

Aus dem Institut für Zoologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
und der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
der Medizinischen Hochschule Hannover

**Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen
zum protektiven Effekt von Glial cell line-derived neurotrophic factor,
Brain-derived neurotrophic factor, Dexamethason und Elektrostimulation
auf Spiralganglienzellen ertaubter Meerschweinchen**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover**

Vorgelegt von
Verena Scheper
aus Emstek

Hannover 2007

Wissenschaftliche Betreuung: PD Dr. rer. nat. K.-H. Esser
für die Tierärztliche Hochschule Hannover

PD Dr. med. T. Stöver
für die Medizinische Hochschule Hannover

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. K.-H. Esser

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Baumgärtner

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2007

Gefördert durch die Europäische Union im Rahmen des „Quality of life and management of living resources“-Projektes „BioEar“ (Projektnummer QLRT -2001-01563).

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis eigener Vorträge, Poster und publizierter Vortragskurzfassungen

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Das Hörorgan	4
2.1.1	Anatomie des Hörorgans	4
2.1.1.1	Die Hörschnecke (Cochlea).....	4
2.1.1.2	Das Spiralganglion (Ganglion spirale)	8
2.1.2	Physiologie des Hörorgans.....	9
2.1.3	Ursachen und Klassifizierungen von Hörschädigungen.....	10
2.1.4	Haarzellschädigung und Degeneration der Spiralganglienzellen	11
2.1.5	Das Cochlea-Implantat (CI)	12
2.2	Evozierte Potentiale des auditorischen Systems	14
2.2.1	Allgemeines.....	14
2.2.2	Akustisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, AABR	15
2.2.3	Elektrisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, EABR.....	16
2.3	Die Neurotrophen Faktoren Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor und Brain-Derived Neurotrophic Factor	18
2.3.1	Neurotrophe Faktoren (NTF)	18
2.3.2	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) und die GDNF-Familie	19
2.3.3	<i>In vitro</i> Effekte von GDNF auf Spiralganglienzellen.....	20
2.3.4	<i>In vivo</i> Effekte von GDNF auf Spiralganglienzellen.....	20
2.3.5	Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und die Neurotrophin-Familie.....	21
2.3.6	<i>In vitro</i> Effekte von BDNF auf Spiralganglienzellen	22
2.3.7	<i>In vivo</i> Effekte von BDNF auf Spiralganglienzellen	23
2.3.8	GDNF- und BDNF- Effekte auf die Funktionalität des Hörorgans nach Ertaubung.....	24
2.4	Das Glukokortikoid Dexamethason (DEX).....	25
2.4.1	Glukokortikoide	25
2.4.2	Dexamethason und seine Wirkung auf das Innenohr	26
2.5	Effekte elektrischer Stimulation (ES) auf Spiralganglienzellen.....	27
2.5.1	<i>In vitro</i> Effekte elektrischer Stimulation auf Spiralganglienzellen und die zugrunde liegenden Mechanismen	27
2.5.2	<i>In vivo</i> Effekte elektrischer Stimulation auf Spiralganglienzellen	28
2.6	Effekte einer kombinierten GDNF- bzw. BDNF- Applikation und elektrischer Stimulation auf das SGZ-Überleben und die Funktionalität des Innenohres nach Ertaubung	30

3	Zielsetzung.....	32
4	Material und Methoden	33
4.1	Material.....	33
4.1.1	Versuchstiere.....	33
4.1.1.1	Tierhaltung.....	33
4.1.1.2	Versuchsgruppen.....	34
4.1.1.2.1	AP-Gruppe.....	34
4.1.1.2.2	AP+ES(M)-Gruppe.....	34
4.1.1.2.3	GDNF-Gruppe.....	34
4.1.1.2.4	GDNF+ES-Gruppe.....	34
4.1.1.2.5	BDNF-Gruppe.....	34
4.1.1.2.6	BDNF+ES-Gruppe.....	35
4.1.1.2.7	AP+ES(B)-Gruppe.....	35
4.1.1.2.8	DEX-Gruppe.....	35
4.1.1.2.9	DEX+ES-Gruppe.....	35
4.1.2	Pharmaka.....	36
4.1.3	Chemikalien zur Verwendung während der Operationen	36
4.1.4	Technische Geräte mit Anwendung am Tier	36
4.1.4.1	Die Elektroden-Mikropumpensysteme.....	38
4.1.4.1.1	Das monopolare Elektroden-Mikropumpensystem	38
4.1.4.1.2	Das bipolare Elektroden-Mikropumpensystem	38
4.1.4.2	Die Mikropumpen	40
4.1.5	Reagenzien, Laborbedarf, Verbrauchsmaterialien und Geräte zur Gewinnung und Aufarbeitung der Cochlea sowie zur Spiralganglienzellauswertung	40
4.2	Methoden	41
4.2.1	Messung akustisch evozierter Hirnstammpotentiale (acoustically evoked auditory brainstem response (AABR))	42
4.2.2	Ertaubung von Meerschweinchen	44
4.2.3	Elektroden- und Pumpen-Implantation	45
4.2.4	Messung elektrisch evozierter auditorischer Hirnstammpotentiale (electrically evoked auditory brainstem response (EABR)).....	46
4.2.5	Chronische elektrische Stimulation.....	49
4.2.6	Pumpenwechsel.....	50
4.2.7	Gewinnung und Aufarbeitung der Cochleae	50
4.2.7.1	Transkardiale Perfusion.....	50
4.2.7.2	Pumpentest.....	51
4.2.7.3	Felsenbeinentnahme und Gewinnung der Cochleae.....	51
4.2.7.4	Aufbereitung der Cochleae für die lichtmikroskopische Untersuchung.....	51
4.2.8	Schneiden und Färben der Cochleae	52
4.2.9	Lichtmikroskopische Auswertung.....	53
4.2.10	Statistische Auswertung und Bindegewebsbeurteilung.....	56
5	Ergebnisse	57
5.1	Ergebnisse der AABR-Messungen.....	57
5.2	Ergebnisse der EABR-Messungen.....	60

5.3	Histologische Befunde an Cortiorgan und Basilarmembran	63
5.4	Quantitative Analyse der Spiralganglienzellen	63
5.4.1	Dichte der Spiralganglienzellen in ertaubten, nicht implantierten Cochleae.....	66
5.4.2	Dichte der Spiralganglienzellen in ertaubten und implantierten linken Cochleae.....	67
5.4.3	Interner Vergleich der Dichten der Spiralganglienzellen rechter und linker ertaubter Cochleae der Tiere einer Experimentalgruppe	68
5.4.4	Überleben der Spiralganglienzellen der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe	70
5.4.5	Protektive Effekte der Einzel- und Kombinationsstimuli auf die Spiralganglienzellen im Vergleich	72
5.4.5.1	GDNF.....	72
5.4.5.2	GDNF+ES	73
5.4.5.3	BDNF	74
5.4.5.4	BDNF+ES	75
5.4.5.5	AP+ES(M)	76
5.4.5.6	AP+ES(B)	77
5.4.5.7	DEX	77
5.4.5.8	DEX+ES.....	77
5.5	Dexamethason-Wirkung auf das Bindegewebswachstum und die Effekte der elektrischen Stimulation	81
5.5.1	Effekte von Dexamethason auf das Bindegewebswachstum nach Implantation eines monopolaren Elektroden-Mikropumpensystems.....	81
5.5.2	Wirkung von Dexamethason auf die Effekte der elektrischen Stimulation.....	85
6	Diskussion.....	87
6.1	Auswirkungen der unterschiedlichen Interventionsmethoden auf die Funktionalität der Cochlea.....	87
6.2	Überleben der Spiralganglienzellen in den ertaubten, nicht implantierten Cochleae	90
6.3	Beurteilung der Dichten überlebender Spiralganglienzellen in den mit AP und DEX behandelten Cochleae.....	91
6.4	Bewertung der Spiralganglien-Überlebensrate nach chronischer elektrischer Stimulation.....	92
6.5	Effekte einer verzögerten Therapie mittels neurotropher Faktoren auf das Überleben der Spiralganglienzellen.....	94
6.6	Beurteilung der protektiven Effekte einer verzögerten kombinierten Therapie aus Nervenwachstumsfaktoren und elektrischer Stimulation auf Spiralganglienzellen	96
6.7	Bewertung des Bindegewebswachstums nach Dexamethason-Applikation.....	99
6.8	Einfluss von Dexamethason auf den Effekt der elektrischer Stimulation.....	100
7	Zusammenfassung	102

8	Summary	105
9	Literaturverzeichnis	108
10	Anhang.....	125
10.1	Reagenzien und Lösungen	125
10.2	Laborbedarf, Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien	126
10.3	Geräte	128
10.4	Herstellung von Lösungen	128
	Erklärung	131
	DANKSAGUNG.....	132

Verzeichnis eigener Vorträge, Poster und publizierter Vortragskurzfassungen

Teile der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden bereits als Vorträge, Poster und publizierte Vortragskurzfassungen (Abstracts) auf Kongressen vorgestellt oder sind als Vortrag akzeptiert:

- SCHEPER, V., WEFSTAEDT, P., LENARZ, T., STÖVER, T.
Untersuchungen zum protektiven Effekt einer Kombination aus elektrischer Stimulation und Dexamethason auf Spiralganglienzellen experimentell ertaubter Meerschweinchen
In: 77. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. 2006 (Vortrag, Poster, e-Abstract)
- SCHEPER, V., PAASCHE, G., MILLER, J.M., LENARZ, T., STÖVER, T.
Effects of combined electrical stimulation and neurotrophic factor treatment on spiral ganglion cells in deafened guinea pigs
In: Bionics and Regeneration of the Ear, the 7th International Academic Conference of Immunobiology in Otorhinolaryngology, University of Melbourne and the Bionic Ear Institute, Melbourne, Australia, 2006 (Poster)
- SCHEPER, V., PAASCHE, G., MILLER, J.M., LENARZ, T., STÖVER, T.
Effects of combined electrical stimulation and GDNF treatment on spiral ganglion cells in deafened guinea pigs
In: 43rd Inner Ear Biology Workshop and Satellite Symposium on "Hearing Rehabilitation and Innovative Inner Ear Therapy" Montpellier, France, 2006 (Poster)
- SCHEPER, V., LENARZ, T., STÖVER, T.
Effects of combined treatment with electrical stimulation and dexamethasone on spiral ganglion cells in deafened guinea pigs
In: 2nd international symposium, interface biology of implants, Rostock, 2006 (Poster)
- SCHEPER, V., PAASCHE, G., MILLER, J.M., LENARZ, T., STÖVER, T.
Combination of electrical stimulation and neurotrophic factor treatment in deafened guinea pigs
In: Association for Research in Otolaryngology, MidWinter Meeting 2007, Denver, CO, USA (Poster)

- SCHEPER, V., SASSE, S., PAASCHE, G., MILLER, J.M., LENARZ, T., STÖVER, T.
Spiralganglienzell-Überleben bei verzögerter Applikation einer minimierten GDNF-Konzentration und elektrischer Stimulation
In: 78. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. 2007 (Vortrag)

Für die vorliegende Arbeit wurden die in den Vorträgen und Postern dargestellten Ergebnisse in einen Kontext gesetzt, ausführlicher beschrieben sowie durch weitere Ergebnisse ergänzt.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABR	Auditory Brainstem Response
AABR	akustisch evozierte auditorische Hirnstamm-Potentiale, acustically evoked auditory brainstem response
AdGDNF	GDNF exprimierender adenoviraler Vektor
AEP	Akustisch Evozierte Potentiale (auditory evoked potentials)
AP	artifizielle Perilymphe
Aqua dest.	Aqua destillata , destiliertes Wasser
BAEP	Brainstem Auditory Evoked Potential
BDG	Binde gewebe
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BERA	Brainstem Electric Response Audiometry
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CI	Cochlea Implantat
dB	Dezibel
DEX	Dexamethason
EABR	elektrisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, Electrically evoked Auditory Brainstem Response
ERA	Elektrische Reaktionsaudiometrie
ES	elektrische Stimulation
et al.	et alii (und andere)
FAEP	Frühe akustisch evozierte Potentiale
FEEP	Frühe elektrisch evozierte Potentiale
FGF	Fibroblast Growth Factor
GDA	Glutardialdehyd
GDNF	Glial Cell line-Derived Neurotrophic Factor
GFR α -1	GDNF Family Receptor α 1
h	hora (Stunde)
HS	Hörschwelle
Hz	Hertz
IHC	Innere Haarzellen, inner hair cells
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kHz	Kiloherz
l	Liter
μ	mikro ($\times 10^{-6}$)
μ A	Mikroampere
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ s	Mikrosekunde
μ V	Mikrovolt
m	milli ($\times 10^{-3}$)
mA	Milliampere
MAEP	Mittlere akustisch evozierte Potentiale
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmol	Millimol
ms	Millisekunde
n	Stichprobenumfang
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor

NT-3/4/5	Neurotrophin-3, -4, -5
NTF	neurotrophe Faktoren
NTR	Neurotrophinrezeptor
OHC	äußere Haarzellen, outer hair cells
p	Probability (Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
p.o.	per os
pps	pulses per second
Pt-Ir	Platin-Iridium
RET	rearranged in transformation , intrazellulärer Rezeptor
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
s	Sekunde
SAP	Summenaktionspotential
Sc.	Scala
s.c.	sub cutan
SGZ	Spiralganglienzellen
SP	Schalldruck (sound pressure)
SPF	Spezifisch pathogen frei
SPL	Schalldruckpegel (sound pressure level)
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TNT	Tumor Nekrose Faktor
Trk	Tyrosin Kinase
u.a.	unter anderem
V	Volt
V.	Vena
v.a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Hörminderung und Taubheit stellen in den industrialisierten Nationen eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten dar. Man geht davon aus, dass von einer Gesamtanzahl von 800.000 Geburten pro Jahr in Deutschland 400 bis 500 Kinder mit dauerhaften Hörstörungen zur Welt kommen. Das bedeutet, dass von 1000 Neugeborenen 1 bis 1,2 schwerhörig sind. Die Behandlung taub geborener und ertaubter Patienten ist in den letzten Jahren durch die Einführung künstlicher elektronischer Innenohrprothesen, so genannter Cochlea-Implantate (CI), revolutioniert worden. Inzwischen ist die CI-Versorgung die weitläufig anerkannte Routinebehandlung von Patienten mit vollständigem sensorineuralen Hörverlust. Insbesondere taub geborenen Kindern ist es nach Versorgung mit einem Cochlea-Implantat möglich, Sprache zu erlernen. Allerdings gibt es nach wie vor große individuelle Unterschiede hinsichtlich des Erfolges, der mit einem CI erreicht wird (LENARZ 1997).

Eine Erklärung für diese Variabilität könnte in der Anzahl der für eine elektrische Stimulation (ES) zur Verfügung stehenden Spiralganglienzellen (SGZ) liegen: SPOENLIN (1984) und ALTSCHULER et al. (1999) konnten zeigen, dass bei einsetzender Taubheit zunächst die Haarzellen absterben und nachfolgend die peripheren Dendriten des Hörnerven und die nachgeschalteten Spiralganglienzellen degenerieren. Da das Cochlea-Implantat die Funktion der geschädigten Haarzellen durch eine direkte elektrische Stimulation der SGZ übernimmt, ist der Erfolg eines CI's auch von der Anzahl der für eine elektrische Stimulation zur Verfügung stehenden Spiralganglienzellen abhängig. Dementsprechend wird die Anzahl der SGZ in der Literatur als eines der entscheidenden Elemente für den Erfolg einer CI-Versorgung angesehen (INCESULU u. NADOL 1998; LOUSTEAU 1987, LEAKE et al. 1992; SHEPHERD et al. 1994). Die Zeitspanne zwischen Ertaubung und Versorgung mit einem CI ist eine den Erfolg der Therapie mitbestimmende Variable. Je mehr Zeit zwischen Ertaubung und Implantation verstreicht, desto geringer wird die Zahl der für die elektrische Stimulation zur Verfügung stehenden Spiralganglienzellen (WEBSTER u. WEBSTER 1981).

Wäre es möglich die Anzahl der vitalen SGZ nach Ertaubung auf einem hohen Niveau zu erhalten, könnte vermutlich die Effektivität der Cochlea-Implantate deutlich erhöht

werden. Eine Verzögerung der Degeneration der Spiralganglienzellen beziehungsweise (bzw.) deren Erhalt nach Ertaubung stellt damit einen zentralen Schritt auf dem Weg zu einer weiteren Verbesserung der Effektivität der Cochlea-Implantat-Versorgung dar.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Substanzen identifiziert, die einen protektiven Effekt auf Spiralganglienzellen bei einsetzender Taubheit ausüben können. Diese so genannten neurotrophen Faktoren (NTF) umfassen Substanzen wie glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3), fibroblast growth factor (FGF) und viele andere. YLIKOSKI et al. (1998) und YAGI et al. (2001) konnten in Versuchen an ertaubten Meerschweinchen zeigen, dass eine sofort nach Ertaubung einsetzende Intervention mit GDNF eine effektive Spiralganglienzellprotektion bewirkt. Auch für BDNF konnte solch ein verbessertes SGZ-Überleben an ertaubten Meerschweinchen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gezeigt werden (STAECKER et al. 1996; HEGARTY et al. 1997; MILLER et al. 1997). GILLESPIE et al. (2004) fanden, dass sogar eine 14 Tage nach Ertaubung verzögert einsetzende BDNF-Gabe die SGZ-Population signifikant erhöht. In der Realität dauert es zwischen einigen Wochen bis hin zu Jahren nach der Ertaubung, bis ein Patient mit einem CI versorgt wird. Somit stellt sich die Frage, ob nach drei Wochen, um zunächst die geringste Verzögerungsspanne zu untersuchen, noch ausreichend vitale SGZ vorhanden sind, welche einer möglichen Protektion durch die neurotrophen Faktoren zur Verfügung stehen und falls sie vorhanden sind, welches Protektionsausmaß in diesem Degenerationsstadium noch erzielt werden kann.

Neben der lokalen Freisetzung von neurotrophen Faktoren im Innenohr, scheint auch die einer Cochlea-Implantat-Stimulation nachempfundene elektrische Reizung selbst einen protektiven Effekt auf SGZ ausüben zu können. Allerdings stellen sich die Ergebnisse tierexperimenteller Versuche diesbezüglich nicht einheitlich dar, so dass eine abschließende Bewertung einer elektrischen Stimulation (ES) als protektiver Stimulus für SGZ *in vivo* bisher nicht getroffen werden kann (HARTSHORN et al. 1991; SHEPHERD et al. 1993; MITCHELL et al. 1997). Es ist zu vermuten, dass die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse auf der Verwendung unterschiedlicher Stimulationsparameter beruhen, welche das Ausmaß des protektiven Einflusses der ES auf die SGZ bestimmen. Zu diesen Parametern zählen unter anderem die Reizfrequenz, die Intensität, die Wiederholungsrate und die Pulsbreite. Vorangegangene Untersuchungen halfen, die optimalen Stimulationsparameter zur chronischen

elektrischen Stimulation von Meerschweinchen-Cochleae zu bestimmen (MITCHELL et al. 1997). Diese Einstellungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit übernommen. Neben der Untersuchung, ob diese Parameter auch nach dreiwöchiger Taubheitsphase noch zu einem Erhalt der Spiralganglienzellen führen, sollte ermittelt werden, ob eine unterschiedliche Positionierung zwischen aktiver Elektrode und Referenzelektrode Auswirkungen auf den möglichen protektiven Effekt der elektrischen Stimulation auf die SGZ hat.

In vitro Untersuchungen konnten belegen, dass durch elektrische Stimulation eine Freisetzung neurotropher Faktoren hervorgerufen werden kann (BALKOWIEC u. KATZ 2000). Es ist daher zu vermuten, dass die zellprotektive Wirkung der ES auf einer Vermittlung durch neurotrophe Faktoren beruht. Es wäre daher möglich, dass die Kombination beider Interventionsmethoden einen synergistischen Effekt bewirkt. Perspektivisch wäre zur Optimierung der Spiralganglienzellprotektion die Kombination einer Lokalthherapie mittels NTF und einer elektrischen Stimulation durch das Implantat von höchstem Interesse. Um dies zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Effekt einer drei Wochen nach systemischer Ertaubung verzögert einsetzenden elektrischen Stimulation auf SGZ untersucht. Anschließend wurde der Effekt der Kombination aus elektrischer Stimulation und GDNF bzw. BDNF betrachtet.

Neben einer möglichst großen Anzahl vitaler SGZ ist für eine optimale Versorgung mit einem CI eine enge Nerv-Elektroden-Interaktion von Bedeutung (GANTZ et al. 1993; LENARZ 1998). Aus diesem Grunde ist es das Ziel ungewollte Nebeneffekte der Cochlea-Implantat-Operation, wie implantationsbezogene Entzündungsprozesse oder Bindegewebsbildung im Bereich der inserierten Elektrode, auf ein Minimum zu reduzieren. Mögliche Kandidaten für eine derartige therapeutische Intervention im Innenohr sind Glukokortikoide wie zum Beispiel Dexamethason. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass Dexamethason (DEX) den nach lärm- (TAKEMURA et al. 2004) und aminoglykosid-induziertem (HIMENO et al. 2002) Hörverlust einsetzenden Haarzellverlust und die daraus resultierende Hörschwellenerhöhung signifikant verringern konnte. Mögliche protektive bzw. toxische Effekte von Glukokortikoiden auf Spiralganglienzellen im Sinne eines verstärkten oder verminderten Spiralganglienzellüberlebens wurden bisher *in vivo* nicht untersucht. Ebenso wenig wurde untersucht, welchen Einfluss Glukokortikoide auf den möglichen SGZ-protektiven Effekt der elektrischen Stimulation haben.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Hörorgan

Das auditorische System der Säugetiere lässt sich in einen peripheren Anteil, das eigentliche Hörorgan, und einen zentralen Anteil, die zentrale Hörbahn, unterteilen. Im Weiteren soll speziell auf das Hörorgan (SEIFERLE 1992) eingegangen werden.

2.1.1 Anatomie des Hörorganes

Das Hörorgan besteht aus drei Teilen: dem Außen-, Mittel- und Innenohr. Das äußere Ohr besteht aus der Ohrmuschel sowie dem sich anschließenden äußeren Gehörgang. Das Trommelfell bildet den Abschluss des äußeren Ohres und trennt dieses vom Mittelohr, welches im Felsenbein liegt (Abb. 1).

An das Trommelfell schließt sich eine knöcherne, luftgefüllte Höhle, das Mittelohr (*Auris media*) an. Dieses setzt sich aus der Paukenhöhle (*Cavum tympani*) und der Ohrtrumpete (*Tuba auditiva*, Eustachische Röhre) zusammen. In der Paukenhöhle liegen die der Schallübertragung dienenden Gehörknöchelchen (*Ossicula auditus*). Hammer (*Malleus*), Amboß (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*) sind beweglich miteinander verbunden und überbrücken den Abstand zwischen Trommelfell und dem Ovalen Fenster (*Fenestra vestibuli*), welches das Mittelohr vom nachfolgenden Innenohr abgrenzt. Im Innenohr (*Auris interna*) befindet sich das eigentliche statoakustische Doppelsinnesorgan. Es besteht aus zwei miteinander in Verbindung stehenden funktionellen Teilen, dem Gleichgewichtsorgan (Vestibularapparat) und der sich rostroventral anschließenden Schnecke (*Cochlea*).

2.1.1.1 Die Hörschnecke (Cochlea)

Die Cochlea liegt beim Meerschweinchen, im Gegensatz zur anatomischen Beschaffenheit des Menschen, nahezu frei im Mittelohr (Abb. 1 und 2) und wird durch eine dünne Knochenwandung, welche sich um eine konusförmige Achsenspindel (*Modiolus*) windet, von diesem abgegrenzt. Beim Menschen weist sie 2,5 und beim Meerschweinchen 3,5 bis nahezu 4, sich verjüngende Windungen auf. Vom Modiolus ragt eine senkrecht angeordnete, ebenfalls spiralförmig verlaufende, dünne Knochen-

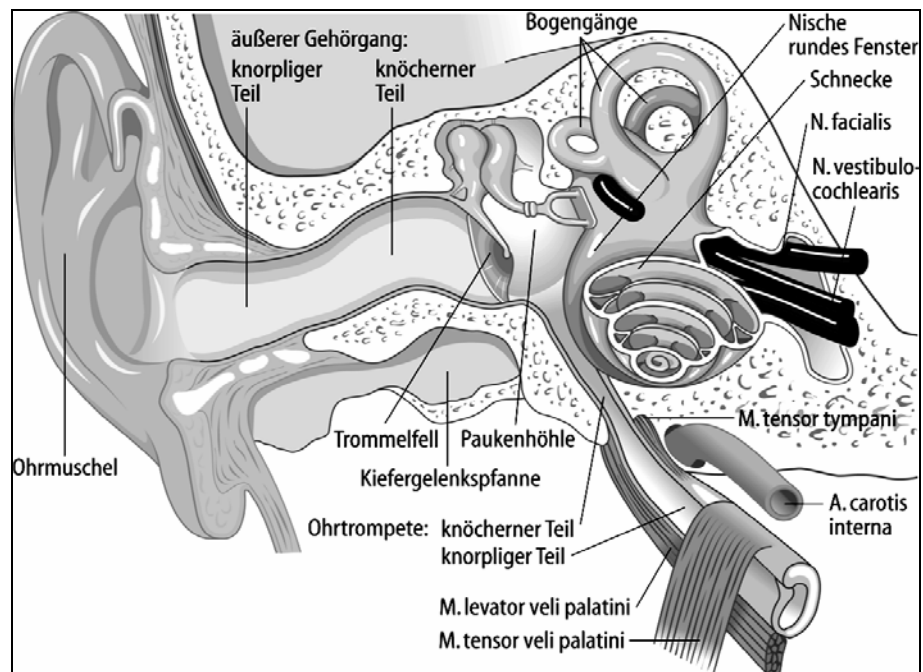


Abb. 1: Aufbau des menschlichen Ohres (BOENNINGHAUS u. LENARZ 2004, Abb. I.1)

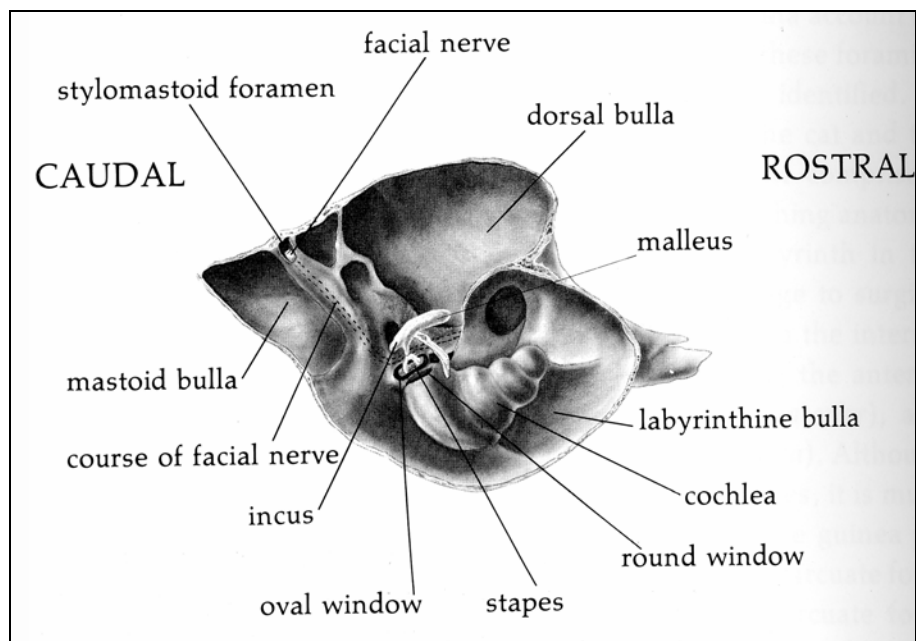


Abb. 2: Innenansicht des Meerschweinchenfelsenbeins (COOPER u. SCHILLER, 1975)

lamelle (*Lamina spiralis ossea*) in den knöchernen Schnecken gang vor. Dieser Vorsprung und zwei an ihm entspringende Membranen teilen den knöchernen Schnecken gang in zwei perilymphatische Treppengänge, die an der *Modiolusspitze* (*Apex*) über einen Hohlraum (*Helicotrema*) miteinander kommunizieren, sowie in einen zwischen den beiden Membranen liegenden häutigen Schlauch, den *Ductus cochlearis* (Abb. 3).

