzanalyse wurde ein Modell entwickelt, das die Zuordnung einzelner Zellen zu den zuvor per Augenschein definierten efferenten Zellclustern anhand der Messwerte aus der Positionsbestimmung ermöglicht. Da die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Zellen vor Beginn der Analyse festgelegt wird, hängt das Analyseergebnis entscheidend von der per Augenschein vorgenommenen Klassifizierung ab. Die Diskriminanzanalyse liefert eine Funktion, die es ermöglicht bisher nicht klassifizierte Zellen einer der beiden Gruppen (VL bzw. DM) zuzuordnen.

Die Frage ob die der Analyse zugrundeliegende Grenzziehung zwischen der dorsomedialen und der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen optimal gewählt war, lässt sich anhand der Diskriminanzanalyse nicht beantworten. Es wurde lediglich ein mathematisches Modell vorgestellt, dass die per Augenschein vorgenommene Zuordnung individueller Zellen anhand der zuvor erhobenen Positionsdaten rechnerisch nachvollzieht. Mit Hilfe des Mann – Whitney – Tests konnte gezeigt werden, dass die per Augenschein VL beziehungsweise DM zugeordneten Zellen sich in bezug auf ihre Lage im Stammhirn signifikant voneinander unterscheiden. In wie weit die per Augenschein vorgenommene Einteilung die gegebenen anatomischen Verhältnisse angemessen widerspiegelt lässt sich mit Hilfe statistischer Analysen nur unzureichend beantworten.

Geht man davon aus, dass es sich bei VL um ein rein auditorisches, bei DM um ein rein vestibuläres Zellcluster handle (siehe 4.2) lassen sich Vorhersagen über die in VL beziehungsweise DM zu beobachtenden Zellzahlen machen. Dass die aufgrund der theoretischen Überlegungen im vorangegangenen Abschnitt vorhergesagten und die tatsächlich beobachteten Zellzahlen, zumindest bei der Schleiereule verblüffend gut übereinstimmen, mag als Beleg dafür angesehen werden, dass die hier gemachte Unterscheidung zwischen VL und DM tatsächlich geeignet ist die anatomischen Verhältnisse angemessen wiederzugeben.

Aufgrund der bei der Schleiereule beobachteten scharfen räumlichen Trennung zwischen dorsomedialer und ventrolateraler Gruppe cochleärer Efferenzen kommt den methodisch bedingten Einschränkungen bei der Interpretation der Lage efferenter Zellkörper im Stammhirn der Schleiereule keinerlei praktische Bedeutung zu (vergleiche Abbildung 5 und 6, Seite 41 f).

Die Situation im Huhn stellt sich dagegen etwas anders dar:

Wie unter anderem aus Abbildung 7, Seite 43, hervorgeht konnte keine scharfe räumliche Trennung zwischen VL und DM beobachtet werden. Die per Augenschein definierten Gruppen cochleär efferenter Zellen überlappen sich stark, die Zuordnung der Zellen in diesem Überlappungsbereich zu DM beziehungsweise VL bleibt zweifelhaft. Entsprechend groß bleibt auch die Unsicherheit bei einer Klassifizierung mit Hilfe der unter 3.1.2, Seite 39 ff, vorgestellten Klassifikationsfunktion.



Im Zusammenhang mit den cochleären Efferenzen beim Huhn kann demnach durchaus von einer dorsomedialen und von einer ventrolateralen Zellgruppe gesprochen werden, eine klare Abgrenzung dieser Gruppen gegeneinander allein aufgrund der Lage der Zellkörper im Stammhirn scheint hier allerdings nicht möglich zu sein.

Eine mögliche Erklärung für die zwischen Huhn und Schleiereule bezüglich der räumlichen Trennung von dorsomedialer und ventrolateraler Gruppe cochleärer Efferenzen beobachteten Unterschiede liegt in der extremen Spezialisierung des auditorischen Systems der Schleiereule. Dieser Punkt wurde bereits auf Seite 77 diskutiert.

#### **4.4 Morphologie individueller cochleärer Efferenzen**

Bei den auditorischen Efferenzen der Säugetiere lassen sich im Wesentlichen zwei funktionell und anatomisch deutlich gegeneinander abzugrenzende Subsysteme unterscheiden: Die medialen olivocochleären (MOC) Efferenzen kontaktieren ausschließlich die äußeren Haarsinneszellen der Säugercochlea, während die lateralen olivocochleären (LOC) Efferenzen überwiegend die Afferenzen der inneren Haarsinneszellen der Säugercochlea kontaktieren (Übersicht in Warr 1992).

Während die äußeren Haarsinneszellen der Säugetiere im Wesentlichen der aktiven Verstärkung und Formung des in der Cochlea eintreffenden Schalls dienen, ist es Aufgabe der inneren Haarsinneszellen, die auditorischen Informationen aufzunehmen und über die primären auditorischen Afferenzen an die cochleären Kerne der aufsteigenden Hörbahn weiterzugeben (Übersicht in Dallos 1996).

Entsprechend scheint eine wesentliche Funktion der medialen olivocochleären Efferenzen der Säugetiere in der Kontrolle und Steuerung des von den äußeren Haarsinneszellen getragenen Mechanismus zur Signalverstärkung zu bestehen (Übersicht in Guinan 1996).

