

Prof. Dr. Marlies Knipper
Abteilung Molekulare Neurobiologie
Hörforschungszentrum
Klinik für Oto-Rhino-Laryngologie
Universität Tübingen

Möglicher Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung des Mobilfunks auf das Auslösen und den Verlauf von Phantomgeräuschen (Tinnitus)

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragsnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung des Auftragsgebers (Bundesminister für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) übereinstimmen.

Zusammenfassung

Im Tiermodell der Ratte wurde untersucht, ob elektromagnetische Wellen des Mobilfunks Ohrgeräusche (Tinnitus) und die begleitenden bzw. ursächlichen Veränderung der aktivitätsabhängigen Plastizitätsgene c-Fos, BDNF Exon 4 und Arg3.1/Arc im Innenohr (Cochlea), Mittelhirn (Colliculus inferior) und auditorischer Großhirnrinde (auditorischer Cortex) auslösen können.

Das entwickelte Antennensystem ermöglichte die weitgehend stressfreie Exposition der Tiere bei freier Beweglichkeit und lokaler Exposition im Bereich des Ohres und der auditorischen Gehirnstrukturen. 80 Tiere wurden in einem Verhaltensmodell konditioniert, Tinnitus mit einer Verhaltensänderung anzuzeigen. Anschließend wurden sie für 4 Wochen 5 mal wöchentlich für 2 Stunden täglich Feldern nach GSM-900 Standard 900 MHz mit Stärke 0.02, 0.2, 2, 20 W/kg SAR (Specific Absorption Rates) und Scheinbefeldung ausgesetzt. Im wöchentlichen Abstand wurde das Verhalten während der Expositionsphase und nach 2 Wochen Erholungsphase gezielt auf Tinnitus-korrelierte Veränderungen hin untersucht. Von 80 weiteren Tieren, die dem gleichen Befeldungsprotokoll ausgesetzt waren, wurden Gewebeproben aus Cochlea, dem inferioren Colliculus (IC) und dem auditorischen Cortex (AC) akut nach der Expositionsphase und nach einer Erholungsphase von 2 Wochen entnommen und die Expression der aktivitätsabhängigen Plastizitätsgene untersucht. Weitere 20 unbehandelte Tiere gingen in die Kontrollgruppe für behandlungsbedingte, expositionsunabhängige Veränderungen.

Alle Untersuchungen wurden verblindet durchgeführt. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Effekt der SAR-Stärke auf Verhaltensparameter, die mit Tinnitus einhergehen. Unspezifische Einflüsse der befeldungsunabhängigen, allgemeinen Behandlung konnten im Verhaltensmodell erfasst werden. Die molekularbiologischen Analysen ergaben keine Veränderungen aktivitätsabhängiger Plastizitätsgene, die mit der SAR-Stärke korrelierten. Die typischerweise bei Tinnitus auftretenden Veränderungen waren nicht nachweisbar.

Ein Einfluss elektromagnetischer Wellen im GSM-Standard 900 MHz über eine Expositionsdauer von 4 Wochen kann mit den vorliegenden Daten im Tiermodell an der Ratte bei den gegebenen SAR-Stärken bis 20 W/kg nicht nachgewiesen werden.

Summary

We examined the potential of the electromagnetic waves generated by mobile phone systems to induce both phantom sound perception (tinnitus) and changes in the expression of the activity-dependent plasticity genes c-Fos, BDNF and Arg3.1/Arc in the cochlea, midbrain (IC) and auditory cortex (AC) in a rat animal model.

An aerial system was adapted which allowed a local exposure to the ear and the auditory brain structures. The rats were able to move freely and were maintained in non-stress conditions. Eighty animals were behaviorally trained (conditioned) to indicate tinnitus perception with a change in behavior. Subsequently, they were exposed to GSM-900 standard electromagnetic waves with Specific Absorption Rates (SAR) of 0.02, 0.2, 2, 20 W/kg and sham exposure for 4 weeks, 5 times per week and 2 hours daily. In weekly tests they were behaviorally monitored for tinnitus during the exposure period and after 2 weeks recovery. Eighty additional animals were exposed to the same exposure protocol and tissue samples taken from cochlea, IC and AC directly after exposure or after 2 weeks recovery for later expression analyses of activity-dependent plasticity changes. The tissues of 20 untreated animals were taken as a control for handling effects and effects unspecific for exposure.

The experiment was conducted in a double-blind manner. Statistical analyses did not reveal significant effects of SAR-strength on tinnitus-related behaviour; however, effects related to general treatment were observed. Molecular analyses did not reveal a change in the expression of activity-dependent plasticity genes which could be correlated with SAR-strength. Expression changes typically found with tinnitus were not detected.

Analysis of the available data in our rat animal model revealed no substantial impact of GSM-900 standard electromagnetic waves of up to 20 W/kg SAR-strength following 4 weeks of exposure.

Abkürzungen

A, B, C, D, E	Befeldungsgruppen (0, 0.02 - 20 W/kg), verblindet
ABR	Auditorische Hirnstammpotenziale (engl. auditory brainstem responses)
AC	Auditorischer Cortex, Kerngebiet der zentralen auditorischen Bahn im Cortex
AMPA	Synthetischer Agonist (Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure Adenosin) der AMPA-Rezeptoren (Untergruppe der Glutamat-Rezeptoren, depolarisierende Neurotransmitter-Rezeptoren im Zentralnervensystem)
Arg3.1/arg	Activity-related Gene 3.1
BDNF	Brain-derived Nerve Growth Factor
cDNA	Copy-DNA (auch Complementary DNA). Einzelsträngige Desoxyribonucleinsäure (engl: desoxyribonucleic acid), Produkt der enzymatischen Bildung von DNA aus RNA durch die reverse Transkriptase, ein Enzym von Retroviren (z.B. HIV) zur Infektion eukaryontischer Wirtszellen mit viraler RNA.
c-Fos	Immediately Early Gene
DPOAE	Distorsionsprodukt der Otoakustischen Emission
EMW	Elektromagnetische Wellen (des Mobilfunks)
EPSP	Erregendes postsynaptisches Potenzial. Neurotransmitterwirkung auf nachgeschaltete Nervenzellen
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure, i.d.R. hemmender Neurotransmitter
HF	hochfrequent
IC	Inferiorer Colliculus, Kerngebiet der zentralen auditorischen Bahn im Mittelhirn
KG	Körpergewicht
LTP	Long Term Potentiation, lang anhaltende Verstärkung einer synaptischen Verknüpfung bei Lernvorgängen
M1-M8	Messreihe 1-8 (im chronologischen Ablauf der Studiendurchführung)
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NaCl	siehe Saline
OAE	Otoakustische Emission
OB	Verhaltensmodell (engl. operant behavior)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Saline	Physiologische Kochsalzlösung, NaCl 0.9%
Salizylat	Wirkstoff von Aspirin
SAR	Spezifische Absorptionsrate, gleichbedeutend mit der Stärke der elektomagnetischen Einwirkung der Befeldung
SPL	Schalldruckpegel (in dB SPL)
TAEAOE	Transiente auditorisch evozierte Otoakustische Emission
W/kg	Watt/kg

Einführung

Hochfrequente, elektromagnetische Felder von Mobilfunkquellen (Sendemasten und Mobiltelefone) sind bisher nur unzureichend auf ein mögliches Potenzial untersucht worden Hörstörungen und Tinnitus zu verursachen. Da ein großer Teil der Bevölkerung unter Hörstörungen und Tinnituswahrnehmungen leidet und diese Störungen oft in direkten Zusammenhang mit Exposition durch elektromagnetische Felder des Mobilfunks gebracht werden, besteht ein hoher Bedarf einen eventuell bestehenden Zusammenhang aufzudecken. Da Untersuchungen am Menschen mit Grenzwert überschreitenden Expositionsintensitäten aus ethischen Gründen nicht möglich sind und "Freifeldstudien" meist durch die hohe Variation sozial- und umfeldrelevanter Faktoren am Grundrauschen scheitern, bietet sich die Untersuchung an einem klar definierten und reproduzierbaren Tiermodell an. Tiermodelle am Kleinsäuger (Nagern) sind in der Hörforschung gut etabliert, die Untersuchungen unter Bedingungen wie bei der Exposition mit elektromagnetische Wellen des Mobilfunks scheitern allerdings oft an methodischen Problemen (in diesem Zusammenhang sei auf die Literaturstudie verwiesen, die als Vorarbeit für das vorliegende Projekt ausgearbeitet wurde und die diesem Bericht als Anlage II beiliegt). Bisher stand kein adäquates Tiermodell zur Verfügung, um feinste Hörstörungen oder gar Tinnitus im Tiermodell nachzuweisen.

Das Tiermodell

Wir konnten erstmals in Deutschland ein Verhaltensmodell zur Untersuchung von Tinnitus im Tiermodell der Ratte etablieren (Rüttiger et al., 2003). Das Tier wird in so genannten Skinner Boxen trainiert bei Wahrnehmung von definierten Breitband-Geräuschen eine Verhaltensänderung zu zeigen, die digital messbar ist. Bei der Induktion von Phantomwahrnehmung (Tinnitus), z.B. durch die Injektion von Salizylat (dem Wirkstoff von Aspirin®) oder nach definiertem Lärmtrauma, zeigen die Tiere auch bei Stille eine messbare, digital auswertbare Verhaltensänderung (Rüttiger et al., 2003). Salizylat (siehe zur Übersicht: Evans et al., 1981; Boettcher and Salvi, 1991; Eggermont and Roberts, 2004) und Lärmtrauma (Cazals, 2000; Kaltenbach and Afman, 2000; Salvi et al., 2000; Moller, 2003; Eggermont and Roberts, 2004) führen bekanntermaßen in Tier und Mensch zu Tinnitus. Unkontrollierte Spontanentladung und Übererregung peripherer und/oder zentraler auditorischer Projektionen werden mit der Wahrnehmung von Phantomgeräuschen in Verbindung gebracht (siehe zur Übersicht: (Plinkert, 1995; Moller, 2006; Bartels et al., 2007; Saunders, 2007).

Magneto-Encephalographie-Studien (MEG) weisen darauf hin, dass distinkte neuronale Projektionen im auditorischen Cortex von Tinnituspatienten reorganisiert sind (Hoke et al., 1998; Muhnickel et al., 1998), ein Phänomen, das auch im Tiermodell im auditorischen Cortex, z.B. nach Deprivation oder peripherer Verletzung in der Katze (Harrison et al., 1991; Rajan and Irvine, 1998) oder in Nagern (Maldonado and Gerstein, 1996), beobachtet wurde. Mit Hilfe der funktionalen bildgebenden Magneto-Resonanz-Technik (fMRI) konnten Tinnitus-korrelierte Aktivitätsänderungen im inferioren Colliculus (Melcher et al., 2000) und im auditorischem Cortex (Flor et al., 2001; Lockwood et al., 2002) nachgewiesen werden. Auch im Tiermodell, in dem Tinnitus durch Salizylat induziert werden kann (Penner and Jastreboff, 1996; Bauer et al., 1999), sind vergleichbar dem Menschen Aktivitätsänderungen im Cortex schon 3 Stunden nach Salizylatbehandlung mittels 2-Deoxyglucose-Markierung messbar (Wallhausser-Franke et al., 1996).

Veränderte neuronale Aktivität, die zu veränderter synaptischer Effizienz (Plastizität) führt, ist mit einer veränderten Expression von so genannten aktivitätsabhängigen Plastizitätsgenen korreliert. So ist der „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) ein Schlüsselmodulator neuronaler Plastizität, der für Langzeit- und Kurzzeit-Potenzierungsphänome an Synapsen essentiell ist (zur Übersicht siehe: Korte et al., 1995; Knipper and Rylett, 1997; Thoenen, 2000; Poo, 2001; Berardi et al., 2003; Lu, 2003; Du and Poo, 2004; Bramham and Messaoudi, 2005). Neuronale Aktivität wirkt differenziell auf die Aktivierung unterschiedlicher Promotoren untranslatierter BDNF Exone, Exon I-IV (Timmusk et al., 1993; Lauterborn et al., 1996; Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998; Takeuchi et al., 2002; Poulsen et al., 2004), was u.a. zum selektiven Transport von BDNF-Transkripten (Pattabiraman et al., 2005) und BDNF-Proteinen (West et al., 2001) an aktivierten Synapsen führen kann. Entsprechend kann spontane Aktivität den BDNF-Transport zu Synapsen (Chytrova and Johnson, 2004) und die BDNF-Freisetzung (Ba et al., 2005) triggern, was BDNF zu einem idealen Protein zur Untersuchung von veränderter neuronaler Aktivität bei Tinnituswahrnehmungen macht. Eine veränderte Arg3.1/Arc Expression konnte direkt mit BDNF-induzierten Plastizitätsänderung in Zusammenhang gebracht werden (Yin et al., 2002; Ying et al., 2002). Man geht zurzeit davon aus, dass Arg3.1/Arc nach synaptischer Stimulierung hochreguliert wird und retrograd zur „aktiven Synapse“ transportiert wird (Montag-Sallaz et al., 1999; Guzowski et al., 2000; Waltereit et al., 2001). Dort verändert es offenbar als Zytoskelettprotein die Rekrutierung von Glutamat-Rezeptoren, wobei eine Erhöhung des Arg3.1/Arc mRNA-Spiegels mit einer Reduzierung von membranständigen ionotropen erregenden Glutamat-Rezeptoren vom AMPA-Typ und Reduktion des erregenden postsynaptischen Potenzial (EPSP) einhergeht.

Eine Reduktion des Arg3.1/Arc mRNA-Spiegels scheint dagegen mit einer Erhöhung membranständiger AMPA-Rezeptoren und entsprechender Erhöhung des EPSP korreliert zu sein (Shepherd et al., 2006; Tzingounis and Nicoll, 2006). Wie BDNF ist auch Arg3.1/Arc für Langzeitpotenzierung (LTP) und Gedächtnis essentiell (Guzowski et al., 2000; Ying et al., 2002; Bramham and Messaoudi, 2005). Kürzlich wurde gezeigt, dass insbesondere positive sensorische Erfahrung durch z.B. nicht-traumatische Geräusche (Mahlke and Wallhauser-Franke, 2004), Geruch (Zou and Buck, 2006) oder durch angereicherte Umgebung (Ramirez-Amaya et al., 2005) zur Erhöhung der Expression von Arg3.1/Arc führen.

Die Induktion von Phantomgeräuschwahrnehmungen ist, wie von uns erstmals gezeigt, mit einer Veränderung aktivitätsabhängiger Gene im peripheren auditorischen System (Spiralganglienneuronen) und zentralen auditorischen Kerngebieten (inferiorer Colliculus, auditorischer Cortex) korreliert (Tan et al., 2007). So konnten wir zeigen, dass verschiedene Tinnitus-induzierende Paradigmen in cochleären Ganglienzellen gleichermaßen zu einer Hochregulation von BDNF Exon IV und c-Fos führen, korreliert mit einer Hochregulation von BDNF und GABA (dem am weitesten verbreiteten hemmenden Neurotransmitter des Gehirns) im inferioren Colliculus und einer signifikanten Reduktion von Arg3.1/Arc im auditorischen Cortex.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass lokale Applikation eines Pharmakons (GABA-Agonist) an das Innenohr von Tieren mit Tinnitus nicht nur die Genexpressionsverschiebungen von BDNF in der Cochlea korrigiert, sondern auch die veränderte Expression von Arg3.1/Arc im AC und auch Tinnituswahrnehmungen korrigiert (Panford-Walsh et al., submitted). Wir gehen zurzeit davon aus, dass eine mit Tinnitus einhergehende Reduktion von Arg3.1/Arc im auditorischen Cortex möglicherweise sogar direkt mit der in Tier und Mensch nachgewiesenen Übererregbarkeit kortikaler Neurone bei Tinnitus (siehe zur Übersicht: (Cazals, 2000; Kaltenbach and Afman, 2000; Salvi et al., 2000; Eggermont and Roberts, 2004) einhergehen könnte. Arg3.1/Arc spielt über die Regulation von Glutamat-Rezeptoren in der Synapse eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung eines normalen Antwortverhaltens einer Nervenendigung auf einen Stimulus. Als Regulator homeostatischer Kompensation bei akuten Veränderungen synaptischer Erregbarkeit kann Arg3.1/Arc den „Synapsen-Output“ an die jeweilige Signalstärke anpassen (Moser et al., 1998; Davis and Bezprozvanny, 2001; Turrigiano and Nelson, 2004; Shepherd et al., 2006). Danach gilt die beobachtete Veränderung (Erniedrigung des Arg3.1/Arc Spiegels im AC und die Erhöhung von BDNF in der Cochlea

und im IC (Tan et al., 2007; Panford-Walsh et al., submitted) für uns als ein molekulares Korrelat von Tinnitus.