Der obere der drei in der Cochlea verlaufenden Flüssigkeitsräume wird als Vorhoftreppe (*Scala vestibuli*) bezeichnet und beginnt am ovalen Fenster (*Fenestra vestibuli*) (SEIFERLE 1992). Von hier aus verläuft er zum *Helicotrema*, wo er mit der am runden Fenster (*Fenestra cochleae*) endenden Paukentreppe (*Scala tympani*) in Verbindung steht. Beide Scalen enthalten zusammen ein Perilymphvolumen von 15,94 µl (SHINOMORI et al. 2001). Der zwischen diesen beiden Scalen liegende *Ductus cochlearis* bzw. auch *Scala media* genannte Raum, wird durch die Reißnersche Membran (*Membrana vestibularis*) von der *Scala vestibuli* und durch die Basilarmembran von der *Scala tympani* getrennt. Die seitliche Begrenzung der *Scala media* bildet die *Stria vascularis*, durch die die Versorgung der *Scala media* und der ihr assoziierten Strukturen mit kaliumreicher Endolymphe erfolgt. Das Volumen dieses Raumes beträgt 4,69 µl (SHINOMORI et al. 2001). Das *Cortische Organ* (*Organum spirale*) befindet sich auf der zwischen der *Lamina spiralis ossea* und dem *Ligamentum spirale* verlaufenden Basilarmembran (*Lamina basilaris*) und besteht aus den mit Stereovilli versehenen Haarzellen sowie Stützzellen (DEITERS'sche Zellen). Zwei, zu Pfeilerzellen umgewandelte Stützzellen bilden den Cortischen Tunnel, der eine Einteilung der Haarzellen in innere (IHC) und äußere Haarzellen (OHC) zulässt. Axial befindet sich eine Reihe innerer Haarzellen, während peripher drei bis maximal fünf Reihen an äußeren Haarzellen vorhanden sind. Die modiolusseitige Begrenzung des Cortischen Organs erfolgt durch den *Limbus spiralis osseae*, dessen oberer Rand (*Labium limbi vestibulare*) die Ansatzstelle für die Tektorialmembran (*Membrana tectoria*) bildet. Unterhalb der Tektorialmembran liegen die erwähnten Haarsinneszellen. Während die Stereovilli der OHC festen Kontakt mit der sie bedeckenden Tektorialmembran haben, flotieren die der IHC frei in der Endolymphe (HOTH u. LENARZ 1997).

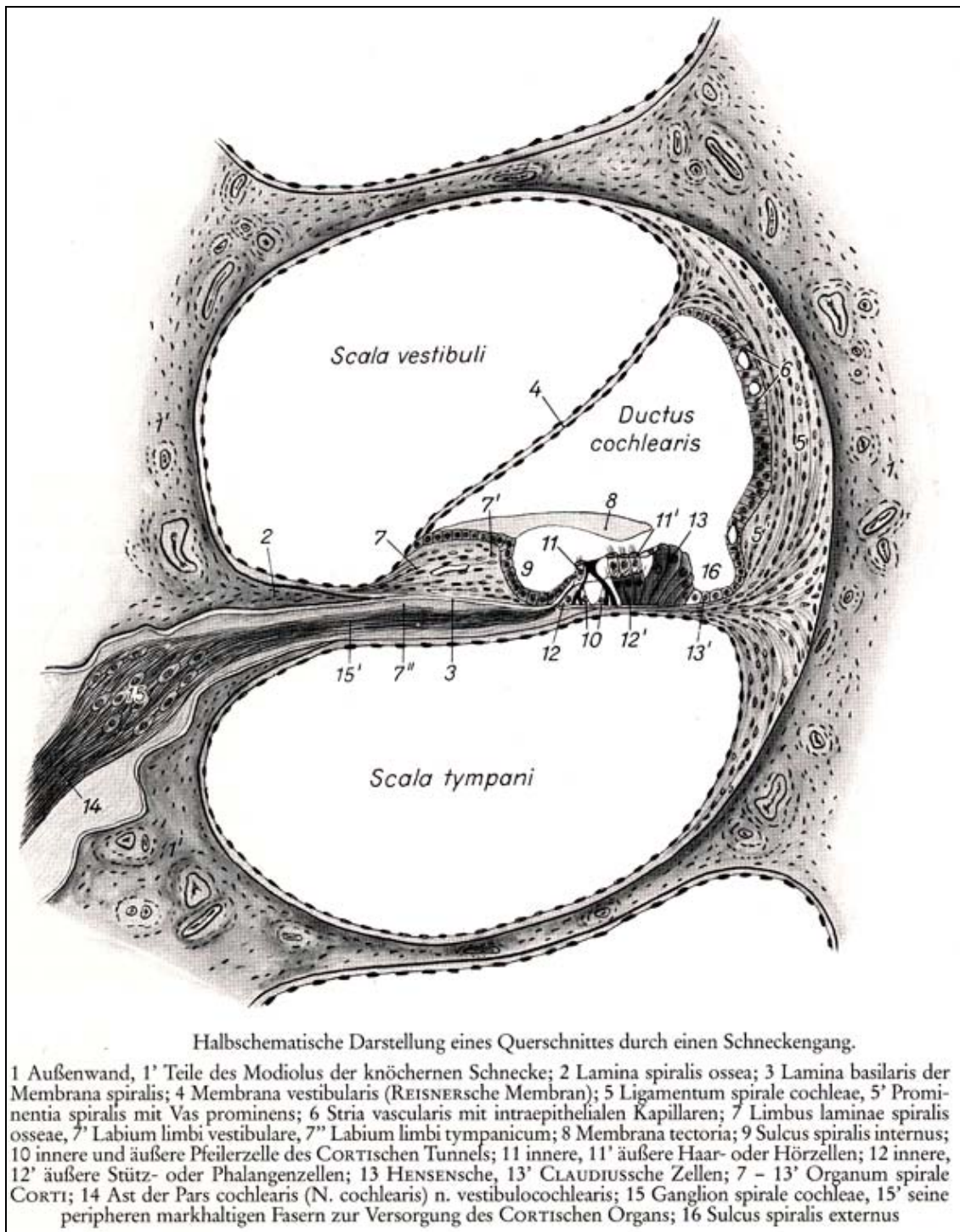


Abb. 3: Darstellung eines Querschnitts durch eine Windung der Cochlea (SEIFERLE 1992)

2.1.1.2 Das Spiralganglion (Ganglion spirale)

Die knöcherne Achse der Cochlea, der Modiolus, enthält einen feinen Knochenkanal (*Canalis spiralis cochleae*, Rosenthalscher Kanal), in welchem der Hörnerv, Blutgefäße und das bipolare Ganglienzellen enthaltende Spiralganglion (*Ganglion spirale cochleae*) liegen.

Das Ganglion spirale wird von den zentralen Axonen der bipolaren Nervenzellen gebildet (LEONHARDT 1990) und stellt das erste auditorische Neuron des afferenten Leitungsbogens dar. Die peripheren Fortsätze des Ganglion spirale bilden die dendritischen Fasern des Hörnervs. Sie verlassen den Modiolus und treten unter Verlust ihrer Markscheide von unten durch die Basilarmembran. Von dort ziehen sie frei durch den inneren Tunnel und bilden synapsenartige Kontakte mit den Haarzellen (BREDBERG 1977; LEONHARDT 1990; NADOL 1990). Am basalen Pol der OHC inserieren vorwiegend efferente Hörnervenfaser (90%) wohingegen nur 5 bis 10% an afferenten synaptischen Strukturen von den OHC entsandt werden, von denen jede durch Kollaterale mit ca. zehn äußeren Haarzellen verbunden wird (ABBAS 1988; BREDBERG 1977; LEONHARDT 1990; ZENNER 1994). Die IHC werden an ihrem basalen Pol vorwiegend von afferenten Fasern und nur von wenigen efferenten Fasern, die mit afferenten Fasern über axodendritische Synapsen in Verbindung stehen, innerviert (HOTH u. LENARZ 1997). Bipolare myelinisierte Typ I-Ganglienzellen stellen bis zu 95% der gesamten Spiralganglienzellen, wohingegen pseudounipolare unmyelinisierte Ganglienzellen vom Typ II 5% der SGZ ausmachen (ROMAND u. ROMAND 1987). Typ I-Ganglienzellen der Meerschweinchen sind mit einem mittleren Durchmesser von 12-25 µm etwas größer als Typ II-Ganglienzellen (BICHLER 1984). Funktionell repräsentieren die Typ I Zellen größtenteils die afferente Versorgung der inneren Haarzellen, wohingegen den Typ II-Zellen die afferente Versorgung der äußeren Haarzellen zukommt (RUBEL u. FRITZSCH 2002).

Die zentralen Neuriten des Spiralganglions vereinigen sich zum *Nervus cochlearis* des sensorischen *Nervus vestibulocochlearis* (VIII. Hirnnerv). Dieser entspringt mit seinen beiden Wurzeln (*Radix cochlearis* und *vestibularis*) aus dem verlängerten Rückenmark. Über dieses erreichen die spezifischen Erregungen das Gehirn und werden in den Endkernen des Rhombencephalons auf die sekundären Neurone und somit auf die zentralen Leitungsbahnen umgeschaltet.

2.1.2 Physiologie des Hörorgans

Das Hörorgan reagiert auf Schallwellen, die als Druckschwankung der Luft auftreten, und vermittelt diese als bewusste Sinnesempfindungen (z.B. Geräusche und Töne). Als Hören wird das Aufnehmen dieser Schallreize, die Weiterleitung der Reize durch Nervenfasern und das Deuten dieser Reize im Gehirn bezeichnet. Ein Ton wird durch eine Sinusschwingung einer einzigen Frequenz dargestellt, während Geräusche ein breites Frequenzband innerhalb des Hörbereiches umfassen (ZENNER 1994).

Die Leistungsfähigkeit des Hörorgans ist bei den verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich ausgeprägt. Säugetiere weisen eine große artspezifische Variabilität im Hörbereich auf. Für den Menschen liegt der wahrnehmbare Frequenzbereich in der Jugend zwischen 20 Hz und 20 kHz und zwischen 2 und 5 kHz ist das Gehör am empfindlichsten (LEHNHARDT u. LASZIG 2001). Beim Elefanten liegt die untere Hörgrenze bei ca. 14 Hz (Infraschall), bei einigen Fledermausarten reicht die obere Hörschwelle bis ca. 160 kHz (Ultraschall) (PENZLIN 1991; SCHMIDT-NIELSEN 1999). Meerschweinchen hören in einem Frequenzbereich von 50 Hz bis 50 kHz (FAY 1988).

Als dynamische Breite wird die Schallintensität bezeichnet, die vom Ohr verarbeitet werden kann. Diese umfasst für das menschliche Ohr einen so großen Wert, dass für sie ein logarithmisches Maß als Schalldruckpegel (SPL) in Dezibel (dB) eingeführt wurde. Daraus ergibt sich für das menschliche Ohr eine dynamische Breite von 0-120 dB. Das gesamte Ohr mit all seinen Strukturen dient der Aufgabe, den eingefangenen Schall den Sinneszellen so zuzuführen, dass diese ihn möglichst gut aufnehmen können.

Schallwellen erreichen über die Ohrmuschel und den äußeren Gehörgang das Trommelfell, womit der Vorgang des Hörens initiiert wird. Das Trommelfell wird durch die Schallwelle in Schwingung versetzt und gibt die mechanische Bewegung an die Gehörknöchelchenkette weiter. Der Druck des Steigbügels auf das ovale Fenster bewirkt eine Wanderwelle in der dahinter liegenden Flüssigkeit (Perilymphe). Diese Wellen laufen entlang der Vorhofstreppe durch die immer enger werdenden Windungen zur Schnecken spitze. Über die Basilarmembran wird auch die Endolymphe im *Ductus cochlearis* angeregt und bewirkt eine Reizung des Cortischen Organs. An der Schnecken spitze gelangen die Druckwellen in den Paukengang, laufen wieder zur Basis der Schnecke zurück und erschöpfen sich schließlich im runden Fenster.

Die Auslenkung der Basilarmembran führt zu einer Scherung der Stereovilli der äußeren Haarzellen durch die darüber liegende Tektorialmembran (LEONHARDT

1990). Die so entstehenden gerichteten Flüssigkeitsströme bewirken ebenfalls eine Deflexion der inneren Haarzellen (PICKLES u. COREY 1992). Darin besteht der adäquate Reiz für die Erregung der Sinneszellen. Durch die Depolarisation der inneren Haarzellen werden an ihrer Basis afferente Neurotransmitter freigesetzt und somit die Auslösung eines postsynaptischen Nervenaktionspotentials erreicht (LIBERMANN 1984; ZENNER 1994). Die inneren Haarzellen führen somit den endgültigen Transduktionsprozeß, die Umwandlung des mechanischen Signals der äußeren Haarzellen in ein körpereigenes bioelektrisches Signal, aus (mechanoelektrische Transduktion) (ABBAS 1988; ALLEN 1980; KLINKE 1987; ZENNER u. PLINKERT 1992; PLATH 1981).

Die Auslenkung der Basilarmembran ist stark nach dem Tonotopieprinzip organisiert, wobei die passive Wanderwelle die Basilarmembran in Abhängigkeit der Stimulusfrequenz an verschiedenen Stellen maximal auslenkt (ABBAS 1988; ALLEN 1980; BÈKÉSY 1970; ZENNER 1994). Dadurch kommt es zur Frequenzdispersion, das heißt, unterschiedliche Frequenzen erregen unterschiedliche Sinneszellen (LEONHARDT 1990). Bei hohen Frequenzen erfolgt die maximale Auslenkung der Basilarmembran an der Basis, bei tiefen Frequenzen an der Schnecken spitze (KLINKE 1987). Die scharfe Abstimmung und Frequenzselektivität wird somit bereits auf der Ebene der Haarzellen erzeugt.

2.1.3 Ursachen und Klassifizierungen von Hörschädigungen

Hörminderung und Taubheit stellen in den industrialisierten Nationen einen der am weitesten verbreiteten Krankheitskomplexe dar. Die Ursachen von Hörstörungen sind äußerst vielfältig. Man kann zwischen kongenital (vor oder während der Geburt) und postnatal (nach der Geburt) entstandenen Schäden unterscheiden. Kongenitale Schäden werden zudem in hereditär (erblich), pränatal (vor der Geburt) und perinatal (während der Geburt) erworbene Hörschäden unterteilt (BOENNINGHAUS 1993).

Eine nicht-ätiologische Einteilung von Hörstörungen beruht auf der Lokalisation der Fehlfunktion. Unter diesem Aspekt lassen sich schallleitungsbedingte und schallempfindungsbedingte Hörstörungen unterscheiden.

Die Ursache einer schallleitungsbedingten (konduktiven) Hörstörung betrifft ausschließlich das Außen- sowie das Mittelohr. Sie ist bedingt durch eine Störung der Übertragung der Schallwellen, z. B. bei Verlegung des Gehörganges (Fremdkörper,

Otits externa, o.ä.), Trommelfellruptur oder Mittelohrveränderungen (Otitis media, Erguss).

Eine Schallempfindungsschwerhörigkeit, auch sensorineurale Schwerhörigkeit genannt, entsteht entweder im Innenohr (Innenohrschwerhörigkeit = sensorische Schwerhörigkeit), im Hörnerven (Nervenschwerhörigkeit = neurale Schwerhörigkeit) (BOENNINGHAUS 1993) oder im zentralen Anteil der Hörbahn.

Schädigungen des Innenohrs beruhen vor allem (v.a.) auf einer Zerstörung der Haarzellen. Sie führen zu sensorischen Schallempfindungsschwerhörigkeiten, welche bei vollständiger Zerstörung der sensorischen Elemente eine vollständige Taubheit zur Folge haben können. Mögliche Ursachen für derartige Innenohrschäden umfassen chronische und akute akustische Traumen, toxische Schäden (z.B. durch Antibiotika und Zytostatika) sowie Infektionen (insbesondere bakterielle Meningitiden). Als Ursachen kommen aber auch degenerative Entwicklungen sowie ein erbbedingter Hörabbau in Frage. Sowohl die Schädigung der IHC als auch die Schädigung der OHC führen zu Wahrnehmungsverlusten.

2.1.4 Haarzellschädigung und Degeneration der Spiralganglienzellen

Gesunde Haarzellen übertragen den physikalisch-mechanischen Schallreiz in eine bioelektrische Erregung, welche über das Spiralganglion und die afferenten Fasern des Nervus (N.) cochlearis im Gehirn zu einer Hörempfindung führt. Die Zerstörung der Sinneszellen führt sekundär zu einer Degeneration der nachgeschalteten Spiralganglienzellen (OTTE et al. 1978; WEBSTER u. WEBSTER 1981; SUTTON u. MILLER 1983; SPOENDLIN 1984; JYUNG et al. 1989; LEAKE et al. 1991; NADOL u. HSU 1991), deren Funktionalität und Anzahl einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg einer Cochlea-Implantat-Behandlung haben (GANTZ et al. 1993).

Lärmexposition und Aminoglykosid-Antibiotika haben sich zur Untersuchung der Effekte einer Ertaubung durch Haarzellverlust im *in vivo* Modell durchgesetzt. Lärmexposition führt laut OHINATA et al. (2000) und YAMASHITA et al. (2004) zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS). ROS und RNS leiten die Bildung freier Radikale ein, welche eine Haarzellschädigung und nachfolgende –apoptose verursachen. Über identische Signalwege führen auch Aminoglykoside zur Haarzelldegeneration (PRIUSKA u. SCHACHT 1995; TAKUMIDA et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das Aminoglykosid-Antibiotikum Kanamycin in

Kombination mit dem Diuretikum Ethacrynsäure zu einer Zerstörung der OHC und IHC führt (WEST et al. 1973). JYUNG et al. konnten 1989 zudem beweisen, dass die Kombination beider Substanzen, bedingt durch die Haarzellschädigung, die Dichte der SGZ vermindert.

Haarzellen produzieren Neurotrophe Faktoren (NTF) wie z.B. Neurotrophin-3, brain- derived neurotrophic factor oder glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), welche für SGZ überlebenswichtig sind. Zusätzlich beeinflussen von den Haarzellen freigesetzte Neurotransmitter die Membranaktivität der SGZ, was sich additional positiv auf ihr Überleben auswirkt. Unter anderem werden sowohl der mangelnde stimulierende Einfluss der Haarzellen auf die SGZ im Sinne fehlender Aktionspotentiale durch die Neurotransmitter, als auch das Fehlen der NTF für die Degeneration der peripheren auditorischen Neurone nach erfolgter Haarzelldegeneration verantwortlich gemacht. Fehlt der trophische Support, kommt es zum Absterben der betroffenen SGZ durch Apoptose.

2.1.5 Das Cochlea-Implantat (CI)

Bei sensorischer Taubheit oder bei durch Hörgeräte nicht nutzbaren Hörresten mit erhaltener Leitfähigkeit des N. cochlearis und intakter zentraler Hörbahn besteht die Möglichkeit, durch direkte elektrische Reizung der SGZ Höreindrücke auszulösen (BOENNINGHAUS u. LENARZ 2004; LENARZ 1998). Eine Innenohrprothese, das Cochlea-Implantat (CI), übernimmt die Funktion der Haarzellen durch direkte elektrische Stimulation des Hörnerven (MATSCHKE u. PLATH 1988).

Cochlea-Implantate bestehen aus einem im Ohrbereich zu tragenden Mikrophon, einem Sprachprozessor, einer externen Sendespule, einer Empfangsspule, einer Verarbeitungseinheit sowie einer Cochlea-Implantat-Elektrode (JAEKEL et al. 2002). Das Mikrophon nimmt die akustischen Signale auf und leitet sie über ein Kabel einem Sprachprozessor zu. Dieser wandelt die akustischen Signale durch Filterung, Komprimierung und Entrauschung in elektrische Impulsfolgen um. Die Signalmuster werden an eine Übertragungsspule weitergeleitet, die sich aus einem Sender- und einem Empfängerteil zusammensetzt. Die Sendeantenne, die hinter dem Ohr angebracht ist, überträgt die Impulse transcutan auf das subcutan retroauriculär implantierte Empfängerteil (LEHNHARDT et al. 1986). Dieses besitzt eine Empfangsantenne, welche die elektrischen Impulse aufnimmt. Die Elektrode, bestehend aus einem biegsamen Bündel leitender Drähte, welche jeweils an einem frei liegenden

Elektrodenkontakt enden, wird über eine Cochleostomie möglichst modiolus- und damit spiralganglienzellnah in der Sc. tympanie positioniert. Die Elektrodenkontakte, je nach Hersteller variiert ihre Anzahl (maximal 22), haben auf Grund ihrer Position in der Scala tympani nur indirekten Kontakt zum Spiralganglion.

Die durch Cochlea-Implantate erzielten Höreindrücke bei erwachsenen Patienten sind im Wesentlichen als sehr positiv zu bewerten. Allerdings gibt es beträchtliche Unterschiede in den Ergebnissen, die durch die Hörprothese erreicht werden können (CLARK et al. 1987; RISBERG et al. 1990). Von fast allen Implantatträgern wird berichtet, dass sie wieder Hörsensationen erfahren. Der Höreindruck, der erzielt wird, ist jedoch infolge der individuellen Voraussetzungen bei jedem Patienten unterschiedlich (GANTZ et al. 1993). Seine Qualität lässt sich nicht mit Sicherheit vorhersagen. In jedem Fall wird Schall anders wahrgenommen, als es die ertaubte Person vor ihrer Hörschädigung gewohnt war. Ein Grund hierfür sind unter anderem post operativ eintretende Entzündungsvorgänge, welche Bindegewebsneubildungen entlang der Elektrode nach sich ziehen und somit zu einer Verschlechterung der Nerv-Elektroden-Interaktion führen. Zum anderen ist der Erfolg einer Cochlea-Implantat-Versorgung maßgeblich von der Anzahl funktionsfähiger SGZ abhängig (GANTZ et al. 1993; PFINGST u. SUTTON 1983). Für eine therapeutische Intervention im Innenohr mit dem Ziel der Unterdrückung von Entzündungsprozessen im Rahmen der Elektroden-Implantation bilden Glukokortikoide (z.B. Dexamethason) interessante Therapieoptionen, wohingegen sich sowohl neurotrophe Faktoren (z.B. glial cell line-derived neurotrophic factor und brain-derived neurotrophic factor) als auch eine elektrische Stimulation hypothetisch als Interventionen eignen, um eine fortschreitende Spiralganglienzell-Degeneration aufzuhalten (WEFSTAEDT 2006).

2.2 Evozierte Potentiale des auditorischen Systems

2.2.1 Allgemeines

Die elektrische Reaktionsaudiometrie (electric response audiometry, ERA) ist ein Verfahren der objektiven Audiometrie zur Registrierung von evozierten Potentialen. Mit Hilfe der ERA ist eine Diagnostik der Art und des Ausmaßes von Schädigungen der gesamten Hörbahn vom peripheren Hörorgan bis zur neuralen Verarbeitung möglich. Von allen Stufen der Hörbahn lassen sich durch an der Körperoberfläche platzierte Elektroden Potenziale ableiten, die durch definierte Reize hervorgerufen werden. Die gemessenen Potenziale sind Teil der gesamten elektrischen Aktivität des Gehirns. Durch Reizwiederholung und anschließende Mittelung hebt sich das evozierte Potenzial von der spontanen Elektroencephalogramm-Aktivität ab und wird als Wellenverlauf im Zeit (Millisekunden, ms)- Spannungsdiagramm (Mikrovolt, μV) dargestellt.

Mit Hilfe der Ableitung evozierter Potentiale des auditorischen Systems (auditory evoked potentials, akustisch evozierte Potenziale, AEP), einem Teilgebiet der elektrischen Reaktionsaudiometrie, werden die beim Hörvorgang entlang der Hörbahn auftretenden Aktionspotentiale von der Cochlea bis hin zum auditorischen Cortex registriert. Periphere Stimulation, afferente Erregungsleitung und zentrale neuronale Verschaltung sind die physiologischen Grundlagen der AEPs. Evozierte Potentiale stellen in der Audiologie eine wesentliche Ergänzung zu den subjektiven Hörtests dar. Sie werden in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde zur objektiven Messung der Hörfunktion eingesetzt. Mit Hilfe der AEPs ist es möglich, auch am narkotisierten Versuchstier Messungen durchzuführen. Zudem hat diese Methode den Vorteil, dass es sich um eine nicht invasive Technik handelt.