Über die Funktion der lateralen olivocochleären Efferenzen ist bisher nur wenig bekannt. Eine Arbeit von Ruel et al. (2001) zeigt jedoch, dass die Aktivität der lateralen olivocochleären Efferenzen die Antwortschwelle und die Spontanaktivität der auditorischen Afferenzen herabsetzt. Dies kann als Mechanismus zur Optimierung des

Signal – Rausch – Verhältnisses der nach zentral weitergeleiteten afferenten Signale interpretiert werden.

In der Papilla basilaris der Vögel existieren ebenfalls zwei unterschiedliche Typen von Haarsinneszellen: langgestreckte, vorwiegend afferent innervierte „lange Haarsinneszellen“ und gedrungene, ausschließlich efferent innervierte „kurze Haarsinneszellen“ (Übersicht in Gleich und Manley 2000). Eine funktionelle Arbeitsteilung zwischen den beiden Typen von auditorischen Haarsinneszellen bei Vögeln, so wie sie für Säugetiere beschrieben wurde, ist, obwohl nicht endgültig bewiesen, als wahrscheinlich anzunehmen (Manley et al. 1989; Manley und Köppl 1998).

In der Papilla basilaris der Vögel lassen sich dicke myelinisierte und dünne nicht myelinisierte efferente Axone unterscheiden (Fischer et al. 1994). Die dünnen, unmyelinisierten Fasern kontaktieren in erster Linie die langen Haarsinneszellen, während die kurzen Haarsinneszellen von den dicken myelinisierten Fasern versorgt werden (Keppler et al. 1994; Zidanic und Fuchs 1996). Während die efferenten Synapsen an den langen Haarsinneszellen als klein und knopfförmig beschrieben werden, sind die efferenten Synapsen der kurzen Haarsinneszellen groß und becherförmig (Chandler 1984; Fischer 1992; Gleich und Manley 1988; Hirokawa 1978; Takasaka und Smith 1971; Tanaka und Smith 1978; Zidanic und Fuchs 1996).

Eine physiologische Charakterisierung auditorischer Efferenzen beim Huhn zeigt, dass mindestens zwei hinsichtlich ihres Antwortverhaltens auf akustische Stimuli unterscheidbare Subtypen auditorischer Efferenzen existieren (Kaiser und Manley 1994). Die von Kaiser und Manley (1994) beschriebenen Antworten lassen sich allerdings nicht mit der Physiologie auditorischer Efferenzen beim Säuger (Übersicht in Guinan 1996) vergleichen. Kaiser und Manley (1994) beschrieben sowohl Efferenzen, die durch Schall erregt als auch solche die durch Schall gehemmt werden. Eine Hemmung auditorischer Efferenzen durch Schall ist beim Säugetier bislang nicht beobachtet worden.

Aufgrund all dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass die Vögel analog zu der Situation bei den Säugetieren Subsysteme innerhalb der auditorischen Efferenzen für die Steuerung der unterschiedlichen Haarzelltypen entwickelt haben.

Bisher konnten im Stammhirn der Vögel jedoch keine im Sinne des oben Gesagten unterschiedlich spezialisierten auditorisch efferenten Zellkörper unterschieden werden (Übersicht in Code 1997).

Unter 4.2 wird argumentiert, dass die Position einzelner efferenter Zellkörper im Stammhirn, das heißt ihre Zugehörigkeit zu der ventrolateralen, beziehungsweise der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen in erster Linie darüber Auskunft gibt, ob es sich bei der jeweiligen Zelle um eine auditorisch oder eine vestibulär efferente Zelle handelt. Zur Unterscheidung der oben postulierten Subsysteme auditorischer Efferenzen ist die Lage efferenter Zellkörper im Stammhirn demnach nicht geeignet.

Eine Beobachtung von Strutz und Schmidt (1982), wonach die Zellen in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen beim Huhn etwas kleiner sind als in der ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen, konnte anhand der in dieser Arbeit gemessenen Zellgrößen nicht bestätigt werden. Die Angaben von Strutz und Schmidt (1982) stützen sich auf direkte Beobachtungen am Präparat, die in der vorliegenden Arbeit getroffenen Aussagen auf präzise Messungen und deren statistische Analyse. Es ist daher denkbar, dass der von Strutz und Schmidt (1982) gefundene Unterschied in der Zellgröße innerhalb der beiden Gruppen cochleärer Efferenzen statistisch nicht signifikant ist und aus diesem Grund mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine Möglichkeit, die im Stammhirn der Vögel gefundenen auditorisch efferenten Zellkörper unterschiedlichen Untergruppen zuzuordnen, liegt in der Analyse morphometrischer Parameter, wie der Größe oder der Struktur des Dendritenbaumes individueller Efferenzen.

In bisherigen Arbeiten über die cochleären Efferenzen des Huhns wurden sowohl sternförmig – multipolar organisierte als auch langgestreckte spindelförmige Zellformen beschrieben (Code und Carr 1994; Schwarz et al. 1992; Whitehead und Morest 1981).

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit beim Huhn und der Schleiereule angefärbten cochleär efferenten Zellen ließen sich per Augenschein den in den vorstehend genannten Arbeiten beobachteten Morphotypen zuordnen.