Schließlich wird die c-Fos Expression mit neuronaler Erregbarkeit korreliert (Curran and Morgan, 1995; Zhang et al., 2002). Im auditorischen System wurde eine veränderte c-Fos Expression während der Entwicklung (Friauf, 1995) gezeigt. Darüber hinaus weisen verschiedene Studien auf einen direkten Zusammenhang von veränderter c-Fos Expression und Stress hin (Massa et al., 1996; Martinez et al., 2002). Aus Studien anderer Arbeitsgruppen war darüber hinaus bekannt, dass nach Gaben von Salizylat, das im Tiermodell Tinnitus induziert, c-Fos im Stammhirn, inferioren Colliculus, auditorischen Cortex und im limbischen System verändert ist (Wallhausser-Franke et al., 2003; Mahlke and Wallhausser-Franke, 2004). Die Analyse von c-Fos in der Cochlea und im IC gibt uns daher sowohl eine Information über eine neuronale Aktivitätsänderung durch Befeldung als auch einen Hinweis auf eine Stressinduktion durch Befeldung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die verschiedenen Studien belegen, dass sich das Auftreten von Tinnitus im Tiermodell durch verschiedene experimentelle Verfahren nachweisen lässt: (1) Verhaltensänderung, (2) aktivitätsabhängige Gene in der Cochlea und in zentralen auditorischen Kerngebieten (inferiorer Colliculus, auditorischer Cortex). Beide experimentelle Verfahren kombiniert, ermöglichen eine zuverlässige Aussage über ein mögliches Potenzial hochfrequenter elektromagnetischer Felder Phantomgeräusche zu induzieren.

Zielsetzung

Der direkte Bezug zur potentiellen Auslöseschwelle von Tinnitus durch HF Exposition soll ermittelt werden durch die Bestimmung der Schwellenwerte für (1) die Induktion von Phantomgeräuschwahrnehmungen im Tierverhaltensmodell, akut und nach Erholung und (2) für die Induktion von Verschiebungen aktivitätsabhängiger Gene in der Cochlea und im zentralen auditorischen Kerngebieten akut und nach Erholung. Alle Analysen sind im Labor etabliert.

Methoden

Tiere und Haltung

Für das Tierversuchsvorhaben liegt die Genehmigung HN1/06 des Regierungspräsidiums Tübingen vor. In dieser Genehmigung sind alle Haltungs- und Behandlungsprozeduren genau beschrieben und für die Anwendung im Tierversuch gestattet. Die Tierversuchsgenehmigung wurde mit Unterstützung und Beratung durch den Fachtierarzt für Versuchstierkunde und Tierschutzbeauftragten der Universität ausgearbeitet, der mit seinen Mitarbeitern das Tierversuchsvorhaben betreut und überwacht hat. Im Rahmen der vorliegenden Genehmigung wird ausdrücklich betont, dass den Versuchstieren in dem vorliegenden Tierversuchsvorhaben kein offensichtliches Leid zugefügt wird. Die Befeldung und die dazu notwendige kurzzeitige Fixierung der Tiere wurden als geringe Beeinträchtigung eingestuft. Wir gehen davon aus, dass das Wohlbefinden der Tiere durch die Behandlung nicht dauerhaft beeinträchtigt wurde.

Für Vorversuche wurden 5 Ratten des Wistar-Stammes aus eigener Zucht verwendet (Alter 3-6 Monate). An diesen Tieren wurde das Antennenträger-System etabliert und Vorversuche zur Tragetoleranz und zu Temperaturverläufen bei Befeldung im Befeldungskäfig durchgeführt.

Für die Messreihen 1-8 (Messreihen 1,3,5 und 7 für Molekularbiologie, Messreihen 2,3,6, und 8 für Hörmessungen und Verhaltensexperimente) wurden je 20 Tiere des Wistar- bzw. des Wistar/Han Stammes verwendet. Diese Tiere stammten von Charles River und wurden im Alter von 2-3 Monaten in die Tierhaltung der HNO eingeführt. Mit Abschluss der molekularbiologischen Versuche waren die Tiere 3-4 Monate bzw. mit Abschluss der Verhaltensversuche 5-6 Monate alt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Stichprobengröße der einzelnen Versuchsblöcke.

Die Tiere wurden in Standardkäfigen (Typ 4 hoch) in Gruppen zu 4 Tieren gehalten. Wasser- und Futtergaben erfolgten durch das Pflegepersonal der Tierhaltung der HNO-Klinik, ebenso die regelmäßige Reinigung der Käfige und Gesundheitskontrollen. Die Tierhaltung erfüllt den SPF-Standard (spezifisch pathogenfreie Haltung).

Tabelle 1 Stichprobenzahlen

Messreihe	Bezeichnung	Gewebe	Tierzahl (pro Versuchsgruppe)	Hörprüfung
	unbehandelte Kontrollen	RT-PCR	20 (20)	-
M1	akut	RT-PCR	20 (4)	-
M2	Verhalten	-	20 (4)	x
M3	nach Erholung	RT-PCR	20 (4)	-
M4	Verhalten	-	20 (4)	x
M5	akut	RT-PCR	20 (4)	-
M6	Verhalten	-	20 (4)	x
M7	nach Erholung	RT-PCR	20 (4)	-
M8	Verhalten	-	20 (4)	x
Gesamtzahl	Verhalten	-	80 (16)	x
	akut	RT-PCR	40 (8*)	-
	nach Erholung	RT-PCR	40 (8*)	-

*jeweils 2 Tiere wurden für die Analyse gepoolt. 8 Tiere ergaben 4 Proben. An jeder Probe wurden zwei Bestimmungen gemacht.

Hörprüfung

Vor einer Trainingseinheit werden induzierte Hirnstammpotenzialableitungen (ABR) durchgeführt, um die normale Hörfähigkeit der Tiere zu verifizieren.

Hierzu wurde vor Versuchsbeginn an allen Tiere, die im Verhaltensmodell getestet werden sollten, die Hörschwelle mit Hilfe von der auditorisch evozierten Hirnstammpotenzialmessungen (ABR, engl: auditory brainstem responses) bestimmt. Das Verfahren wird ausführlich in (Knipper et al., 2000) und (Carnicero et al., 2004) beschrieben. Kurz: Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion eines Gemischs aus Xylazin (Xylazinhydrochlorid 5mg/kg KG, Rompun, Bayer, Leverkusen) und Ketamin (Ketaminhydrochlorid 70mg/kg KG, Pharmacia-Upjohn/Pfizer, Erlangen) narkotisiert. Die schlafenden und reflexfreien Tiere wurden in einer schalldichten Kabine (IAC 400, Niederkrüchten) vor einen Lautsprecher (Beyerdynamik DT-911, Heilbronn) auf ein regelbares Heizkissen gelegt (Lohmann Research) und die Körpertemperatur über den Verlauf der Messung (30-60 min) über einen Temperatursensor unter dem Bauch des Tieres konstant gehalten. Über den Lautsprecher wurden Klicktöne (10 μ s Dauer, reversierende Polarität, 30 Wiederholungen pro Sekunde) aufsteigender Lautstärke

(Schalldruckpegel, SPL) präsentiert. Über subkutane Hautelektroden an Ohr (Mastoid, Ableitelektrode), Stirn (Referenzelektrode) und Rücken (Erdung) wurde das Summenpotenzial des Hirnstamms über die folgenden 10 ms aufgezeichnet und 64/256-fach zum ABR Signal gemittelt. Als Hörschwelle wurde der geringste Schalldruck definiert, der zu einem reproduzierbaren, vom Rauschen deutlich verschiedenen Ausschlag im ABR Signal führte (typischerweise 0-20 dB SPL).

Konditionierung im Verhaltensmodell

Ratten werden operant konditioniert, um auf den Wechsel von Stille und Geräuschwahrnehmung mit einer deutlichen Verhaltensänderung zu antworten. Wird von der Ratte ein Ohrgeräusch (Tinnitus) empfunden, verhält sie sich messbar anders. Über die Verhaltensleistung kann direkt auf die Tinnitusempfindung der Tiere geschlossen werden.

Die Studiengestaltung ermöglicht die Korrelation zwischen Befeldung mit elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks, Tinnitus im Tiervershaltensmodell und Veränderungen in der Expression aktivitätsabhängiger Gene bei verschiedenen Befeldungsstärken. Um Tinnitus im Tiermodell nachzuweisen, bedarf es eines Verhaltensmodells. In unserem Labor des Hörforschungszentrums der HNO-Klinik in Tübingen haben wir ein solches Verhaltenstiermodell an der Ratte etabliert. Das Modell ist ausführlich in Rüttiger et al (2003) beschrieben und wird in der Zwischenzeit routinemäßig dazu eingesetzt, Tinnitus im Ratten-Tiermodell nachzuweisen (siehe z.B. Tan et al., 2007). In Kürze: Ratten werden in angepassten Verhaltenskäfigen (Skinnerbox, Abb. 1) darauf konditioniert, Wahrnehmung von Ton mit motorischer Aktivität zu beantworten (die Tiere laufen zwischen zwei Belohnungsnischen, in denen unter bestimmten Voraussetzungen ein Tropfen Zuckerwasser als Belohnung angeboten wird, hin und her), und bei Wahrnehmung von Stille motorisch inaktiv zu bleiben (die Tiere setzen sich auf eine Ruheplattform und warten auf die nächste Tonwahrnehmung). Dies kann erreicht werden durch Belohnung mit Zuckerwasser bei Zugriff auf den Belohnungsspender während ein Rauschton dargeboten wird und mit Bestrafungen durch leichte Elektroschocks bei Zugriff auf den Belohnungsspender während es still ist (siehe Schema in Abb. 2).

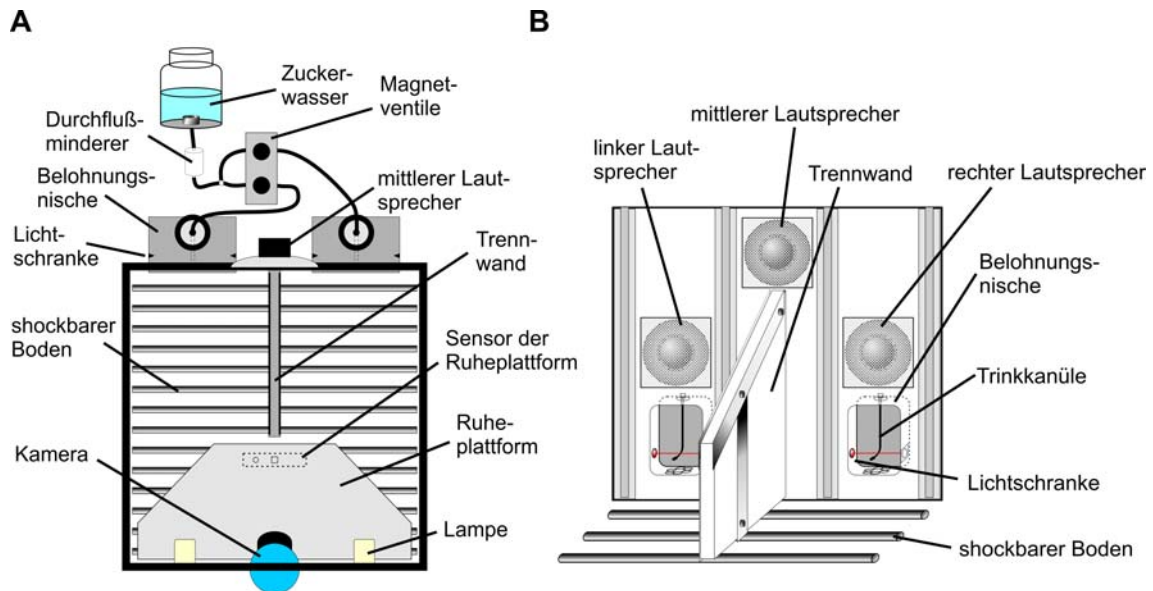


Abb. 1: Schematische Darstellung des Verhaltenskäfigs (Skinnerbox). **(A)** Aufsicht. **(B)** Schrägansicht auf die Seitenwand mit Belohnungsnischen, Lautsprechern und Trennwand. Alle Sensoren und Steuerungen sind automatisiert und computerkontrolliert.

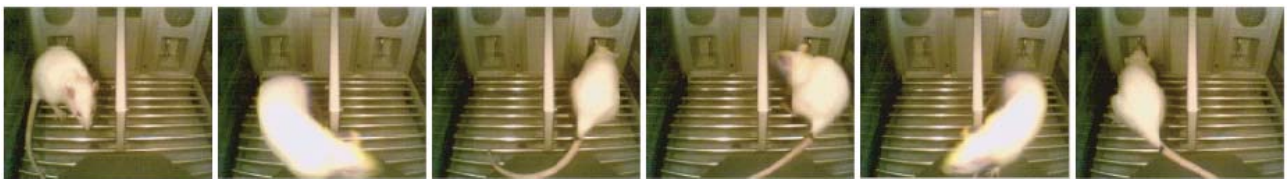
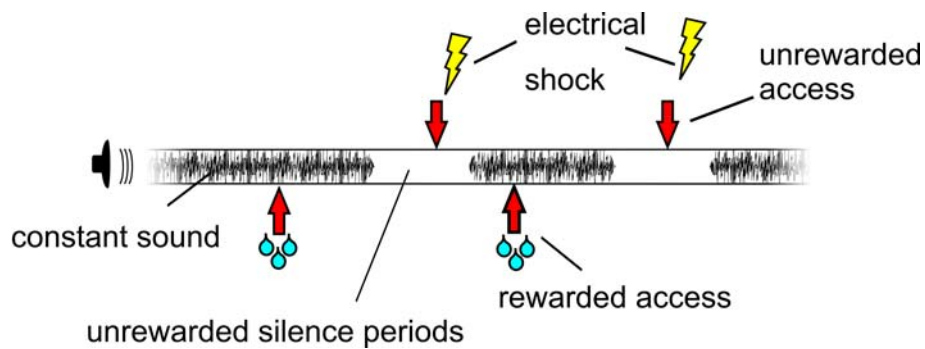


Abb. 2: Schema des Verhaltenstrainings in der Skinnerbox und Momentaufnahmen der Aktivität des Tieres bei der Wahrnehmung des Rauschtons. Nimmt die Ratte einen Ton wahr, läuft sie rasch von Seite zu Seite, greift auf den Belohnungsspender zu (in der rechten und linken Nische) und nimmt ggf. die Zuckerwasserbelohnung auf.

Analyse der Verhaltensdaten

In einer Verhaltenssitzung werden alle Aktionen des Tieres aufgezeichnet. Von Bedeutung für die Auswertung sind: (a) die genaue Zeit eines Zugriffs auf einen Belohnungsspender, (b) die Seite der besuchten Belohnungsnische, (c) die Tonsituation (Stille- oder Geräuschphase). Aus diesen Zeiten lässt sich ableiten:

(1) Gesamtaktivität:

$$activity = n_{\text{sound}} / t_{\text{sound}} \quad [Zugriffe/min]$$

activity = Relative Aktivität bei Tonphase
 n_{sound} = Zahl der Zugriffe bei Tonphasen
 t_{sound} = Dauer der Tonphasen

(2) Tinnitus:

$$tinnitus = \frac{n_{\text{silence}} / t_{\text{silence}} \quad [Zugriffe/min]}{n_{\text{sound}} / t_{\text{sound}} \quad [Zugriffe/min]}$$

tinnitus = Relative Tinnitusaktivität
 n_{silence} = Zahl der Zugriffe bei Stillephase
 t_{silence} = Dauer der Stillephase
siehe auch (1)

(3) Wechselhäufigkeit:

$$changes = \frac{c_{\text{sound}} / t_{\text{sound}} \quad [Wechsel/min]}{n_{\text{sound}} / t_{\text{sound}} \quad [Zugriffe/min]}$$

changes = Relative Wechselhäufigkeit
 c_{sound} = Zahl der Seitenwechsel bei Tonphase
 t_{sound} = Dauer der Tonphase
siehe auch (1)

Test auf Induzierbarkeit von Tinnitus im Verhaltensmodell

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 6-8 Wochen operant mit einem Verhaltensprotokoll aufsteigenden Schwierigkeitsgrades konditioniert (siehe hierzu Rüttiger et al., 2003). Im Schema der Abb. 1 ist das Konditionierungsprinzip mit dem ständigen Wechsel der Bewertung eines Zugriffs der Ratte auf einen Belohnungsspender verdeutlicht (Belohnung der Zugriffe bei Tonphasen und Bestrafung der Zugriffe bei Stillephasen). Im Anschluss an die Konditionierung wurde der Erfolg der Verhaltensdressur durch Induktion von reversiblen Tinnitus mittels Salizylatinjektion

überprüft und mit dem Verhalten nach einer Scheinbehandlung mittels Saline verglichen. Hierzu wurde den Tieren vor dem Verhaltenstest eine Injektion von 350 mg/kg KG Salizylat, gelöst in Injektionswasser (5 ml/kg KG) bzw. ein entsprechendes Volumen von Salinelösung verabreicht. Salizylatinjektionen dieser Größenordnung führen nachweislich im Tiermodell zu Tinnitus (Cazals, 2000). Der Tinnitus ist ab 1 Stunde nach Injektion nachweisbar und hält mindestens 6-12 Stunden an. Es gibt einen dosisabhängigen Zusammenhang von Injektionsmenge, Hörverlust und Tinnitus (siehe z.B. Rüttiger et al., 2003; Tan et al., 2007; Panford-Walsh et al., submitted). Drei Stunden nach Substanzinjektion wurde das Verhalten in der Skinnerbox getestet.

Verhaltenstest

Im Verhaltenstest war der Bestrafungsreiz ausgeschaltet und auch die Belohnungsgabe wurde nach 3 Minuten ausgesetzt. Diese ersten 3 Minuten wurden für die Datenauswertung verworfen und das Spontanverhalten der Tiere in den verbleibenden 20 Minuten analysiert. Falls die Motivation der Tiere nicht ausreichte, um eine durchschnittliche Aktivität von mindestens 3 Zugriffen pro Minute zu erhalten, wurde der Verhaltenstest nach einer weiteren Stunde ohne neuerliche Injektion wiederholt. An einem anderen Tag, nach mindestens 48 Stunden Erholung und gegebenenfalls einer Nachkonditionierung, wurde der "Kreuz-Verhaltenstest" mit der jeweils anderen Behandlung (Saline oder Na-Salizylat) durchgeführt. Durch den individuellen Vergleich der Verhaltensdaten konnte die erfolgreiche Konditionierung bestätigt werden.