Die Ableitung erfolgt bei Tieren in der Regel über Nadelelektroden. Sie werden am Vertex (Positivpol), am rechten und linken Mastoid (Negativpole) und in der rechten Kniefalte (Erdung) platziert. Zwischen Vertex und dem dem Reiz zugewandten Mastoid wird die ipsilaterale Antwort abgeleitet. Die kontralaterale Antwort wird zwischen Vertex und dem dem Reiz abgewandten Mastoid abgeleitet. Das AEP-Signal verläuft in einem charakteristischen Muster, dessen Extrema in der Audiologie als Welle bezeichnet werden. Als Amplitude einer Welle ist die Differenz des positiven zum darauf folgenden negativen Extremum definiert. Aufgrund ihres zeitlichen Auftretens im

Abstand zum auslösenden Reiz (Latenz) werden die gemessenen Potentiale in sehr frühe, frühe, mittlere, späte und sehr späte Potentiale eingeteilt. Zudem lassen sich den Wellen aufgrund der Latenz spezifischen Regionen der Hörbahn als Generatoren zuordnen. Die sehr frühen AEPs (SFAEP, Sehr Frühe Akustisch Evozierte Potentiale) umfassen die mit der Elektrocochleographie gewonnenen cochleären Mikrophonpotentiale, das Summationspotential der Cochlea, sowie das Summenaktionspotential des Hörnervens (HOTH u. LENARZ 1994). Sie treten innerhalb der ersten 5 ms nach Reizbeginn auf. Wellen im Bereich bis 10 ms nach Reizgebung werden als frühe Potentiale (FAEP, Frühe AEP) oder Hirnstammpotentiale bezeichnet. Die Nomenklatur innerhalb dieses Feldes ist nicht immer einheitlich. Häufig verwendete Bezeichnungen sind „brainstem evoked response audiometry (BERA)“, „brainstem auditory-evoked potential (BAEP)“ und „auditory brainstem response (ABR)“.

Die FAEP erfassen die Reaktionen bis einschließlich des Hirnstammes, welcher nicht von Narkotika beeinflusst wird und somit eine Registrierung sowohl im wachen wie auch im narkotisierten Zustand zulässt, was bei der Arbeit mit Tieren von großer Relevanz ist. Mittlere Akustisch Evozierte Potentiale (MAEP) erscheinen 10-50 ms nach dem auslösenden Reiz. Schwelle und Verlauf der Signale werden von Narkosemitteln und auch vom Alter verschiedenartig beeinflusst (KRAUS et al. 1985). Im Anschluss daran folgen die Späten und Sehr Späten akustisch evozierten Potentiale (SAEP, SSAEP), bei denen es sich um Antworten des auditorischen Cortex handelt.

Im weiteren Verlauf dieses Kapitels werden die Methoden zur objektiven Hörschwellenmessung mittels Ableitung akustisch und elektrisch evozierter FAEPs näher erläutert. Die frühen akustisch evozierten Hirnstammpotentiale werden im Weiteren als AABR, akustisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale (acustically evoked auditory brainstem response) und die frühen elektrisch evozierten Hirnstammpotentiale als EABR, elektrisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale (electrically evoked auditory brainstem response) bezeichnet.

2.2.2 Akustisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, AABR

Die AABR des Meerschweinchens setzen sich aus 7 vertex-positiven Wellen zusammen. Diese werden entweder mit römischen Ziffern P I- VII oder mit J1 – J7, in Anlehnung an einen der Erstbeschreiber (JEWETT 1970) bezeichnet. Bei den akustisch evozierten Potenzialen handelt es sich zum Teil um Überlagerungen von Summenaktionspotenzialen aus verschiedenen Kerngebieten, so dass eine getrennte Zuordnung

zu einzelnen Kernen der Hörbahn nicht eindeutig getroffen werden kann. Nach HOTH und LENARZ (1994) wird das Potenzial I topologisch den cochleären Strukturen sowie der Aktivität des Hörnerven zugeordnet, P II dem Eintritt des Hörnerven in den Hirnstamm, P III dem Nucleus Cochlearis, P IV der ipsilateralen oberen Olive oder dem Lemniscus lateralis und P V der kontralateralen oberen Olive oder dem Lemniscus lateralis oder dem Colliculus inferior. Die späteren Potenziale VI und VII, die nur inkonstant nachweisbar sind, sind dem Zwischenhirn und dem primären auditorischen Cortex zuzuordnen.

Die akustische Stimulation des auditorischen Systems erfolgt im Allgemeinen durch so genannte Clicks. Der Clickreiz ist ein Rechteckimpuls mit einer steil ansteigenden Flanke. Die kurze Reizdauer und die damit verbundene schnelle Änderung des Schalldruckes führen zur synchronen Erregung einer großen Anzahl von Neuronen. Durch die Synchronität überlagern sich die einzelnen Aktionspotentiale der Nerven der gesamten Hörbahn, es entsteht ein Summenaktionspotential (SAP). Das SAP der zentralen Hörbahn von der Cochlea über den Hörnerv und den Hirnstamm bis zum auditorischen Cortex ist als AABR messbar.

Zur Bestimmung der akustischen Hörschwelle bei Meerschweinchen wird P III herangezogen. Laut INGHAM et al. (1998) ist die akustische Hörschwelle als die niedrigste Stimulusintensität definiert, welche eine wiederholbare, mindestens $0.5\mu\text{V}$ große, Amplitude evoziert.

2.2.3 Elektrisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, EABR

Nach Implantation einer Innenohrelektrode werden durch intracochleäre Stimulation elektrische Impulse im Hörnerv erzeugt, welche über die aufsteigende Hörbahn weitergeleitet werden. In Folge der Reizverarbeitung entstehen elektrische Potentiale, die an der Kopfoberfläche registriert werden können (HOTH und LENARZ 1994). Analog zu den AABRs ist es ebenfalls möglich, die Reaktion der zentralen Hörbahn auf direkte elektrische Reizung des Hörnervs sichtbar zu machen. Die elektrische Reizung erfolgt mit Hilfe der Implantat-Elektrode. Das Ergebnis der Messungen sind die frühen elektrisch evozierten Potenziale (FEPP), welche im Weiteren elektrisch evozierte auditorische Hirnstammpotentiale, Electrically Evoked Auditory Brainstem Response, EABR, genannt werden (Abb.4). Sie werden mittels Elektroden an der Schädeloberfläche abgeleitet. Die Benennung der Wellen erfolgt analog zu der der akustischen Messung mit P I-VII. Anhand der EABR-Messung lässt sich die Qualität der Implantation beurteilen.

Je enger der Kontakt zwischen Elektrode und Hörnerv, desto geringer ist die Hörschwelle (SHEPHERD et al. 1993, 1997). Die Bestimmung der Hörschwelle erfolgt auf Grund der Amplitudengröße der dritten Welle. Diejenige Stromstärke, welche eine wiederholbare $1\mu\text{V}$ oder größere Amplitude der dritten Welle hervorrufen kann, wird als elektrische Hörschwelle, oder auch Reizschwelle bezeichnet (YAMAGATA et al. 2004).

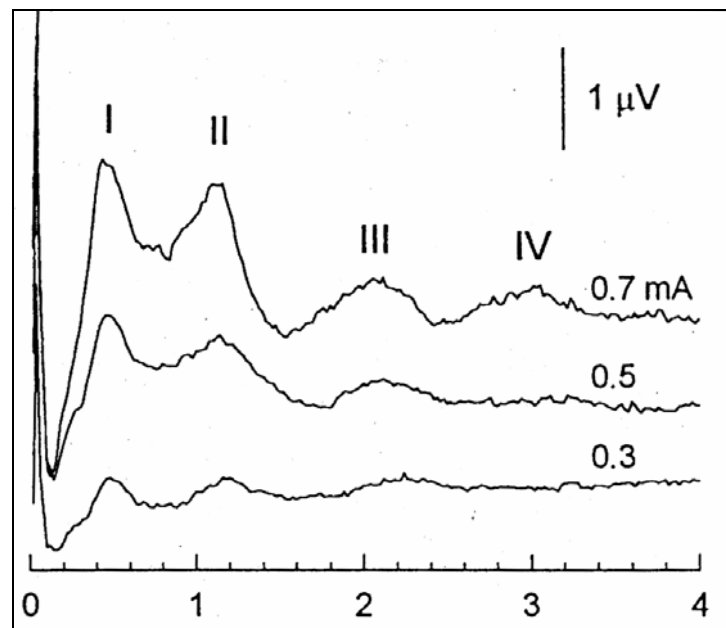


Abb. 4: Darstellung einer typischen EABR-Kurve eines normal hörenden Meerschweinchens nach MILLER et al. (1995). Es wurde eine bipolare intracochleare Elektrode verwendet. Stimulus: $20\mu\text{s}$ monophasische rektanguläre Pulse alternierender Polarität. Die Stimulusintensitäten sind rechts neben der jeweiligen Ableitung beschrieben. Die römischen Ziffern bezeichnen die gemittelten Wellen.

2.3 Die Neurotrophen Faktoren Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor und Brain-Derived Neurotrophic Factor

2.3.1 Neurotrophe Faktoren (NTF)

Im Nervensystem existieren im Wesentlichen zwei Zelltypen: zum einen Neurone, die über ihre Fortsätze, Axone und Dendriten, miteinander verbunden sind und für die Informationsspeicherung und -weiterleitung zuständig sind und zum anderen ubiquitär vorhandene Gliazellen, die für die Versorgung von Neuronen und die Erhaltung der Homöostase verantwortlich sind. Im Normalzustand, aber insbesondere bei pathogenen Prozessen, kommunizieren diese beiden Zelltypen über elektrische Signale, direkte Zell-Zell-Kontakte und extrazelluläre Moleküle miteinander. Eine wichtige Rolle spielen bei diesen komplexen Interaktionen neurotrophe Faktoren (NTF). In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der NTF auf die Neurone des Rosenthalschen Kanals, die so genannten Spiralganglienzellen, untersucht. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird deshalb nur auf diesen neuronalen Zelltyp eingegangen.

Neurotrophe Faktoren, eine Subklasse der Wachstumsfaktoren, sind endogene, lösliche, Proteine, welche das Überleben und das Wachstum sowie die morphologische Plastizität oder Synthese von Proteinen für differenzierte Neuronfunktionen regulieren (LOUGHLIN u. FALLON 1993). LIPON und KALIL zeigten 1995, dass neurotrophe Faktoren sowohl auf neuronale wie auch auf non-neurale Zellen wirken. Während der embryonalen und postnatalen Entwicklung regulieren sie die Differenzierung und das Überleben von Neuronen im gesamten Nervensystem. Im adulten Nervensystem spielen sie eine wichtige Rolle für die Erhaltung der synaptischen Verbindungsfähigkeit und Plastizität (MANESS et al. 1994). Aufgrund struktureller und funktioneller Homologien sowie spezifischer Affinitäten zu bestimmten Rezeptortypen können die NTF in mindestens vier verschiedene Familien unterteilt werden: 1. die Neurotrophine, welche die am besten charakterisierte Familie der neurotrophen Faktoren darstellt, 2. die Fibroblast Growth Factor (FGF)- Familie (acidic und basic fibroblast growth factor, aFGF und bFGF), 3. die neuropoetischen Cytokine (z.B. ciliary neurotrophic factor, CNTF) und 4. die GDNF Familie (LIPTON u. KALIL 1995). Diverse NTF spielen eine wichtige Rolle während der Entwicklung des auditorischen Systems, von der morphologischen Ausbildung des endolymphatischen Ganges über die Größe der SGZ-Population bis hin zur neuronalen Verschaltung. Diese Wirkungen führen zu der

Hypothese, dass NTF einer traumatisch bedingten SGZ-Degeneration entgegenwirken könnten (GILLESPIE u. SHEPHERD 2005). Für einige Faktoren wie z.B. GDNF und BDNF konnte im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Versuchen eine Protektion der SGZ nach Ertaubung nachgewiesen werden.

2.3.2 Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) und die GDNF-Familie

Die GDNF-Familie wird zur Transforming Growth Factor- β -(TGF- β)-Superfamilie gezählt und setzt sich aus GDNF und den verwandten Proteinen Neurturin (KOTZBAUER et al. 1996), Artemin (BALOH et al. 1998) und Persephin (MILBRANDT et al. 1998) zusammen.

Der Rezeptor-Komplex für GDNF wurde annähernd zeitgleich von verschiedenen Forschungsgruppen entdeckt (LINDSAY u. YANCOPOULOS 1996; MASON 1996) und besteht aus zwei Komponenten. Eine Komponente ist der extrazelluläre GDNF-family receptor α -1 bis 4 (GFR α -1 bis 4) (JING et al. 1996; TREANOR et al. 1996) und die andere Komponente ist ein intrazellulärer Rezeptor der trk-Superfamilie (trk = Tyrosin Kinase) mit der Bezeichnung RET (rearranged in transformation). Jing et al. (1996) zufolge bindet das GDNF-Molekül an das GFR α -1-Rezeptormolekül, welches mit RET interagieren und so verschiedene Signalkaskaden auslösen. Neurturin zeigt Präferenz für die Bindung an GFR α -2, Artemin für GFR α -3 und Persephin für GFR α -4. GDNF, Neurturin, Artemin und Persephin führen alle durch ihre GFR α -Rezeptoren zu einer sekundären Aktivierung von RET und initialisieren somit die intrazelluläre Signalkaskade (STÖVER et al. 2000a).

GDNF wurde 1993 als eine von Gliazellen produzierte Substanz isoliert und als Wachstumsfaktor, welcher das Überleben von embryonalen dopaminergen Neuronen des Mittelhirns fördert, also jene Zellen, welche bei Morbus-Parkinson degenerieren, charakterisiert (LIN et al. 1993, 1994; TOMAC u. LINDQUIST 1995). GDNF wird von diversen Zelltypen synthetisiert und beeinflusst die Entwicklung und das Überleben unterschiedlichster neuronaler Zellen (MOORE et al. 1996; PICHEL et al. 1996). Sowohl HENDERSON et al. (1994) als auch BUJ-BELLO et al. (1995) und TRUPP et al. (1995) konnten trophische Effekte des GDNF auf eine Vielzahl neuronaler Zellen unterschiedlichster Entwicklungsstadien sowohl des peripheren als auch des zentralen Nervensystems nachweisen (WEFSTAEDT 2006). GDNF ist für die Entwicklung der Niere (HELLMICH et al. 1996) und des enterischen Nervensystems (SANCHEZ et al.

1996) mit von entscheidender Bedeutung. ARENAS et al. gelang es 1995 die Wirkung auf noradrenerge Neurone aufzuzeigen während WILLIAMS und Kollegen (1996) Effekte auf cholinerge Neurone bewiesen.

2.3.3 *In vitro* Effekte von GDNF auf Spiralganglienzellen

Verschiedene *in vitro* Untersuchungen belegen den protektiven Effekt des GDNFs auf Spiralganglienzellen. YLIKOSKI et al. (1998) und QUN et al. (1999) zeigten an vereinzelten Spiralganglienzell-Kulturen embryonaler (embryonaler Tag 16, 18 und 21) und postnataler Ratten im Alter von bis zu 12 Tagen, dass 100pg GDNF/ml Lösungsmittel das Spiralganglienzellüberleben nach 48 Stunden Kultivierung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant verbessern konnte. Im vergangenen Jahr wurde eine ausdifferenzierende Wirkung des GDNF auf kultivierte Vorläuferzellen von Spiralganglienzellen adulter Menschen und Meerschweinchen nachgewiesen (RASK-ANDERSEN et al. 2005). WEFSTAEDT (2006) untersuchte den Einfluss unterschiedlicher GDNF-Konzentrationen (25 ng, 50 ng, 100 ng) auf dissoziierte Spiralganglienzellen 3-5 Tage alter Ratten und wies ein signifikantes Überleben der SGZ nach Behandlung mit 100 ng GDNF nach.

2.3.4 *In vivo* Effekte von GDNF auf Spiralganglienzellen

Unterschiedlichste NTF beeinflussen das SGZ-Überleben *in vivo* (SHAH et al. 1995; MILLER et al. 1997; GILLESPIE et al. 2004, 2005). Da die Überlegungen zur Anwendung von NTF am Menschen dahin zielen, Patienten mit sensorineuralem Hörverlust und nachfolgender Degeneration der SGZ zu behandeln, führen viele Arbeitsgruppen zunächst eine Ertaubung der Versuchstiere durch. YLIKOSKI et al. (1998) untersuchten die protektive Wirksamkeit einer chronischen intracochlearen GDNF-Applikation auf die SGZ ertaubter Meerschweinchen. Ab dem vierten Tag nach Lärmtrauma-Exposition wurden zunächst 72ng GDNF über 7 Tage in das Innenohr appliziert. Nachfolgend wurden 50 ng GDNF über 14 Tage verabreicht. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ermittelten YLIKOSKI et al. (1998) durch die GDNF-Therapie einen signifikant erhöhten Spiralganglienzellerhalt. Andere Arbeitsgruppen ertaubten Meerschweinchen systemisch mittels Kanamycin und Ethacrynsäure (KUANG et al. 1999; YAGI et al. 2000; KANZAKI et al. 2002). 50 ng/ml GDNF, vor der Ertaubung mittels eines Pumpsystems in Meerschweinchencochleae appliziert, führten zu einer Erhöhung der SGZ-Dichte im Vergleich zur Zellzahl im unbehandelten Ohr (KUANG et al. 1999). YAGI et al. (2000)

und KANZAKI et al. (2002) applizierten das GDNF mittels adenoviraler Vektoren (AdGDNF) 4-7 Tage nach Ertaubung. Die Ergebnisse beider Arbeitsgruppen zeigen eine signifikante Protektion der Nervenzellen nach Ertaubung.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den SGZ-protectiven Effekt einer nach Ertaubung verzögert einsetzenden chronischen Applikation von 100 ng/ml GDNF zu untersuchen. Hintergrund dieser Fragestellung ist die klinische Situation der Cochlea-Implantat-Versorgung in der Humanmedizin. Auch in der Klinik erfolgt die Versorgung betroffener Patienten mit einer zeitlichen Verzögerung. Somit würde eine potentielle, im Rahmen der CI-Operation beginnende, Wachstumsfaktor-Applikation erst ab diesem Zeitpunkt starten. Aus diesem Grund ist es von praktischer Bedeutung, den Effekt von GDNF auf die Neurone zu untersuchen, wenn diese schon einer fortschreitenden Degeneration ausgesetzt sind.

2.3.5 Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und die Neurotrophin-Familie

BDNF bildet zusammen mit dem Nerve Growth Factor (NGF), dem Neurotrophin-3 (NT-3) sowie dem Neurotrophin 4/5 (NT-4/5) die Gruppe der Neurotrophine (GILLESPIE u. SHEPHERD 2005). Neurotrophine sind, wie die anderen neurotrophen Faktoren, körpereigene Signalstoffe welche an membranständige Rezeptoren binden. Es existieren zwei Typen von Rezeptoren für Neurotrophine: a: p75 Neurotrophin Rezeptor (p75NTR), ein Rezeptor der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptor Familie, b: Rezeptoren der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie (TrkA, TrkB und TrkC). Der p75NTR ist in der Lage alle fünf Neurotrophine zu binden, allerdings ist die Affinität vergleichsweise gering. Die Rezeptoren der Trk-Familie hingegen sind affiner und binden spezifisch nur bestimmte Neurotrophine, wobei TrkB der das BDNF bindende Rezeptor ist (HUANG u. REICHARDT 2001). Die Bindung von Neurotrophinen an p75NTR führt zum programmierten Zelltod (Apoptose). Bindung an Rezeptoren der Trk-Familie hingegen löst eine Kaskade von Kinasen aus, die sich anti-apoptotisch auswirkt.

Nach der ersten Beschreibung von BDNF 1982 (BARDE et al. 1982) gelang bereits 1989 die Klonierung und heterologe Expression (LEIBROCK et al. 1989). BDNF spielt als Vertreter der Gruppe der Neurotrophine eine essentielle Rolle in der Entwicklung, dem Erhalt und der Funktion verschiedenster neuronaler Zellen im zentralen und peripheren Nervensystem (LOUGHLIN u. FALLON 1993).

2.3.6 *In vitro* Effekte von BDNF auf Spiralganglienzellen

Es liegen Untersuchungen vor, welche belegen, dass BDNF, NT-3 und NT-4/5 auf das Überleben früher postnataler SGZ in Kultur einen fördernden Einfluss haben. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass BDNF, im Gegensatz zu neurotrophin-freien Kontrollkulturen, das SGZ-Überleben signifikant steigert (ZHENG et al. 1995; MALGRANGE et al. 1996; MARZELLA et al. 1999, WEFSTAEDT et al. 2005). PIRVOLA et al. (1992) konnten für Spiralganglienzellen der Ratte demonstrieren, dass BDNF sowohl das Spiralganglienzellüberleben als auch das Auswachsen von Neuriten aus kultivierten Spiralganglienzellimplantaten fördern kann. LEFEBVRE et al. (1994) führten Versuche an Kulturen adulter Ratten-SGZ durch und konnten beweisen, dass BDNF auch hier zu einem signifikanten Anstieg der SGZ-Überlebensrate führt. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Neurotrophine für die permanente trophische Zuwendung im auditorischen System während des Erwachsenseins notwendig sind (GILLESPIE u. SHEPHERD 2005).

Andere *in vitro* Studien belegen, über die alleinige Erhöhung des SGZ-Überlebens hinaus, dass BDNF Spiralganglienzellen vor den ototoxischen Folgen von Aminoglykosiden (LALWANI et al. 2002; GAO 1999), therapeutischer Medikamente (GAO 1999) und Chemotherapeutika (ZHENG u. GAO 1996; GAO 1999; DUAN et al. 2002) schützen kann. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Neurotrophe Faktoren in der Prävention der zerstörenden Effekte von therapeutischen ototoxischen Substanzen, welche zu den Hauptursachen für sensorineuralen Hörverlust zählen, eine wichtige Rolle spielen (GILLESPIE u. SHEPHERD 2005).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten *in vitro* demonstrieren, dass BDNF-Konzentrationen von 50 ng bis 100 ng/ml, im Vergleich zu anderen Konzentrationen, die stärkste SGZ-protective Wirkung ausüben (ZHENG et al. 1995; HEGARTY et al. 1997; MOU et al. 1997; WEFSTAEDT et al. 2005).

ZHENG et al. (1995) verglich die Wirkungen von NGF, NT-3, NT-4/5 und BDNF auf kultivierte, mittels Cisplatin toxisch behandelte SGZ früher postnataler Ratten (Tag 5). Im Rahmen dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass NT-3, NT-4/5 und BDNF einen steigernden Effekt auf das Überleben postnataler SGZ ausüben, NGF allerdings nicht. Der das Überleben der SGZ steigernde Effekt war am stärksten bei NT-4/5 ausgeprägt. Auch NT-3 führte zu einer Erhöhung der SGZ-Dichte trotz Cisplatin-Behandlung. Allerdings war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt als in der mit BDNF behandelten Gruppe. WEFSTAEDT et al. (2005) verglichen unter anderem den

SGZ-protectierenden Effekt von 25, 50 und 100 ng/ml BDNF und GDNF auf Kulturen dissoziierter postnatale SGZ (Ratten) und kamen zu dem Ergebnis, dass BDNF in allen getesteten Konzentrationen einen effektiveren SGZ-Schutz gewährleistet als GDNF.

2.3.7 *In vivo* Effekte von BDNF auf Spiralganglienzellen

Neben *in vitro* Überlebensstudien Spiralganglienzellen betreffend, demonstrieren *in vivo* Studien, dass die Freisetzung von BDNF im Innenohr die sekundäre Degeneration der Spiralganglienzellen nach Haarzellverlust verringern kann. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch eine verzögerte Neurotrophin-Verabreichung, zur Gewährleistung des Fortschreitens degenerativer Prozesse, protektiv auf SGZ wirkt. An mittels Kanamycin und Ethacrynsäure ertaubten Meerschweinchen konnte gezeigt werden, dass intracochleaer verabreichtes BDNF mit einer Konzentration von 50 ng/ml, ab dem siebten Tag nach ototoxischer Behandlung für 14 Tage appliziert, ein verbessertes Haar- und Spiralganglienzellüberleben bewirkt (MILLER et al. 1997). Auch einen Tag nach Ertaubung (LALWANI et al. 2002 (adenoviral)) und fünf Tage nach Ertaubung beginnende vierwöchige (GILLESPIE et al. 2003 (Protein, 62,5µg/ml)) und achtwöchige (STAECKER et al. 1996 (Protein, 1mg/ml)) BDNF-Behandlungen von ototoxisch ertaubten Meerschweinchen führten zu diesem Ergebnis.

GILLESPIE et al. (2004) demonstrierten, dass sowohl BDNF, NT-3, NT-4/5 und NGF, jeweils in einer Konzentration von 62,5µg/ml verabreicht, ein weiteres Fortschreiten der SGZ-Degeneration nach vierzehntägiger Taubheit verhindern können. Auch eine Kombination aus BDNF und NT-3 (50 µg/ml) hat nach einer Taubheit von vier Wochen noch ähnlichen protektiven Einfluss (WISE et al. 2005). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine zwei oder sechs Wochen nach Neomycin-Ertaubung verzögert einsetzende Behandlung mittels einer Kombination aus BDNF (100 µg/ml) und CNTF (100 ng/ml) schützend auf das Innenohr wirken kann (SHINOHARA et al. 2002; YAMAGATA et al. 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen eines verbesserten Spiralganglienzellüberlebens kamen auch NAKAIZUMI et al. (2004), welche BDNF und/oder CNTF mittels adenoviraler Vektoren 7 Tage nach Ertaubung in die Scala tympani injizierten. SHEPHERD et al. (2005) demonstrierten, dass nach Aminoglykosid/Furosemid-induzierter Ertaubung von Meerschweinchen eine BDNF-Konzentration von 62,5µg/ml, ab dem fünften Tag nach Ertaubung für 28 Tage intracochleaer verabreicht, die Anzahl überlebender SGZ, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, signifikant erhöhen konnte.