Damit konnten die im Huhn nachgewiesenen Morphotypen erstmals auch in einer weiteren Vogelart beobachtet werden.

Ein quantitatives Maß, mit dessen Hilfe zwischen spindelförmigen und multipolaren Efferenzen unterschieden werden kann, ist in der Literatur bisher nicht zu finden.

In einer von Kaiser (1993) durchgeführten quantitativen Analyse der Morphologie efferenter Zellkörper konnte gezeigt werden, dass Länge, Breite und Fläche der untersuchten Somata unimodal verteilt und damit für eine Klassifizierung der Zellen nicht geeignet sind. Daraus kann geschlossen werden, dass die in den oben genannten Arbeiten per Augenschein vorgenommene Einteilung eher auf der Morphologie der Zellfortsätze als auf der des Somas beruht.

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten weisen ebenfalls auf eine unimodale Verteilung von Somalänge – breite – fläche und - umfang hin. Die Schlussfolgerung, dass eine Einteilung der Zellen in verschiedene Klassen allein aufgrund der Morphometrie des Zellkörpers nicht möglich sei, konnte demnach im Verlauf der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit gemessene Länge der cochleär efferenten Somata liegt beim Huhn zwischen 19,9 und 50,8  $\mu\text{m}$ , bei der Schleiereule zwischen 9,9 und 64,0  $\mu\text{m}$ . Die von Kaiser (1993) beim Huhn gemessene Länge der cochleär efferenten Somata liegt zwischen 10 und 156  $\mu\text{m}$ . Berücksichtigt man, dass in der vorliegenden Arbeit beim Huhn lediglich neun, bei der Schleiereule lediglich 37 Zellen vermessen werden konnten und dass Somata mit einer Länge von mehr als 60  $\mu\text{m}$  von Kaiser (1993) nur selten gefunden wurden, kann davon ausgegangen werden, dass weder die beim Huhn noch die bei der Eule gemessenen Somalängen wesentlich von den von Kaiser (1993) beim Huhn ermittelten Werten abweichen.

In der Breite der vermessenen Somata konnte ebenfalls kein wesentlicher Unterschied zwischen den in dieser Arbeit bei der Schleiereule und den von Kaiser (1993) beim Huhn gemessenen Werten festgestellt werden.

Obwohl aufgrund der in dieser Arbeit vorgestellten morphometrischen Daten kein vollkommen eindeutiges Maß für die Klassifizierung der cochleär efferenten Somata gefunden werden konnte, gibt es deutliche Hinweise darauf, dass eine derartige Klassifizierung möglich ist.

So konnte gezeigt werden, dass das Längen – Breiten – Verhältnis der von den Zellfortsätzen überspannten Fläche ein geeignetes Maß zur mathematischen Unterscheidung zwischen den beobachteten Zelltypen darstellt, die Klassifizierung mit dieser Methode jedoch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet bleibt. Abbildung 11, Seite 56, zeigt ein Beispiel für eine Zelle die aufgrund des Längen – Breiten – Verhältnisses der von ihren Zellfortsätzen überspannten Fläche als sternförmig beziehungsweise multipolar zu klassifizieren wäre, bei einer Klassifizierung per Augenschein jedoch eher als spindelförmig angesprochen würde.

Eine Erweiterung des Datenmaterials um weitere cochleär efferente Zellen kann helfen, ein mehrere morphometrische Parameter umfassendes Modell zu entwickeln, das eine eindeutige Klassifikation erlaubt.

Wendet man das auf dem Längen – Breiten – Verhältnis der von den Zellfortsätzen überspannten Fläche beruhende Maß auf die bei der Schleiereule vermessenen cochleären Efferenzen an, so sind 10,8% dieser Zellen als spindelförmig zu klassifizieren. Die übrigen Zellen sind demnach als multipolar anzusprechen. Wie das in Abbildung 11, Seite 56, angeführte Beispiel zeigt, wird der Anteil der als spindelförmig klassifizierten Zellen an der Gesamtpopulation mit diesem Ansatz wahrscheinlich leicht unterschätzt.

Beim Huhn klassifizierten Code und Carr (1994) 75% der cochleären Efferenzen als multipolar und 14% der cochleären Efferenzen als spindelförmig. Die übrigen Zellen wurden einem intermediären, als oval beschriebenen Typ zugeordnet.

Trotz der oben vorgebrachten methodologischen Einschränkungen kann angenommen werden, dass zumindest der Anteil der spindelförmigen cochleären Efferenzen an der Gesamtpopulation bei Huhn und Eule in etwa derselben Größenordnung liegt.

Über die Anzahl der in der Papilla basilaris unterscheidbaren Typen efferenter Synapsen beziehungsweise Axone (Übersicht in Code 1997) liegen keine verlässlichen Informationen vor. Ein Vergleich der relativen Anteile dieser Efferenzen an der

Gesamtpopulation, mit den im Stammhirn beobachteten Häufigkeiten spindelförmiger, beziehungsweise multipolarer Efferenzen ist daher nicht möglich.

Eine Zuordnung einzelner von Kaiser und Manley (1994) beschriebener physiologischer Untergruppen cochleärer Efferenzen zu einzelnen, unter anderem in dieser Arbeit beschriebenen Morphotypen cochleärer Efferenzen kann aufgrund der bisher über das cochleär efferente System der Vögel verfügbaren Daten nicht vorgenommen werden.