Test auf Tinnitus im Verhaltensmodell in der Befeldungsphase

Vor Beginn der Befeldung wurde, wie oben beschrieben, ein Verhaltenstest durchgeführt ("Vor Befeldung" bzw. "Pre"), ebenso am Ende jeder Befeldungswoche ("Befeldung Woche 1-4" bzw. "E1-E4") sowie Erholungswoche ("Erholung Woche 1-2" bzw. "R1-R2"). Bei Bedarf fand eine Auffrischkonditionierung statt, um die Motivation der Tiere zu erhalten.

Statistische Auswertung der Verhaltensdaten

Mittelwertsdaten der Vortests (Tinnitusinduktion nach Salizylatinjektion) wurden mit dem Student's t-test auf signifikante Unterschiede getestet. Für multiples Testen wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holms angepasst. Die Zeitverläufe des

Tinnitusverhaltens (tinnitus), der Aktivität (activity) und des Wechselverhaltens (changes) wurde mit der 1-way Repeated Measures ANOVA und Tukey's post test auf Mittelwertsunterschiede verglichen.

Molekularbiologische Methoden

Vor der Dekapitation wurden die Tiere mit CO₂ narkotisiert. Die Cochleae wurden, wie beschrieben (Knipper et al., 2000), dessektiert und schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C eingefroren. Der auditorische Cortex (anterior und posterior vom so genannten Ectosylvianen Sulcus, dem primären auditorischen Feld A1) und der inferiore Colliculus wurden entsprechend Paxinos and Watson (1998) identifiziert, dessektiert und zur RNA Präparation sehr schnell bei -70°C eingefroren. Gesamt-RNA wurde von Cochlea- und Gehirngewebe mit Hilfe des RNeasy Mini Kit von QIAGEN isoliert. Eine reverse Transkription der IC- und AC-RNA erfolgte mit SensiScript Reverse Transcriptase (QIAGEN). Es wurde eine Duplex-PCR-Reaktion in Analogie zu (Givalois et al., 2001; Zuccato et al., 2001) durchgeführt. Hierbei wurde mit identischem Ansatz eine PCR-Reaktion mit dem „housekeeping gene“ Cyclophilin als interne Kontrolle durchgeführt, sodass die Intensität des aktivitätsabhängigen Gens auf die Menge eingesetzter mRNA normiert wird. Darüber hinaus wurden in jedem Ansatz „Negativkontrollen“ gefahren, in denen die PCR-Reaktion ohne cDNA durchgeführt wird. Die Anzahl der Zyklen und die „Annealing“ Temperatur wurde individuell so optimiert, dass für Arg3.1/Arc, BDNF Exon IV, c-Fos und Cyclophilin noch keine Sättigung erreicht war. PCR-Primersequenzen für Arg3.1/Arc sind: forward 5'-caatgtgatcctgcagattg-3' und reverse 5'-tgatggcataggggctaaca-3'; für BDNF Exon IV wurden die Primer forward 5'-ggagcgtgacaacaatgtgactccact-3' und reverse 3'-ggaagtgtacaagtccgcgtccttat-3' und für Cyclophilin forward 5'-cgtgctctgagcactggggagaaa-3' und reverse 5'-catgccttcttcaccttcccaaagac-3' eingesetzt (Zha et al., 2001); für c-Fos wurden die Primer forward 5'-gacttttgccgagatctgtc-3' und reverse 5'-attcctttcccttcggattc-3' verwendet (Tan et al., 2007). Die Amplifikationsbedingung für Arg3.1/Arc, BDNF, c-Fos und Cyclophilin entsprechen einer so genannten "Touch-Down" PCR mit einer initialen Denaturierungsphase von 94°C für 3 Minuten, 1 x 5, 1 x 5 und 1 x 28 Zyklen (Denaturierung: 94°C für 30 Sekunden; „Annealing“: 72°C/64°C/55°C für je 30 Sekunden; Synthese: 72°C für 30 Sekunden) und einer finalen Bindungsphase von 5 Minuten bei 72°C. Zum Nachweis korrekt amplifizierter PCR-Produkte sind alle amplifizierten Produkte zu Beginn kloniert und sequenziert worden (Tan et al., 2007; Panford-Walsh et al., submitted). Zur Quantifizierung der PCR-Reaktion wurde eine densitometrische Analyse

mit Hilfe des CellF Systems (Olympus Softimaging Solution, OSIS) durchgeführt. Die Intensität der amplifizierten Banden für jedes aktivitätsabhängige Gen wurde auf das „Housekeeping Gene“ Cyclophilin normiert. Die einzelnen Befeldungsgruppen und die unbefeldete Kontrollgruppe können hinsichtlich der Expressionsstärke aktivitätsabhängiger Gene (Arg3.1/Arc, BDNF Exon IV, c-Fos) als Mittelwert und Standardabweichung direkt miteinander verglichen werden (als % von der Expressionsstärke des „Housekeeping Gene“ Cyclophilin, das als 100% berechnet wird).

Statistische Auswertung der Daten aus der Molekularbiologie

Die erste statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des ungepaarten Student's t-test, * = $p < 0.05$. Die Anzahl an Tieren zur statistischen Analyse betrug pro Expositionsintensität 8 (16 Cochleae). Es wurden Cochleae von je 2 Tieren gepoolt und pro RNA-Isolation (4 x 4 Cochleae) je eine Reverse Transkriptase (RT) Umschreibung durchgeführt. Für jede Reverse Transkriptase Umschreibung wurden anschließend zwei RT-PCR Reaktionen durchgeführt. D. h. die statistische Auswertung lieferte für jede Expositionsintensität RT-PCR Information aus 8 Tieren bzw. 16 Cochleae, die letztlich aus 4 RT mit je 2 RT-PCRs resultieren (4 x 4 Cochleae / 4 x RT / 4 x 2 RT-PCRs).

Weiterhin wurde statistisch überprüft, ob die Expressionsdaten mit der Expositionsintensität korrelierten. Hierzu wurde das 95% Konfidenzintervall (KI) für den Pearson Rang-Korrelations-Koeffizient berechnet und überprüft, ob das KI den Wert Null (keine Korrelation) einschließt. Ist der Null-Wert nicht im KI enthalten, kann davon ausgegangen werden dass eine Korrelation in den Daten vorliegt. Mit der 1-way ANOVA und Tukey's post-test wurden statistische Unterschiede der Mittelwerte überprüft. Dieser Test lieferte auch eine Einschätzung, ob die Streuungen unterschiedlich sind. War dies der Fall, wurde mit dem F-Test auf statistische Streuungsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen geprüft.

Befeldungssystem

Ein Antennensystem zur Mobilfunkbefeldung an frei beweglichen Tieren wurde etabliert.

Siehe hierzu Anhang I:

C Adami, A Bahr, T Bolz: „Zwischenbericht, Aufbau einer Expositionseinrichtung“ vom 22. Mai 2006.

Das Antennensystem wurde speziell so angepasst, dass sich die Tiere innerhalb des Befeldungskäfigs weitgehend frei bewegen konnten. Dies wurde durch eine Befeldungsjacke aus Stoff mit Antennenträger realisiert, der die Extremitäten und den Kopf (bis auf den Ring in Höhe der Ohren) freiließ. Das "Anzieh-Prozedere" dauerte ca. 1 Minute, inklusive der Zeit für Gewichtskontrolle. In der Regel hatten sich die Ratten nach kurzer Zeit an das Tragen der Antenne gewöhnt und zeigten nach einer kurzen Phase explorativen Verhaltens normales Ruheverhalten. Zudem wurde die Akzeptanz des Befeldungskäfigs durch eine Futterbelohnung noch unterstützt. Wir haben keine Hinweise darauf dass das Vorgehen zur Befeldung bei den Tieren Stress ausgelöst haben könnte.

Für die Verhaltensexperimente und Befeldungen wurden die Tiere in Gruppen zu 20 Tieren in 8 Versuchsblöcken (Messreihen, M1-M8) über den Zeitraum von 1.5 Jahren behandelt, präpariert und ausgewertet. Zuvor wurden 20 unbehandelte Tiere (keine Bestimmung der Hörschwelle, keine Befeldung, keine Verhaltenskonditionierung) als Vergleichsgruppe für die Molekularbiologie präpariert.

Die 20 Tiere in jedem Versuchsblock wurden in 5 Gruppen zu je 4 Tiere aufgeteilt und (verblindet) den Befeldungsstärken SAR 0.02, 0.2, 2, 20 Watt/kg GSM 900 MHz und Scheinbefeldung zugeführt. Hierbei handelte es sich, wie im Anhang ausgeführt, um eine 2 Stunden Freifeld- und Ganzkörper-Exposition eines RF Feldes mit identischer Puls- und Modulationscharakteristik, wie sie für globale Systeme mobiler Kommunikation (GSM) angewendet werden (900 MHz Felder bei Puls-Wiederholungsfrequenz von 217 Hz moduliert und einer Pulsweite von 0.6 ms). Tiere im Verhaltensversuch wurden zuvor über den Zeitraum von 2-3 Monaten operant konditioniert. Die Befeldung fand in einem speziell angepassten Raum der Tierhaltung statt. Das Befeldungssystem war in 2 Systeme mit jeweils 4 Befeldungskäfigen aufgeteilt. 2 Versuchsgruppen konnten so parallel befeldet werden. Die Tiere wurden in einem Zeitraum von 4 Wochen 20 x für 2 Stunden täglich befeldet (5 Tage die Woche), wobei nie mehr als 2 Tage Pause zwischen 2 Befeldungssitzungen lagen.

Die Tiere für die Molekularbiologie wurden am Ende der Befeldung (gesamt 40 Tiere) bzw. Nach 2 Wochen Erholung im Anschluss an die Befeldung (gesamt 40 Tiere) präpariert. Für Tiere im Verhaltensexperiment galt, dass am Abschluss jeder Befeldungswoche und Erholungswoche ein Verhaltenstest durchgeführt wurde. Am Ende der 6 Wochen (4 Wochen Befeldung und 2 Wochen Erholung) wurden alle Tiere aus dem Versuch genommen.

Ergebnisse

Vorversuche wurden durchgeführt zur Analyse der

- Tolerierung des Antennenträgers
- Wärmeentwicklung bei Befeldung
- Stabilität der Befeldung und Messung typischer Absorptionswerte

Tolerierung des Antennenträgers

Nach kurzer Eingewöhnungszeit haben die Tiere die Befeldungsjacke und die teilweise eingeschränkte Bewegungsfreiheit durch das Antennenkabel im Befeldungskäfig problemlos akzeptiert. Wissenschaftliche Hilfskräfte konnten, nach kurzer Einweisung, die Tiere ohne Anstrengung "anziehen" und sie in die Befeldungskäfige setzen. Meistens legten sich die Tiere nach 5 bis 10 Minuten Explorationsverhalten hin und verbrachten die restliche Zeit der 2 Stunden Befeldung in Ruhe.

Zur Illustration des Ablaufs der Befeldung und der Tolerierung durch die Tiere sei auf die Beiträge zum BfS- Kolloquium vom 11.-12.10.2005 und zum DFM-Workshop vom 11.-12.10.2007 verwiesen.

Stabilität der Befeldung und typische Absorptionswerte

Während der Befeldung wurden verschiedene Kenngrößen (Reflexionsfaktoren) der Antennenleistung aufgezeichnet. Täglich wurden die Dateien an die Mitarbeiter des IMST übersandt, die die Daten sichteten und analysierten. So konnte rechtzeitig erkannt werden welche Antennen bald ausgetauscht werden mussten. Eine Antenne konnte über mehrere Messreihen genutzt werden, der Aufbau erwies sich als sehr stabil. Ein Schwachpunkt war die Verbindung zwischen Antennenring und Antennenkabel, an einer Stelle, an der die mechanische Belastung am größten war. Allerdings konnte jeweils vor der Befeldungssitzung die Funktion der Antenne über die Software überprüft werden und ggf. die Antennen ad hoc ausgetauscht werden. Ein weiteres Problem war, dass die Ratten das Antennenkabel anknabberten. Dieses Problem konnte durch Ummantelung mit harten Plastikringen aber sehr gut gelöst werden. Die anfängliche Strategie durch Bitterstoffe das Antennenkabel unattraktiv zu gestalten, musste schnell aufgegeben werden.

Angaben über typische Absorptionswerte sind der Anlage I (Zwischenbericht IMST) zu entnehmen.

Einfluss der Befeldungsjacke und der Befeldung auf die Körpertemperatur

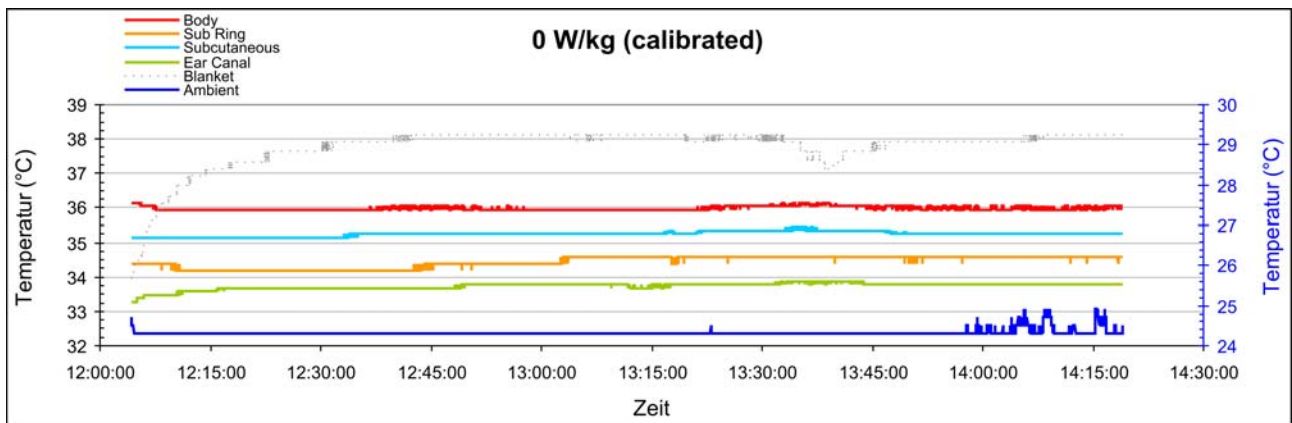


Abb. 3: Temperaturverläufe im Befeldungskäfig über die Zeitdauer von ca. 2 Stunden bei Scheinbefeldung (SAR 0 W/kg). An einer narkotisierten Ratte in der Befeldungsjacke wurden in Sekundenintervallen bestimmt: die Körperkerntemperatur (Body), die Temperatur an der Hautoberfläche direkt unterhalb des Antennenrings (Sub Ring), die Temperatur subcutan im Bereich des Felsenbeins ca. in Höhe des Innenohres (Subcutaneous) und die Temperatur im Gehörgang (Ear Canal). Das Versuchstier lag auf einer geregelten Heizmatte, deren Temperatur ebenfalls kontrolliert wurde (Blanket). Die Umgebungstemperatur wurde unterhalb des Käfigdaches, über der Ratte, abgegriffen (Ambient).

Die Temperaturverläufe waren weitgehend unverändert, im Rahmen der Messgenauigkeit kam es unterhalb der Befeldungsjacke (Sub Ring) zu einem leichten Anstieg der Temperatur. Die Kerntemperatur blieb konstant bei 36°C.

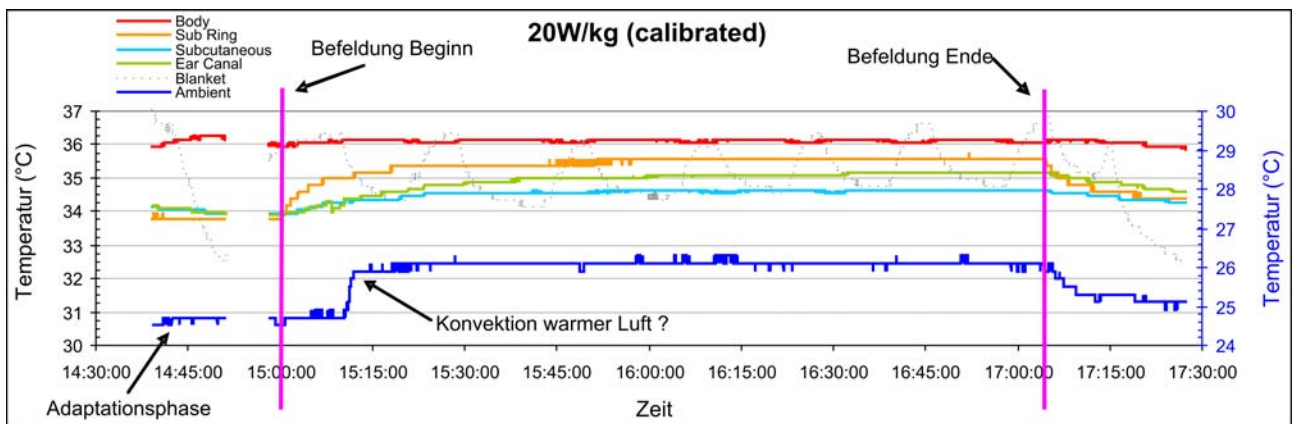


Abb. 4: Temperaturverläufe im Befeldungskäfig über die Zeitdauer von ca. 2 Stunden bei Befeldung mit maximaler Absorptionsrate (SAR 20 W/kg). Für Einzelheiten siehe Abb. 3.