Obwohl BDNF-Effekte auf das SGZ-Überleben nach Ertaubung untersucht wurden, ist dessen Wirkung noch nicht für die hier verwendeten Konditionen mit einer Konzentration von 50 ng/ml, einer Taubheitsphase von 21 Tagen vor Therapiebeginn und einer Behandlungsdauer von vier Wochen beschrieben worden. Diese Arbeit dient der Untersuchung der Wirkung von BDNF zu den so eben beschriebenen Konditionen auf das SGZ-Überleben. Zudem soll der beobachtete Effekt des BDNFs mit dem des GDNF, welches demselben Versuchsaufbau folgend eingesetzt wird, verglichen werden, um eventuell eine Aussage treffen zu können, welcher der beiden Neurotrophen Faktoren effektiver für eine zukünftige *in vivo* Anwendung geeignet erscheint.

2.3.8 GDNF- und BDNF- Effekte auf die Funktionalität des Hörorgans nach Ertaubung

Neben den Auswirkungen der NTF-Therapie auf Spiralganglienzellen spielt auch ihre Wirkung auf die Funktionalität des Innenohres eine wichtige Rolle. Auch wenn GDNF und BDNF, wie oben beschrieben, SGZ-protectiv wirken können, so würde dies keinen medizinischen Gewinn bringen, wenn nicht auch gleichzeitig die Funktionalität positiv beeinflusst werden würde. Für einige NTF, wie zum Beispiel *acidic fibroblast growth factor* (aFGF, SUGAHARA et al. 2000) oder *neurotrophin-3* (NT-3, SHOJI et al. 2000 a) konnte gezeigt werden, dass ihr Einsatz zu einer Verbesserung der Cochlea-funktion nach Traumaexposition führen kann.

Nicht alle Arbeitsgruppen, welche die Wirkungen von GDNF und BDNF auf das SGZ-Überleben nach Ertaubung untersuchten, führten gleichzeitig auch funktionelle Tests, wie Ermittlungen der akustischen oder elektrischen Hörschwelle, durch.

Nur zwei Arbeitsgruppen prüften in ihren GDNF-Studien neben möglichen morphologischen Veränderungen durch Faktorgabe auch eventuell auftretende Modifikationen der akustischen Hörschwellen im Verlauf der Behandlung mit GDNF. YLIKOSKI et al. (1998) konnten hierbei keinerlei Unterschiede betreffend der Hörschwellen zwischen GDNF behandelten und unbehandelten Tieren bzw. Kontrollseiten feststellen. Im Gegensatz hierzu konnten SHOJI et al. (2000b), welche die Effektivität von GDNF zur Verminderung von Cochlea-Schäden (Haarzellen) nach Lärmtrauma untersuchte, zeigen, dass eine Intervention mittels 100 ng GDNF zu einer signifikant geringeren Hörschwellenerhöhung nach Lärmexposition führte.

BDNF-Therapie nach Ertaubung kann neben einer Protektion der SGZ auch zu einer funktionalen Erhaltung bzw. Verbesserung führen. Dass die Intervention mittels BDNF

die funktionelle Effektivität des auditorischen Systems signifikant erhöhen kann wurde von SHEPHERD et al. (2005) mittels EABR-Messungen und von SHOJI et al. (2000a) mittels AABR-Messung bewiesen. Auch in Kombination mit anderen NTF wie CNTF_{AX1} (*ciliary neurotrophic factor axokine-1*) bewirkt BDNF im Vergleich mit einer Kontrollgruppe eine signifikante Erniedrigung der Hörschwelle ertaubter Meerschweinchen, wie SHINOHARA et al. (2002) und YAMAGATA et al. (2004) mittels EABR-Messung nachweisen konnten.

2.4 Das Glukokortikoid Dexamethason (DEX)

2.4.1 Glukokortikoide

Glukokortikoide werden in der Nebennierenrinde gebildet und zählen zu den Steroidhormonen. Die wichtigsten natürlichen Vertreter dieser Gruppe der Steroidhormone sind Cortisol, Cortison und Corticosteron. Die zur Steroidwirkung führenden Schritte beginnen mit dem Eindringen des Steroidmoleküls in die Zelle und seiner Bindung an ein spezifisches zytoplasmatisches Rezeptorprotein (HOLLENBERG et al. 1985; GREEN u. CHAMBOM 1986). Über mehrere, sowohl intrazellulär als auch im Zellkern stattfindende, Schritte bewirken die Glukokortikoide die Synthese von spezifischen Proteinen, welche die Wirkungen des Glukokortikoids vermitteln.

Bisher konnten in jedem Zelltyp der daraufhin untersucht wurde, unter anderem auch in verschiedenen cochleären und vestibulären Regionen und im Zytosol von Spiralganglienzellen (TEN CATE et al. 1993; PITOVSKI et al. 1994; ZUO et al. 1995), die Existenz von Glukokortikoidrezeptoren nachgewiesen werden (BALLARD et al. 1974). Es gibt lediglich Schwankungen in der Anzahl, die zwischen 5 000 und 100 000 pro Zelle liegt (FEHM 1990). In Folge dessen kann vermutet werden, dass jede Zelle eine Reaktion zeigen wird, wenn sie Glukokortikoiden ausgesetzt wird und dass das biologische Resultat dieser Reaktion für jeden Zelltypus spezifisch ist (FEHM 1990). So haben Glukokortikoide Einfluss auf die Hämatopoese sowie den Muskel-, Wasser-, Elektrolyt-, Fett-, Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsel. Durch Hemmeffekte der Glukokortikoide auf die Proteinsynthese der Lymphozyten und eine hypotrophierende Wirkung auf Lymphknoten und den Thymus bewirken sie eine Suppression der zellvermittelten Immunität. Antiphlogistisch wirken sie auf Grund der Hemmung der Proliferation von Fibroblasten und von entzündlichem Granulations-

gewebe sowie der Verminderung der Ablagerung von Kollagengrundsubstanzen (PSCHYREMBEL 1994; FEHM 1990).

Die verschiedenen klinisch gebräuchlichen Steroide unterscheiden sich durch ihre Affinität zum Rezeptor. Im Wesentlichen läuft die Affinität zum Rezeptor der antiinflammatorischen Potenz parallel. Während die natürlichen Steroide wie das Kortisol nicht nur Affinität zum Glukokortikoidrezeptor, sondern auch zum Mineralokortikoidrezeptor haben, handelt es sich bei den klinisch gebräuchlichen Steroiden überwiegend um synthetisch hergestellte reine Glukokortikoide. Bei den synthetischen Glukokortikoiden sind infolge chemischer Veränderungen des Cortisolmoleküls die unerwünschten mineralokortikoiden Nebenwirkungen der Glukokortikoide vermindert, die erwünschten glukokortikoiden Aktivitäten jedoch erhöht (FEHM 1990). Außerdem wurden synthetische Glukokortikoide entwickelt, bei denen die entzündungshemmenden Eigenschaften besonders ausgeprägt sind. Zu diesen zählt das Dexamethason.

2.4.2 Dexamethason und seine Wirkung auf das Innenohr

Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid. Wie die natürlichen Glukokortikoide wirkt es katabolisch auf den Fett-, Protein- und Kohlenhydratmetabolismus und beeinflusst das Immunsystem und den Ionentransport in Neuronen des zentralen Nervensystems. Wie fast alle Glukokortikoide signalisiert Dexamethason über einen zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (ZHOU u. CIDLOWSKI 2005) und ist so in der Lage, die Transkriptionsrate verschiedener Zielgene zu steigern oder zu hemmen (STELLATO 2004).

Glukokortikoide, insbesondere Dexamethason, werden aufgrund ihrer antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkung in Bezug auf das Innenohr erfolgreich in der Therapie von Krankheitsgeschehen angewendet, für die eine autoimmune Ursache angenommen wird (MC CABE 1979; HAYNES et al. 1980; KANZAKI et al. 1993). Dexamethasonapplikation führte im Falle von Hörverlusten und Tinnitus die mit dem Morbus Ménière assoziiert sind zu einer Verbesserung des Tinnitusgeschehens sowie einer verminderten Wahrscheinlichkeit eines Fortschreitens des Hörverlustes (SHEA u. GE 1996). Dass aminoglycosid-bedingter Hörverlust durch Dexamethason-Infusion in die Scala tympani eingedämmt werden kann, konnten HIMENO et al. im Jahr 2002 am Meerschweinchenmodell beweisen. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte, dass Dexametha-

son zu einer Verringerung der durch Lärm verursachten Traumen führt (TAKEMURA et al. 2004).

Zusätzlich zu den genannten Einsatzmöglichkeiten könnte Dexamethason in Verbindung mit Cochlea-Implantaten eingesetzt werden. Neben einer möglichst großen Anzahl vitaler Spiralganglienzellen ist für eine optimale Patientenversorgung mit einem Cochlea-Implantat eine enge Nerven-Elektroden-Interaktion anzustreben. Ungewollte Nebeneffekte der Cochlea-Implantat-Operation, wie implantationsbezogene Entzündungsprozesse oder Bindegewebsneubildung im Bereich der inserierten Elektrode, könnten durch die antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung des Dexamethasons auf ein Minimum reduziert werden. *In vitro* Versuche an kultivierten SGZ zeigten, dass 100 ng/ml DEX keinerlei Einfluss auf Spiralganglienzellen ausübt (WEFSTAEDT 2006). In humanen Versuchen verringerte eine einmalige intraoperative Applikation von 20mg/ml Triamcinolon-Kristall-Suspension die Impedanz verglichen mit einer Kontrollgruppe signifikant (PAASCHE et al. 2006). Dies lässt darauf schließen, dass Steroide, und somit auch DEX, als mögliche Interventionsmethoden zur Optimierung der CI-Versorgung in Erwägung zu ziehen sind.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, die Effekte einer lokalen Dexamethason-Therapie auf das postoperative Bindegewebswachstum nach Elektrodeninsertion zu untersuchen. Des Weiteren soll die Frage beantwortet werden, inwiefern eine lokale Dexamethason-Behandlung Einfluss auf einen möglichen SGZ-protectierenden Effekt der elektrischen Stimulation ausübt.

2.5 Effekte elektrischer Stimulation (ES) auf Spiralganglienzellen

2.5.1 *In vitro* Effekte elektrischer Stimulation auf Spiralganglienzellen und die zugrunde liegenden Mechanismen

In der Literatur finden sich nur wenige Angaben betreffend der Auswirkungen elektrischer Stimulation auf kultivierte Spiralganglienzellen. Zudem kamen die sich mit dieser Problematik beschäftigenden Arbeitsgruppen zu keinen übereinstimmenden Ergebnissen. HEGARTY et al. (1997) führten Versuche mit vereinzelter Spiralganglienzellen der Ratte durch, welche nach Wechselfeldstimulation ein signifikant gesteigertes Überleben zeigten. WEFSTAEDT (2006) hingegen, welcher ebenfalls die Effekte elektrischer Stimulation auf das Zellüberleben kultivierter vereinzelter Spiral-

ganglienzellen der Ratte untersuchte, konnte keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich eines verbesserten Spiralganglienzellüberlebens im Verhältnis zur unstimulierten Kontrollgruppe feststellen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die protektiven Effekte der Depolarisation auf Spiralganglienzellen *in vitro* (HEGARTY et al. 1997) und *in vivo* (MILLER et al. 2002, 2003) auf einem gesteigerten Ca^{2+} -Influx in die Zellen durch Steuerung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle beruht. Zum einen aktiviert das Ca^{2+} die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Kinase (CaMK) (HANSON u. SCHULMAN 1992), welche wiederum das depolarisationsabhängige Überleben der Zellen vermittelt (HACK et al. 1993). Zum anderen erhöht das Ca^{2+} das als ein Überlebensfaktor für Neurone geltende intrazelluläre cAMP (RYDEL u. GREENE 1988; KAISER u. LIPTON 1990; D'MELLO et al. 1993; GALLI et al. 1995; HANSON et al. 1998) via der Ca^{2+} /calmodulin-abhängigen Adenylyl-Zyklase (COOPER et al. 1995). Untersuchungen von HANSEN et al. (2001) und GHOSH et al. (1994) lassen darauf schließen, dass neben den genannten noch ein autokriner Signalweg initiiert wird, der über die gesteigerte Freisetzung neurotropher Faktoren auto- oder parakrin das Spiralganglienzellüberleben steigert.

2.5.2 *In vivo* Effekte elektrischer Stimulation auf Spiralganglienzellen

Im Jahr 1987 konnte LOUSTEAU an mittels Kanamycin und Ethacrynsäure systemisch ertaubten und vor der Ertaubung einseitig mit einer elektrischen Innenohrprothese versorgten Meerschweinchen demonstrieren, dass eine chronische elektrische Stimulation mittels biphasischer Rechteckpulse (eine Stunde/Tag; 100 μA ; 250 μs /Phase; 200 Hz; 45 Tage Dauer) die Dichte der SGZ auf der stimulierten Seite im Vergleich zur unstimulierten Seite auf einem höheren Niveau erhalten konnte. Auch in einem ähnlichen Versuch mit systemisch ertaubten Meerschweinchen konnte bei sofort nach Ertaubung beginnender chronischer sinusoidaler elektrischer Stimulation (2 Std./Tag; 0 μA , 100 μA , 200 μA , 300 μA und 400 μA ; 1000 Hz; neun Wochen Dauer) ein signifikant gesteigertes Überleben der SGZ im Vergleich zur unstimulierten Seite gefunden werden (HARTSHORN et al. 1991). LEAKE et al. (1991, 1992) führten Versuche an systemisch ertaubten Katzen durch und variierten unterschiedliche Stimulationsparameter. Ihre ersten Versuche im Jahr 1991 zeigten, dass eine um 10-16 Wochen nach Ertaubung verzögert einsetzende einseitige intracochleäre Stimulation mittels biphasischer Rechteckpulse (eine Stunde/Tag; 6 dB über HS; 200 μs /Phase; 30 Hz; 4, 13 und 14 Wochen

Dauer) bei einer 13 bzw. 14 Wochen dauernden Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der SGZ-Dichte führte (LEAKE et al. 1991). Im darauf folgenden Jahr führte dieselbe Arbeitsgruppe einen ähnlichen Versuch mit veränderten Stimulationsparametern durch. Die Intensität des Stimulus wurde auf 2 dB oberhalb der gemessenen HS reduziert und die Dauer auf 4 Stunden am Tag für bis zu 23 Wochen erhöht. Die Ergebnisse dieser Studie lassen darauf schließen, dass eine Verlängerung der Stimulationsdauer bei niedriger Intensität den SGZ-protectierenden Effekt der ES potenziert (LEAKE et al. 1992). MITCHELL et al. (1997) untersuchten den Einfluss verschiedener Reizfrequenzen und Pulsdauern auf die Dichte der SGZ ertaubter Meerschweinchen. Sie kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine ES die Spiralganglienzelldichte nach Ertaubung auf hohem Niveau erhalten kann. Es waren aber keine Unterschiede beim Vergleich der verschiedenen Reizparameter feststellbar. Durch Untersuchung der Auswirkungen einer elektrischen Gleichstrom-Stimulation (0,4-2,8 μ A; Pulsdauer 50 μ s, 20000 pps) von SGZ normal hörender Katzen nach einer Stimulationsdauer von 2200 h zeigten SHEPHERD et al. (1999) die Wichtigkeit einer ladungsneutralen Stimulation für einen maximalen Spiralganglienzellerhalt. So führte die Durchführung einer Gleichstromstimulation zu einer signifikant verringerten Spiralganglienzelldichte gegenüber unstimulierten Kontrolltieren.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Untersuchungen konnten NI et al. (1992) und SHEPHERD et al. (1994) keinen Unterschied in der Ganglienzelldichte zwischen elektrisch stimulierten und unstimulierten Cochleae ertaubter Katzen nachweisen. Die Versuchstiere wurden nach Ertaubung mit Kanamycin und Ethacrynsäure über ca. 100 Tage insgesamt bis zu 1730 Stunden mit biphasischen Rechteckpulsen (100 μ s/Phase) einer Frequenz von 100Hz intracochleär stimuliert (SHEPHERD et al. 1994). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen ARAKI et al. (1998): neonatal mit Kanamycin und Ethacrynsäure ertaubte Katzen wurden für 49 bis 67 Tage mit biphasischen Rechteckpulsen (100 μ s/Phase) einer Frequenz von 200Hz für mindestens 16 Stunden täglich elektrisch intracochleär stimuliert. Die Reizintensität lag jeweilig 6dB über der zuvor ermittelten EABR-Hörschwelle. In einer histopathologischen Studie zur Untersuchung möglicher schädlicher Effekte einer elektrischen Stimulation auf SGZ wurden normal hörende Katzen bilateral mit Cochlea-Implantaten versorgt und mit ladungsneutralen biphasischen Pulsen (1000-2000 Hz) elektrisch stimuliert (XU et al. 1997). Nach einer Stimulationsdauer von 2100 h konnten morphologisch keine auf die elektrische Stimulation zurückzuführenden Schädigungen des Spiralganglions im Vergleich zu einer

Kontrollgruppe nachgewiesen werden (XU et al. 1997). Diese Ergebnisse zeigten, dass eine chronische elektrische intracochleäre Stimulation keine pathologischen Effekte in noch vorhandenen Spiralganglienzellen ausübt. In einer ähnlichen Studie mit ertaubten Meerschweinchen konnte in elektrisch stimulierten Cochleae eine signifikante Erhöhung der Dichte der SGZ, aber nicht der absoluten SGZ-Zahl festgestellt werden (LI et al. 1999). Diese Erhöhung der Spiralganglienzelldichte unter elektrischer Stimulation wurde nicht auf einen möglichen protektiven Effekt zurückgeführt, sondern auf eine Verengung des Rosenthalschen Kanals in Folge elektrischer Stimulation (LI et al. 1999).

2.6 Effekte einer kombinierten GDNF- bzw. BDNF- Applikation und elektrischer Stimulation auf das SGZ-Überleben und die Funktionalität des Innenohres nach Ertaubung

Die Effekte einer 4-7 Tage nach Ertaubung einsetzenden Kombinationstherapie aus GDNF und elektrischer Stimulation auf das Überleben der SGZ wurden 2002 von KANZAKI et al. untersucht. Hierfür wurden Meerschweinchen ertaubt (Kanamycin und Ethacrynsäure) und bekamen 4-7 Tage später einmalig intracochleaer GDNF mittels eines adenoviralen Vektors (AdGDNF) appliziert. Zeitgleich begann die elektrische Stimulation (ES) der Tiere. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, dass der Kombinationsstimulus (ES + AdGDNF) hinsichtlich eines maximalen Spiralganglienzellerhalts nach experimenteller Ertaubung effektiver war als die jeweiligen Einzelstimuli (KANZAKI et al. 2002). Dieser statistisch signifikante Unterschied spiegelte sich jedoch nicht in vorgenommenen EABR-Messungen wieder, welche in der AdGDNF + ES-Gruppe verglichen mit der ES-Gruppe keine statistisch signifikante Differenz in den durchschnittlichen Hörschwellen ergab. Zu bemerken ist jedoch, dass es in beiden Versuchsgruppen im Verlauf der Untersuchung zu einer 10%igen Abnahme der Hörschwelle im Vergleich zur Ausgangshörschwelle kam.

Ein Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Effektes einer drei Wochen verzögert nach Ertaubung einsetzenden, kombinierten chronischen Behandlung mittels definierter GDNF-Dosis und elektrischer Stimulation auf SGZ systemisch ertaubter Meerschweinchen. KANZAKI et al. (2002) wiesen zwar einen additiven Effekt beider Behandlungskomponenten nach, doch verwendete diese Arbeitsgruppe adenovirale Vektoren zum Einbringen des GDNF ins Innenohr. Auch wenn es heutzutage möglich ist, den Grad der Genexpression durch diätetische Promotoren zu regulieren, so ist es doch kaum

möglich, die Freisetzungsrates und somit die Konzentration des produzierten Proteins im Innenohr zu bestimmen. Bis heute existieren keine Studien, welche den kombinierten Effekt einer definierten GDNF-Konzentration und elektrischen Stimulation auf SGZ *in vivo* untersuchen. Zudem werden Cochlea-Implant-Patienten, auch heute noch, nicht direkt im Anschluss eines sensorineuralen Hörverlustes implantiert. Dementsprechend sollte man im Rahmen von *in vivo* Versuchen, deren Ergebnisse auf humane Gegebenheiten umgesetzt werden sollen, eine angemessene Zeitspanne zwischen Ertaubung und Therapiebeginn verstreichen lassen. Kanzaki und Kollegen (2002) begannen die GDNF-Elektro-Therapie 4-7 Tage nach Ertaubung. In der vorliegenden Studie sollen die Auswirkungen einer Kombination aus 100 ng/ml GDNF (WEFSTAEDT et al. 2005) und elektrischer Stimulation auf Spiralganglienzellen mit einem verlängerten Ertaubungs-Implantations-Intervall von 21 Tagen untersucht werden.

Eine additive Wirksamkeit auf SGZ ertaubter Meerschweinchen konnte auch für die Kombination einer elektrischen Stimulation mit kontinuierlicher BDNF-Applikation (10 µg BDNF je Cochlea), ab dem fünften Tag nach Ertaubung über einen Zeitraum von 28 Tagen verabreicht, demonstriert werden (SHEPHERD et al. 2005). Eine alleinige ES erwies sich dabei sowohl morphologisch als auch funktionell (Hörvermögen) als nicht effektiv für einen verbesserten Spiralganglienzellerhalt, wohingegen die Kombinations-therapie zu einem signifikant verbesserten Spiralganglienzellüberleben und auch zu erniedrigten Hörschwellen nach EABR-Untersuchung führte (SHEPHERD et al. 2005). Ein verbessertes Spiralganglienzellüberleben wurde insbesondere in den Windungen der Cochlea gefunden, die in Folge der Elektrodeninsertion elektrisch stimuliert werden konnten (SHEPHERD et al. 2005).

Da die Cochlea-Implantat-Versorgung von Patienten mit akutem sensorineuralen Hörverlust erst zeitlich verzögert erfolgt und die Verwendung von Wachstumsfaktoren als therapeutische Mittel aus toxikologischer und ökonomischer Sicht möglichst minimal gehalten werden sollte, untersuchte diese Arbeit unter anderem die Effekte einer drei Wochen nach Ertaubung verzögert einsetzenden chronischen Behandlung mit einer minimierten BDNF-Dosis von 50 ng/ml und zeitgleicher elektrischer Stimulation auf das Überleben der Spiralganglienzellen.

3 Zielsetzung

Entsprechend der dargestellten Sachverhalte ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzungen:

- Histologische Untersuchung der Effekte einer verzögerten GDNF-, BDNF- und Dexamethason-Applikation sowie monopolarer oder bipolarer elektrischer Stimulation auf die Spiralganglienzellen ertaubter Meerschweinchen
- Elektrophysiologische Untersuchung möglicher synergistischer Effekte einer Kombination aus GDNF oder BDNF und elektrischer Stimulation auf die Funktionalität der SGZ nach Ertaubung
- Untersuchung möglicher synergistischer Effekte einer Kombination aus GDNF oder BDNF und elektrischer Stimulation auf das Überleben der Spiralganglienzellen nach Ertaubung
- Histologische Untersuchungen bezüglich einer möglichen Reduktion von Bindegewebsbildung nach Insertion eines Cochlea-Implantats durch Dexamethason
- Untersuchung des Einflusses einer Dexamethason-Applikation auf mögliche protektive Effekte der elektrischen Stimulation auf Spiralganglienzellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten die tierexperimentelle Grundlage für eine anzustrebende humane Anwendung der Interventionsmodelle schaffen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen gewählt, da für diese Spezies standardisierte, operative Zugänge zum Innenohr bestehen und sich die anatomischen Dimensionen als günstig für mikrochirurgische Eingriffe erwiesen haben. Zudem existieren für diese Tierart etablierte Methoden zur systemischen Ertaubungen und es liegen bereits Untersuchungen über FAEP vor, so dass Vergleichswerte für die eigenen Untersuchungen zur Verfügung standen.

Für die Untersuchungen wurden männliche Meerschweinchen des BFA-Stammes mit einem Anfangsgewicht von ca. 250 g bis 450 g verwendet. Die Tiere stammen aus der Zucht der Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld. Die Verwendung der Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (Tierversuchsanträge 02/558, 04/913 und 04/914). Die Studie wurde in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und mit der Richtlinie 86/601/EEC des Rates der europäischen Gemeinschaft zum Schutz der für experimentelle Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt.

Der Hörstatus der Tiere, welche in der vorliegenden Studie eingesetzt wurden, war bei allen Tieren einheitlich. Es handelt sich um normal hörende Meerschweinchen (Hörschwelle ≤ 50 dB). Dies wurde vor dem eigentlichen Experiment durch Ableitung akustisch evozierter Hirnstammpotentiale überprüft. Alle Versuche fanden in Operationsräumen des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover statt.

4.1.1.1 Tierhaltung

Die Meerschweinchenhaltung erfolgte in den Räumlichkeiten des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover und entsprach der EG-Richtlinie für die Haltung von Versuchstieren der Länder der Europäischen Union. Die Lebensbedingungen waren für alle Versuchstiere identisch. Die Tiere wurden in

Dreiergruppen beziehungsweise *post implantationem* einzeln in Typ 4 Makrolon®-Käfigen (Uno Roestvaststaal B.V., Zevenaar, Holland) auf einer Standardeinstreu bei Raumtemperatur und $55 \pm 5\%$ relativer Luftfeuchtigkeit bei einem täglichen hell/ dunkel-Zyklus von jeweilig 12 Stunden gehalten. Sie erhielten ein Trockenpelletfutter (Ssniff®, Spezialdiäten GmbH, Soest) sowie Heu und Trinkwasser *ad libitum*.

4.1.1.2 Versuchsgruppen

Die Gesamtzahl von 49 Versuchstieren setzt sich aus 9 Gruppen zusammen, wobei alle Tiere systemisch ertaubt und 21 Tage später linksseitig implantiert wurden. Eine zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Experimentalgruppen findet sich in Tabelle. 1. Die Benennung der Gruppen erfolgte aufgrund von mir eingeführter Abkürzungen, welche auf der jeweils angewendeten Intervention basierten.