#### **4.5 Bilateral projizierende auditorische Efferenzen**

Im Verlauf dieser Arbeit konnten bilateral projizierende Efferenzen in allen fünf daraufhin getesteten Eulen sowie bei zwei von drei Hühnern nachgewiesen werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt eine Studie von Schwarz et al. (1992) in deren Verlauf mit Hilfe der Tracer True Blue und Fluorogold in vier Hühnern insgesamt sechs bilateral projizierende Zellen nachgewiesen werden konnten. Leider enthält die Arbeit von Schwarz et al. (1992) keine Angaben darüber ob die doppelmarkierten Zellen in der ventrolateralen oder in der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen beobachtet wurden. Die Frage ob es sich bei den von Schwarz et al. (1992) beschriebenen bilateral projizierenden Zellen tatsächlich um auditorische Efferenzen handelte kann demnach nicht beantwortet werden. Im Gegensatz dazu konnten Cole und Gummer (1990) mit den Tracern Diamidino Yellow und Fast Blue keine bilateral projizierende Zellen im Huhn nachweisen.

Da in der Arbeit von Cole und Gummer (1990) pro Injektion im Durchschnitt etwas weniger Zellen (242) gefärbt wurden, als das bei Schwarz et al. (1992) und in der vorliegenden Arbeit der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil pro Tracerinjektion markierter Zellen an der Gesamtpopulation cochleärer Efferenzen bei Cole und Gummer (1990) zu gering war, um die seltenen bilateral projizierenden Zellen nachweisen zu können.

Bei der Schleiereule muss berücksichtigt werden, dass eine unvollständige Färbung der cochleären Efferenzen zu einer Unterschätzung der Anzahl bilateral projizierender Zellen geführt haben mag. Eine eindeutige Korrelation zwischen der Anzahl der im jeweiligen

Versuch insgesamt gefärbten Zellen und der Anzahl der dabei detektierten Doppelmarkierungen ist jedoch nicht zu erkennen (siehe Tabelle 3, Seite 60).

Trotz dieser Unsicherheit konnte für beide Arten nachgewiesen werden, dass ein kleiner Anteil von bis zu 2% der auditorischen Efferenzen beide Cochleae kontaktiert. Es ist wahrscheinlich, dass sich diese Beobachtung für weitere Vogelarten verallgemeinern lässt.

Die Schleiereule ist ein weitgehend von seiner auditorischer Leistungsfähigkeit abhängiger Hörspezialist. Auf der Ebene der Papilla basilaris äußert sich dies unter anderem in einer starken Überrepräsentation hoher Frequenzen deutlich über den Hörbereich anderer Vögel hinaus, sowohl was die Anzahl afferenter Neurone als auch was den auf der Papilla basilaris beanspruchten Raum angeht. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von der auditorischen Fovea der Schleiereule (Köppl 1997; Köppl et al. 1993). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese auditorische Fovea neben den afferenten Spezialisierungen eine ungewöhnlich dichte efferente Innervation aufweist (Köppl 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Eule gegenüber dem Huhn, wenn überhaupt, nur ein leichter Anstieg im Anteil bilateral projizierender Zellen an der Gesamtpopulation auditorischer Efferenzen beobachtet werden. Ein erhöhter Bedarf an bilateral projizierenden Zellen in der auditorischen Fovea der Schleiereule, beziehungsweise bei höheren Frequenzen, scheint demnach nicht zu bestehen.

Zu beiden Ohren projizierende Efferenzen konnten bei einer Vielzahl unterschiedlicher Wirbeltiergruppen nachgewiesen werden. Die auditorischen und die vestibulären Efferenzen im Stammhirn der Säugetiere liegen in deutlich voneinander getrennten Kerngebieten. Im Stammhirn der Vögel kann zumindest eine Gruppe ausschließlich auditorischer Efferenzen (VL – siehe 4.2) identifiziert werden. Bei den übrigen Wirbeltiergruppen formen die Efferenzen der unterschiedlichen Haarzellorgane eine gemeinsame efferente Gruppe im Stammhirn, individuelle Neurone dieser Gruppen projizieren darüber hinaus zu Haarzellorganen verschiedener Sinnesmodalitäten (Gehör, Gleichgewichtssinn und Seitenlinienorgan). Einen Überblick über das bisher in diesem

Absatz Gesagte bieten Fritsch (1999) sowie Roberts und Meredith (1992) Vor diesem Hintergrund kann lediglich bei Säugetieren und bei Vögeln zweifelsfrei davon ausgegangen werden, dass es sich bei den bilateral projizierenden Neuronen tatsächlich um auditorische Efferenzen handelt.

Von den 43 in der Eule nachgewiesenen bilateralen Zellen lagen 41 in der sicher als rein auditorisch anzusprechenden ventrolateralen Gruppe cochleärer Efferenzen. Zwei der drei beim Huhn gefundenen Doppelmarkierungen wurden ebenfalls innerhalb der sicher auditorischen Efferenzen dokumentiert.