Mit Einschalten der Befeldung kam es zu einem schnellen Anstieg der Temperatur unterhalb des Antennenrings um ca. 1.5°C (Sub Ring), und zu einem verzögerten Anstieg im Gewebe (Subcutaneous, ca. 0.6°C) und im Gehörgang (Ear Canal, ca. 1°C). Verzögert, erklärbar durch Einsetzen der Luftzirkulation im Befeldungskäfig, stieg die Umgebungstemperatur um ca. 1.5°C an (Ambient). Die Kerntemperatur (Body) blieb unverändert. Offenbar konnte die zweifelsfrei entstehende Wärme durch die Befeldung vom Tier abgegeben werden, ohne zur Erhöhung der Kerntemperatur beizutragen. Die lokalen Erwärmungen sind minimal. Die Messdaten geben keinen Hinweis auf eine mögliche, thermische Belastung der Tiere.

Hörmessung

Die Hörfähigkeit aller Tiere, die im Verhaltensversuch waren, wurde zu Beginn der Konditionierung überprüft. Die Versuchstiere setzten sich teils aus Ratten des klassischen Wistar-Stammes ($n = 60$), teils aus Ratten der Wistar-Han-Züchtung (Hannover, $n = 20$) zusammen. In Abb. 5 sind die Hörschwellen, aufgeschlüsselt nach ihrer Zugehörigkeit zur jeweiligen Messreihe oder Befeldungsgruppe, dargestellt. Nicht bei allen Tieren konnten beide Ohren gemessen werden. Die Hörschwellen waren in allen Versuchsgruppen vergleichbar (Abb. 5B). Die Homogenität der Befeldungsgruppen bezüglich des Hörvermögens war somit gegeben. Tiere des Wistar-Han Stammes zeigten tendenziell eine im Mittel etwas höhere Hörschwelle bei etwas größerer Variabilität (Abb. 5A: M2, Han), was allerdings aufgrund der Verteilung der Tiere auf verschiedene Versuchsgruppen im Gesamtergebnis ohne Bedeutung blieb. Im Verlauf des Projekts über 2 Jahre haben sich die durchschnittlichen Hörschwellen um ca. 5 dB reduziert (Abb. 5 A: M4 bis M8). Dies kann auf Verbesserungen der Methodik und Narkose zurückzuführen sein. Da zu jedem Zeitpunkt alle Befeldungsgruppen (verblindet) vertreten waren, sind die Verbesserungstendenzen in der Hörschwelle für einen eventuellen Einfluss der Befeldung allerdings ohne Bedeutung (Abb. 5C).

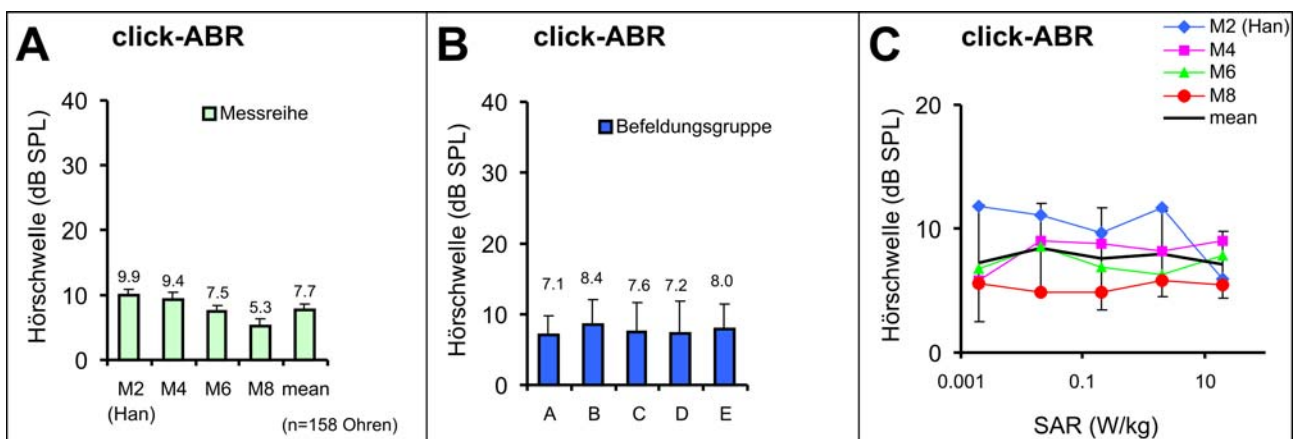


Abb. 5: Hörschwellen auf Klickreize, bestimmt aus ABR-Funktionen bei aufsteigendem Schalldruck (dB SPL). Mittelwerte und Standardabweichung. Gemessen wurden jeweils beide Ohren getrennt.

(A) Schwellen aufgeschlüsselt nach den vier nacheinander durchgeführten Messreihen ($n = 20$ Tiere, 39-40 Ohren) und Gesamtmittelwert ($n = 158$ Ohren). (B) Daten aufgeschlüsselt nach Befeldungsgruppe ($n = 16$ Tiere, 32 Ohren). (C) Daten aufgeschlüsselt nach Befeldungsstärke ($n = 16$), in die die Tiere nachfolgend überführt werden sollten.

Verhaltensmodell

Über den Zeitraum von 18 Monaten wurden insgesamt 82 Ratten im Verhaltensmodell operant konditioniert (für den genauen Ablauf der Konditionierung siehe Rüttiger et al. (2003). Nach erfolgreicher Konditionierung auf das differentielle Verhalten (Tonempfindung → Aktivität; Stilleempfindung → Inaktivität) wurde die Fähigkeit der Tiere, Tinnitus zu zeigen, überprüft. Hierzu wurde den Tieren eine hohe Dosis Salizylat (350 mg/kg KG) gespritzt. Salizylat führt in hohen Dosen zu reversiblen Tinnitus, der nach 1-2 Tagen wieder verschwindet. Nach 3 Stunden wurde das Verhalten der Tiere auf einen Ton-Stille-Wechsel im Verhaltenskäfig überprüft: für 20-23 Minuten wurden die Zugriffe der Tiere auf die Zuckerwasserspender aufgezeichnet. Der elektrische Strafreiz wurde hierbei ausgesetzt, ebenso die aktivitätskorrelierte Belohnungsgabe. Somit wurde ohne positive und negative Rückmeldung das Spontanverhalten der Tiere auf den fortlaufenden Ton-Stille-Wechsel gemessen. Das Spontanverhalten wurde 2-4-mal an verschiedenen Tagen überprüft, mindestens einmal in der Kontrollsituation (Injektion von Saline) und nach Tinnitusinduktion (Injektion von Salizylat).

Der zeitliche Ablauf des Verhaltenstrainings und der Verhaltenstest vor, während und nach der Befeldung sind in Abb. 6 dargestellt.

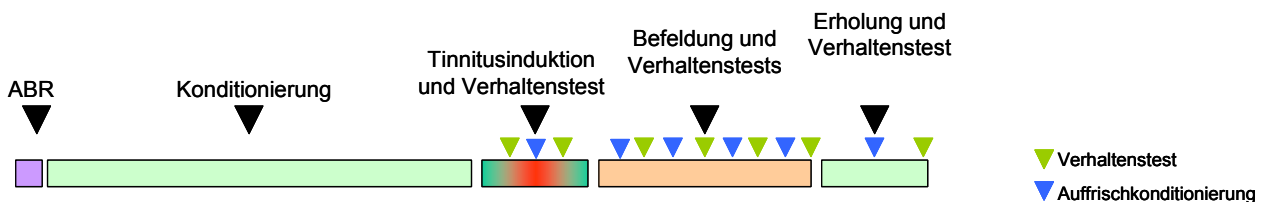


Abb. 6: Schema des Ablaufs eines von 4 durchgeführten Versuchsblöcken zur Verhaltenskonditionierung und Testung im Tinnitusverhaltensmodell. Die Tinnitusinduktion und der Verhaltenstest vor Beginn der Befeldung wurde (reversibel) mit Salizylatinjektion durchgeführt.

Tinnitusinduktion

Bevor die Tiere in die Befeldung kamen, wurde pharmakologisch Tinnitus induziert (mit Salizylat, s.o.) und ihr Tinnitusverhalten überprüft. Abb. 7 zeigt individuelle Daten für einen beispielhaften Versuchsblock nach Induktion von Tinnitus durch Salizylatinjektion bzw. nach Kontrollinjektion mit physiologischer Kochsalzlösung (Saline). Die Parameter "Tinnitus", "Activity" und "Changes" sind typischerweise verändert und weisen darauf hin, dass die Tiere in der Lage waren Tinnituswahrnehmungen über ihre Verhaltensänderung

anzuzeigen. Nach Salizylat verhielten sich annähernd alle Versuchstiere bei Stille aktiver als nach Saline, daran zu erkennen, dass die Mehrzahl der Datenpunkte oberhalb der Winkelhalbierenden zu liegen kommt (siehe Abb. 7A, Tinnitus Behavior).

Die Gesamtaktivität war vergleichbar, unabhängig von der Behandlung (Abb. 7B, Activity). Allerdings kann aufgrund von Hör-unspezifischen Nebenwirkungen von Salizylat Schwindel ausgelöst werden, wodurch es auch zu geringer Aktivität (Changes) nach Salizylatinjektion kommen kann. Daher musste die kritische Aktivität von 3-4 Zugriffen pro Minute erreicht werden. Andernfalls wurden die Messungen wiederholt und, falls die Messwerte vergleichbar waren, die Daten gemittelt.

Die Wechselhäufigkeit war aufgrund von Schwindel als Nebenwirkung nach Injektion von Salizylat reduziert, erkennbar daran dass die Datenpunkte individueller Tiere rechts der Winkelhalbierenden zu liegen kommen (Abb. 7C, Changes). Dieser Parameter dient als zusätzliche Kontrolle für die Wirksamkeit des Salizylats und beschreibt die Vestibularfunktion.

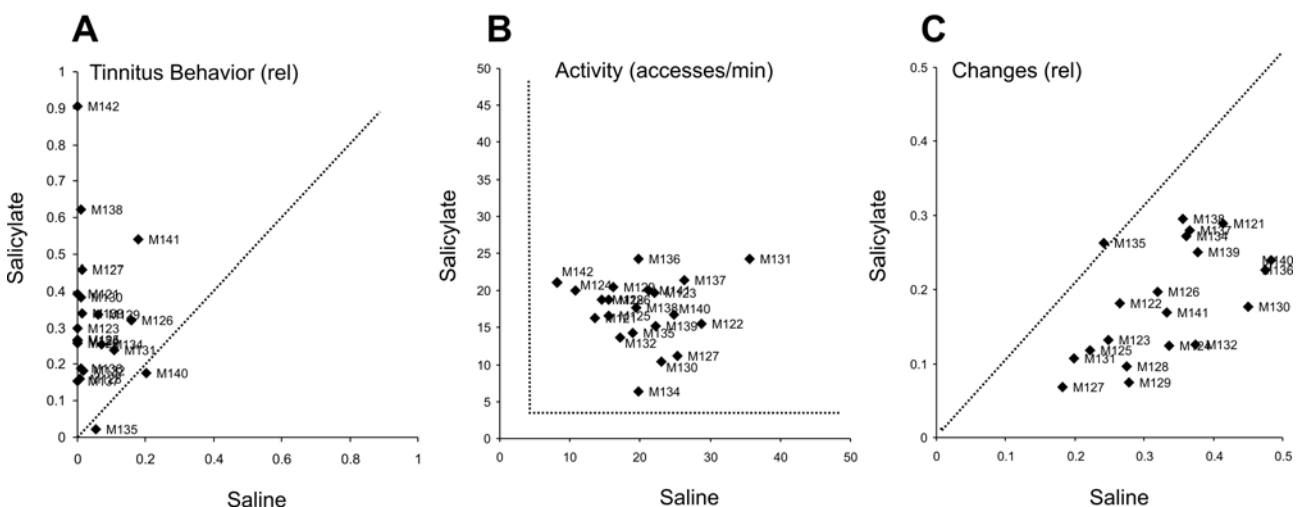


Abb. 7: Verhaltensparameter **(A)** Tinnitus (Tinnitus Behavior), **(B)** Zugriffshäufigkeit (Activity) und **(C)** Häufigkeit der Seitenwechsel (Changes) im Konditionierungskäfig für individuelle Versuchstiere (z.B. M142) nach Saline- (Abszisse) bzw. Salizylatinjektion (Ordinate). Beispielhaft für einen der 4 Versuchsblöcke. "Tinnitus" und "Changes" dienen als Maß für die erfolgreiche Konditionierung bzw. als Gewähr einen später induzierten Tinnitus mit Hilfe einer Verhaltensänderung erfassen zu können.

In Abb.8 sind die mittleren Verhaltensparameter aller 4 Versuchsblöcke (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt. Die Mittelwerte bestätigen die Verhaltenswerte der Einzeldaten und qualifizieren die Versuchstiere aller 4 Messreihen für die Detektierbarkeit von Tinnitus im Verhaltensexperiment.

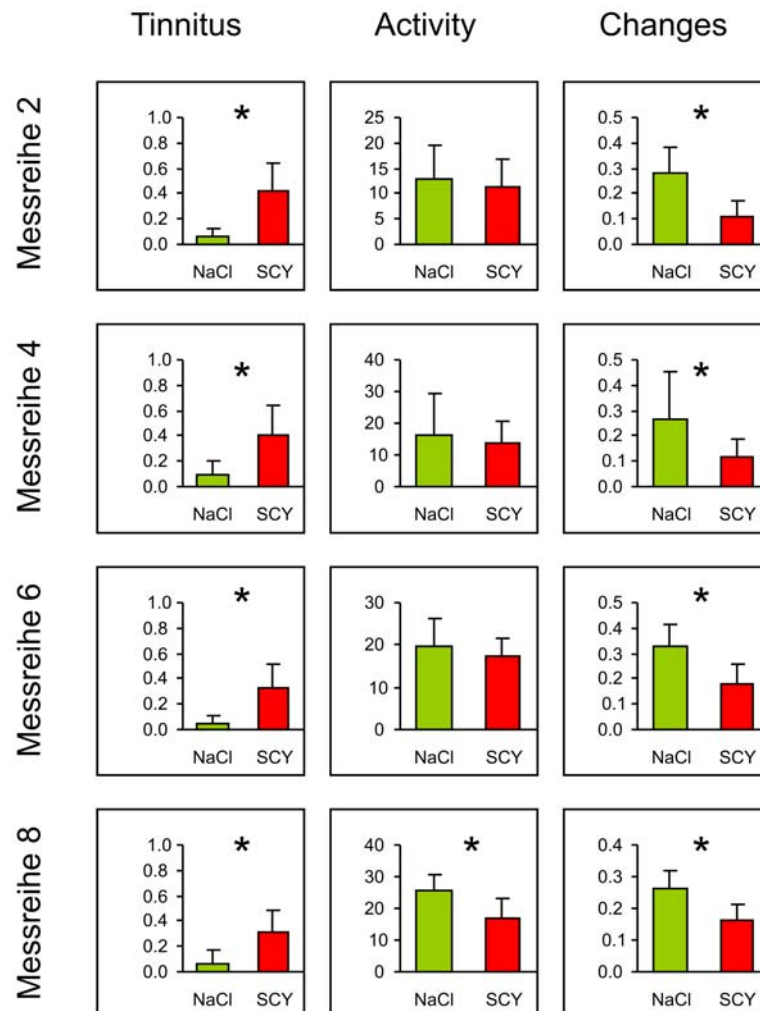


Abb. 8: Verhaltensparameter Tinnitus, Zugriffshäufigkeit (Activity) und Häufigkeit der Seitenwechsel (Changes) als Mittelwert (Balken) und Standardabweichung (Fehlerbalken) nach Saline- und Salizylatinjektion für die 4 Versuchsblöcke (Messreihe 2, 4, 6, 8), $n = 20$ für alle Balken. *: $p < 0.001$ (Wicoxon-Paardifferenztest, zweiseitig). Diese Quantifizierung bestätigt das Verhalten der Einzeltiere (siehe Abb.7) auch im Mittelwert.

Tinnitusverhalten bei Befeldung

Die Abbildungen 9 - 11 zeigen die Verhaltensparameter Tinnitus, Activity und Changes als Mittelwert und Standardabweichung für die einzelnen Befeldungsgruppen. Die Daten wurden erst nach der Auswertung entblindet. Die Werte der einzelnen Befeldungsgruppen und Scheinbefeldung wurden vorab zur deskriptiven Darstellung mit dem Student's t-test miteinander verglichen. Zwischen der Befeldungsgruppe SAR 0.2 und 2 W/kg ergab sich vor Beginn der Befeldung ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0.05$). Zu diesem Zeitpunkt war mit der Befeldung noch nicht begonnen worden und daher steht die Signifikanz nicht im Zusammenhang mit einem Einfluss der Befeldung. Allerdings muss als Erklärungsmöglichkeit akzeptiert werden, dass die Tiere in Versuchsgruppe 0.2 W/kg eventuell etwas schlechter vorkonditioniert waren oder aus Tieren etwas flexiblerer Verhaltensantwort zusammengesetzt waren. Die nachfolgenden Verhaltenstests sollten dies nicht bestätigen und damit bleibt die Signifikanz rein statistisch und ist allein in der Zufälligkeit bei einer bestimmten Häufigkeit statistischer Vergleiche begründet.