4.1.1.2.1 AP-Gruppe

Diesen Tieren wurde ein monopolarer Elektroden-Mikropumpensystem implantiert. Sie wurden nicht stimuliert. Durch das Mikropumpensystem wurde **artifizielle Perilymphe (AP)** in die Cochlea appliziert.

4.1.1.2.2 AP+ES(M)-Gruppe

Die dieser Gruppe zugehörigen Tiere wurden von Tag 24 bis 48 durch ein monopolar wirkendes Elektroden-Mikropumpenmodell elektrisch stimuliert. In die Cochlea wurde **artifizielle Perilymphe** eingeleitet.

4.1.1.2.3 GDNF-Gruppe

Durch ein monopolarer Prothesen-Modell wurde den Tieren dieser Versuchsgruppe **glial cell line-derived neurotrophic factor** ins Innenohr appliziert. Eine elektrische Stimulation fand nicht statt.

4.1.1.2.4 GDNF+ES-Gruppe

Die Tiere dieser Gruppe wurden mittels eines monopolar wirkenden Elektroden-Mikropumpensystem mit **GDNF** und intracochleärer elektrischer Stimulation versorgt.

4.1.1.2.5 BDNF-Gruppe

Brain-derived neurotrophic factor wurde mittels eines bipolaren Elektroden-Mikropumpensystems intracochleär appliziert.

4.1.1.2.6 BDNF+ES-Gruppe

Auch in dieser Gruppe wurde **BDNF** appliziert. Zusätzlich erfolgte eine bipolare intra-cochleare elektrische Stimulation.

4.1.1.2.7 AP+ES(B)-Gruppe

Den Tieren dieser Gruppe wurde **artifizielle Perilymphe** ins Innenohr geleitet. Gleichzeitig erfolgte eine **bipolare elektrische Stimulation**.

4.1.1.2.8 DEX-Gruppe

Ein monopolar designtes Elektroden-Mikropumpensystem leitete **Dexamethason** ins Innenohr.

4.1.1.2.9 DEX+ES-Gruppe

Diese Tiere wurden zeitgleich mittels **Dexamethason** und monopolarer elektrischer Stimulation behandelt.

Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsgruppen und ihre Benennung in dieser Dissertation, die Tierzahlen, die Wirkungsweise der verwendeten Elektroden-Mikropumpensysteme, die applizierte Substanz und die elektrische Stimulation

Versuchsgruppe/ Benennung, Tierzahl	Experimentelle Konditionen			
	Ertaubung	Elektroden- Mikropumpen- system	Substanz	Elektrische Stimulation
AP, n=7	ja	monopolar	AP	nein
AP+ES(M), n=6	ja	monopolar	AP	ja
GDNF, n=6	ja	monopolar	GDNF	nein
GDNF+ES, n=5	ja	monopolar	GDNF	ja
BDNF, n=6	ja	bipolar	BDNF	nein
BDNF+ES, n=5	ja	bipolar	BDNF	ja
AP+ES(B), n=3	ja	bipolar	AP	ja
DEX, n=6	ja	monopolar	DEX	nein
DEX+ES, n=5	ja	monopolar	DEX	ja

4.1.2 Pharmaka

- a) Atropinsulfat (0,5 mg/ml), *Atropinsulfat Braun 0,5 mg*[®]; B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- b) Carprofen (50 mg/ml), *Rimadyl*[®], 20 ml; Pfizer GmbH, Karlsruhe
- c) Ethacrynsäure (50 mg), *Edecrin*[®]; Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, New Jersey, USA
- d) Isotone Natriumchloridlösung, 0,9% (20/10/5 ml); Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- e) Lactobacillen (*Lactobacillus* (L.) *fermentum*, L. *casei*, L. *plantarum*, L. *acidophilus*, je 60 mg) und *Streptococcus faecium* (60 mg), *Bird Bene-Bac*[®]; A. Albrecht GmbH & Co., Aulendorf
- f) Kanamycinsulfat (333 mg/ml), *Kanamycin Injection, USP*[®]; American Pharmaceutical Partners, Inc., Schaumburg, IL, USA
- g) Ketaminhydrochlorid (115,3 mg/ml), *Ketamin Gräub*[®] 10%; A. Albrecht GmbH & Co., Aulendorf
- h) Prilocainhydrochlorid (20 mg/ml), *Xylonest*[®] 1%; AstraZeneca GmbH, Plankstadt
- i) Sulfamethoxazol (200 mg) und Trimethoprim (40 mg), *Cotrim K-ratiopharm*[®] Saft; ratiopharm GmbH, Ulm
- j) *Thilo-Tears*[®] Gel; Alcon Pharma (Dr. Thilo) GmbH, Freiburg i. Breisgau
- k) Xylazin-Hydrochlorid (23,32 mg/ml) und p-Hydroxybenzoesäuremethylester (1 mg/ml) in Natriumchloridlösung, *Rompun*[®] 2%; Bayer Vital GmbH, Leverkusen

4.1.3 Chemikalien zur Verwendung während der Operationen

- a) Carboxylatzement, *Durelon*[®]; ESPE Dental AG, Seefeld
- b) Polymethylmethacrylat, *Meta Fast Resin*[®] Puder und Lösung; J. Morita Europe GmbH, Dietzenbach

4.1.4 Technische Geräte mit Anwendung am Tier

- a) AABR-Messeinheit: Die Ableitung der akustisch evozierten Hirnstammpotentiale (acoustically evoked auditory brainstem response, AABR) erfolgte mit Hilfe der BERA-Messeinheit *Nicolet Viking IV (Version 4.4)* der Firma Nicolet Biomedical (Madison, Wisconsin, USA). Diese Messeinheit besteht aus mehreren Hardware-Komponenten: einem Personal-Computer (PC) mit einem integriertem Signalgene-

rator, einem integrierten Verstärker, einem EA 101 Vorverstärker, einem Analog/Digital-Wandler, einem Bandpassfilter und einem Farbmonitor. Eine Multifunktions-Bedienkonsole, eine deutsche Standardtastatur und eine „PC-Maus“ dienten der Menüführung. Zusätzlich war das System mit einer Analysesoftware zur Auswertung der akustisch evozierten Potentiale ausgestattet. Lautsprecher (*Nicolet TIP-300 Tubal Insert Phone*, Nicolet) und Ableitelektroden (*Subdermal EMG Needle Electrodes*, 12 mm, Medtronic Xomed, Jacksonville, Florida USA) wurden extern an die Messeinheit angeschlossen.

- b) EABR-Messeinheit: Der Messaufbau zur Ableitung der elektrisch evozierten Hirnstammpotentiale (electrically evoked auditory brainstem response, EABR) bestand aus einem modifizierten Aufbau für die Messung von akustisch evozierten Potentialen. Die Generierung der elektrischen Pulse erfolgte durch die *Nicolet Viking IV* Messeinheit in Kombination mit einem Pulsgenerator (*TGP 110 10MHz Pulse Generator*, Thurlby Thandar instruments, Huntingdon, England). Diese zwei Geräte ermöglichten die Generierung monophasischer Pulse. Eine in den Zentralen Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover hergestellte „*Biphasische Box*“ diente zur Umwandlung der monophasischen Stimuli in biphasische Reize und ermöglichte zusätzlich die Einstellung der Stimulusintensität zwischen 0 und 1 mA. Die Biphasische Box wurde über ein Kabel mit dem Konnektor des Elektroden-Mikropumpensystems verbunden. Die evozierten Potentiale wurden mittels isolierter Verbindungskabel von den Ableitschrauben (s. 4.2.3) der Meerschweinchen zum Verstärker des Messsystems geleitet. Zur Messung, Darstellung und Aufzeichnung der Potentialdifferenzen bei elektrischer Stimulation diente wiederum die Nicolet-Messapparatur.
- c) Portabler Stimulator: Da die Tiere 24 Stunden am Tag, für eine Dauer von 24 Tagen, elektrisch stimuliert werden, befindet sich der Stimulator am Tier. Mittels einer Verankerungsschraube am Tier und eine Bohrung in der Bodenplatte des Stimulators ist das Gerät am implantierten Tiere fixierbar und die Tiere können sich weiterhin frei bewegen. Dieser, zum kontinuierlichen Tragen geeigneten, Stimulator wurde uns freundlicherweise vom *Kresge Hearing Research Institute*, The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA zur Verfügung gestellt. Durch vier 3 V Batterien betrieben (10.2.), generiert der Stimulator bei einer Frequenz von 250 Hz 100 μ s dauernde Rechteckimpulse wechselnder Polarität. Die Stimulusintensität ist zwischen 50 μ A und 1000 μ A justierbar.

- d) Wärmebett, bestehend aus Badthermostat *Thermostat C10* der Fa. Thermo Haake, Karlsruhe, und Liegefläche, hergestellt in den Zentralen Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover.
- e) Stativmikroskop *OPMI-6-M*, Fa. Carl Zeiss
- f) Kautereinheit: Elektrochirurgiegerät *Erbotom T175E*, Fa. Erbe, Tübingen; *Bipolare Koagulationspinzette*, abgewinkelt und dazugehöriges Kabel, Fa. Medicalis, Garbsen
- g) Bohrsystem *Storz Unidrive II plus*, Fa. Storz,
- h) Haarschneidemaschine *ECO-black M*, Tondeo Werk GmbH, Solingen

4.1.4.1 Die Elektroden-Mikropumpensysteme

In dieser Studie wurden zwei Elektroden-Mikropumpensysteme unterschiedlicher Hersteller verwendet. Beide Modelle bestanden aus einer aktiven Elektrode, einer Referenzelektrode, einem Verbindungsstück für die elektrische Stromzufuhr (so genannter Konnektor) und einem Silikonschlauch an welchem die Mikropumpe befestigt wurde.

4.1.4.1.1 Das monopolare Elektroden-Mikropumpensystem

Die aktive Elektrode und die Referenzelektrode der von der Fa. *MedEl GmbH*, Innsbruck, Österreich, hergestellten Elektroden-Schlauch-Kombination verlaufen getrennt (Abb. 5) und werden in der Cochlea und im Mittelohr positioniert. Somit handelt es sich um ein monopolarer Modell. Die aktive Elektrode besteht aus einem 50 µm starkem Platin-Iridium(Pt-Ir)-Draht, welcher an einem Ballkontakt (0,25 mm Durchmesser) endet. Der Draht ist von einer Silikonschicht (0,60 mm Durchmesser) ummantelt in welcher auch ein Medikamentenkanal von 150 µm Durchmesser verläuft. Kanal und Elektrode separieren sich am perkutanen Konnektor, an welchem der Draht endet und der Silikonschlauch zur Pumpenbefestigung beginnt. Dieser hat einen Außendurchmesser von 1,2 mm und einen Innendurchmesser von 0,6mm. Ein unisolierter Pt-Ir-Draht von 150 µm Stärke dient als Referenzelektrode.

4.1.4.1.2 Das bipolare Elektroden-Mikropumpensystem

Dieses Elektrodenmodell besteht aus sechs jeweils 0,3 mm breiten, ringförmigen Pt-Ir-Elektrodenkontakten, welche sich in einem Abstand von jeweils 0,4 mm an der Elektrodenspitze befinden. Der erste und vierte Kontakt sind durch einen 0,4 mm dicken teflonisierten Pt-Ir-Draht mit einem Steckkontakt, dem Konnektor, verbunden.

Da beide aktiven Kontakte intracochleär platziert werden handelt es sich um ein bipolares Elektrodenmodell. Die Elektrodendrähte sind in einem Silikonträger eingebettet, dessen Außendurchmesser 0,2032 mm beträgt. Im Inneren des Silikons befindet sich ein Medikamentenkanal mit einem Durchmesser von 0,12 mm welcher an der Elektrodenspitze endet. Elektrodendrähte und Medikamentenkanal separieren sich 20 mm von der Elektrodenspitze entfernt (Abb. 6). Dieses Elektroden-Mikropumpensystem wurde von der Fa. Cochlear Ltd., Sydney, Australien, hergestellt.

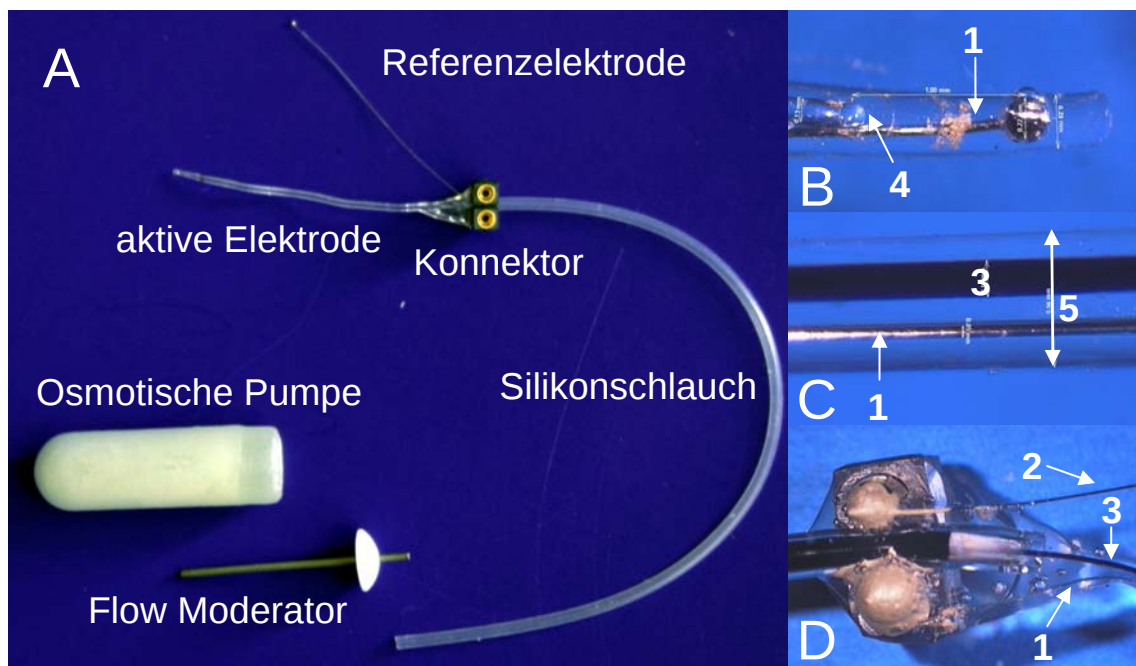


Abb. 5: Darstellung des monopolaren Elektroden-Mikropumpensystems der Firma MedEl. A: Elektroden-Mikropumpensystem mit osmotischer Pumpe und dem beide Komponenten verbindenden Flow Moderator. B: Endstück der aktiven Elektrode. C: Mittelstück der aktiven Elektrode und Applikationskanal im Silikonmantel. D: Ventralansicht des Konnektors. Erläuterungen: 1: aktive Elektrode; 2: Massedraht; 3: 150 µm-Medikamentenkanal; 4: Kanalöffnung, 1 mm vor Kugelkontakt, 5: Silikonmantel.

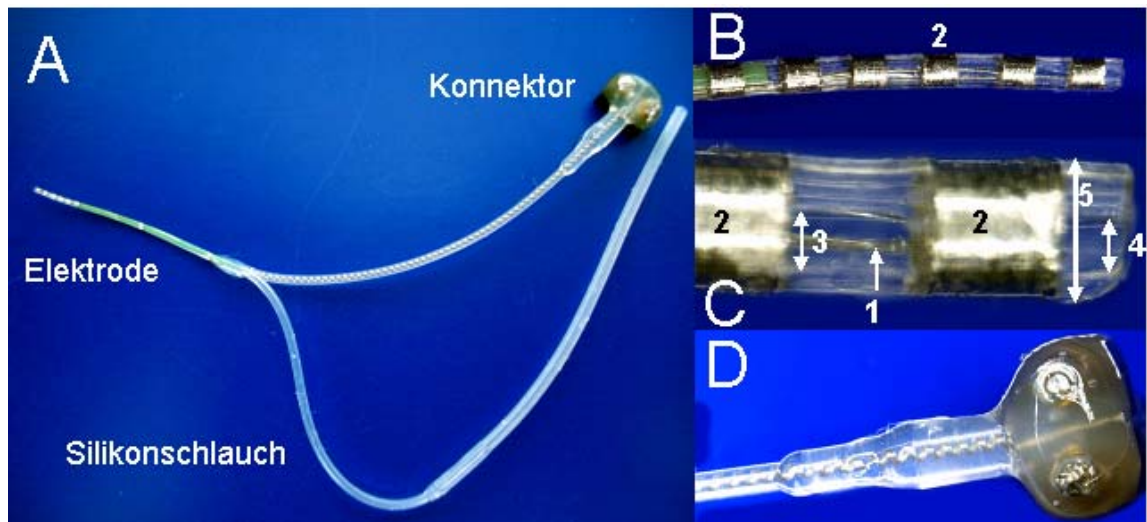


Abb. 6: Darstellung des bipolaren Elektroden-Mikropumpensystems der Firma Cochlear. A: Elektroden-Mikropumpensystem. B: Endstück der Elektrode mit den 6 Kontakten (2). C: Elektrodenspitze mit der Pt-Ir-Elektrode (1), den Kontakten (2), dem Medikamentenkanal (3), der Kanalöffnung (4) und dem Silikonmantel (5). D: Ventralansicht des Konnektors.

4.1.4.2 Die Mikropumpen

Die osmotischen Pumpen (Alzet[®] *mini-osmotic pump, model 2002*, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) weisen eine Infusionsrate von 0.5 µl/Std. für eine Dauer von 14 Tagen auf. Mittels eines als Flow Moderator bezeichneten Verbindungsteils werden die Pumpen am Silikonschlauch der Elektroden befestigt (Abb. 5).

4.1.5 Reagenzien, Laborbedarf, Verbrauchsmaterialien und Geräte zur Gewinnung und Aufarbeitung der Cochlea sowie zur Spiralganglienzellauswertung

Ein Verzeichnis der verwendeten Lösungen, Reagenzien (10.1) und Geräte (10.3) sowie des verwendeten Laborbedarfs inklusive aller Verbrauchsmaterialien (10.2) findet sich in Tabellenform im Anhang.

4.2 Methoden

Alle Messungen und Eingriffe (Abb. 7) an Tieren fanden unter Anästhesie statt. Den Tieren wurde initial 40 mg Ketamin/kg Körpergewicht (KGW) in Kombination mit 10 mg Xylazin/ kg KGW *intra muskulär* (i.m.) verabreicht. Zur Erhaltung wurde die halbe Ursprungsdosis verwendet. Eine Mischspritze bestehend aus 1,5 ml Ringer Lactat oder Natrium Chlorid (NaCl)/ 100 g KGW, 0,05 ml Atropin/kg KGW und 0,1 ml Carprofen/kg KGW sub cutan (s.c.) injiziert diente als Flüssigkeitsdepot, zur Minderung muköser Sekretion und zur Analgesie. Die Tiere wurden auf einem Wärmebett platziert, welches die Körpertemperatur bei 37-38° Celsius hielt.

Unmittelbar nach der Messung der akustisch evozierten Potentiale (AABR, s. 4.2.1) zur Festlegung der Ausgangshörschwelle wurden die Meerschweinchen am Tag 0 systemisch ertaubt (s. 4.2.2). Der Erfolg der Ertaubung wurde mit Hilfe einer erneuten AABR-Messung 5 Tage später verifiziert (s. 4.2.1).

Am 21. Tag nach der Ertaubung erfolgte die linksseitige Implantation aller Tiere mit einem Elektroden-Mikropumpensystem, an welches eine osmotischen Pumpe zur intracochleären Freisetzung der neurotrophen Faktoren (GDNF und BDNF) bzw. DEX oder AP adaptiert wurde (s. 4.2.3). Durch eine intraoperative Messung elektrisch evozierter Potentiale (EABR) wurde die korrekte Lage der implantierten Elektroden bestätigt und die elektrische Hörschwelle der Tiere bestimmt (s. 4.2.4).

Bei allen Tieren wurde am Tag 34 und 48 eine erneute AABR-Messung durchgeführt. Am Tag 34 fand außerdem bei allen Tieren ein Pumpenwechsel statt (s. 4.2.5). Die zur elektrischen Stimulation bestimmten Tiere wurde ab dem 24. Versuchstag mit einem portablen Stimulator versorgt und kontinuierlich 8 dB oberhalb der an Tag 21 bestimmten EABR-Hörschwelle stimuliert. Am 28., 34., 41. und 48. Tag wurden bei diesen Tieren weitere AABR- und EABR-Messungen durchgeführt, um die Stimulatoren an etwaige Hörschwellenänderungen anzupassen.

Alle Tiere wurden am 48. Versuchstag getötet. Die Cochleae wurden beidseits entnommen und für die histologische Untersuchung bearbeitet. Die Ergebnisse der rechten und linken Cochlea eines jeden Tieres sowie die Ergebnisse der Cochleae der einzelnen Gruppen wurden miteinander verglichen und statistisch ausgewertet.

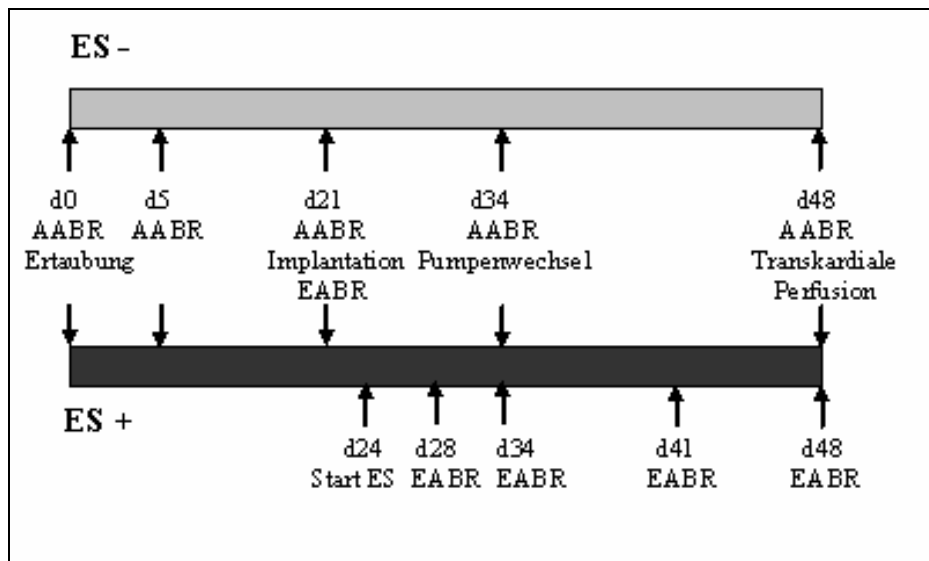


Abb. 7: Zeitschema zur Darstellung des Versuchsablaufes. Die obere Zeitskala bezieht sich auf nicht elektrisch stimulierte Tiere, die untere auf elektrisch stimulierte Tiere. Die sich zwischen den beiden Zeitskalen befindenden Beschriftungen betreffen alle Versuchsgruppen. Die unteren Beschriftungen beziehen sich nur auf elektrisch stimulierte Tiere.

4.2.1 Messung akustisch evozierter Hirnstammpotentiale (acoustically evoked auditory brainstem response (AABR))

Nadelelektroden wurden subdermal am Vertex (aktiv), am rechten und linken Mastoid (Referenz) und in der rechten Kniefalte (Erde) platziert. Die neuronalen Aktivitäten wurden durch einen *EA101* Vorverstärker geleitet und ein *Viking IV Signal Analyser* diente zur Aufnahme, Auswertung und Darstellung der Messungen (s. 4.1.2.5.a)). Es wurden biphasische Click Stimuli mit einer Wiederholungsrate von 10 Hz und 100 µsec Dauer präsentiert (INGHAM et al. 1998). Die obere und untere Grenzfrequenz betrugen 100 Hz und 3 kHz. Die Strompulse wurden mit Hilfe von Ohrhörern, welche im äußeren Gehörgang platziert wurden, in akustische Signale umgewandelt. Um die Hörschwelle zu bestimmen wurden die Stimuli von 60 dB SPL absteigend zunächst in Intensitätsstufen von 10 dB SPL, um die Hörschwelle herum in 5 dB SPL Schritten, dargeboten. Die Hörschwelle wurde definiert als die niedrigste Stimulusintensität, welche reproduzierbare AABRs mit einer Amplitude von mindestens 0.5 µV Amplitude evozierte (YAMAGATA et al. 2004). Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Methode zur Bestimmung der akustischen Hörschwelle.

Das kontralaterale Ohr wurde durch die Präsentation weißen Rauschens, jeweils 30 dB SPL unter dem entsprechend verwendeten Click-Stimulus, vertäuscht. Die AABR-Messungen wurden bei allen Tieren an den Tagen 0, 5 oder 6, 21, 34 und 48 vorgenommen. Die akustische Hörschwelle der elektrisch stimulierten Tiere wurde zusätzlich am 28. und 41. Tag nach der Ertaubung bestimmt. Um in den Versuch mit einbezogen zu werden mussten die Tiere normal hörend sein. Dies hieß, ihre durch AABR-Messung bestimmte Ausgangshörschwelle musste am Tag 0 vor der Ertaubung ≤ 50 dB SPL betragen (KANO u. STARR 1987; MITCHELL et al. 1997).