Bilateral projizierende auditorische Efferenzen konnten bisher in jeder daraufhin getesteten Säuger – Art nachgewiesen werden. Interessanterweise scheinen alle diese bilateralen Efferenzen dem medialen olivocochleären System (MOC), welches zu den äußeren Haarsinneszellen der Säuger projiziert, zuzurechnen zu sein. Der Anteil der bilateralen Zellen an den insgesamt im MOC nachgewiesenen Zellen beträgt üblicherweise weniger als 5% (Übersicht in Warr 1992). Bezogen auf die Gesamtzahl aller cochleären Efferenzen machen die bilateral projizierenden Efferenzen etwas weniger als 2% der efferenten Population aus (Aschoff und Ostwald 1988; Azeredo et al. 1999; Robertson et al. 1987; Robertson et al. 1989).

Der beim Vogel gefundene Anteil bilateral projizierender auditorischer Efferenzen an den insgesamt vorhandenen cochleären Efferenzen und der beim Säugetier ermittelte Wert stimmen demnach überein.

Ob die bilateral projizierenden Efferenzen der Vögel, so wie dies bei den Säugetieren der Fall ist, auf eine spezifische Subpopulation auditorischer Efferenzen beschränkt sind, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Die von Whitehead und Morest (1981) aufgrund der Form individueller Zellen vorgeschlagene Zuordnung der cochleären Efferenzen zu verschiedenen Untergruppen konnte zwar nachvollzogen werden, doch fiel die Färbung der Dendriten in den doppelmarkierten Zellen in der Regel so schwach aus, dass eine entsprechende Klassifizierung nicht vorgenommen werden konnte.



Beim Vogel werden die im erwachsenen Tier zum kontralateralen Ohr projizierenden Efferenzen ipsilateral zu diesem Ohr geboren. Von dort wandern sie dann über die Mittellinie des Stammhirns auf die kontralaterale Seite. Die kontralateral projizierenden Efferenzen der Säugetiere werden bereits kontralateral zu dem später innervierten Ohr geboren. Anschließend knüpfen diese Zellen Kontakt zu beiden Ohren. Die Verbindung zum ipsilateralen Ohr wird zu einem späteren Zeitpunkt wieder zurückgebildet (Fritsch 1999). Aufgrund dieser unterschiedlichen Entwicklung sagte Fritsch (1999) voraus, dass bilaterale Zellen beim Säuger leichter entstehen und dementsprechend häufiger angetroffen werden müssten als dies beim Vogel der Fall ist.

Wie bereits festgestellt, ist der Anteil bilateral projizierender Zellen bei Säugern und Vögeln mit jeweils knapp 2% in etwa gleich groß.

Dass trotz der unterschiedlichen Entwicklung der auditorischen Efferenzen beim Säuger und beim Vogel in etwa gleich viele bilateral projizierende Zellen gefunden wurden, kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass diese Zellen eine grundlegende, von den unterschiedlichen Ausprägungen an des Hörsystems unabhängige, Funktion erfüllen.

# Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die genaue Lage cochleär efferenter Neurone im Stammhirn des Huhns und erstmals auch der Schleiereule detailliert beschrieben.

Die zu Beginn dieser Arbeit im Abschnitt „Ziel der Arbeit“ gestellten Fragen konnten weitgehend beantwortet werden:

- 1.) Es konnte eine Möglichkeit aufgezeigt werden im Stammhirn der Schleiereule sicher zwischen auditorischen und vestibulären Efferenzen zu unterscheiden. Efferenzen die der ventrolateralen Gruppe cochleäre Efferenzen zuzurechnen sind, sind als auditorisch, solche die der dorsomedialen Gruppe cochleärer Efferenzen zuzurechnen sind, als vestibulär anzusprechen. Es wurde eine Diskriminanzfunktion vorgestellt die eine eindeutige Zuordnung individueller Zellen zu einer der beiden Gruppen ermöglicht.
- 2.) Innerhalb der auditorischen Efferenzen der Säugetiere lassen sich zwei funktionell und anatomisch distinkte Subpopulationen unterscheiden (Übersicht in Warr 1992). Auch beim Vogel gibt es zahlreiche Hinweise auf das Vorhandensein unterschiedlich spezialisierter auditorischer Efferenzen (Übersicht in Code 1997) Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise darauf, dass eine Abgrenzung unterschiedlicher Subpopulationen auditorischer Efferenzen im Stammhirn der Schleiereule aufgrund der Morphologie einzelner Zellen möglich ist.
- 3.) Bilateral projizierende auditorische Efferenzen, wie sie für zahlreiche Säugetiere beschrieben wurden (Übersicht in Warr 1992) konnten erstmals auch für die Schleiereule nachgewiesen werden.

Aufgrund der mit dieser Arbeit vorgelegten Daten über die genaue Lage der auditorischen Efferenzen innerhalb des Stammhirns der Eule scheint es nun möglich mit Hilfe von Ableitungen und Füllungen einzelner Zellen weiteren grundlegenden Fragen nachzugehen.

Es liegt zum Beispiel nahe, zu versuchen die unterschiedlichen im Stammhirn der Schleiereule beobachteten Formen auditorisch efferenter Zellkörper mit den unterschiedlichen Klassen in der Papilla basilaris beschriebener efferenter Synapsen, oder mit den unterschiedlichen Antworttypen cochleär efferenter Zellen zu korrelieren.