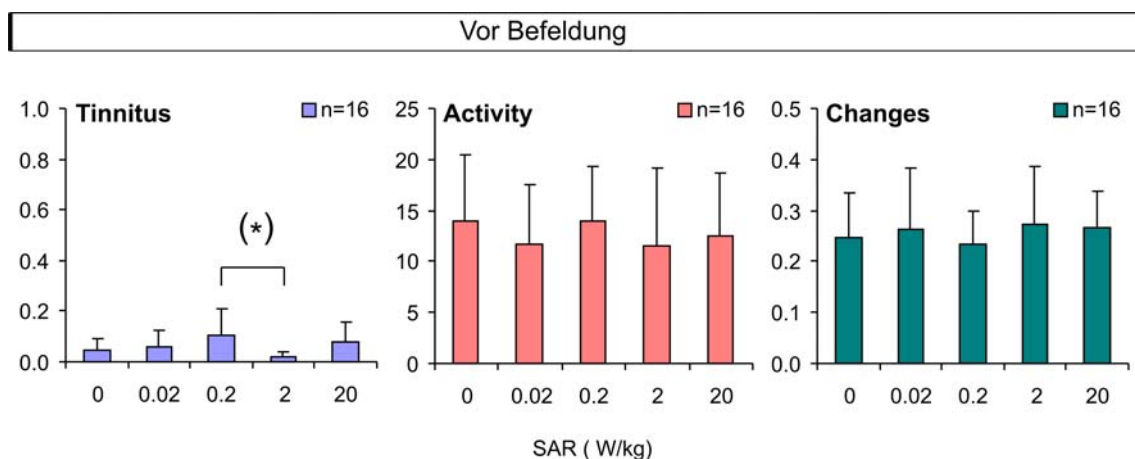


Abb. 9: Tinnitus, Gesamtaktivität (Activity) und Seitenwechselhäufigkeit (Changes) vor Beginn der Befeldung, aufgeschlüsselt nach Versuchsgruppen (SAR 0.02-20 W/kg und Scheinbefeldung 0 W/kg). Dargestellt sind Mittelwerte von jeweils 16 Tieren und die Standardabweichung (vertikale Linien). Der Mittelwertvergleich der Versuchsgruppen ergab eine statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen, die in die 0.2 W/kg und 2 W/kg Gruppen eingeteilt waren (* $p < 0.05$, t-test). Zu diesem Zeitpunkt war mit der Befeldung noch nicht begonnen worden und daher steht die Signifikanz nicht im Zusammenhang mit einem Einfluss der Befeldung.

Für die Bedeutungen Tinnitus, Activity und Changes siehe Gleichungen (1), (2), und (3) und Text Seite 13.

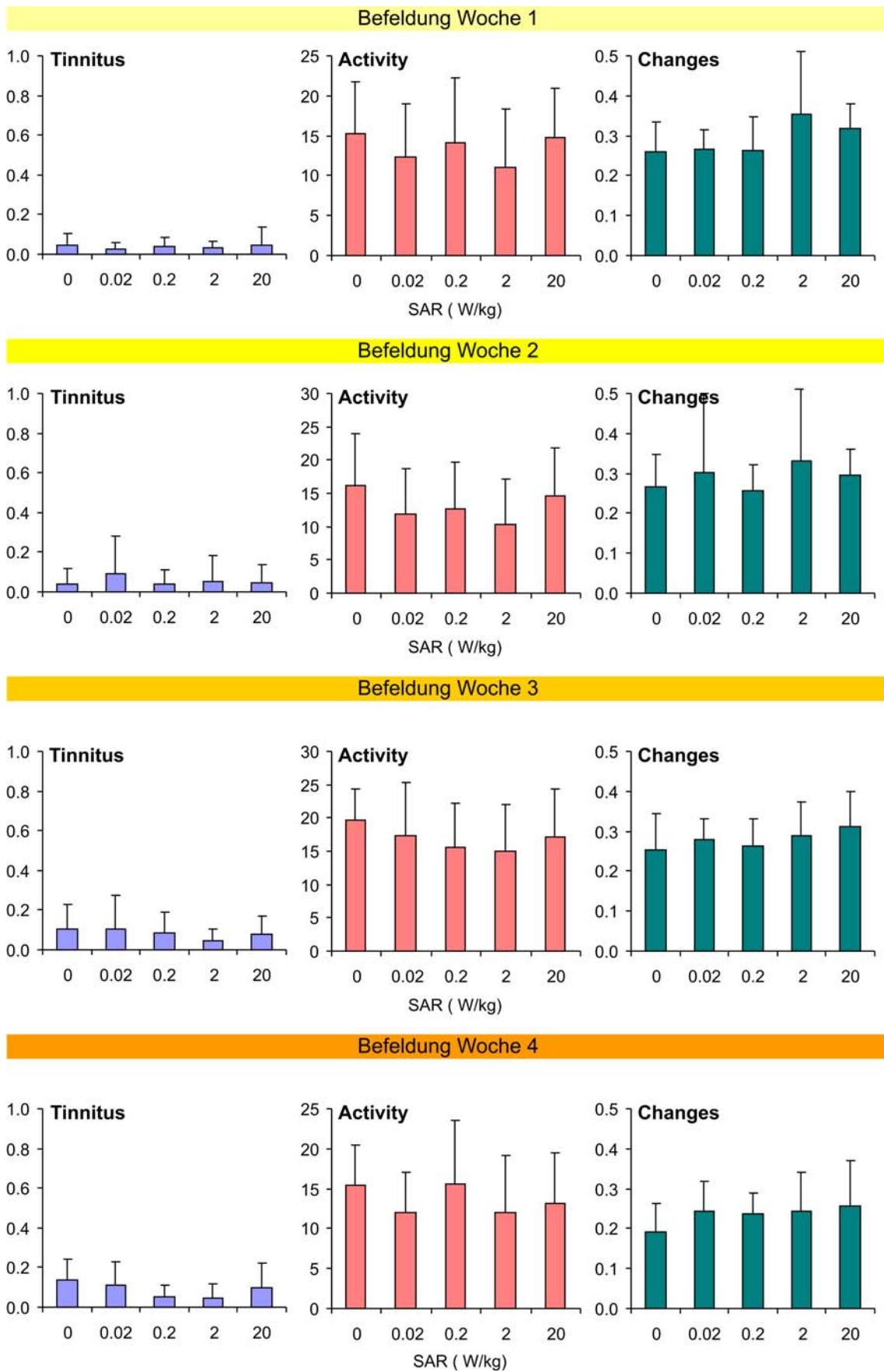


Abb. 10: Tinnitus, Gesamtaktivität und Seitenwechselhäufigkeit bei 4 Wochen Befeldung. Siehe auch Abb. 9.

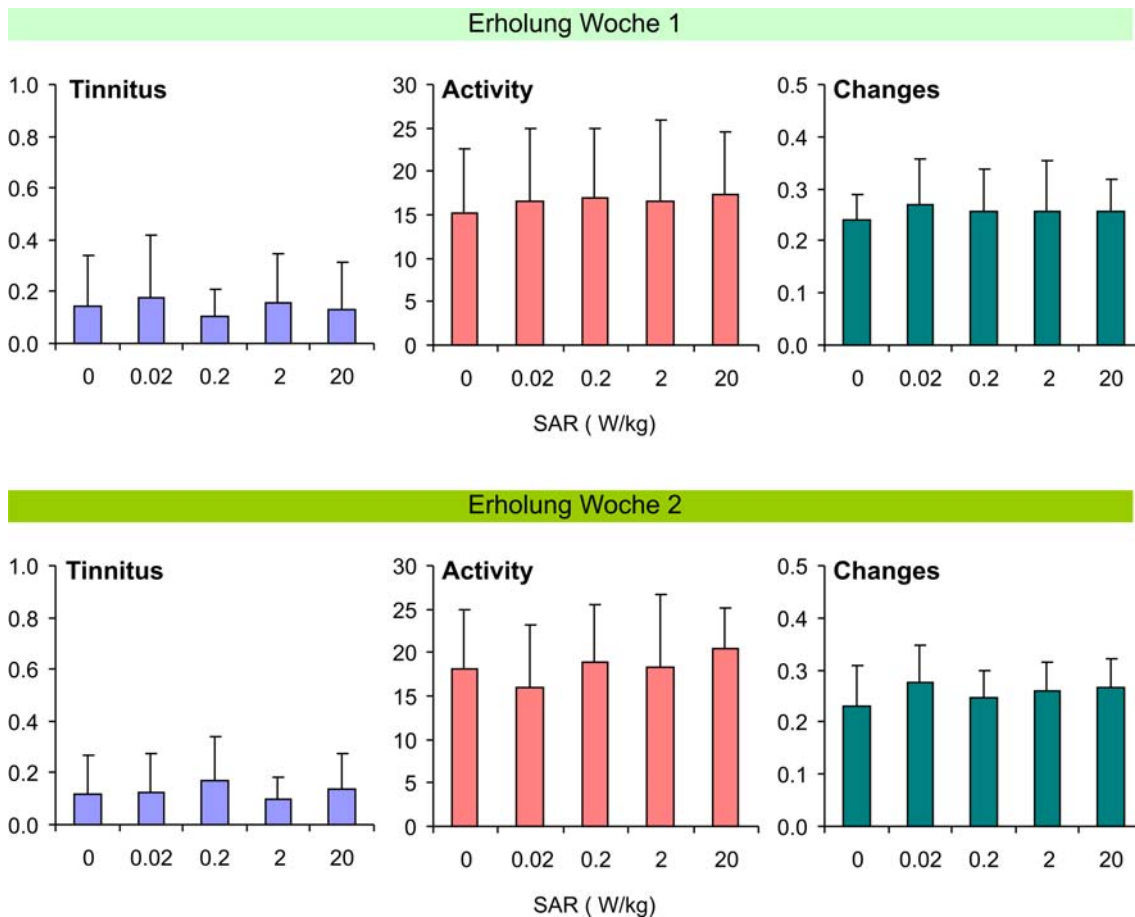


Abb. 11: Tinnitus, Gesamtaktivität und Seitenwechselhäufigkeit nach 4 Wochen Befeldung und einer (oben) bzw. zwei (unten) Wochen Erholung. Siehe auch Abb. 9.

Abb. 12 zeigt die Verhaltensparameter Tinnitus, Activity und Changes aufgeschlüsselt nach Befeldungsstärke über den gesamten Verlauf des Verhaltensexperiments. Das Tinnitusverhalten nimmt im Verlauf der 6 Wochen und der 7 Verhaltenstests erwartungsgemäß leicht zu, da das gelernte Verhalten etwas „verblasst“. Der Wert für das Tinnitusverhalten bleibt jedoch bei Weitem unter dem, den man nach salizylatinduziertem Tinnitus erwartet. Die Kurven für alle Befeldungsstärken und Scheinbefeldung zeigen einen vergleichbaren Verlauf. Das Symbol jeweils links in den Diagrammen gibt die mittlere Standardabweichung (Strecke Rechtecksymbol bis "typical") und den minimalen (Strecke bis "min") und die maximale Standardabweichung (Strecke bis "max") an.

Ein Einfluss der Befeldungsstärke auf eine der Verhaltensleistungen konnte nicht festgestellt werden (siehe statistische Auswertung der Verhaltensdaten).

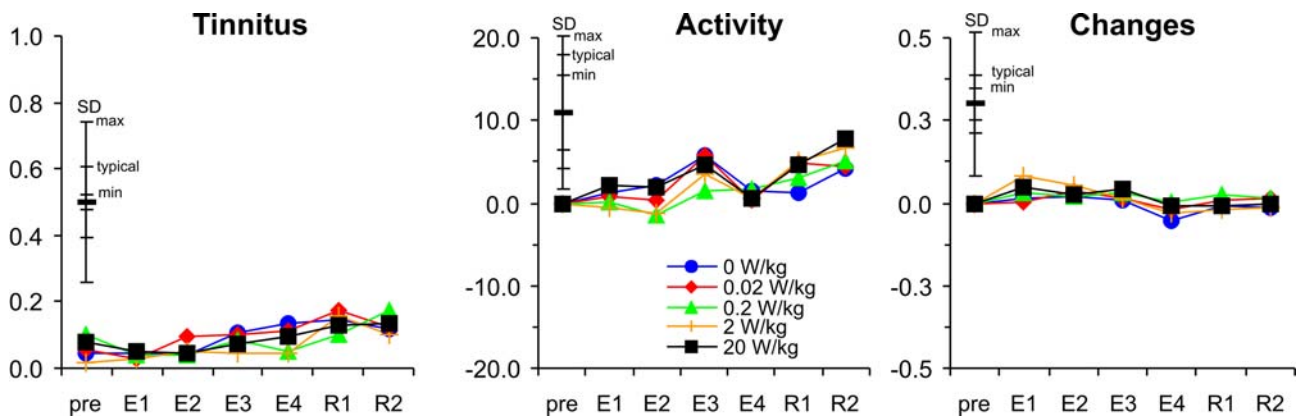


Abb. 12: Tinnitus, Gesamtaktivität (Activity) und Seitenwechselhäufigkeit (Changes), dargestellt als Funktion der Befeldungsstärke (W/kg, unterschiedliche Symbole und Farben) über den Verlauf des Verhaltensexperiments. Pre: Verhaltenstest vor Befeldung. E1-E4: Verhaltenstests jeweils am Ende einer Befeldungswoche. R1-R2: Verhaltenstests nach einer und zwei Erholungswochen. Dargestellt sind Mittelwerte von je 16 Tieren. Zu besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken für die einzelnen Mittelwerte verzichtet.

Statistische Auswertung der Verhaltensdaten

Die Gesamtverläufe aus Abb. 12 (Tinnitus, Activity und Changes im Zeitverlauf) wurden mit der Analysis of Variance (1-way repeated measures ANOVA) auf Einflüsse von Zeit und Befeldungsstärke getestet.

Tinnitus

Das Tinnitusverhalten variiert hochsignifikant über den Zeitverlauf ($p < 0.0001$, 2-way ANOVA). Dieser Zusammenhang zeigt auf, dass es eine Tendenz zum Verlernen der Verhaltensaufgabe in allen Gruppen gibt, die allerdings für den Einfluss der Befeldung ohne Bedeutung ist. Ein Einfluss der SAR-Stärke auf das Tinnitusverhalten konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0.2405$, 2-way ANOVA). Unabhängig vom Zeitverlauf des Tinnitusverhaltens, konnte auch der Einfluss der Befeldung allein (Gruppen verschiedener SAR-Stärke gegeneinander in der "repeated-measures 1-way ANOVA") nicht nachgewiesen werden ($p > 0.1602$)

Activity

Für den Zeitverlauf findet sich wiederum eine hochsignifikante Korrelation, die mit der Veränderung des Verhaltens im Laufe der Verhaltenstests zu begründen ist (2-way ANOVA, $p < 0.0001$). Ein Einfluss der SAR-Stärke auf die Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden (2-way ANOVA, $p = 0.3845$). Unabhängig vom Zeitverlauf des

Aktivitätsverhaltens, konnte auch der Einfluss der Befeldung allein (Gruppen verschiedener SAR-Stärke gegeneinander in der "repeated-measures 1-way ANOVA") nicht nachgewiesen werden ($p > 0.1299$).

Changes

Auch für die Wechselhäufigkeit findet sich eine hochsignifikante Korrelation mit der Veränderung des Verhaltens im Laufe der Verhaltenstests (2-way ANOVA, $p = 0.0008$). Ein Einfluss der SAR-Stärke konnte nicht nachgewiesen werden (2-way ANOVA, $p = 0.3845$). Unabhängig vom Zeitverlauf der Wechselhäufigkeit, konnte auch der Einfluss der Befeldung allein (Gruppen verschiedener SAR-Stärke gegeneinander in der "repeated-measures 1-way ANOVA") nicht nachgewiesen werden ($p > 0.1945$).

Molekularbiologische Studien

Als Plastizitätsgene werden der „brain-derived-neurotrophic factor“ (BDNF) und das aktivitätsabhängige Zytoskelettprotein Arg3.1/Arc untersucht, welche beide (wie oben ausführlich beschrieben) als Effektor neuronaler Aktivität und Plastizität Informationen über veränderte neuronale Aktivität und veränderte synaptische Effizienz geben (siehe Einleitung, Diskussion). Darüber hinaus wurde das „immediate early gene“ c-Fos, untersucht, dessen Expression sich nachweislich in Neuronen der Cochlea und in zentralen auditorischen Kerngebieten während der Entwicklung und nach auditorischer Erfahrung verändert (siehe Einleitung, Diskussion).

Die Genprodukte von BDNF, Arg3.1/Arc und c-Fos werden mittels der „Reversen Transcriptase Polymerase“ Kettenreaktion (RT-PCR) amplifiziert.

In Abb. 13-18 sind die gemittelten Genexpressionsdaten von Arg3.1/Arc, BDNF E4 und c-Fos in Auditorischem Cortex (Abb. 13-14), Colliculus inferior (Abb. 15-16) und Cochlea (Abb. 17-18) dargestellt. Der jeweils linke Datenpunkt gibt die Expression der unbehandelten Kontrollen an ("untreated"), die verbundenen Datenpunkte die Expression als Funktion der Befeldungsstärke (SAR 0 W/kg – 20 W/kg). Alle Datenpunkte wurden auf den Expressionswert des Housekeeping-Gens Cyclophilin (=100%) normiert.