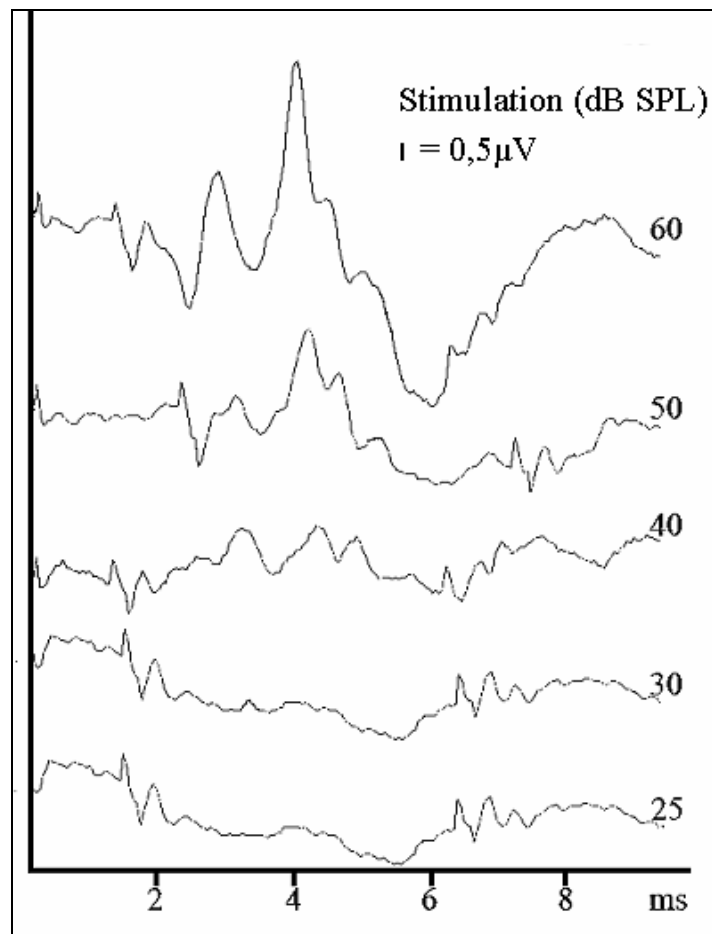


Abb. 8: Auszug aus einer am Versuchstag 0 durchgeführten AABR-Messung (Tier B25) zur Veranschaulichung der Bestimmung der akustischen Hörschwelle. Es sind die ersten 10 ms nach Stimulusgabe gegen die Stimulusamplitude ($0,5 \mu\text{V}$) dargestellt. Die Reizintensitäten sind rechts der jeweiligen Ableitung beschrieben. Die Bestimmung der Hörschwelle erfolgte aufgrund der Amplitude der 3. Welle. Es zeigt sich deutlich, dass die Amplitude der 3. Welle mit sinkender Stimulusintensität abnimmt. Bei einer Stimulation mit 30 dB SPL ist noch eine $0,5 \mu\text{V}$ große Amplitude zu erkennen, bei 25 dB SPL hingegen nicht. Somit lag die akustische Hörschwelle dieses Tieres bei 30 dB SPL. Verzögerung: 0 ms.

4.2.2 Ertaubung von Meerschweinchen

Um die Ausgangssituation eines Cochlea-Implantat-Patienten mit sensorineuralem Hörverlust modellhaft darstellen zu können, muss eine gezielte Zerstörung der Haarzellen im Versuchstier gewährleistet sein. Es sind einige Methoden entwickelt worden, um einen schnellen und totalen Hörverlust bei Meerschweinchen zu erreichen. Aminoglykosidantibiotika sind bekannt für ihr hohes ototoxisches Potential. Einen wirkungsvollen Vertreter dieser Gruppe stellt das Kanamycin dar. WEST et al. (1973) konnten nachweisen, dass eine Kombination Kanamycins mit dem Schleifendiuretikum Ethacrynsäure, welches mit einer Latenz von 2 Stunden verabreicht werden soll, innerhalb von 2 Std. zur permanenten Zerstörung fast aller Haarzellen führt.

Für die Ertaubung der Tiere wurden 400 mg Kanamycin/kg KGW s.c. injiziert. Nach einer Stunde wurden die Tiere narkotisiert (s. 4.2), die akustische Hörschwelle bestimmt (s. 4.2.1) und die Tiere für die Operation vorbereitet. Zunächst wurde ein linksseitiger paramedianer Hautschnitt an der ventralen Halsseite vorgenommen, die Halsmuskulatur den anatomischen Strukturen folgend stumpf durchtrennt und die externe Vena (V.) jugularis vorgelagert. Um das Gefäß wurden drei Schlaufen aus resorbierbarem Nahtmaterial gelegt. Der herzwärtsgelegene Faden wurde legiert während die zwei übrigen locker als Schlaufen um das Gefäß verblieben. Unter mikroskopischer Sicht (10.3) wurde mittels einer feinen chirurgischen Schere (10.2) oberhalb der Legierung eine feine Venotomie durchgeführt, durch welche ein Silikonschlauch (10.2) ca. 1,5 cm in craniale Richtung in die V. jugularis eingeführt wurde. Das Gefäß wurde durch sanftes Anziehen der mittleren Schlaufe um den Schlauch fixiert und die richtige Positionierung des Schlauches durch eine mit NaCl gefüllte Spritze überprüft. Floß bei Aspiration das Blut ohne jegliche Behinderung in den Schlauch bzw. floss bei Injektion keine Flüssigkeit neben das Gefäß, so lag der Schlauch optimal in der Vene. Anschließend wurde die NaCl-Spritze durch die Ethacrynsäure enthaltende Spritze ersetzt und 40 mg/kg KGW des Diuretikums langsam *intra venös* appliziert. Zum durchspülen des Schlauches wurde anschließend wiederum die NaCl-haltige Spritze verwendet. Nach erfolgter Applikation wurde der Schlauch soweit zurückgezogen, dass seine Öffnung zwischen mittlerer und cranialer Schlaufe lag. Die oberste Schlinge wurde straff zugezogen und der Schlauch vollständig entfernt. Anschließend wurde die mittlere Ligatur entfernt, das Gefäß unter Sichtkontrolle zurückgelagert, die Muskulatur

mit resorbierbarem Nahtmaterial (10.2) mittels Einzellheften verschlossen und die Haut mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial (10.2) adaptiert.

4.2.3 Elektroden- und Pumpen-Implantation

Am Vortag der Implantationsoperation wurden die osmotischen Pumpen steril mit der jeweils anzuwendenden Lösung (10.4.1-10.4.4) befüllt.

Der durch MITCHELL et al. (1997) beschriebenen Operationsmethode folgend wurden drei als epidural ableitende Elektroden fungierende Schrauben (M2x4 mm, 10.2) und drei Schrauben zur Befestigung der Stimulatorhalterung implantiert (Abb. 9). Eine medial einen cm caudal des Bregmas positionierte Schraube diente als aktive Elektrode. Einen cm rostral des Bregmas in der Medianen wurde die Referenzelektrode befestigt. Die zweite aktive Elektrode befand sich sinistral einen cm lateral des Bregmas. Zur Fixierung der gegenläufigen Schraube (M3x12mm, 10.2), welche als Halterung des Stimulators diente, wurden drei 2 x 8mm Zylinderschrauben (10.2) triangelförmig um den Medialpunkt des Bregmas positioniert (Abb. 9). Eine zwischen den Schulterblättern liegende subkutane Tasche wurde gefertigt und diente zur Aufnahme der osmotischen Pumpe. Zur Freilegung der linksseitigen Bulla wurden die Haut und das Platysma postaurikulär inzisiert, die Muskulatur nach kaudal verlagert und der mastoidale Anteil des M. sternocleidomastoideus von seinem Ursprung entfernt. Die Bulla wurde von ihrem Periost befreit, das Mittelohr mittels einer 11er Skalpellklinge (10.2) eröffnet und die Rundfenstermembran durch einen Mikrohaken (10.2) zerstört. Sowohl Konnektor als auch Silikonschlauch der Elektroden-Mikropumpen-Konstruktion wurden durch einen subkutanen Gang von postauriculaer in Richtung der dorsalen Schädeloberfläche gezogen. Der Schlauch wurde, um eine Entlastung desselben zu gewährleisten, um die einen cm posterior des Bregmas gelegene Schraube geführt. Die Pumpe wurde angeschlossen und in der subkutanen Tasche zwischen den Scapulae positioniert (BROWN et al. 1993). Alle Schrauben, der Schlauch und der Konnektor (in einer Position, welche das spätere Einfügen des Stimulators ermöglichte) wurden mittels Polymethylmethacrylat (4.1.3) auf der Schädeloberfläche befestigt (MITCHELL et al. 1997). Die Elektrode wurde unter mikroskopischer Sicht vorsichtig über die Rundfensteröffnung etwa 3 mm tief in die Scala tympani eingeführt. Aufgrund der Flexibilität des Materials konnten beide Modelle entlang der natürlichen Schneckenwindung gleiten. Im Falle des monopolaren Elektroden-Mikropumpensystems wurde die Referenzelektrode innerhalb der Bulla an deren Außenwandung

platziert. Zur Kontrolle der Funktionalität und korrekten Positionierung der Elektrode wurde eine intraoperative EABR-Messung durchgeführt. Die Elektrode wurde durch den darauf folgenden Verschluss des Bulladefektes mittels Carboxylatzement (4.1.3) fixiert. Die Wunde wurde in zwei Schichten geschlossen, wobei absorbierbarer Faden für die Adaptation der Muskulatur und Nylonfaden zum Verschluss der Haut verwendet wurden (10.2). Der Operation anschließend erfolgte eine erneute Messung der elektrischen Hörschwelle (4.2.4.)

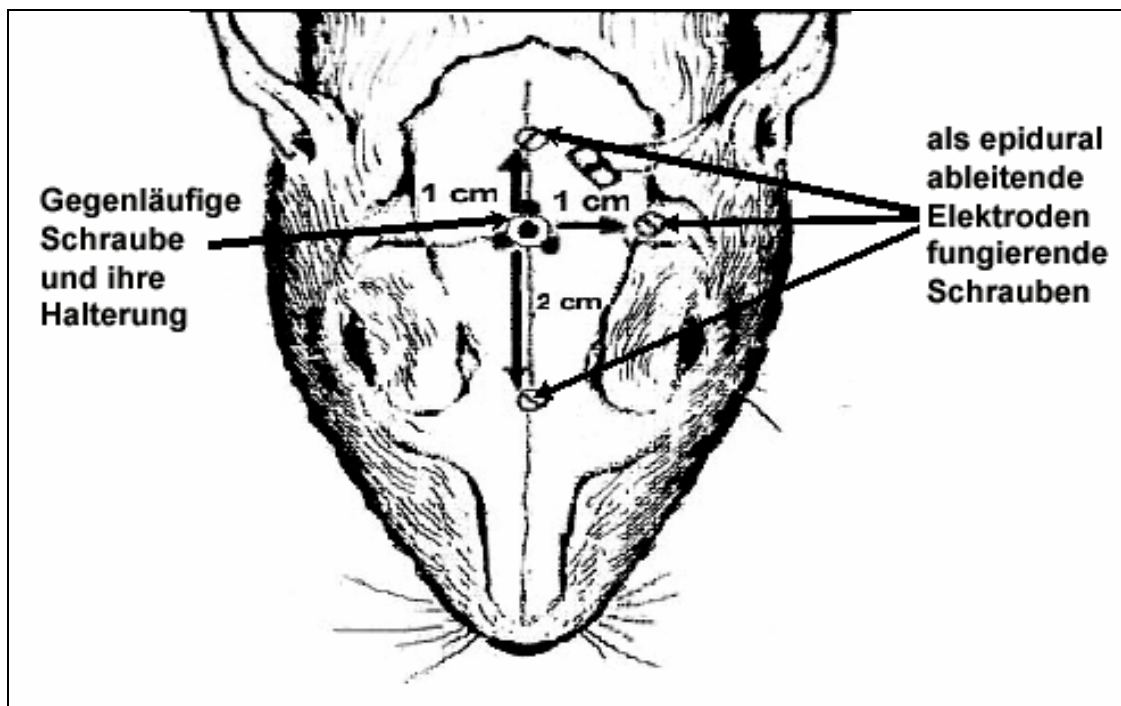


Abb. 9: Schematische Darstellung der Schraubenpositionierung.

4.2.4 Messung elektrisch evozierter auditorischer Hirnstammpotentiale (electrically evoked auditory brainstem response (EABR))

Die intracochleäre akute elektrische Stimulation der Tiere zur Bestimmung der elektrischen Hörschwelle fand direkt nach der Implantation der Elektrode sowie am 28., 34., 41. und 48. Tag nach der Ertaubung statt. Die genaue Beschreibung der EABR-Messeinheit erfolgt in 4.1.2.3 b).

Die monophasischen elektrischen Signale wurden durch den integrierten Signalgenerator der Messapparatur (*Viking IV*) erzeugt, getriggert und an den Frequenzgenerator weitergeleitet. Durch die Triggierung konnte eine reizsynchrone Aufnahme und dadurch die zeitliche Kopplung zwischen Reiz und Ableitung der Reizantwort hergestellt

werden. Durch den Frequenzgenerator war die Präsentation von 50 μsec dauernden Strompulsen mit einer Wiederholungsrate von 50 Pulsen pro Sekunde (pulses per second, pps) möglich. Eine „Biphasische Box“ diente der Umwandlung der monophasischen Pulse in biphasische Rechteckimpulse, zudem war an ihr die Stromstärke zwischen 0-1 mA einstellbar. Die registrierten Antworten des Hirnstammes wurden bezogen auf 500 präsentierte Stimuli gemittelt. Die Stimulusintensität wurde in 10 μA Schritten verändert und so die elektrische Hörschwelle bestimmt. Als elektrische Hörschwelle wurde die niedrigste Stromstärke (μA) bezeichnet, welche eine Amplitude von 1 μV oder größer hervorrief (YAMAGATA et al. 2004). Abbildung 10 zeigt anhand eines Tieres der BDNF+ES-Gruppe beispielhaft die mittels EABR-Messung ermittelten Ableitungen sowie die bei diesem Tier messbare Verbesserung der Hörschwelle zwischen dem Tag der Implantation und dem Tag des Versuchsendes.

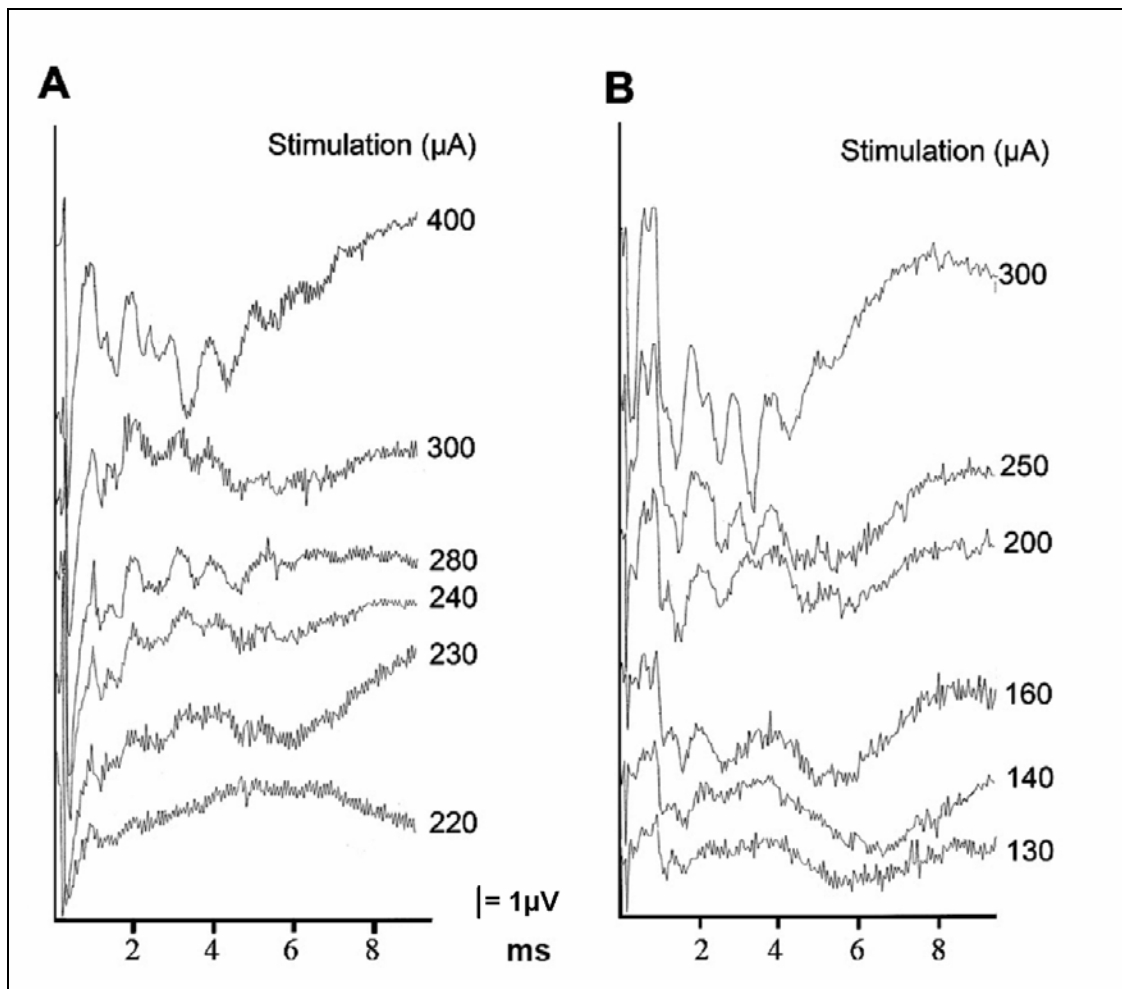


Abb. 10: Beispielhafte Darstellung der gemittelten Potentiale der am 21. (A) und 48. (B) Versuchstag durchgeführten EABR-Messung (Tier 23) zur Veranschaulichung der Hörschwellenbestimmung. Die bei unterschiedlichen Stromstärken (μA) gemittelten Ableitungen sind gegen die Zeitdauer (ms) nach Stimulusgabe aufgetragen und zur besseren Veranschaulichung je Messtag in einem Graphen dargestellt. Die jeweiligen Stimulusintensitäten sind rechts neben der zugehörigen Ableitung angegeben. In Abbildung A ist bei einer Stimulation mit 230 μA bei 2 ms eine PIII Welle mit einer höheren Amplitude als 1 μV zu sehen, welche bei der Anwendung von 220 μA nicht zu beobachten ist. Somit liegt die elektrische Hörschwelle dieses Tieres nach Implantation bei 230 μA . 27 Tage später lässt sich bereits bei einer Stimulationsstärke von 140 μA eine PIII Welle mit einer größeren Amplitude als 1 μV beobachten, welche bei der Anwendung von 130 μA noch nicht darstellbar ist. Somit liegt die EABR-Hörschwelle an diesem Tag bei 140 μA und hat sich gegenüber der Ausgangshörschwelle um fast 100 μA verbessert.

4.2.5 Chronische elektrische Stimulation

Die chronische elektrische intracochleäre Stimulation der Tiere der AP+ES(M)-Gruppe, der GDNF+ES-Gruppe, der BDNF+ES-Gruppe, der AP+ES(B)-Gruppe und der DEX+ES-Gruppe durch einen portablen Stimulator (4.1.2.3 c)) begann drei Tage nach der Implantationsoperation, um den Tieren eine Phase der Erholung zu gewähren. 24 Tage lang wurden den Tieren 250 biphasische spannungsstabilisierte Pulse pro Sekunde mit einer Dauer von jeweils 100 μ s pro Phase in einem 40 zu 60 Arbeitszyklus (40% duty cycle) 8 dB oberhalb der am Tag 21 ermittelten elektrischen Hörschwelle präsentiert (Abb. 11).

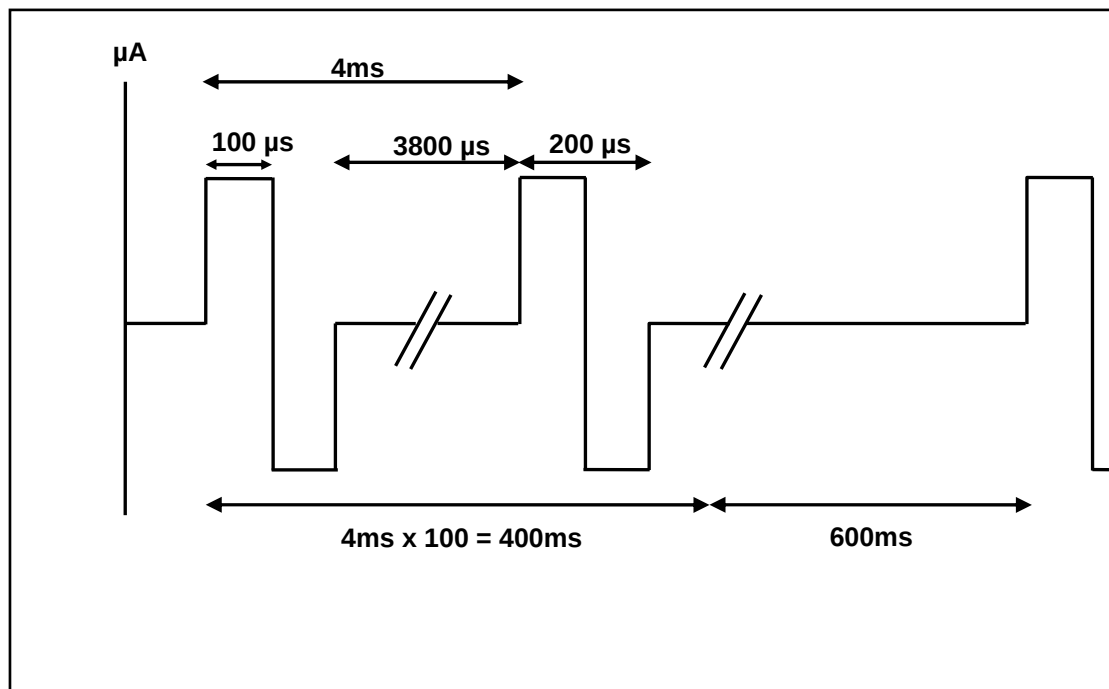


Abb. 11: Darstellung der Parameter der chronischen elektrischen Stimulation: Biphasische Rechteckpulse unterschiedlicher Intensität (0 - 1000 μ A); Pulsbreite: 200 μ s; Reizfrequenz: 250 Hz; Stimulusburst: 4 ms; Interburstintervall: 600 ms.

An den Tagen 28, 34 und 41 fanden jeweils erneute EABR-Messungen statt. Im Falle einer veränderten elektrischen Hörschwelle wurde der Stimulator neu justiert und der neuen Reizschwelle des Tieres angepasst, so dass wiederum 8 dB oberhalb der Hörschwelle stimuliert wurde.

Die Stimulatoren wurden jeweils auf einen 2 dB oberhalb der elektrischen Hörschwellen liegenden μ A-Wert eingestellt. Die Bestimmung der Hörschwelle erfolgte bei einer Pulsbreite von 50 μ s während mit einer Pulsbreite von 100 μ s chronisch

elektrisch stimuliert wurde. Dies ergibt einen verdoppelten Ladungseintrag ins Gewebe, der einer Stimulation mit verdoppelter Stromstärke bei gleich bleibender Pulsbreite entspricht. Die Berechnung der um 8 dB erhöhten Stimulationsstärke erfolgte nach folgender Gleichung: $\text{dB} = 20 \times \log (\text{Stromstärke}/\text{Hörschwelle})$, $\text{Stromstärke} = 10^{0,05 \times \text{dB}} \times \text{Hörschwelle}$. Hieraus ergibt sich nach obiger Formel eine Korrektur von 6 dB und damit eine Stimulation von 8 dB oberhalb der Hörschwelle für alle Versuchsgruppen mit elektrischer Stimulation.

4.2.6 Pumpenwechsel

Da die verwendeten Mikropumpen eine Applikationsdauer von 14 Tagen aufwiesen, die Tiere jedoch 27 Tage mit Substanzen versorgt werden sollten, fand am 13. Tag nach der Implantation ein Wechsel der Pumpen statt. Hierfür wurde am narkotisierten Tier ein medianer Hautschnitt zwischen den Schulterblättern geführt, die Pumpe vorgelagert, vom Applikationsschlauch getrennt und eine neue Pumpe befestigt. Diese wurde subcutan in die Position der verbrauchten Pumpe gebracht und die Wunde wurde dreischichtig verschlossen.

4.2.7 Gewinnung und Aufarbeitung der Cochleae

4.2.7.1 Transkardiale Perfusion

Am 48. Versuchstag wurden die Tiere anästhesiert (s. 4.2) und AABR- und EABR- Messungen wurden durchgeführt. Nach nochmaliger i.m. Injektion einer vollen Narkosedosis wurden die Tiere transkardial perfundiert. Ziel war es, einen gleichmäßigen Strukturenerhalt und eine blutfreie Cochlea zu erreichen. Dem betreffenden Tier wurden 10 ml Xylonest[®] s.c. entlang der nachfolgenden Schnittlinien verabreicht: 1. median entlang der Linea alba bis zum Schlüsselbein, 2. in einem Bogen von der Apertura thoraxis bis in die rechte Achselhöhle, 3. dem rechten letzten Rippenbogen ca. 2 cm folgend. Zunächst wurde eine Thorakotomie durchgeführt, das Herz freigelegt und der Herzbeutel eröffnet. Ein Schnitt in den rechten Vorhof ermöglichte den Abfluss von Blut und Perfusionslösung (REUTER 1997). In die linke Kammerwand wurde eine an ein Infusionsgerät angeschlossene Kanüle (10.2) eingeführt über welche dem Herzen zunächst 200 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline, PBS (10.4)) zur Ausspülung des Blutes aus dem Kreislaufsystem zugeführt wurde. Anschließend wurde der Körper durch Zufuhr von 200 ml 5%igen Glutardialdehyds (GDA (10.1)) fixiert.

4.2.7.2 Pumpentest

Nach erfolgter Perfusion wurde die Haut oberhalb der Mikropumpe eröffnet. Die korrekte Adaptation der Pumpe am Silikonschlauch wurde ebenso kontrolliert wie die Färbung der Flüssigkeit im Schlauch.

Stichproben (n=22) der Mikropumpen wurden auf ihre Funktionalität untersucht. Hierfür wurde der Silikonschlauch 3cm vor der Pumpe durchtrennt. Mittels einer Kanüle und einer Spritze wurde der Schlauch vom 0,5. bis 1. Zentimeter mit Mineralöl (10.1) und vom 1. bis zum 2. Zentimeter mit Hämalaun-Lösung (10.1) gefüllt. Die Öffnung des Schlauches wurde einen Zentimeter weit mit Öl verschlossen. Anschließend wurden die Pumpen-Schlauch-Kombinationen in einem Glasbehälter in NaCl gelagert und in einem Wärmeschrank bei 37°C aufbewahrt. Nach 12 Stunden wurde die Bewegung der blauen Flüssigkeitsstrecke beurteilt. Hatte sich diese in Richtung der Schlauchöffnung bewegt, so war die entsprechende Pumpe funktionell intakt. Alle getesteten Pumpen wiesen volle Funktionalität auf.