Es zeigte sich, dass die Schleiereule, nicht zuletzt aufgrund der, anders als beim Huhn scharfen Trennung zwischen auditorischen und vestibulären Efferenzen, ein geeignetes Modell zum Verständnis des auditorisch efferenten Systems der Vögel darstellt. Weitere Arbeiten zum auditorisch efferenten System der Schleiereule scheinen damit lohnenswert.



# Danksagung

Wie so viele wissenschaftliche Studien hätte auch die vorliegende Arbeit ohne die Unterstützung vieler hilfsbereiter Menschen nicht verwirklicht werden können. Einige dieser Helfer sollen hier besonders hervorgehoben werden.

Zunächst danke ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Christine Köppl für viele hilfreiche Gespräche bei methodischen und fachlichen Problemen, sowie für die Geduld, die sie in schwierigen Phasen dieser Arbeit bewiesen hat.

Herrn Dipl. Math. Friedhelm Würfel, Firma PictureFactory, Hamburg danke ich für die unentgeltliche Programmierung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Programms zur Umrechnung von Zellkoordinaten in Bilder „Coordinate to Pixel“.

Herrn Metz aus der universitätseigenen Mechanikwerkstatt danke ich für seine Hilfe beim Bau des Messsystems zur Erfassung der Zellpositionen.

Herrn Prof. Dr. Hermann Wagner, Institut für Zoologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen-Hochschule Aachen danke ich für die Überlassung einiger der in dieser Arbeit verwendeten Schleiereulen.

Meinen Eltern, sowie Frau PD Dr. Almut Würfel und Herrn Daniel Rawer danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die daraus resultierenden Verbesserungsvorschläge.

Finanziert wurde meine Arbeit über eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie über das DFG – Graduiertenkolleg „Sensomotorische Interaktion in biologischen und technischen Systemen“, für die vorbildliche Organisation dieses Graduiertenkollegs danke ich Frau Dr. Isolde von Bülow.

Meinen Kollegen aus der Zoologie Garching, und aus dem DFG-Graduiertenkolleg danke ich für ein angenehmes Arbeitsumfeld und für ihre Hilfsbereitschaft bei den kleinen und großen Problemen des Alltags.

Und sicher nicht zuletzt gilt mein Dank den Verwandten und Freunden, die mir in einer schwierigen privaten Situation beigestanden und mir auf diese Weise ermöglicht haben, diese Arbeit zum Erfolg zu führen.

# Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

		Seite
Abbildung 1	Messsystem zur Erfassung der Zellpositionen	25
Abbildung 2	Lage der Efferenzen im Stammhirn, Eu 15	32
Abbildung 3	Lage der Efferenzen im Stammhirn, Eu 17	33
Abbildung 4	Lage der Efferenzen im Stammhirn, Hu 46	34
Abbildung 5	Unterscheidung VL und DM, Eu 15	41
Abbildung 6	Unterscheidung VL und DM, Eu 17	42
Abbildung 7	Unterscheidung VL und DM, Hu 46	43
Abbildung 8	Beispiele Zellformen, Eu und Hu	48
Abbildung 9	Quantifizierung Zellformen Eu 8	52
Abbildung 10	Detail Quantifizierung Zellformen Eu 8	55
Abbildung 11	Quantifizierung Zellformen, Beispiel	56
Abbildung 12	Bilateral projizierende Zellen, Beispiel	61
Abbildung 13	Färbungen nicht auditorisch-efferenter Strukturen	65
Tabelle 1	Zellzahlen bei Eule und Huhn	36
Tabelle 2	Quantifizierung Zellform, Huhn	58
Tabelle 3	Doppelmarkierungen bei Eule und Huhn	60

# Abkürzungsverzeichnis

CtB	Choleratoxin Untereinheit B
DAB	Diaminobenzidin
DM	dorsomediale Gruppe efferenter Neurone
DMSO	Dimethylsulfoxid
EKG	Elektrokardiogramm
FG	Flourogold
IE	Internationale Einheiten
KgKG	Kilogramm Körpergewicht
LOC	laterales olivocochleäres System
MOC	mediales olivocochleäres System
PFA	Paraformaldehyd
PP	Phosphatpuffer
SIS	Soft Imaging System
TP	Trispuffer
VL	ventrolaterale Gruppe efferenter Neurone