Auditorischer Cortex

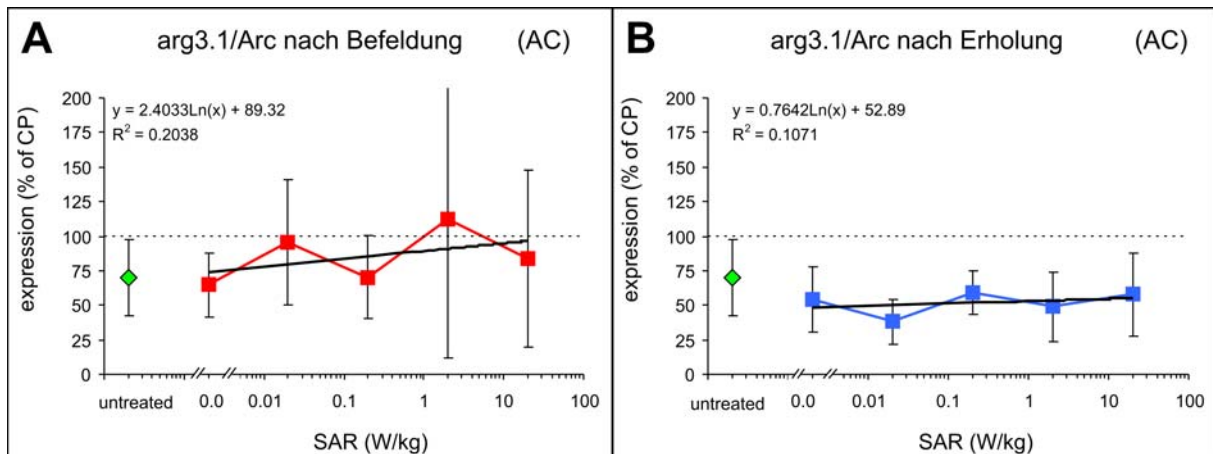


Abb. 13: Genexpression von Arg3.1/Arc im auditorischen Cortex von Ratten **(A)** akut nach 4 Wochen Befeldung und **(B)** nach anschließender 2-wöchiger Erholung, Mittelwert und Standardabweichung von jeweils $n = 8$ (4×2 Tiere \times je 1 Umschreibungen \times 2 RT-PCRs). Der jeweils linke Datenpunkt zeigt vergleichend die Genexpression bei unbehandelten Tieren (untreated, $n = 20$). Akut nach der 4-wöchigen Behandlung schwanken die Werte offenbar mehr als nach anschließender 2-wöchiger Erholung, zeigen aber keine statistisch signifikante Korrelation mit der Befeldungsstärke (Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben).

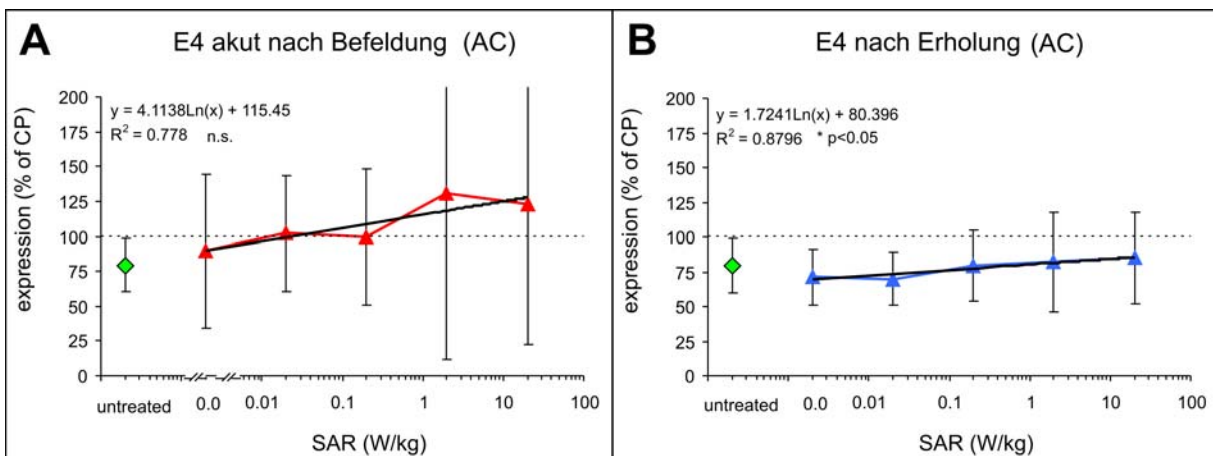


Abb. 14: Genexpression von BDNF Exon 4 (E4) im auditorischen Cortex von Ratten **(A)** akut nach 4 Wochen Befeldung und **(B)** nach anschließender 2-wöchiger Erholung, Mittelwert und Standardabweichung von jeweils $n = 8$ (4×2 Tiere \times je 1 Umschreibungen \times 2 RT-PCRs). Der jeweils linke Datenpunkt zeigt vergleichend die Genexpression bei unbehandelten Tieren (untreated, $n = 20$). Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben. Akut nach der 4-wöchigen Behandlung schwanken die Werte mehr als nach anschließender 2-wöchiger Erholung, zeigen aber keine statistisch signifikante Korrelation mit der Befeldungsstärke. Nach Erholung liegt eine rechnerisch signifikante Korrelation vor, allerdings unterscheiden sich die Expressionswerte bei den einzelnen Befeldungsstärken nicht statistisch voneinander.

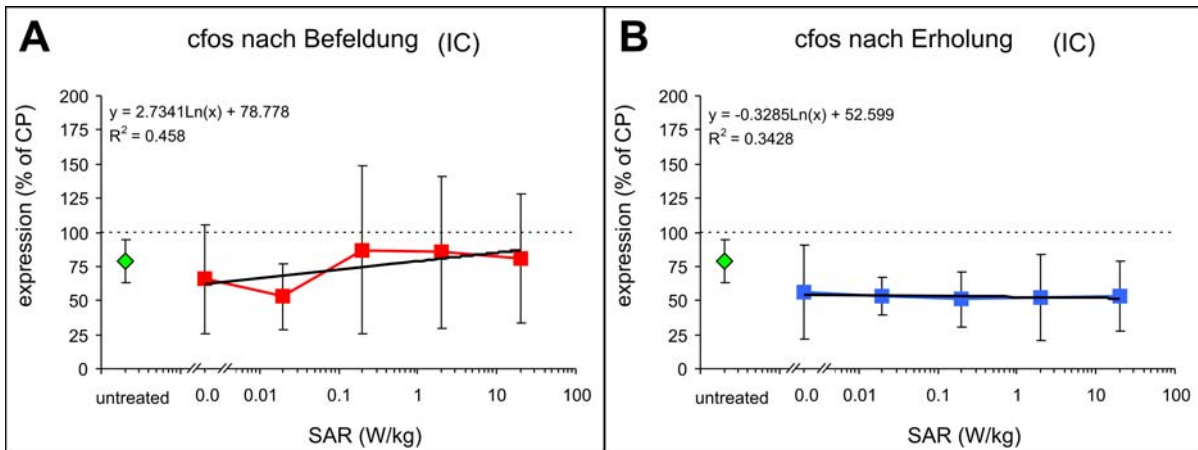


Abb. 15: Genexpression von c-Fos im inferioren Colliculus (IC) von Ratten **(A)** akut nach 4 Wochen Befeldung und **(B)** nach anschließender 2-wöchiger Erholung. Mittelwert und Standardabweichung von jeweils $n = 8$ (4 x 2 Tiere x je 1 Umschreibungen x 2 RT-PCRs). Der jeweils linke Datenpunkt zeigt vergleichend die Genexpression bei unbehandelten Tieren (untreated, $n = 20$). Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben. Akut nach der 4-wöchigen Behandlung schwanken die Werte mehr als nach anschließender 2-wöchiger Erholung, zeigen aber keine statistisch signifikante Korrelation mit der Befeldungsstärke (Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben).

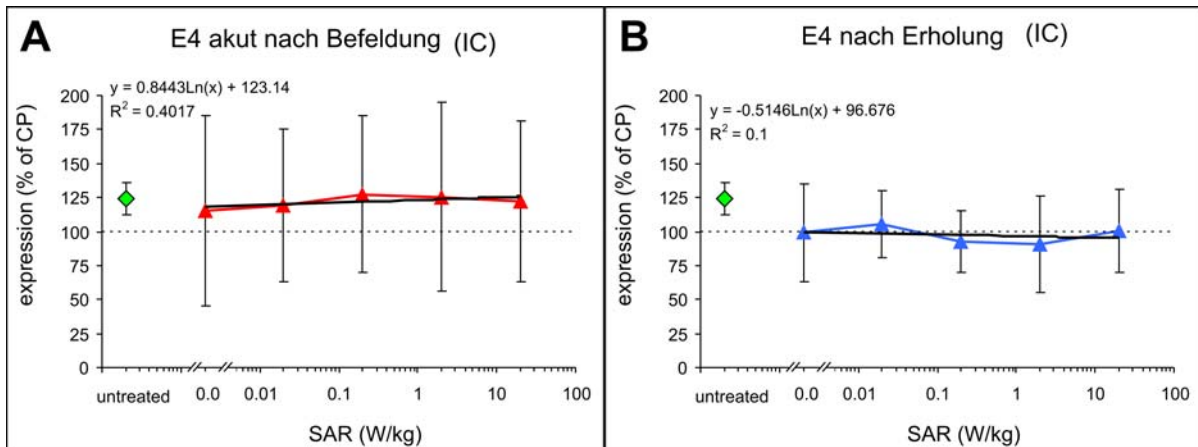


Abb. 16: Genexpression von BDNF Exon 4 (E4) im inferioren Colliculus (IC) von Ratten **(A)** akut nach 4 Wochen Befeldung und **(B)** nach anschließender 2-wöchiger Erholung. Mittelwert und Standardabweichung von jeweils $n = 8$ (4 x 2 Tiere x je 1 Umschreibungen x 2 RT-PCRs). Der jeweils linke Datenpunkt zeigt vergleichend die Genexpression bei unbehandelten Tieren (untreated, $n = 20$). Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben. Akut nach der 4-wöchigen Behandlung schwanken die Werte mehr als nach anschließender 2-wöchiger Erholung, zeigen aber keine statistisch signifikante Korrelation mit der Befeldungsstärke (Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben).

Cochlea

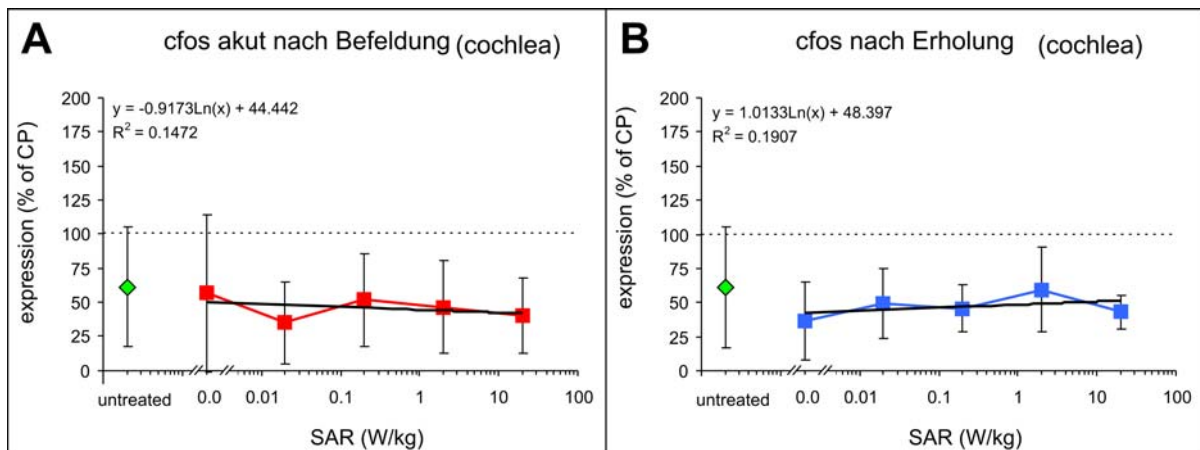


Abb. 17: Genexpression von c-Fos in der Cochlea von Ratten **(A)** akut nach 4 Wochen Befeldung und **(B)** nach anschließender 2-wöchiger Erholung. Mittelwert und Standardabweichung von jeweils $n = 8$ (4 x 2 Tiere x je 1 Umschreibungen x 2 RT-PCRs). Der jeweils linke Datenpunkt zeigt vergleichend die Genexpression bei unbehandelten Tieren (untreated, $n = 20$). Akut nach der 4-wöchigen Behandlung schwanken die Werte mehr als nach anschließender 2-wöchiger Erholung, zeigen aber keine statistisch signifikante Korrelation mit der Befeldungsstärke (Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben).

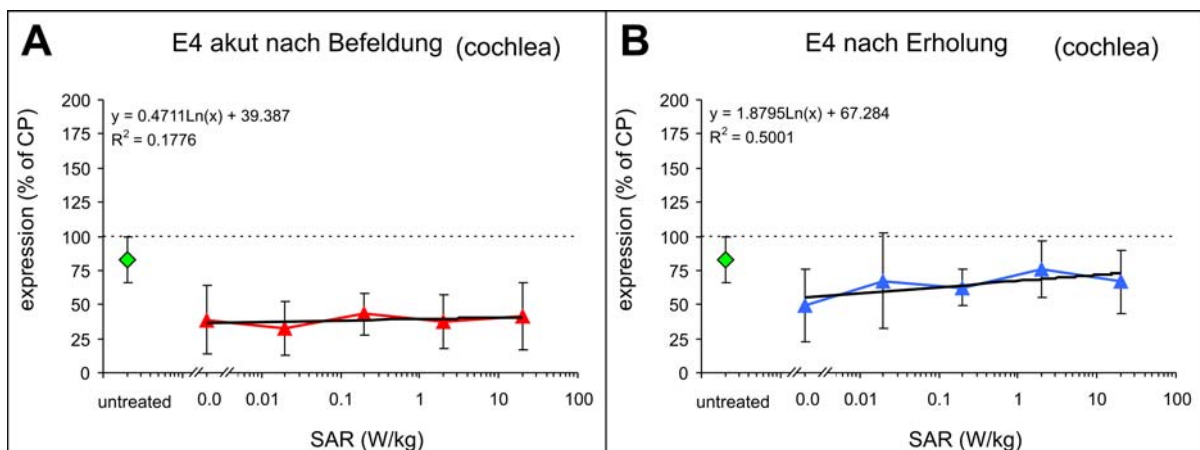


Abb. 18: Genexpression von BDNF Exon 4 (E4) in der Cochlea von Ratten **(A)** akut nach 4 Wochen Befeldung und **(B)** nach anschließender 2-wöchiger Erholung. Mittelwert und Standardabweichung von jeweils $n = 8$ (4 x 2 Tiere x je 1 Umschreibungen x 2 RT-PCRs). Der jeweils linke Datenpunkt zeigt vergleichend die Genexpression bei unbehandelten Tiere (untreated, $n = 20$). Es zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation mit der Befeldungsstärke (Korrelationswerte sind jeweils in A, B angegeben).

Statistische Auswertung der molekularbiologischen Studien

Die angegebenen Korrelationskoeffizienten (Pearson productmoment correlation coefficients) sind deskriptiv und dienen zur Orientierung. Die maximale, gefundene Korrelation beträgt $r^2 = 0.88$ für E4 im AC nach Erholung. Dieser Wert ist knapp statistisch von $r = 0$ (kein Effekt) verschieden (das 95% Konfidenzintervall bei $n = 5$ erfordert ein r^2 von 0.783, um $r = 0$ nicht einzuschließen). Eine direkte Korrelationsanalyse, als Nachweis dafür, dass ein gefundener Wert für "r" signifikant ist (also eine statistische Korrelation besteht), ist aber erst ab $n = 6$ möglich und kann daher nicht auf die vorliegenden Daten angewendet werden (es wurden nur 5 Befeldungsgruppen getestet). Beispielhaft wurde die Korrelation für $n = 8$ Messungen x 5 Gruppen = 40 Einzelwerte analysiert. Hier liegt die Korrelationskoeffizient aufgrund der großen Streuung der Einzeldaten sogar noch niedriger (z.B. $r = 0.0455$ bei E4 im AC, nach Erholung). Signifikante Effekte sind bei der Korrelationsanalyse daher nicht zu bestätigen.

Test auf Mittelwertsunterschiede (1-way ANOVA) und Varianzanalyse (F-Test)

Dieser Test soll klären, ob die Streuungszunahme in der Expression von E4 und Arg3.1/Arc im AC akut nach Befeldung von statistischer Relevanz ist.

Die Mittelwerte und Varianzen der Befeldungsgruppen und der unbehandelten Kontrollgruppe wurden mit der 1-faktoriellen Varianzanalyse (1-way ANOVA) berechnet ($\alpha = 0.05$, PRISM 2.0.1, GraphPad Software) mit anschließendem Tukey's Test für Mittelwertsvergleiche aller Gruppen und Bartlett's Test zum Vergleich der Varianzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Der Vergleich wurde durchgeführt für:

- (1) Alle Befeldungsgruppen plus die unbehandelte Kontrollgruppe (Vergleich aller Gruppen), um einen von der Befeldung unabhängigen Effekt der Behandlung zu erfassen (Handling der Tiere, Transport, Verbringung in die Befeldungskäfige etc.).
- (2) Nur die in der Befeldung befindlichen Tiere werden gegeneinander getestet, um einen für die Befeldung spezifischen Effekt zu erfassen (Vergleich der Befeldungsgruppen).