4.2.7.3 Felsenbeinentnahme und Gewinnung der Cochleae

Der Fixierung folgten die Dekapitierung und die Abpräparation der Schädelhaut. Die Schädeldecke wurde durch zwei Scherenschnitte (10.2) vom Hinterhauptslöcher in Richtung rostral zu den caudalen Augenwinkeln hin gelöst und durch Umklappen nach rostral entfernt. Nach Entfernung der Hirnanteile wurden die Felsenbeine manuell aus dem Schädel heraus gebrochen und in PBS (10.4) überführt. Die weitere Dissektion erfolgte unter einem Auflichtstereomikroskop (10.3) mittels feiner Uhrmacherpinzetten (10.2). Dabei wurde zunächst das Felsenbein eröffnet und die Bullawand großflächig entfernt. An den rechten Cochleae wurde sowohl das runde wie auch das ovale Fenster mittels einer feinen Pinzette (10.2) zerstört. An den linken Cochleae wurde das ovale Fenster eröffnet und die Elektroden vorsichtig entfernt. Allen Cochleae wurde eine kleine Öffnung in den Apex gebohrt. Anschließend wurden sie vom runden Fenster aus in Richtung Apex mit 4% GDA vorsichtig durchgespült, in 4%iges GDA überführt und für 24 Stunden bei 4°C im Dunkeln fixiert.

4.2.7.4 Aufbereitung der Cochleae für die lichtmikroskopische Untersuchung

Im Anschluss an den Fixationsvorgang wurden die Cochleae mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwingtisch (10.3) in einer 20%igen Tri-Natriumcitrat Pufferlösung (10.4) gespült, wobei die Flüssigkeit nach Bedarf, aber mindestens 3 Mal,

erneuert wurde. Zur Entkalkung wurden die Cochleae bei Raumtemperatur in Entkalkungslösung (10.4) gelagert welche täglich gewechselt wurde. Die Verweildauer war vom jeweiligen Verknöcherungsgrad abhängig und betrug ungefähr 2 Wochen. Erneute Zugabe von Spülpuffer und eine Einwirkzeit von einer Stunde auf dem Schwingtisch beendeten die Entkalkung. Die Entwässerung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe: 50%iges, 70%iges, 90%iges und 100%iges Ethanol, wobei die einzelnen Konzentrationen jeweils 2 Std. einwirkten. Über Nacht erfolgte die Einwirkung reinsten Methylbenzoats (10.1). Am darauf folgenden Tag wurde das Methylbenzoat verworfen und die Einbettung der Präparate in Paraffin erfolgte: die Cochleae wurden mit flüssigem Paraffin durchtränkt und über Nacht im 65°C warmen Trockenschrank belassen. Nachfolgend wurden sie mit senkrecht stehender Schneckenachse in Einbettschälchen gestellt, welche mit Paraffin ausgegossen wurden. Die Paraffin-Cochlea-Blöcke erkalten bei Zimmertemperatur und wurden bei – 21°C gelagert.

4.2.8 Schneiden und Färben der Cochleae

Die Paraffin-Cochlea-Blöcke wurden aus ihren Schälchen herausgelöst und auf kleine Holzklötze aufgeschmolzen, welche in die Präparathalterung des Mikrotoms eingesetzt wurden. Serienschnitte mit einer Stärke von 5 µm wurden angefertigt. Die Schnittrichtung wurde senkrecht zur Modiolusachse gewählt. Alle Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Die beschickten Objektträger wurden nach folgendem Hämalaun/Eosin-Färbeschema weiterbehandelt:

- | | |
|--------------------|-------------------------|
| 1. Xylol | 2x 5 min |
| 2. Carbol-Xylol | 5 sec. |
| 3. 100% Ethanol | 5 min |
| 4. 90% Ethanol | 5 min |
| 5. 70% Ethanol | 5 min |
| 6. Aqua dest. | 5 min |
| 7. Hämalaun | 6 min |
| 8. Leitungswasser | 8 min, anfangs wechseln |
| 9. Eosin | 2,5-3 min |
| 10. Leitungswasser | 5 min |
| 11. 70% Ethanol | 2,5 min |
| 12. 90% Ethanol | 2,5 min |
| 13. 100% Ethanol | 2,5 min |
| 14. Carbol-Xylol | 5 sec. |
| 15. Xylol | 2x 5 min |

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Entellan® eingedeckelt und für mindestens 24 Stunden zum Trocknen unter einen Abzug gestellt.

4.2.9 Lichtmikroskopische Auswertung

Ein mitmodiolarer Schnitt wurde zufällig ausgewählt. Dieser erste Schnitt und jeder fünfte nachfolgende Schnitt wurden analysiert. Insgesamt wurden je Cochlea 5 Schnitte mit je 7 Querschnitten des Rosenthalschen Kanals für die quantitative Analyse der SGZ herangezogen. Die Rosenthalschen Kanäle wurden entlang der Windung von basal nach apikal als untere basale und obere basale Windung, als erste, zweite, dritte und vierte mittlere Windung sowie als apikale Windung bezeichnet (Abb. 12). In jedem Paraffinschnitt wurde jeder Querschnitt des Rosenthalschen Kanals beurteilt.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops (10.3) und einer CCD-Camera (10.3) mit angeschlossenem rechnergestütztem Bildbearbeitungssystem Analysis[®] (10.3). Zunächst erfolgte eine digitale Aufnahme jedes Rosenthalschen Kanals. Deren Kontur wurde mittels des Bildverarbeitungsprogramms nachgezogen und die jeweilige Fläche wurde computergestützt berechnet. Nachfolgend wurde die SGZ-Zahl pro Querschnitt bestimmt (Abb.13).

Einschlusskriterien für die SGZ in die Zählung waren ein Neurondurchmesser von mindestens 12 μm und ein sichtbarer Nucleus, wobei keine Differenzierung zwischen Typ I- und Typ II-SGZ (SPOENDLIN 1975) vorgenommen wurde. Aus der Fläche eines Rosenthalschen Kanals und der sich darin befindenden SGZ-Anzahl wurde die SGZ-Dichte berechnet, welche als Spiralganglienzellen pro 10.000 μm^2 ($\text{SGZ}/10.000 \mu\text{m}^2$) angegeben wurde. Auf Grund von Variabilitäten beim Schneidevorgang waren im apikalen Bereich der Cochlea nicht immer zuverlässige Flächenbestimmungen und Messungen der SGZ-Zahl möglich. Daher wurden diese Werte mit denen der vierten mittleren Windung kombiniert.

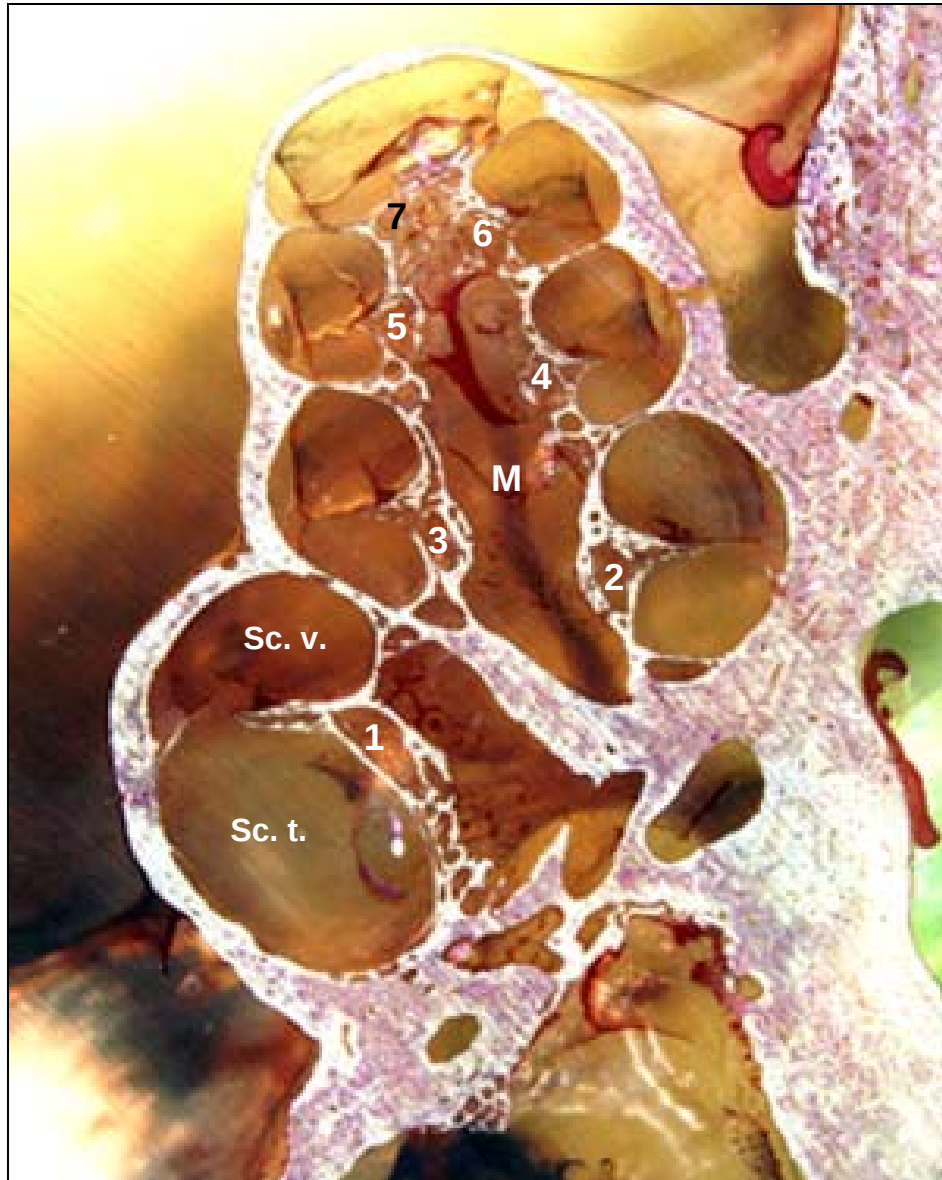


Abb. 12: Mitmodiolares Schliffbild einer Meerschweinchencochlea zur Erläuterung der Benennung der Rosenthalschen Kanäle. 1: untere basale Windung; 2: obere basale Windung; 3: erste mittlere Windung; 4: zweite mittlere Windung; 5: dritte mittlere Windung; 6: vierte mittlere Windung; 7: apikale Windung; Sc. t.: Scala tympani; Sc. v.: Scala vestibuli; M: Modiolus

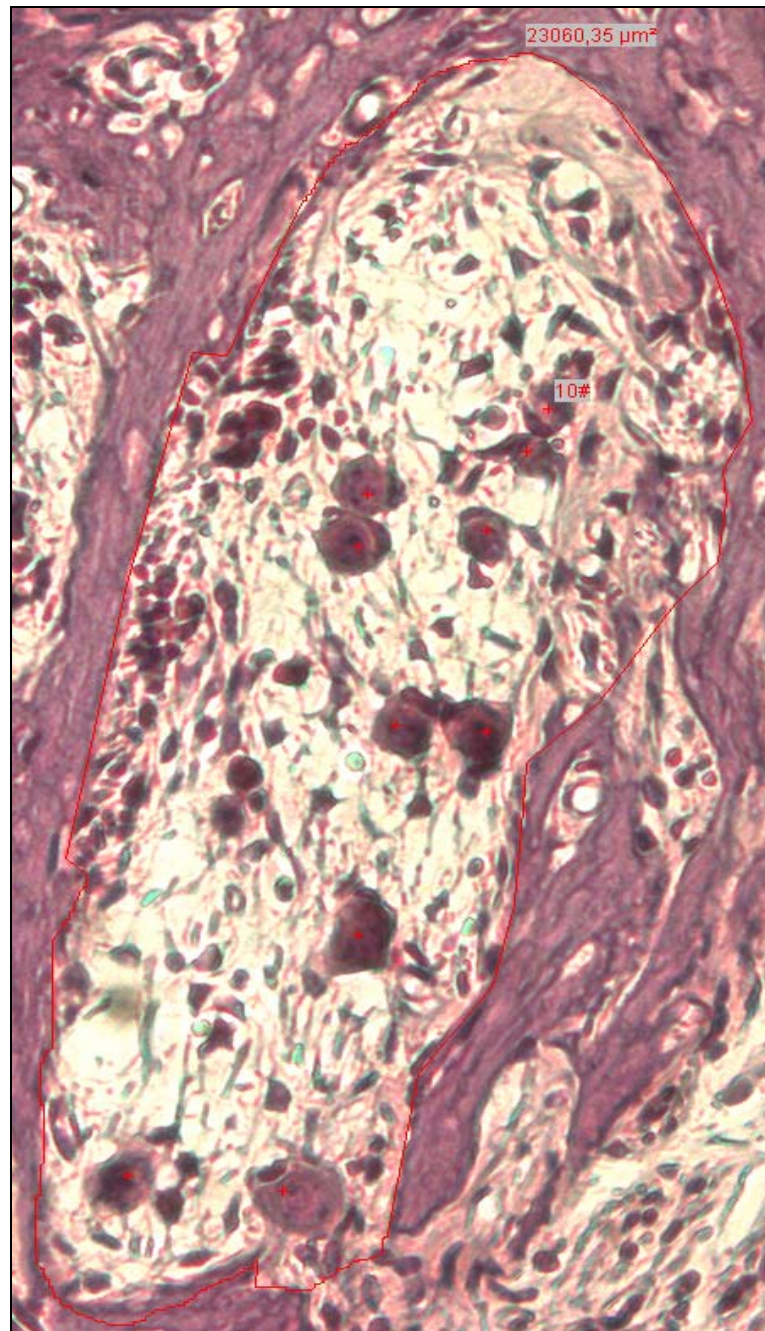


Abb. 13: Beispielhafte Darstellung der computergestützten Auswertung der Spiralganglienzelldichte eines Rosenthalschen Kanals. Die rote Linie beschreibt die äußere Grenze des Kanals welche manuell nachgezogen wurde. Das Analysis[®]-System errechnete die Fläche des mit der Markierung erfassten Bereichs (rechter oberer Bildbereich, in diesem Fall 23060,35 µm²). Wiederum manuell wurden die überlebenden Spiralganglienzellen durch Mausklick gekennzeichnet (rote Additionszeichen) und das Computerprogramm errechnete bei Beendigung der Messung die Gesamtzahl der Nervenzellen (hier: 10 SGZ). Vergrößerung: 200fach.

4.2.10 Statistische Auswertung und Bindegewebsbeurteilung

Die statistische Auswertung der SGZ-Dichten erfolgte mittels GraphPad Prism[®]. Zunächst wurde eine Prüfung der Daten auf Normalverteilung durchgeführt. Nachfolgend wurde der t-Test für abhängige Stichproben für die Analyse der SGZ-Dichten-Differenz zwischen den behandelten linken und ertaubten, aber ansonsten unbehandelten rechten Cochleae innerhalb der Tiere einer Gruppe herangezogen. Die Zelldichten der verschiedenen Gruppen wurden mittels eines multiplen Gruppenvergleiches mit Adjustierung nach Bonferroni verglichen.

Das Bindegewebswachstum in der Scala tympani und dem assoziierten Mittelohr der implantierten (= linken) Cochleae wurde anhand einer Skala von 0 (= kein Bindegewebe vorhanden) bis +++ (= maximale Ausprägung des Bindegewebes) beurteilt. Die genaue Aufschlüsselung wird unter 5.5.1. beschrieben.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der AABR-Messungen

Akustisch evozierte Hirnstammpotential (AABR)-Messungen wurden bei allen Tieren am 0., 5. oder 6., 21., 34., und 48. Versuchstag durchgeführt. Die Tiere der elektrisch stimulierten Gruppen wurden am 28. und 41. Versuchstag zu zusätzlichen akustischen Messungen herangezogen (Abb. 14).

An Tag 0 wurden die Ausgangshörschwellen aller Tiere vor dem Ertaubungseingriff bestimmt. Die höchste gemessene Hörschwelle lag bei 50 dB, die niedrigste bei 25 dB. Der Durchschnitt betrug 35 dB. Somit galten alle Experimentaltiere als normal hörend und konnten in den Versuch einbezogen werden (KANO u. STARR 1987) (Abb. 14).

Der Erfolg der Ertaubung wurde am 5. oder 6. Versuchstag an allen Tieren exklusive einem, welches von der Ertaubungsoperation noch nicht vollständig genesen war, verifiziert. Bei allen untersuchten Meerschweinchen erhöhte sich die Hörschwelle (Abb. 14). Die geringste Zunahme betrug 60 dB, die höchste 100 dB. Im Mittel lag die Hörschwellenzunahme bei 76 dB. Somit galten alle Tiere als ertaubt und konnten an weiteren Versuchen teilnehmen (MITCHELL et al. 1997).

Vor der Implantation der Elektroden-Mikropumpensysteme an Tag 21 fand eine erneute AABR-Messung statt (Abb. 14). Verglichen mit den vor der Ertaubung ermittelten Hörschwellen zeigten alle Tiere eine Erhöhung der individuellen Hörschwelle von mindestens 60 dB. Im Vergleich zur Messung am 5. Experimentaltag gab es bei 12 Tieren keine Veränderung der Hörschwelle. Eine Erhöhung war bei 16 Tieren zu beobachten und 20 Meerschweinchen zeigten eine Erniedrigung der akustischen Hörschwelle. Die Hörschwelle des an Tag 5 nicht gemessenen Meerschweinchens lag am 21. Versuchstag bei 110 dB. Die Ausgangshörschwelle dieses Tieres betrug 35 dB.

Die Hörschwelle aller elektrisch stimulierten Tiere erhöhte sich zwischen Tag 21 und Tag 28 des Versuches um mindestens 5 dB (Abb. 14). Die AP+ES(B)-Gruppe zeigte mit einer durchschnittlichen Hörschwellenerhöhung von 7 dB die geringste Steigerung, die AP+ES(M)-Gruppe und die BDNF+ES-Gruppe lagen mit durchschnittlich 15 bzw. 17 dB Hörschwellenerhöhung im Mittelfeld und die DEX+ES-Gruppe und die

GNDF+ES-Gruppe zeigten mit einem Durchschnittswert von 24 bzw. 26 dB die größte Zunahme.

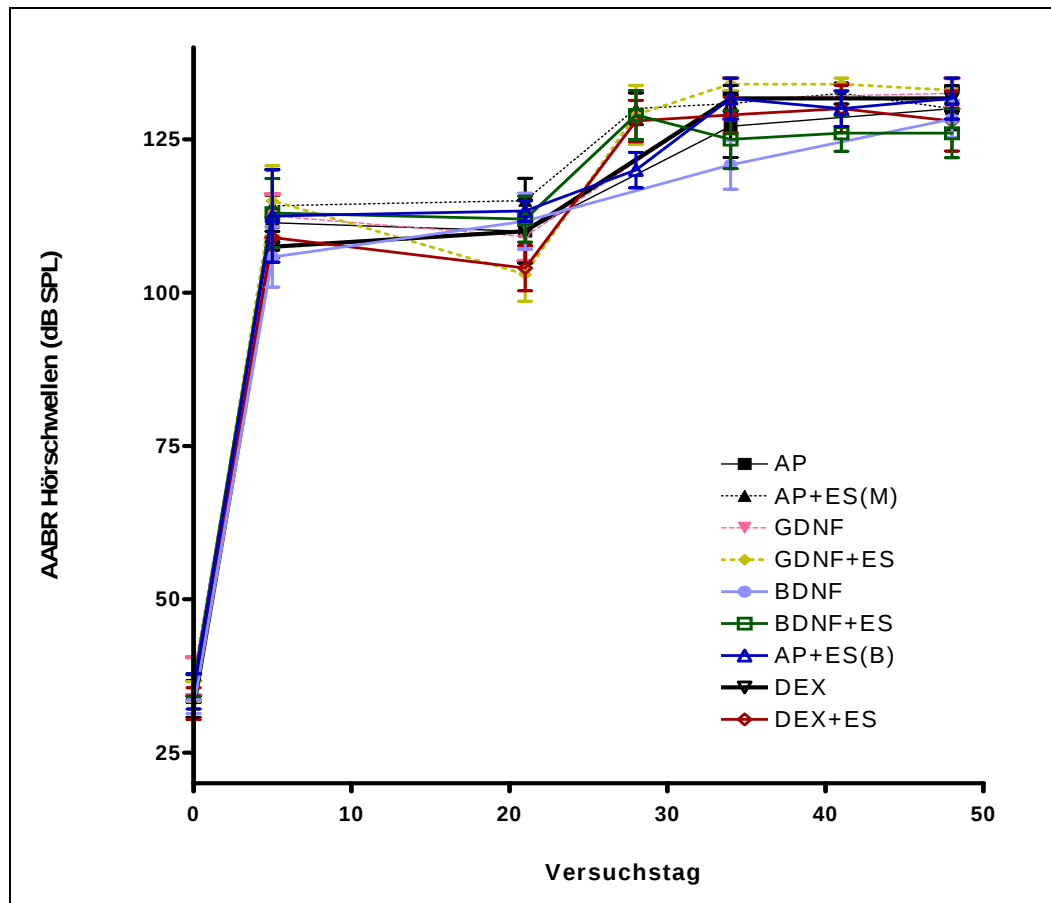


Abb. 14: Darstellung der an den Versuchstagen 0, 5 oder 6, 21, 28, 34, 41 und 48 gemessenen durchschnittlichen akustischen Hörschwellen (Symbole) sowie der jeweiligen Standardfehler (vertikale Balken) aller Experimentalgruppen. Die Ausgangshörschwellen aller Tiere erhöhten sich nach Ertaubung (Tag 0) um mindestens 60 dB. Auch nach der Implantation (Tag 21) zeigten alle Experimentalgruppen eine durchschnittliche Zunahme der Hörschwellen.

Am 13. Tag nach der Implantation (Versuchstag 34) zeigte sich, dass sich die Hörschwellen fast aller Mitglieder der Experimentalgruppen, verglichen zu den an Tag 21 gemessenen Schwellen, erhöht hatten (Abb. 15). Drei Tiere, aus jeweils verschiedenen Versuchsgruppen, zeigten am 34. Versuchstag die gleiche HS wie am Tag der Implantation. Bei manchen Individuen erhöhte sich die HS um 5 dB, bei anderen um bis zu 40 dB. Im Durchschnitt lag die Hörschwellenerhöhung bei 19 dB.

Die Hörschwellen der Tiere der stimulierten Gruppen erhöhten sich in 10 Fällen, welche auf alle Gruppen verteilt waren, zwischen Tag 28 und Tag 34 noch einmal. Bei 11 Tieren ließ sich am 34. Versuchstag die gleiche HS wie am 28. Tag messen. Je ein Mitglied der AP+ES-Gruppe und der DEX+ES-Gruppe zeigte an Tag 34 eine Erniedrigung der HS um 5 dB. Bei einem Tier der BDNF-Gruppe wurde am 34. Tag eine gegenüber der Tag-28-Hörschwelle um 25 dB verminderte HS gemessen. Im Durchschnitt erhöhten sich die Hörschwellen der AP+ES(M)-Gruppe (0,8 dB), der GDNF+ES-Gruppe (5 dB), der AP+ES(B)-Gruppe (11 dB) und der DEX+ES-Gruppe (1 dB). Der Mittelwert der Hörschwellen der BDNF+ES-Gruppe lag 4 dB unterhalb des an Tag 28 gemessenen Durchschnittes (Abb. 15).

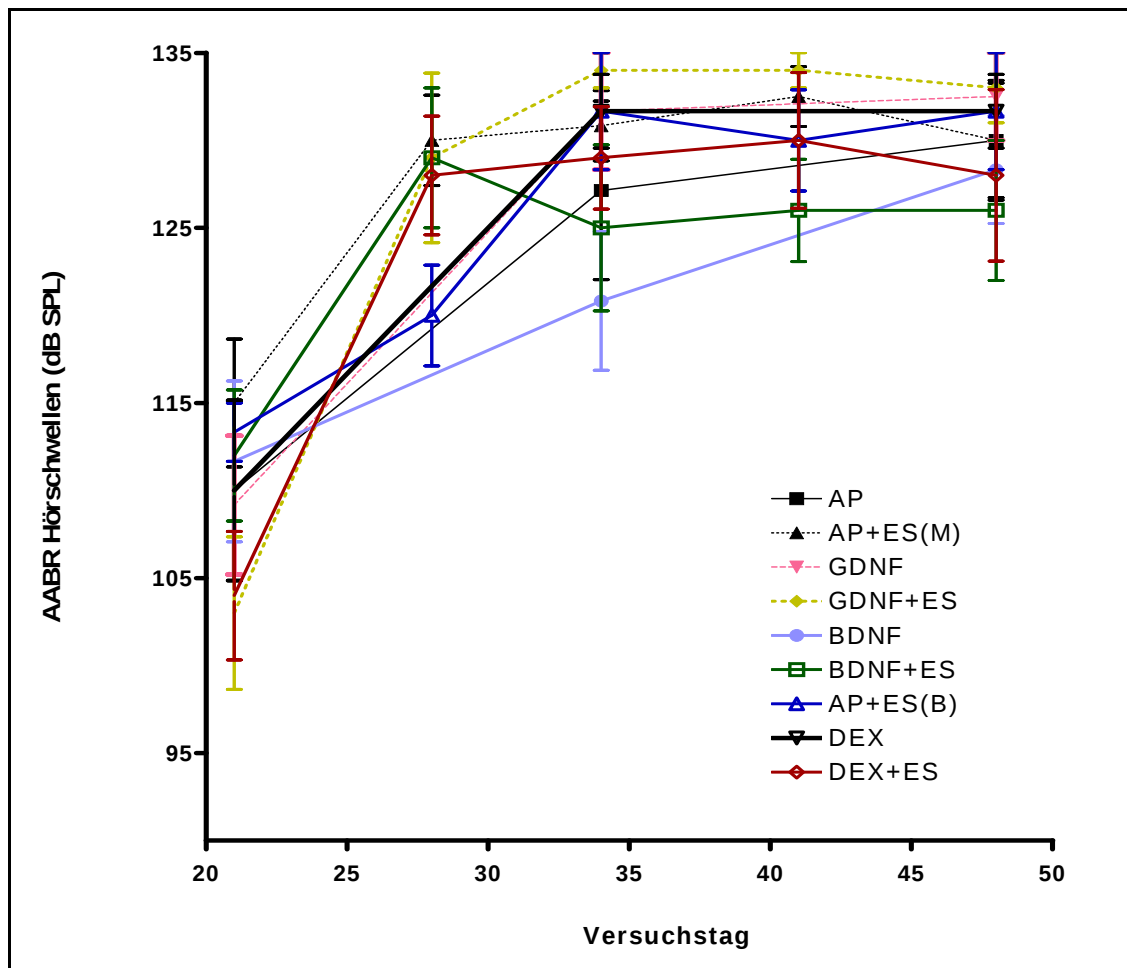


Abb. 15: Darstellung des Verlaufs der durchschnittlichen AABR-Hörschwellen (Symbole) und der jeweiligen Standardfehler (vertikale Balken) der unstimulierten Versuchsgruppen an den Versuchstagen 21, 34, und 48 sowie der stimulierten Versuchsgruppen an den Versuchstagen 21, 28, 34, 41 und 48. Bei allen Gruppen war nach der Implantation (Tag 21) eine Erhöhung der Hörschwelle zu beobachten.