## Literaturverzeichnis:

- Aschoff, A. und J. Ostwald (1988). "Distribution of cochlear efferents and olivocollicular neurons in the brainstem of rat and guinea pig: A double labeling study with fluorescent tracers." Experimental Brain Research **71**: 241-251.
- Azeredo, W. J., M. L. Kliment, B. J. Morley, E. Relkin, N. B. Slepecky, A. Sterns, W. B. Warr, J. M. Weekly und C. I. Woods (1999). "Olivocochlear neurons in the chinchilla: a retrograde fluorescent labelling study." Hearing Research **134**(1-2): 57-70.
- Büttner-Ennever, J. A. (1999). "A review of otolith pathways to brainstem and cerebellum." Annals of the New York Academy of Sciences **871**: 51-64.
- Chandler, J. P. (1984). "Light and electron microscopic studies of the basilar papilla in the duck, (*Anas platyrhynchos*). I. The hatchling." The Journal of Comparative Neurology **222**: 506-522.
- Code, R. A. (1995). "Efferent neurons to the macula lagena in the embryonic chick." Hearing Research **82**(1): 26-30.
- Code, R. A. (1996). "Chick auditory terminals contain dynorphin-like immunoreactivity." Neuroreport **7**(18): 2917-2920.
- Code, R. A. (1997). "The avian cochlear efferent system." Poultry Avian Biol. Rev. **8**: 1-8.
- Code, R. A. und C. E. Carr (1994). "Choline acetyltransferase-immunoreactive cochlear efferent neurons in the chick auditory brainstem." The Journal of Comparative Neurology **340**(2): 161-173.
- Code, R. A. und C. E. Carr (1995). "Enkephalin-like immunoreactivity in the chick brainstem: Possible relation to the cochlear efferent system." Hearing Research **87**(1-2): 69-83.
- Code, R. A., M. S. Darr und C. E. Carr (1996). "Chick cochlear efferent neurons are not immunoreactive for calcitonin gene-related peptide." Hearing Research **97**(1-2): 127-135.
- Cole, K. S. und A. W. Gummer (1990). "A double-label study of efferent projections to the cochlea of the chicken, *Gallus domesticus*." Experimental Brain Research **82**(3): 585-588.
- Dallos, P. (1996). Overview: Cochlear neurobiology. The Cochlea. P. Dallos, A. N. Popper und R. R. Fay. New York, Springer Verlag: 1-43.
- Desmedt, J. E. und P. J. Delwaide (1963). "Neural inhibition in a bird: Effect of strychnine and picrotoxin." Nature **200**: 583-585.



- Desmedt, J. E. und P. J. Delwaide (1965). "Functional properties of the efferent cochlear bundle of the pigeon revealed by stereotaxic stimulation." Experimental Neurology **11**: 1-26.
- Dickman, J. D. und M. J. Correia (1992). "Vestibular efferent system in pigeons: Anatomical organization and effect upon semicircular canal afferent responsiveness." Ann. NY. Acad. Sci. **656**: 927-930.
- Dickman, J. D. und Q. Fang (1996). "Differential central projections of vestibular afferents in pigeons." The Journal of Comparative Neurology **367**(1): 110-131.
- Fischer, F. P. (1992). "Quantitative analysis of the innervation of the chicken basilar papilla." Hearing Research **61**: 167-178.
- Fischer, F. P., B. Eisensamer und G. A. Manley (1994). "Cochlear and lagenar ganglia of the chicken." The Journal of Morphology **220**(1): 71-83.
- Fischer, F. P., C. Köppl und G. A. Manley (1988). "The basilar papilla of the barn owl *Tyto alba*: A quantitative morphological SEM analysis." Hearing Research **34**: 87-102.
- Fritsch, B. (1999). Ontogenetic and evolutionary evidence for the motoneuron nature of vestibular and cochlear efferents. The efferent auditory system: Basic science and clinical applications. C. I. Berlin, Singular Publishing: 31-59.
- Fuchs, P. A. und B. W. Murrow (1992). "Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea." The Journal of Neuroscience **12**(3): 800-809.
- Fuchs, P. A. und B. W. Murrow (1992). "A novel cholinergic receptor mediates inhibition of chick cochlear hair cells." Proc. R. Soc. Lond. [Biol. ] **248**(1321): 35-40.
- Gleich, O. und G. A. Manley (1988). "Quantitative morphological analysis of the sensory epithelium of the starling and pigeon basilar papilla." Hearing Research **34**: 69-85.
- Gleich, O. und G. A. Manley (2000). The hearing organ of birds and crocodilia. Comparative Hearing: Birds and Reptiles. R. J. Dooling, R. R. Fay und A. N. Popper. New York, Springer Verlag. **Springer Handbook of Auditory Research, Vol. 13**: 70-138.
- Guinan, J. J. J. (1996). Physiology of olivocochlear efferents. The Cochlea. P. Dallos, A. N. Popper und R. R. Fay. New York, Springer Verlag: 435-502.
- Hirokawa, N. (1978). "The ultrastructure of the basilar papilla of the chick." J Comp Neur **181**: 361-374.
- Kaiser, A. (1993). Das efferente Bündel des Hörorgans beim Huhn - Ursprung, Projektionen und Physiologie, Institut für Zoologie der Technischen Universität München (Dissertation)