Statistisch signifikante Ergebnisse wurden hierbei dann als biologisch signifikant gewertet, wenn die Streuung in der Behandlungsgruppe zunahm bzw. ein Effekt auf den Mittelwert des Expressionswerts des untersuchten Gens für mehrere aufeinander folgende

Befeldungsstärken signifikant verschieden war. Aufgrund der Häufigkeit der statistischen Gegentests sind rein zufällige statistisch Signifikanzen zu erwarten und müssen entsprechend vorsichtig interpretiert werden (in Tabelle 2 mit [*] gekennzeichnet).

Der Vergleich der Genexpressionsdaten zwischen der Kontrollgruppe vor Befeldungsbeginn und der Daten akut nach bzw. 2 Wochen nach der Befeldungsphase kann Aufschluss geben, ob eventuell ein Effekt der Behandlung an sich nachgewiesen werden kann (Handling der Tiere und Überführung in die Befeldungskäfige).

Tabelle 2: Statistik molekularbiologischer RT-PCR Analysen (1-way ANOVA, $\alpha=0.05$)

1) Vergleich aller Gruppen				
(unbehandelte Kontrolle gegen Befeldungsgruppen und Scheinbefeldung)				
			mean	variance
Cochlea	c-Fos	acute	n.s.	n.s.
		recovery	n.s.	(*) ¹⁾
	E4	acute	p<0.001 ^[all]	n.s.
		recovery	(*) ²⁾	n.s.
IC	c-Fos	acute	n.s.	p<0.0001 ³⁾
		recovery	p<0.05 ^[all]	p<0.05 ⁴⁾
	E4	acute	n.s.	p<0.0001 ^[all]
		recovery	p<0.05 ⁵⁾	p<0.05 ^[all]
AC	Arg3.1/Arc	acute	n.s.	p<0.0001 ⁶⁾
		recovery	n.s.	n.s.
	E4	acute	n.s.	p<0.0001 ^[all]
		recovery	n.s.	n.s.
2) Vergleich der Befeldungsgruppen				
(Scheinbefeldungs-Kontrolle 0 W/kg gegen Befeldungsgruppen 0.02, 0.2, 2 und 20 Watt/kg)				
Cochlea	c-Fos	acute	n.s.	n.s.
		recovery	n.s.	n.s.
	E4	acute	n.s.	n.s.
		recovery	n.s.	n.s.
IC	c-Fos	acute	n.s.	n.s.
		recovery	n.s.	n.s.
	E4	acute	n.s.	n.s.
		recovery	n.s.	n.s.
AC	Arg3.1/Arc	acute	n.s.	p<0.01 ⁷⁾
		recovery	n.s.	n.s.
	E4	acute	n.s.	p<0.05 ⁸⁾
		recovery	n.s.	n.s.

^[all] Unbehandelte Kontrolle statistisch signifikant gegenüber allen Befeldungsstärken und Scheinbefeldung

¹⁾ Unbehandelte Kontrolle statistisch signifikant p<0.05 gegenüber 0.02 und 20 W/kg
(Varianz bei 0.02 und 20 W/kg geringer)

²⁾ Unbehandelte Kontrolle statistisch signifikant p<0.05 gegenüber der Scheinbefeldung
(Mittelwert nicht signifikant gegenüber anderen Befeldungsgruppen)

³⁾ Unbehandelte Kontrolle statistisch signifikant gegenüber 0.2, 2 und 20 W/kg und Scheinbefeldung, nicht für 0.02 W/kg

⁴⁾ Unbehandelte Kontrolle statistisch signifikant gegenüber 2 und 20 W/kg und Scheinbefeldung

⁵⁾ Unbehandelte Kontrolle statistisch signifikant gegenüber 0.2 und 2 W/kg

⁶⁾ Unbehandelte Kontrolle statistisch signifikant gegenüber 0.02, 2 und 20 W/kg

⁷⁾ Scheinbefeldete Kontrolle (0 W/kg) statistisch signifikant gegenüber 2 und 20 W/kg

⁸⁾ Scheinbefeldete Kontrolle (0 W/kg) statistisch signifikant gegenüber 2 W/kg

Diskussion

Es ist uns keine aktuelle Studie bekannt, die sich im Kern mit der Entstehung oder Beeinflussung von Tinnitus im Zusammenhang mit der Exposition durch elektromagnetische Felder befasst. Dementsprechend können die Ergebnisse der vorliegenden Studie als erste Analyse eines Einflusses hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf die Induktion von Tinnitus bewertet werden.

Analyse von Tinnitus im Tiermodell

Zurzeit besteht kein Zweifel, dass auch Tiere Phantomwahrnehmungen empfinden. Molekulare wie elektrophysiologische Analysen in Tiermodellen unterstützen die Annahme, dass Plastizitätsänderungen in auditorischen Kerngebieten gleichermaßen in Tier und Mensch ursächlich mit der Wahrnehmung von Phantomgeräuschen verknüpft sind (siehe zur Übersicht: Norena and Eggermont, 2003; Bartels et al., 2007; Saunders, 2007). In Tier und Mensch werden Veränderungen neuronaler Aktivität in zentralen auditorischen Kerngebieten als Ursache für die kortikalen Plastizitätsänderungen (Reorganisationsprozesse) und korrelierten Fehlwahrnehmungen angesehen: Lockwood et al., 2002; Norena and Eggermont, 2003; Bartels et al., 2007; Saunders, 2007, Eggermont, 2007; Kaltenbach, 2007). Das Tierverhaltensmodell ist mittlerweile ein "akzeptiertes" Werkzeug zur gezielten Fehlwahrnehmung nach Tinnitus-Therapeutika (Guitton et al., 2004; Panford-Walsh et al., submitted).

Das Ergebnis aus der vorliegenden Studie zur Analyse des Effektes von elektromagnetischer Strahlung auf die Induktion von Tinnitus im Tiermodell lässt zweifelsfrei erkennen, dass weder im operanten Verhaltenstest noch in der molekularen Analyse aktivitätsabhängiger Gene ein Hinweis auf ein Potenzial hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung des Mobilfunks Tinnitus zu induzieren sichtbar wird. Dies ist im Einklang mit jüngsten Befragungsstudien am Menschen. Studenten, die ihr Mobiltelefon häufiger nutzten als andere, hatten nach ihren subjektiven Angaben in gleichem Maße Hörstörungen, Tinnitus oder Schwindelsymptome wie eine Vergleichsgruppe die als Wenignutzer eingestuft war (Davidson and Lutman, 2007). Auch andere Anzeichen von Unwohlsein waren nicht häufiger vertreten (Mortazavi et al., 2007).

Verhaltensstudien, Hörmessungen

Wir konnten bei keiner Befeldungsstärke Hinweise auf Tinnitus finden. Dies ist in Einklang

mit der statistischen Analyse der Studie an 873 Personen aus der *King Saud Universität* in Saudi-Arabien überein, die keinen Hinweis auf eine Hör- oder Sehminderung von eifrigen Nutzern von Mobiltelefonen zeigte (Meo and Al-Drees, 2005). In dieser Studie, die vor gesundheitlichen Gefahren der Mobiltelefonnutzung warnt, wurden jedoch aus der Statistik nicht ableitbare falsche Korrelationen zwischen somatischen Beschwerden und Nutzung von Mobiltelefonen gezogen (Meo and Al-Drees, 2005).

Darüber hinaus zeigt die vorliegende Studie bei keiner Befeldungsstärke einen signifikanter Unterschied im Tinnitusverhalten zur Tiergruppe mit Scheinbefeldung (Abb. 9 - 11). Es konnte weder akut, d.h. im wöchentlichen Test während der Befeldung (Abb. 10) noch nach 2-wöchiger Erholungszeit (Abb. 11) eine Tendenz zur Induktion von Tinnitus nachgewiesen werden. Zu allen Zeitpunkten blieb das ermittelte relative Verhalten während der Testphase signifikant unter dem Verhalten, das typischerweise als Tinnitus interpretiert wird (siehe Abb. 8 und Abb. 12, Tinnitus).

Bisher gibt es weltweit nur wenige Tierverhaltensmodelle (siehe zur Übersicht: (Bauer, 2003, 2004). Alle Tierverhaltensmodelle, etabliert in den USA in der Arbeitsgruppe von R. Salvi (Salvi et al., 2000) und C. Bauer (Bauer, 2003), in Frankreich in der Arbeitsgruppe J.L. Puel (Puel and Guillon, 2007) und in Deutschland in der Arbeitsgruppe M. Knipper (Ruttiger et al., 2003) benutzen zur Induktion von Tinnitus Lärmstimuli und Salicylatkonzentrationen in vergleichbaren Größenordnungen. Wir gehen daher davon aus, dass zurzeit auch mit keinem anderen existierenden Tinnitus-Tierverhaltensmodell Ergebnisse zur Tinnitus-Induktion durch Exposition mit elektromagnetischen Feldern erzielt würden, die von unseren Studien abweichen.

Diese Schlussfolgerung ist jedoch beschränkt auf die derzeit putative eingeschränkte Empfindlichkeit Tinnitus im Tierverhaltensmodell zu detektieren. Hier sollte der parallele Ansatz zur Detektion von aktivitäts-abhängigen Genen als zusätzlicher Parameter zur Detektion von Tinnitus-Schwellenveränderungen dienen.

Auf der Basis der Detektion veränderter neuronaler Aktivität zentraler Projektionen im auditorischen System bei Tinnitus (Norena and Eggermont, 2003), wurden aktivitätsabhängige Plastizitätsgene in Maus und Ratte nach unterschiedlichen Tinnitus Paradigmen untersucht (Tan et al., 2007; Panford-Walsh et al., submitted). Die Studien zeigten eine direkte Korrelation veränderter Genexpression mit der Wahrnehmung von Phantomgeräuschen im Tierverhaltensmodell (Tan et al., 2007, Panford-Walsh et al., submitted).

Die Hypothese geht davon aus, dass die durch einen Hörschaden initiierte veränderte Spontanaktivität im Hörnerv eine veränderte Expression von

aktivitätsabhängigen Genen wie BDNF in Spiralganglienneuronen und im Hörnerv bedingt, wodurch die Effizienz von Synapsen im Stammhirn verändert wird und über ein Ungleichgewicht hemmender und erregender Aktivitätsmuster im zentralen auditorischen Kerngebieten kortikale Reorganisationsprozesse und Tinnitus ausgelöst werden. Letzteres geht mit einer Erniedrigung der Expression des aktivitätsabhängigen Gens Arg3.1/Arc im auditorischen Cortex einher (Tan et al., 2007). Tatsächlich zeigen verschiedene getesteten Paradigmen, die in unterschiedlichen Arbeitsgruppen studiert wurden und zu Tinnitus führen (siehe zur Übersicht: Lockwood et al., 2002; Eggermont, 2007; Kaltenbach, 2007), gleichermaßen eine Erhöhung von BDNF in der Cochlea und im IC sowie eine Erniedrigung des aktivitätsabhängigen Gens Arg3.1/Arc im auditorischen Cortex (Tan et al., 2007; Panford-Walsh et al., submitted). Dagegen führen nicht-traumatische Stimuli wie Gedächtnisleistung, "Environmental Enrichment" oder z.B. nicht-traumatische Geräusche eher zu einer Potenzierung von BDNF und Arg3.1/Arc in zentralen, kortikalen bzw. subkortikalen Regionen (Korte et al., 1995; Guzowski et al., 2000; Turrigiano and Nelson, 2004; Bramham and Messaoudi, 2005).

Als Korrelat veränderter neuronaler Aktivität wurden auch die sogenannten „Immediately Early Genes“ wie c-Fos angesehen. Die Expression von c-Fos verändert sich durch verschiedene Paradigmen wie z.B. durch Verhaltensänderungen (z.B. Gammie and Nelson, 2001), Umgebungsreize (z.B. Gallitano-Mendel et al., 2007) aber auch nach akustischen Stimuli wie nicht-traumatische (Mahlke and Wallhausser-Franke, 2004) und traumatische Schallexpositionen (Ruan et al., 2007). Entsprechend sollte man davon ausgehen, dass die mit Tinnitus einhergehende veränderte Expression von c-Fos in der Cochlea (Tan et al., 2007) und im IC (Mahlke and Wallhausser-Franke, 2004) wohl mit der veränderten neuronalen Aktivität korreliert, nicht aber kausal mit Plastizitätsänderungen einhergeht.

Entsprechend sind die in der vorliegenden Studie dokumentierten gleichbleibenden Spiegel an aktivitätsabhängigen Genen wie BDNF, c-Fos und Arg3.1/Arc in der Cochlea, dem IC und AC akut und 2 Wochen nach hochfrequenter elektromagnetischer Befeldung sowohl ein Hinweis auf konstant bleibende neuronale Aktivitätsmuster im auditorischen System und auch ein Hinweis auf konstant bleibende Synapsen-Effizienzen im auditorischen System. Im auditorischen Cortex zeigt sich einzig für die beiden höchsten Befeldungsstärken 2 W/kg und 20 W/kg eine signifikant veränderte Varianz für Arg3.1/Arc akut nach der Befeldung und für BDNF Exon IV eine signifikant veränderte Varianz akut nach der Befeldung mit 2 W/kg (Tabelle 2). Da allerdings der gemittelte Genexpressionsspiegel unverändert war und im Vergleich mit der unbehandelten

Kontrollgruppe die Varianzen der Genexpression für fast alle Befeldungsgruppen höchstsignifikant verschieden waren, ist es nahe liegend, dass ein von der Befeldungsstärke unabhängiger Effekt die Ursache sein könnte. Denkbar wäre, dass die thermische Belastung der Tiere zu der höheren Variation geführt hat. Wie in Voruntersuchungen gezeigt, kann die thermische Belastung vom Tier offensichtlich problemlos kompensiert werden ohne zu einer Erhöhung der Kerntemperatur bzw. zu einer bedeutenden Erhöhung der lokalen Gewebetemperatur zu führen (Abb. 3, Abb. 4). Es ist jedoch möglich, dass die Temperaturbelastung zu veränderten Verhaltensmustern führt, die wiederum auf die Genexpression Einfluss nehmen könnten. Diese Verhaltensmuster könnten durchaus so etwas wie "Wohlbefinden" oder "Unbehagen" widerspiegeln, mit unterschiedlicher Ausprägung im einen wie im anderen Tier, was zur Erhöhung der Varianz geführt haben könnte. Eine solche Interpretation wird unterstrichen durch die Tatsache, dass nach 2-wöchiger Erholung ("recovery") keine signifikanten Unterschiede sowohl im gemittelten Genexpressionspiegel als auch in der Varianz der Expression von Arg3.1/Arc und BDNF Exon IV nachweisbar sind.

Da sich für Arg3.1/Arc in der akuten Befeldungssituation der Mittelwert mit zunehmender Varianz tendenziell eher in Richtung Zunahme als in Richtung Abnahme der Genexpression bewegt (Abb. 13A), kann - dem Stand der Forschung gemäß - kein Hinweis auf eine Tendenz zur Induktion von Tinnitus gefunden werden, wohl eher ein Hinweis auf eine kortikale Reaktion wie sie nach z.B. veränderten Umgebungsreizen (Pinaud et al., 2001; Koh et al., 2005) oder Plastizitätsänderungen (Shepherd et al., 2006; Tzingounis and Nicoll, 2006) nachweisbar ist.

Vergleichbar wäre die zunehmende Varianz von BDNF Exon IV bei höheren Befeldungsstärken zu interpretieren (Abb. 14A), die nur für 2 W/kg signifikant ist und daher besonders vorsichtig zu interpretieren ist. Auch hier gibt es, entsprechend der Rolle von BDNF bei Plastizitätsänderungen maximal einen Hinweis auf einen veränderten Umgebungsreiz (Barth, 2007; Monfils et al., 2007), nicht aber auf die Induktion von Tinnitus.

Zwischen unbehandelten Kontrollen und Tieren, die der Scheinbefeldung oder einer anderen Befeldungsstärke ausgesetzt waren, zeigten sich Unterschiede in der Expression von BDNF Exon IV (E4) in der Cochlea akut nach Befeldung. Es ist anzunehmen, dass die veränderte akustische Umgebung im Versuchsraum und im Befeldungskäfig diese veränderte Genexpression induziert hat, denn nach 2 Wochen Erholung ("recovery") unter den normalen Haltungsbedingungen ist kein Unterschied zur den unbehandelten Kontrolltieren mehr auszumachen. Die scheinbar signifikante, niedrigere Expression von

E4 in der Cochlea nach 2 Wochen Erholung gilt nur für die Versuchsgruppe aus der Scheinbefeldung. Die Wahrscheinlichkeit für eine sinnfreie, zufällige Signifikanz muss daher als sehr hoch eingeschätzt werden. Es wäre zwar denkbar wenn auch sehr spekulativ, dass die Befeldung zu einer Erhöhung von BDNF Exon IV führt und das Handling der Tiere zu einer Reduktion. Für die Tiere in der Scheinbefeldung bedeutete dies eine (statistisch signifikante) Reduktion der E4-Expression, für die Befeldungsgruppen würde diese Reduktion durch den gegenläufigen Effekt der Befeldung wieder ausgeglichen. Wir konnten allerdings keine Bestätigung für eine SAR-dosisabhängige Erhöhung der E4-Expression finden und halten daher die Erklärung für angebracht, dass es sich um eine zufällige, zumal schwach signifikante, unbedeutende Signifikanz handelt.