- Kaiser, A. und G. A. Manley (1994). "Physiology of single putative cochlear efferents in the chicken." The Journal of Neurophysiology **72**(6): 2966-2979.
- Kaiser, A. und G. A. Manley (1996). "Brainstem connections of the Macula lagenae in the chicken." The Journal of Comparative Neurology **374**: 108-117.
- Keppler, C., L. Schermuly und R. Klinke (1994). "The course and morphology of efferent nerve fibres in the papilla basilaris of the pigeon (*Columba livia*)." Hearing Research **74**(1-2): 259-264.
- Klump, G. M. und O. N. Larsen (1992). "Azimuthal sound localization in the European starling (*Sturnus vulgaris*): I. Physical binaural cues." Journal of Comparative Physiology A - Sensory Neural and Behavioral Physiology **170**(2): 243-251.
- Köppl, C. (1997). "Number and axon calibres of cochlear afferents in the barn owl." Auditory Neuroscience **3**: 313-334.
- Köppl, C. (2001). "Efferent axons in the avian auditory nerve." European Journal of Neuroscience **13**: 1889-1901.
- Köppl, C. (2001). "Tonotopic projections of the auditory nerve to the cochlear nucleus angularis in the barn owl." Journal of the Association for Research in Otolaryngology **2**(1): 41-53.
- Köppl, C., O. Gleich und G. A. Manley (1993). "An auditory fovea in the barn owl cochlea." Journal of Comparative Physiology A - Sensory Neural and Behavioral Physiology **171**: 695-704.
- Köppl, C., A. Wegscheider, O. Gleich and G. A. Manley (2000). "A quantitative study of cochlear afferent axons in birds." Hearing Research **139**: 123-143.
- Kuenzel, W. J. und M. Masson (1988). *A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Chick*. London, The Johns Hopkins University Press.
- Lewald, J. (1990). "The directionality of the ear of the pigeon (*Columba livia*)." Journal of Comparative Physiology A - Sensory Neural and Behavioral Physiology **167**: 533-543.
- Lin, J.-W. und D. S. Faber (1988). "An efferent inhibition of auditory afferents mediated by the goldfish Mauthner cell." Neuroscience **24**(3): 829-836.
- Manley, G. A., O. Gleich, A. Kaiser and J. Brix (1989). "Functional differentiation of sensory cells in the avian auditory periphery." Journal of Comparative Physiology A - Sensory Neural and Behavioral Physiology **164**: 289-296.
- Manley, G. A. und C. Köppl (1998). "Phylogenetic development of the cochlea and its innervation." Current Opinion in Neurobiology **8**(4): 468-474.

- Moiseff, A. und M. Konishi (1981). "The owl's interaural pathway is not involved in sound localization." Journal of Comparative Physiology A - Sensory Neural and Behavioral Physiology **144**: 299-304.
- Raabe, T. und C. Köppl (2003). "Bilaterally-projecting efferent neurones to the basilar papilla in the barn owl and the chicken." Brain Research **986**: 124-131.
- Roberts, B. L. und G. E. Meredith (1992). The efferent innervation of the ear: Variations on an enigma. The Evolutionary Biology of Hearing. D. B. Webster, R. R. Fay und A. N. Popper. New York, Springer Verlag: 185-210.
- Robertson, D., K. S. Cole und K. Corbett (1987). "Quantitative estimate of bilaterally projecting medial olivocochlear neurones in the guinea pig brainstem." Hearing Research **27**: 177-181.
- Robertson, D., A. R. Harvey und K. S. Cole (1989). "Postnatal development of efferent innervation of the rat cochlea." Developmental Brain Research **47**: 197-207.
- Ruel, J., R. Nouvian, C. G. d'Aldin, R. Pujol, M. Eybalin und J. L. Puel (2001). "Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea." European Journal of Neuroscience **14**(6): 977-986.
- Schwarz, D. W. F., I. E. Schwarz und A. Dezsoe (1992). "Cochlear efferent neurons projecting to both ears in the chicken, *Gallus domesticus*." Hearing Research **60**(1): 110-114.
- Schwarz, D. W. F., I. E. Schwarz und R. D. Tomlinson (1978). "Avian efferent vestibular neurons identified by axonal transport of [3H]adenosine and horseradish peroxidase." Brain Research **155**: 103-107.
- Schwarz, I. E., D. W. F. Schwarz, J. M. Frederickson und J. P. Landolt (1981). "Efferent vestibular neurons: A study employing retrograde tracer methods in the pigeon (*Columba livia*)." The Journal of Comparative Neurology **196**: 1-12.
- Siegel, S. (1987). Nichtparametrische statistische Methoden. Eschborn, Fachbuchhandlung für Psychologie, Verlagsabteilung.
- Smith, D. W., D. A. Turner und M. M. Henson (1999). "Psychophysical correlates of contralateral efferent suppression. I. The role of the medial olivocochlear system in "central masking" in nonhuman primates." Journal of the Acoustical Society of America **107**(2): 933-941.
- Strutz, J. (1981). "Efferent innervation of the cochlea." Ann Otol Rhinol Laryngol **90**: 158-160.
- Strutz, J. und C. L. Schmidt (1982). "Acoustic and vestibular efferent neurons in the chicken (*Gallus domesticus*)." Acta Otolaryngologica (Stockholm) **94**: 45-51.

- Takasaka, T. und C. A. Smith (1971). "The structure and innervation of the pigeon's basilar papilla." J Ultrastructure **35**: 20-65.
- Tanaka, K. und C. A. Smith (1978). "Structure of the chicken's inner ear: SEM and TEM study." The American Journal of Anatomy **153**: 251-272.
- Warr, W. B. (1992). Organization of olicocochlear efferent systems in mammals. The Mammalian Auditory Pathway: Neuroanatomy. D. B. Webster, A. N. Popper und R. R. Fay. New York, Springer Verlag: 410-448.
- Whitehead, M. C. und D. K. Morest (1981). "Dual populations of efferent and afferent cochlear axons in the chicken." Neuroscience **6**(11): 2351-2365.
- Zidanic, M. (2002). "Cholinergic innervation of the chick basilar papilla." Journal of Comparative Neurology **445**(2): 159-175.