Einen statistischen Grenzfall stellt die Signifikanz der Expression von c-Fos im IC nach 2 Wochen Erholung dar. Zwar deutet die 1-way ANOVA auf eine signifikante Veränderung, die allerdings im Tukey's Post-Test nicht spezifiziert werden kann, da alle Paarvergleiche ein nicht-signifikantes Ergebnis liefern. Es ist daher davon auszugehen, dass die reduzierte Expression von c-Fos im IC nach 2 Wochen Erholung im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren eher auf eine leichte Variation im Mittelwert der Kontrolltiere zurückzuführen ist. Auch BDNF Exon IV war im IC nach 2 Wochen Erholung für die Befeldungsstärken 0.2 W/kg und 2 W/kg signifikant reduziert. Zusammengenommen erscheint es möglich, dass verzögerte Veränderungen der Expression von c-Fos und BDNF Exon IV im IC stattfinden könnten, allerdings nicht in Abhängigkeit von der SAR-Stärke und nur für einzelne Tiere (größere Varianz), eine eher unwahrscheinliche Annahme. Vermutlich ist die vermeintliche Reduktion in den Befeldungsgruppen vielmehr eine Erhöhung der Expression in der unbehandelten Kontrollgruppe (die eventuell eine größere Aufregung bei der Präparation erfährt).

Während die Ergebnisse von 4 unabhängigen Befeldungsabschnitten keine signifikanten Hinweise auf Tinnitus-begleitende Verhaltensänderungen im Tierverhaltensmodell oder Tinnitus-induzierende Genexpressionsveränderungen zeigen, weisen doch Genexpressionstudien von c-Fos und BDNF in der Cochlea und im IC auf veränderte Expression zwischen Tieren in normaler Haltung und solchen mit Scheinbefeldung bzw. Befeldung hin. Ganz vergleichbar zeigen Studien, welche den Einfluss von Befeldungsstärken von 900 MHz, SAR 4 W/kg für täglich 1 Stunde über 2 Jahre auf eine Veränderung der c-Fos Expression im Hippocampus, cerebralen Cortex und Cerebellum untersuchen, keinen Unterschied zwischen befeldeten und Scheinbefeldeten Tiergruppen auf (Finnie, 2005; Finnie et al., 2007). Hier wurde die aktive

Einschränkung der Mobilität durch das Einspannen des Kopfes zur Exposition als Ursache für eine Erhöhung der c-Fos Aktivität im zentralen Nervensystem gegenüber Käfigkontrollen interpretiert (Finnie et al., 2007). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass eine Veränderung von c-Fos nicht nur mit Veränderungen neuronaler Aktivität sondern vor allem auch mit verschiedenen Arten von Stress korreliert. (Gammie and Nelson, 2001; Martinez et al., 2002). Für die Frage nach einem Induktionspotential von elektromagnetischer Befeldung auf die Induktion von Tinnitus kann dieser Befund nicht hoch genug eingeschätzt werden, da er insbesondere zeigt, dass sogar langanhaltende Expositionen mit hohen spezifischen Absorptionsenergien an sich keinen Stressstimulus darstellen und sich dieser dementsprechend nicht negativ auf Induktionswahrscheinlichkeit von Tinnitus auswirken kann.

Ganz entsprechend ist die veränderte Expression von c-Fos und BDNF Exon IV in der Cochlea und im IC von nicht-behandelten Tieren gegenüber Scheinbefeldung und Befeldung zu interpretieren. In den vorliegenden Studien ist jedoch weniger eingeschränkte Mobilität als vielmehr vermehrte Mobilität, durch z.B. kontinuierliches Handling, als Stimulusparadigma für die veränderte Genexpression anzusehen.

Betrachtet man die Ergebnisse der Studie im Zusammenhang aller Daten, so fällt ein weiteres interessantes Phänomen auf. Das Behandlungsparadigma an sich (ob mit oder ohne Befeldung) scheint zu einer Genexpressionsverschiebung zu führen, die tendenziell einer Induktion von Tinnitus gegenläufig scheint: Die Expression von c-Fos und BDNF in der Cochlea und im IC wird eher herunter, die von Arg3.1/Arc eher heraufreguliert. Letzteres zeigt, dass das angewendete Behandlungsparadigma, als Umgebungsreiz interpretiert, Spuren im auditorischen Cortex hinterlässt, vergleichbar zu Gedächtnisleistungen (Guzowski et al., 2000). Es zeigt darüber hinaus die Empfindlichkeit der Messmethodik, die zusammen mit den Verhaltensstudien zu Ergebnissen führt die sich gegenseitig bestätigen.

Schlussfolgerungen

Berücksichtigt man alle Daten aus den molekularbiologischen Analysen und die Daten aus dem Verhaltensmodell muss die Schlussfolgerung sein, dass die eingesetzten Befeldungsstärken keine Hinweis darauf geben, dass eine 2-stündige Exposition mit elektromagnetischen Feldern mit bis zu 20 Watt/kg SAR an 5 Tagen die Woche für 4 Wochen lang Tinnitus auszulösen vermag oder zu einer Änderung des Expressionsspektrums aktivitätsabhängiger Plastizitätsgene führt, die auf eine Tendenz zur Förderung der Induzierbarkeit von Tinnitus hinweist.

Literatur

- Ba F, Ren J, Greer JJ (2005) Brain-derived neurotrophic factor release with neuronal activity in fetal rats. *Neuroreport* 16:141-143.
- Bartels H, Staal MJ, Albers FW (2007) Tinnitus and neural plasticity of the brain. *Otol Neurotol* 28:178-184.
- Barth AL (2007) Visualizing circuits and systems using transgenic reporters of neural activity. *Curr Opin Neurobiol.*
- Bauer CA (2003) Animal models of tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am* 36:267-285, vi.
- Bauer CA (2004) Mechanisms of tinnitus generation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 12:413-417.
- Bauer CA, Brozoski TJ, Rojas R, Boley J, Wyder M (1999) Behavioral model of chronic tinnitus in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 121:457-462.
- Berardi N, Pizzorusso T, Ratto GM, Maffei L (2003) Molecular basis of plasticity in the visual cortex. *Trends Neurosci* 26:369-378.
- Boettcher FA, Salvi RJ (1991) Salicylate ototoxicity: review and synthesis. *Am J Otolaryngol* 12:33-47.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76:99-125.
- Carnicero E, Zelarayan LC, Ruttiger L, Knipper M, Alvarez Y, Alonso MT, Schimmang T (2004) Differential roles of fibroblast growth factor-2 during development and maintenance of auditory sensory epithelia. *J Neurosci Res* 77:787-797.
- Cazals Y (2000) Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate. *Prog Neurobiol* 62:583-631.
- Chytrova G, Johnson JE (2004) Spontaneous retinal activity modulates BDNF trafficking in the developing chick visual system. *Mol Cell Neurosci* 25:549-557.
- Curran T, Morgan JI (1995) Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol* 26:403-412.
- Davidson HC, Lutman ME (2007) Survey of mobile phone use and their chronic effects on the hearing of a student population. *Int J Audiol* 46:133-138.
- Davis GW, Bezprozvanny I (2001) Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis. *Annu Rev Physiol* 63:847-869.
- Du JL, Poo MM (2004) Rapid BDNF-induced retrograde synaptic modification in a developing retinotectal system. *Nature* 429:878-883.
- Eggermont JJ (2007) Pathophysiology of tinnitus. *Prog Brain Res* 166:19-543.
- Eggermont JJ, Roberts LE (2004) The neuroscience of tinnitus. *Trends Neurosci* 27:676-682.
- Evans EF, Wilson JP, Borerwe TA (1981) Animal models of tinnitus. *Ciba Found Symp* 85:108-138.
- Finnie JW (2005) Expression of the immediate early gene, c-fos, in mouse brain after acute global system for mobile communication microwave exposure. *Pathology* 37:231-233.
- Finnie JW, Cai Z, Blumbergs PC, Manavis J, Kuchel TR (2007) Stress response in mouse brain after long-term (2 year) exposure to mobile telephone radiofrequency fields using the immediate early gene, c-fos. *Pathology* 39:271-273.
- Flor H, Denke C, Schaefer M, Grusser S (2001) Effect of sensory discrimination training on cortical reorganisation and phantom limb pain. *Lancet* 357:1763-1764.
- Friauf E (1995) C-fos immunocytochemical evidence for acoustic pathway mapping in rats. *Behav Brain Res* 66:217-224.
- Gallitano-Mendel A, Izumi Y, Tokuda K, Zorumski CF, Howell MP, Muglia LJ, Wozniak DF, Milbrandt J (2007) The immediate early gene early growth response gene 3 mediates adaptation to stress and novelty. *Neuroscience* 148:633-643.

- Gammie SC, Nelson RJ (2001) cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Res* 898:232-241.
- Givalois L, Marmigere F, Rage F, Ixart G, Arancibia S, Tapia-Arancibia L (2001) Immobilization stress rapidly and differentially modulates BDNF and TrkB mRNA expression in the pituitary gland of adult male rats. *Neuroendocrinology* 74:148-159.
- Guitton MJ, Wang J, Puel JL (2004) New pharmacological strategies to restore hearing and treat tinnitus. *Acta Otolaryngol* 124:411-415.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- Harrison RV, Nagasawa A, Smith DW, Stanton S, Mount RJ (1991) Reorganization of auditory cortex after neonatal high frequency cochlear hearing loss. *Hear Res* 54:11-19.
- Hoke ES, Ross B, Hoke M (1998) Auditory afterimage: tonotopic representation in the auditory cortex. *Neuroreport* 9:3065-3068.
- Kaltenbach JA (2007) The dorsal cochlear nucleus as a contributor to tinnitus: mechanisms underlying the induction of hyperactivity. *Prog Brain Res* 166:89-106.
- Kaltenbach JA, Afman CE (2000) Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear Res* 140:165-172.
- Knipper M, Rylett RJ (1997) A new twist in an old story: the role for crosstalk of neuronal and trophic activity. *Neurochem Int* 31:659-676.
- Knipper M, Zinn C, Maier H, Praetorius M, Rohbock K, Kopschall I, Zimmermann U (2000) Thyroid hormone deficiency before the onset of hearing causes irreversible damage to peripheral and central auditory systems. *J Neurophysiol* 83:3101-3112.
- Koh S, Chung H, Xia H, Mahadevia A, Song Y (2005) Environmental enrichment reverses the impaired exploratory behavior and altered gene expression induced by early-life seizures. *J Child Neurol* 20:796-802.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856-8860.
- Lauterborn JC, Rivera S, Stinis CT, Hayes VY, Isackson PJ, Gall CM (1996) Differential effects of protein synthesis inhibition on the activity-dependent expression of BDNF transcripts: evidence for immediate-early gene responses from specific promoters. *J Neurosci* 16:7428-7436.
- Lockwood AH, Salvi RJ, Burkard RF (2002) Tinnitus. *N Engl J Med* 347:904-910.
- Lu B (2003) BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 10:86-98.
- Mahlke C, Wallhauser-Franke E (2004) Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3.1 and c-fos immunocytochemistry. *Hear Res* 195:17-34.
- Maldonado PE, Gerstein GL (1996) Neuronal assembly dynamics in the rat auditory cortex during reorganization induced by intracortical microstimulation. *Exp Brain Res* 112:431-441.
- Martinez M, Calvo-Torrent A, Herbert J (2002) Mapping brain response to social stress in rodents with c-fos expression: a review. *Stress* 5:3-13.
- Massa SM, Swanson RA, Sharp FR (1996) The stress gene response in brain. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8:95-158.
- Melcher JR, Sigalovsky IS, Guinan JJ, Jr., Levine RA (2000) Lateralized tinnitus studied with functional magnetic resonance imaging: abnormal inferior colliculus activation. *J Neurophysiol* 83:1058-1072.
- Meo SA, Al-Drees AM (2005) Mobile phone related-hazards and subjective hearing and vision symptoms in the Saudi population. *Int J Occup Med Environ Health* 18(1):53-7.
- Moller AR (2003) Pathophysiology of tinnitus. *Otolaryngol Clin North Am* 36:249-266, v-vi.

- Moller AR (2006) Neural plasticity in tinnitus. *Prog Brain Res* 157:365-372.
- Monfils MH, Cowansage KK, LeDoux JE (2007) Brain-derived neurotrophic factor: linking fear learning to memory consolidation. *Mol Pharmacol* 72:235-237.
- Montag-Sallaz M, Welzl H, Kuhl D, Montag D, Schachner M (1999) Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. *J Neurobiol* 38:234-246.
- Mortazavi SM, Ahmadi J, Shariati M. (2007) Prevalence of subjective poor health symptoms associated with exposure to electromagnetic fields among university students. *Bioelectromagnetics* 28:326-330.
- Moser EI, Krobot KA, Moser MB, Morris RG (1998) Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. *Science* 281:2038-2042.
- Muhlnickel W, Elbert T, Taub E, Flor H (1998) Reorganization of auditory cortex in tinnitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10340-10343.
- Norena AJ, Eggermont JJ (2003) Changes in spontaneous neural activity immediately after an acoustic trauma: implications for neural correlates of tinnitus. *Hear Res* 183:137-153.
- Panford-Walsh R, Singer W, Rüttiger L, Hadjab S, Tan J, Geisler H-S, Zimmermann U, Köpschall I, Rohbock K, Vieljans A, Ciuman R, Oestreicher E, Haas H, Knipper M (submitted) Midazolam Reverses Salicylate Induced Changes in BDNF and Arg3.1 Expression : Implications for Tinnitus Perception and Auditory Plasticity.
- Pattabiraman PP, Tropea D, Chiaruttini C, Tongiorgi E, Cattaneo A, Domenici L (2005) Neuronal activity regulates the developmental expression and subcellular localization of cortical BDNF mRNA isoforms in vivo. *Mol Cell Neurosci* 28:556-570.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*: Academic Press Inc.
- Penner M, Jastreboff MM (1996) Tinnitus: Psychophysical observations in humans and an animal model. In: *Clinical aspects of hearing* (Van de Water T, Popper, Fax, eds), pp 208-304. New York, Heidelberg: Springer.
- Pinaud R, Penner MR, Robertson HA, Currie RW (2001) Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. *Brain Res Mol Brain Res* 91:50-56.
- Plinkert P (1995) *Physiologie und Pathophysiologie des Corti-Organ*. *Eur Arch Otorhinolaryngol* [Suppl. I], 34:53-115.
- Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
- Poulsen FR, Lauterborn J, Zimmer J, Gall CM (2004) Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine-induced seizure-like activity is related to mode of Ca²⁺ entry. *Neuroscience* 126:665-676.
- Puel JL, Guitton MJ (2007) Salicylate-induced tinnitus: molecular mechanisms and modulation by anxiety. *Prog Brain Res* 166:141-146.
- Rajan R, Irvine DR (1998) Neuronal responses across cortical field A1 in plasticity induced by peripheral auditory organ damage. *Audiol Neurootol* 3:123-144.
- Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA (2005) Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci* 25:1761-1768.
- Ruan Q, Wang D, Gao H, Liu A, Da C, Yin S, Chi F (2007) The effects of different auditory activity on the expression of phosphorylated c-Jun in the auditory system. *Acta Otolaryngol* 127:594-604.
- Rüttiger L, Ciuffani J, Zenner HP, Knipper M (2003) A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus. *Hear Res* 180:39-50.
- Salvi RJ, Wang J, Ding D (2000) Auditory plasticity and hyperactivity following cochlear damage. *Hear Res* 147:261-274.
- Saunders JC (2007) The role of central nervous system plasticity in tinnitus. *J Commun Disord* 40:313-334.

- Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, Haganir RL, Worley PF (2006) Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475-484.
- Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20:727-740.
- Takeuchi Y, Miyamoto E, Fukunaga K (2002) Analysis on the promoter region of exon IV brain-derived neurotrophic factor in NG108-15 cells. *J Neurochem* 83:67-79.
- Tan J, Ruttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, Schulze H, Kilian SB, Hadjab S, Zimmermann U, Kopschall I, Rohbock K, Knipper M (2007) Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1/arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience* 145:715-726.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-726.
- Thoenen H (2000) Neurotrophins and activity-dependent plasticity. *Prog Brain Res* 128:183-191.
- Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10:475-489.
- Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107.
- Tzingounis AV, Nicoll RA (2006) Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron* 52:403-407.
- Wallhauser-Franke E, Braun S, Langner G (1996) Salicylate alters 2-DG uptake in the auditory system: a model for tinnitus? *Neuroreport* 7:1585-1588.
- Wallhauser-Franke E, Mahlke C, Oliva R, Braun S, Wenz G, Langner G (2003) Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp Brain Res* 153:649-654.
- Waltereit R, Dammermann B, Wulff P, Scafidi J, Staubli U, Kauselmann G, Bundman M, Kuhl D (2001) Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation. *J Neurosci* 21:5484-5493.
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11024-11031.
- Yin Y, Edelman GM, Vanderklis PW (2002) The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2368-2373.
- Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR (2002) Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* 22:1532-1540.
- Zha XM, Bishop JF, Hansen MR, Victoria L, Abbas PJ, Mouradian MM, Green SH (2001) BDNF synthesis in spiral ganglion neurons is constitutive and CREB-dependent. *Hear Res* 156:53-68.
- Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M (2002) c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet* 30:416-420.
- Zou Z, Buck LB (2006) Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex. *Science* 311:1477-1481.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493-498.