Die an Tag 41 bei den elektrisch stimulierten Tieren durchgeführten AABR-Messungen zeigten, dass es im Vergleich zu den am 34. Versuchstag ermittelten Hörschwellen, in jeder Versuchsgruppe Tiere mit unveränderter HS, erhöhter HS und erniedrigter HS gab. Der Vergleich der am 41. und 48. Versuchstag gemessenen Hörschwellen zeigt einen ähnlich durchsetzten Verlauf (Abb. 15).

Der Vergleich der am 21. Versuchstag unmittelbar vor der Implantationsoperation gemessenen Hörschwellen mit den am 48. Tag gemessenen zeigte, dass sich die Schwellen fast aller Tiere erhöhten. Nur ein Tier der AP-Gruppe zeigte keine HS-Veränderung und ein Tier der DEX-Gruppe zeigte eine Verbesserung um 5 dB. Durchschnittlich erhöhte sich die Hörschwelle bei den mit AP behandelten Tiere von Tag 21 bis Tag 48 um 20 dB, bei der AP+ES(M)-Gruppe um 15 dB, bei der GDNF-Gruppe um 23 dB, bei den mit GDNF und ES behandelten Tieren um 30 dB, bei der BDNF-Gruppe um 17 dB, bei der BDNF+ES-Gruppe um 14 dB, bei der AP+ES(B)-Gruppe um 18 dB, bei der DEX-Gruppe um 22 dB und bei der mit DEX und ES behandelten Gruppe um 24 dB (Abb. 15).

5.2 Ergebnisse der EABR-Messungen

Die Messungen der elektrisch evozierten auditorischen Hirnstammpotentiale (EABR) wurden an den chronisch elektrisch stimulierten Tieren am 21., 28., 34., 41. und 48. Versuchstag durchgeführt. In Ergänzung zu den Untersuchungen bezüglich des SGZ-Überlebens unter GDNF-, BDNF- und DEX-Therapie in Kombination mit elektrischer Stimulation wurden die Auswirkungen dieser Interventionsmethoden auf die elektrische Hörschwelle (HS) untersucht. Verglichen wurde der Hörschwellenverlauf von Tieren die artifizielle Perilymphe über 27 Tage intracochleaer appliziert bekamen und entweder monopolar (MedEl-Elektroden-Mikropumpensystem) oder bipolar (Cochlear-Elektroden-Mikropumpensystem) stimuliert wurden. Die elektrisch evozierten Hörschwellen der Tiere dieser Gruppen wurden zudem mit denen von solchen verglichen, welche mittels eines MedEl-Implantats chronisch elektrisch stimuliert wurden und zeitgleich GDNF oder DEX intracochleaer appliziert bekamen oder bipolar stimuliert wurden und zeitgleich BDNF verabreicht bekamen (Abb. 16). Normwert für die Beurteilung des Hörschwellenverlaufs jeder Versuchsgruppe waren die bei Implantation der Elektrode für jede Versuchsgruppe ermittelten durchschnittlichen Ausgangshörschwellen (Tab.3)

Tabelle 3: Darstellung der durch Messung der elektrisch evozierten auditorischen Hirnstammpotentiale (EABR) ermittelten mittleren Ausgangshörschwellen sowie Standardabweichungen der elektrisch stimulierten Versuchsgruppen. Die Mittelwerte der Ausgangshörschwellen dienten als Normwerte zur Beurteilung der Entwicklung der elektrischen Hörschwelle im Versuchsverlauf.

Versuchsgruppe	AP+ES(M)	GDNF+ES	DEX+ES	BDNF+ES	AP+ES(B)
Mittlere EABR-Hörschwelle (μA) und Standardabweichung	158,3 $\pm 27,87$	251,7 $\pm$ 138,5	281,7 $\pm$ 99,08	288,3 $\pm$ 130,4	303,3 $\pm 140,1$

Wie Abbildung 16 zeigt, wiesen die Tiere der AP+ES(M)-Gruppe die niedrigsten Ausgangshörschwellen auf. Die Werte lagen bei allen 6 Tieren zwischen 120 und 190 μV (Mittel: 158 μV). Die Ausgangshörschwellen der Mitglieder der GDNF+ES-Gruppe lagen zwischen 110 und 510 μV (Mittel: 266 μV), die der BDNF+ES-Gruppe zwischen 230 und 530 μV (Mittel: 318 μV), die der AP+ES(B)-Gruppe zwischen 190 und 460 μV (Mittel: 303 μV) und die der DEX+ES-Gruppe zwischen 180 und 290 μV (Mittel: 246 μV).

Sowohl die GDNF+ES-Gruppe als auch die AP+ES(B)-Gruppe zeigten im gesamten Versuchsverlauf eine stetige Verringerung der durchschnittlichen elektrischen Hörschwelle. Die mittlere HS der DEX+ES-Gruppe stieg nach der Innenohrmanipulation zunächst um 10 μV an, um im weiteren Verlauf des Versuches permanent bis auf knapp 180 μV zu sinken. Die durchschnittliche HS der mit einer Kombination aus BDNF und elektrischer Stimulation behandelten Tiere fiel zwischen Tag 21, 28 und 34 von 318 μV auf 262 μV und 246 μV . Zwischen dem 34. und 41. Versuchstag erhöhte sich die HS um 52 μV auf 298 μV , um schlussendlich bis zum 48. Experimentaltag wieder auf 264 μV zu sinken (Abb. 16). In der AP+ES(M)-Gruppe erhöhte sich die durchschnittliche HS zwischen dem Zeitpunkt der Implantation und der Messung am 34. Versuchstag von 158 μV über 178 μV auf 228 μV . Am 41. Tag war eine Verringerung der mittleren HS auf 178 μV messbar, welche bis zur Tag 48-Messung auf 188 μV stieg.

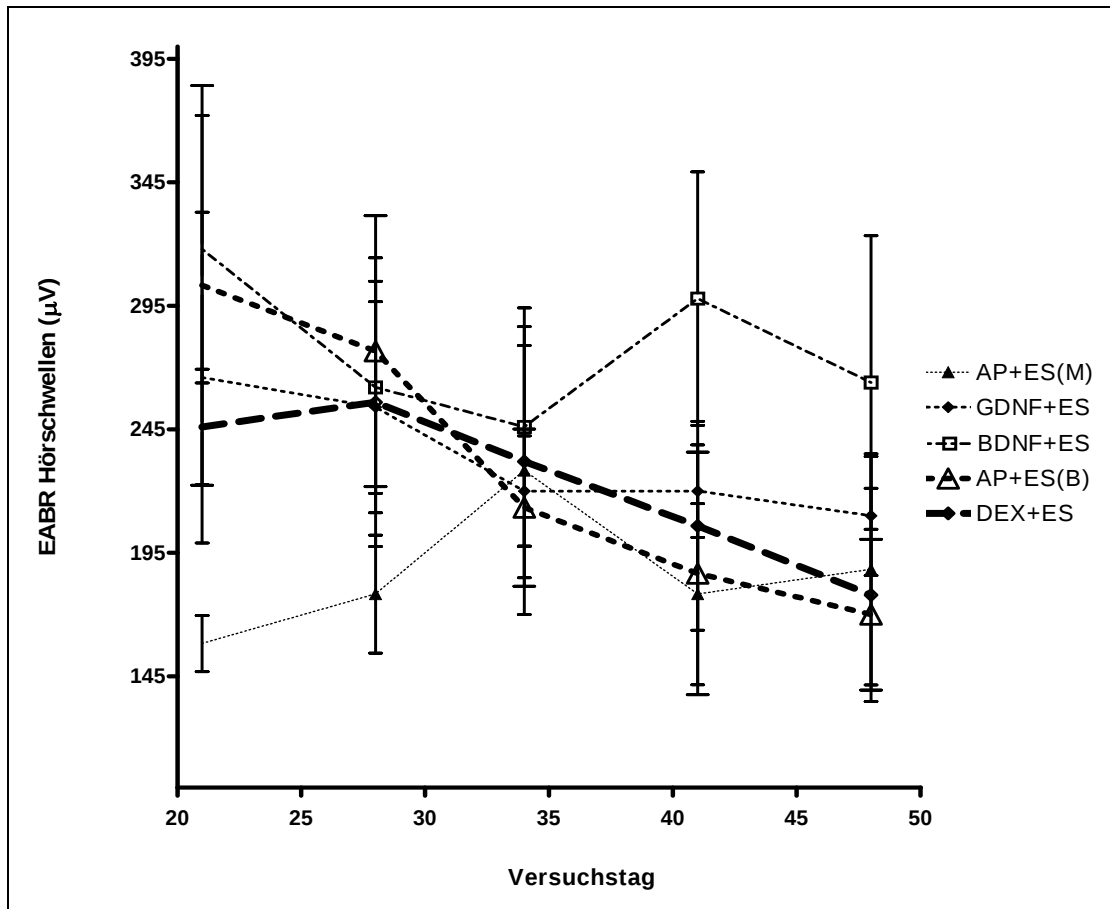


Abb. 16: Darstellung des Verlaufs der durchschnittlichen Hörschwellen der elektrisch stimulierten Versuchsgruppen vom Tag der Implantation (Tag 21) über Tag 28, 34, 41 bis zum 48. Versuchstag. Gezeigt werden die Mittelwerte (Symbole) und die jeweiligen Standardfehler (vertikale Balken). Auch wenn es im Verlauf der Messungen zu teils erheblichen Schwankungen kam, so wird doch deutlich, dass sich die Hörschwellen im Falle der GDNF+ES-, der BDNF+ES-, der AP+ES(B)- und der DEX+ES-Gruppe im Vergleich zur elektrischen Ausgangshörschwelle bis zum Tag 48 verbesserten. Die Durchschnittshörschwellen der AP+ES(M)-Gruppe jedoch stiegen im Verlauf der Messungen an.

5.3 Histologische Befunde an Cortiorgan und Basilarmembran

In allen bewerteten histologischen Schnitten war ein nahezu vollständiger Verlust der Haar- und Stützzellen zu beobachten. Abbildung 17 illustriert dieses repräsentativ. In allen Versuchsgruppen war das Cortiorgan über eine Distanz von mindestens drei Windungen, von der unteren basalen Windung bis zur dritten mittleren Windung, zerstört. In der vierten mittleren und der apikalen Windung war das Ausmaß des Zellverlustes variabel. Hier fehlte das Cortiorgan entweder vollständig oder es waren noch einzelne, aber geschädigte Haarzellen vorhanden. In Einzelfällen konnte ein völlig erhaltenes Cortiorgan im apikalen Bereich der Cochlea detektiert werden. Keines der untersuchten Präparate zeigte eine Verletzung der Basilarmembran durch das Elektroden-Mikropumpensystem.

5.4 Quantitative Analyse der Spiralganglienzellen

Zur Untersuchung der Effekte der neurotrophen Faktoren glial cell line-derived neurotrophic factor und brain-derived neurotrophic factor sowie des Glukokortikoids Dexamethason und elektrischer Stimulation durch zwei unterschiedliche Elektrodenmodelle auf die Spiralganglienzellpopulation systemisch ertaubter Meerschweinchen wurden 49 Tiere linksseitig mit einem Elektroden-Mikropumpensystem versorgt. Gemäß der eingangs formulierten Hypothese eines gesteigerten Überlebens der SGZ (GDNF, BDNF) bzw. eines nicht beeinträchtigten SGZ-Überlebens (DEX) unter Zusatz der genannten Faktoren wurden selbige je 6 Tieren für die Dauer von 27 Tagen in die sinistrale Scala tympani verabreicht. Zusätzlich wurden 16 Meerschweinchen implantiert, welchen artifizielle Perilymphe intracochleaer verabreicht wurde. Zur Untersuchung der Effekte elektrischer Stimulation auf das SGZ-Überleben nach Ertaubung wurden 6 dieser Tiere durch ein monopolarer Elektrodenmodell elektrisch stimuliert. Weitere 3 Tiere wurden mit einem bipolaren Elektrodenmodell versorgt und elektrisch stimuliert. Zudem wurden die Effekte einer Kombinationsstimulation mit BDNF, GDNF und DEX an je 5 Tieren untersucht. Die BDNF+ES-Tiere wurden mittels eines bipolaren Elektroden-Mikropumpensystems stimuliert. Die GDNF- und DEX-Tiere wurden durch ein monopolarer Elektroden-Mikropumpensystem stimuliert.

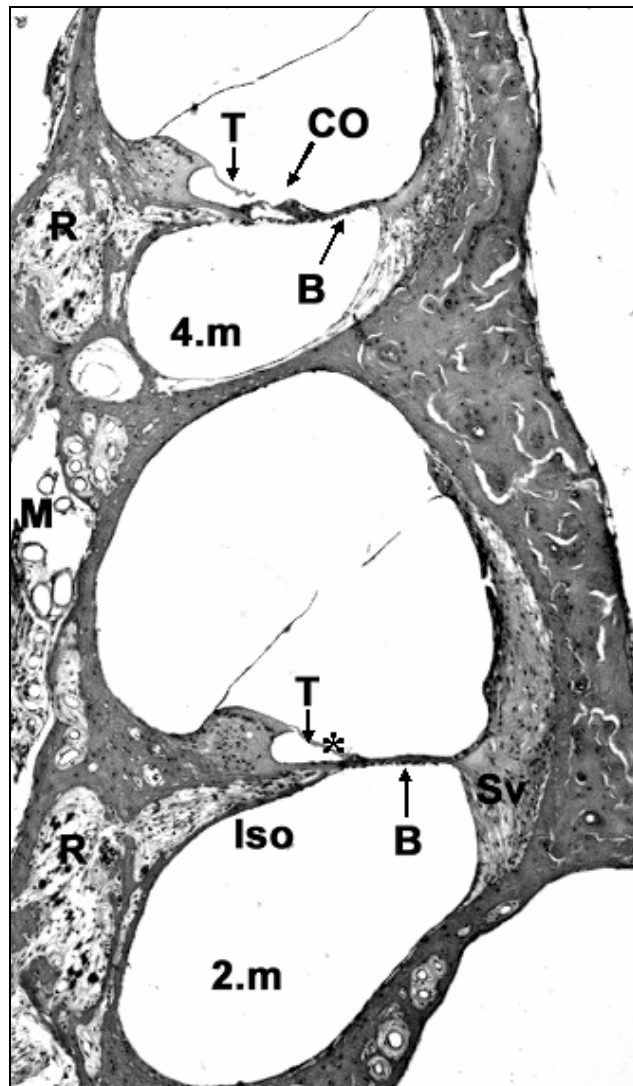


Abb. 17: Beispielhafte Darstellung des in den verschiedenen Cochleawindungen eines Meerschweinchens unterschiedlich ausgeprägten Verlustes der Haar- und Stützzellen 48 Tage nach der Verabreichung einer Kombination aus Kanamycin und Ethacrynsäure (linke Cochlea Tier B35). In der zweiten mittleren Windung (2.m) ist das vollständige Fehlen der Haar- und Stützzellen (Sternchen) unter und neben der Tektorialmembran (T) zu beobachten. In der vierten mittleren Windung (4.m) sind zwar beschädigte, jedoch weiterhin vorhandene Haarzellen und andere Strukturen des Cortiorgans (OC) erkennbar. In allen Versuchsgruppen war das Cortiorgan von der unteren basalen Windung bis zur dritten mittleren Windung zerstört. Weiter apikal jedoch war das Ausmaß der Beschädigung der Zellen äußerst variable. B: Basilarmembran; Iso: Lamina spiralis ossea; M: Modiolus; R: Rosenthalscher Kanal; Sv: Stria vascularis; Vergrößerung: 40 fach.

Insgesamt wurden für 98 Cochleae die Anzahl der SGZ und die Flächen der Rosenthal-schen Kanäle bestimmt. Mittels dieser Daten war es möglich, die durchschnittliche SGZ-Dichte jeder Cochlea zu ermitteln. Es wurden Vergleiche zwischen den durchschnittlichen SGZ-Dichten der rechten Cochleae aller Versuchsgruppen durchgeführt. Ebenso wurden die durchschnittlichen Dichten der linken Cochleae aller Versuchsgruppen verglichen. Auch ein interner Vergleich der mittleren Dichten der SGZ der rechten Cochleae einer Versuchsgruppe mit der mittleren Zelldichte der kontralateralen linken Cochleae wurde durchgeführt.

Da die jeweilige rechte Cochlea eines Tieres die SGZ-Dichte nach 48 Tagen Taubheit wiedergibt, spiegelt die Differenz zwischen der SGZ-Dichte der linken und der rechten Cochlea eines Tieres die Wirkung der jeweiligen Intervention wider. Die, durch die jeweilige Therapie bedingte, linksseitige Protektion der SGZ innerhalb eines Tieres wird als Summe der durchschnittlichen Dichte der überlebenden SGZ der implantierten Seite ($dSGZ_i$) abzüglich der durchschnittlichen Dichte überlebender SGZ der nicht implantierten Seite ($dSGZ_{ni}$) angegeben ($dSGZ_i - dSGZ_{ni}$). Aus dieser durchschnittlichen Dichte durch Protektion überlebender SGZ eines Tieres wurde die mittlere Dichte der je Versuchsgruppe durch Protektion überleben SGZ berechnet. Dieses Verfahren zur Berechnung der Dichte der durch Protektion überlebenden SGZ sowie die der Terminus „Dichte“ ist in der Literatur etabliert (MILLER et al. 1997; KANZAKI et al. 2002). Korrekt wäre hier die Benennung „Dichte-Differenzwert“.

Zur Beurteilung der Effekte der unterschiedlichen Behandlungsformen auf die SGZ nach Ertaubung wurden die Dichten der protektierten SGZ der linken Cochleae ($dSGZ_i - dSGZ_{ni}$) aller Versuchsgruppen mittels eines multiplen Gruppenvergleichs mit Adjustierung nach Bonferroni (Bonferroni multiple comparison test) verglichen. Die durchschnittlichen Dichten der protektierten SGZ ($dSGZ_i - dSGZ_{ni}$) sowie die zugehörigen Standardabweichungen aller Versuchsgruppen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht der mittleren Dichten der protektierten SGZ aller Versuchsgruppen. Dargestellt sind jeweils die Anzahl der untersuchten Tiere sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Dichten der protektierten SGZ je Experimentalgruppe. Weitere statistische Auswertungen der Spiralganglienzelldichten werden im nachfolgenden Teil dieser Arbeit behandelt.

Versuchsgruppe	Tierzahl	Mittlere Dichte der protektierten SGZ / 10.000 μm^2 , Standardabweichung
AP	7	-0,45 $\pm$ 0,61
AP+ES(M)	6	0,74 $\pm$ 0,72
GDNF	6	1,08 $\pm$ 0,76
GDNF+ES	5	2,46 $\pm$ 0,76
DEX	6	-0,10 $\pm$ 1,31
DEX+ES	5	2,05 $\pm$ 1,72
BDNF	6	1,10 $\pm$ 1,99
BDNF+ES	5	1,68 $\pm$ 0,82
AP+ES(B)	3	1,18 $\pm$ 0,79

5.4.1 Dichte der Spiralganglienzellen in ertaubten, nicht implantierten Cochleae

Die systemisch ertaubten, nicht implantierten rechten Cochleae aller Tiere wurden 48 Tage nach Ertaubung gewonnen und gaben somit die SGZ-Dichten nach 48 Tagen Degeneration wieder. Unterschiede in der SGZ-Dichte könnten Rückschlüsse auf eventuell auftretende Einflüsse der linksseitigen Interventionen auf die assoziierte rechte Cochlea zulassen. Ein multipler Gruppenvergleich mit Adjustierung nach Bonferroni ergab für keine Gegenüberstellung der Gruppen untereinander einen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$).

Die durchschnittliche SGZ-Dichte lag zwischen 2,33 (DEX-Gruppe) und 3,93 (AP+ES(B)-Gruppe) SGZ/ 10.000 μm^2 . Die durchschnittliche Zellzahl der rechten

Cochleae der AP-Gruppe betrug 2,84 SGZ/ 10.000 μm^2 , der AP+ES(M)-Gruppe 2,86 SGZ/ 10.000 μm^2 , der GDNF-Gruppe 3,01 SGZ/ 10.000 μm^2 , der GDNF+ES-Gruppe 3,03 SGZ/ 10.000 μm^2 , der BDNF-Gruppe 3,60 SGZ/ 10.000 μm^2 , der BDNF+ES-Gruppe 2,91 SGZ/ 10.000 μm^2 und der DEX+ES-Gruppe 3,35 SGZ/ 10.000 μm^2 (Abb. 18).

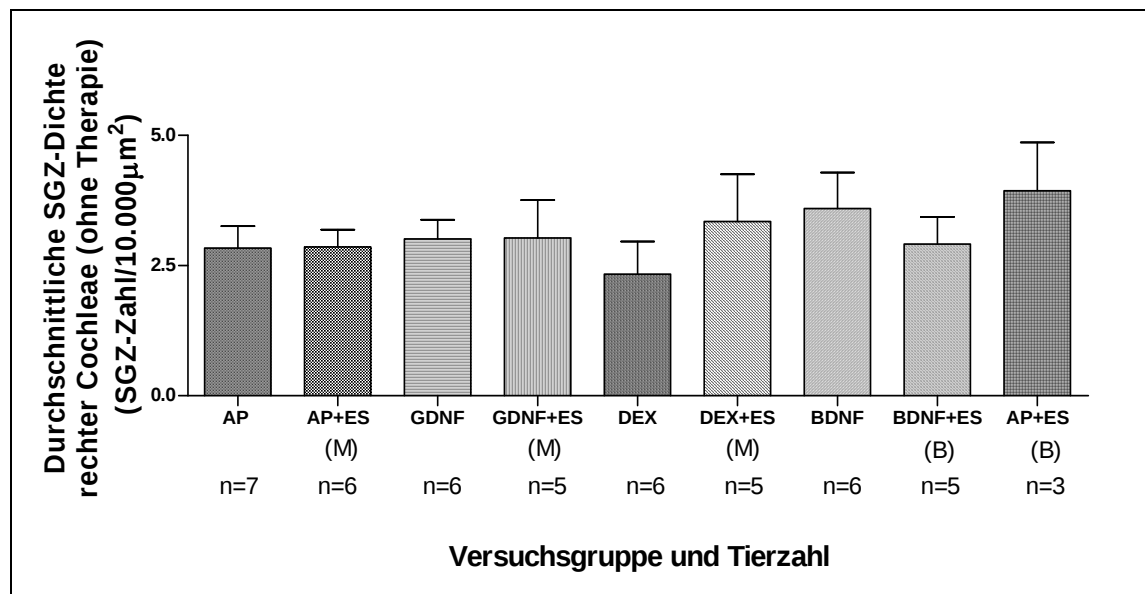


Abb. 18: Durchschnittliche SGZ-Dichte und jeweiliger Standardfehler rechter ertaubter Cochleae aller Versuchsgruppen 48 Tage nach Ertaubung. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellbar (Multipler Gruppenvergleich mit Adjustierung nach Bonferroni, $p > 0,05$). Die in den kontralateralen linken Ohren verwendeten Stimulationen sind unter den Versuchsgruppen in Klammern dargestellt. (M) = monopolare Stimulation, (B) = bipolare Stimulation.

5.4.2 Dichte der Spiralganglienzellen in ertaubten und implantierten linken Cochleae

Die durchschnittlichen SGZ-Dichten der ertaubten und mit GDNF, BDNF, DEX und/oder ES behandelten Cochleae lagen zwischen 2,23 SGZ/ 10.000 μm^2 (DEX) und 5,49 SGZ/ 10.000 μm^2 (GDNF+ES). Die zweitniedrigste durchschnittliche SGZ-Dichte mit 2,38 SGZ/ 10.000 μm^2 wiesen die linken Cochleae der Kontrollgruppe (AP) auf. Es folgten die AP+ES(M)-Gruppe (3,60 SGZ/ 10.000 μm^2), die mit GDNF behandelte Gruppe (4,10 SGZ/ 10.000 μm^2), die BDNF+ES-Gruppe (4,60 SGZ/ 10.000 μm^2), die mit dem Wachstumsfaktor BDNF behandelten Cochleae (4,70 SGZ/ 10.000 μm^2), die AP+ES(B)-Gruppe (5,12 SGZ/ 10.000 μm^2) und die mit DEX+ES versorgten Cochleae

(5,40 SGZ/ 10.000 μm^2). Im statistischen Vergleich ergab sich zwischen der AP-Gruppe und der GDNF+ES-Gruppe ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$. Gegenüber der durchschnittlichen SGZ-Dichte der DEX-Gruppe zeigte die GDNF+ES-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Zelldichte ($p < 0,01$). Ein weiterer signifikanter Unterschied war zwischen den SGZ-Dichten der AP+ES(B)-Gruppe und der DEX-Gruppe feststellbar. Hier lag der p-Wert unter 0,05. Alle übrigen Vergleiche ließen keine signifikanten Unterschiede in den Dichten der erhaltenen SGZ erkennen.

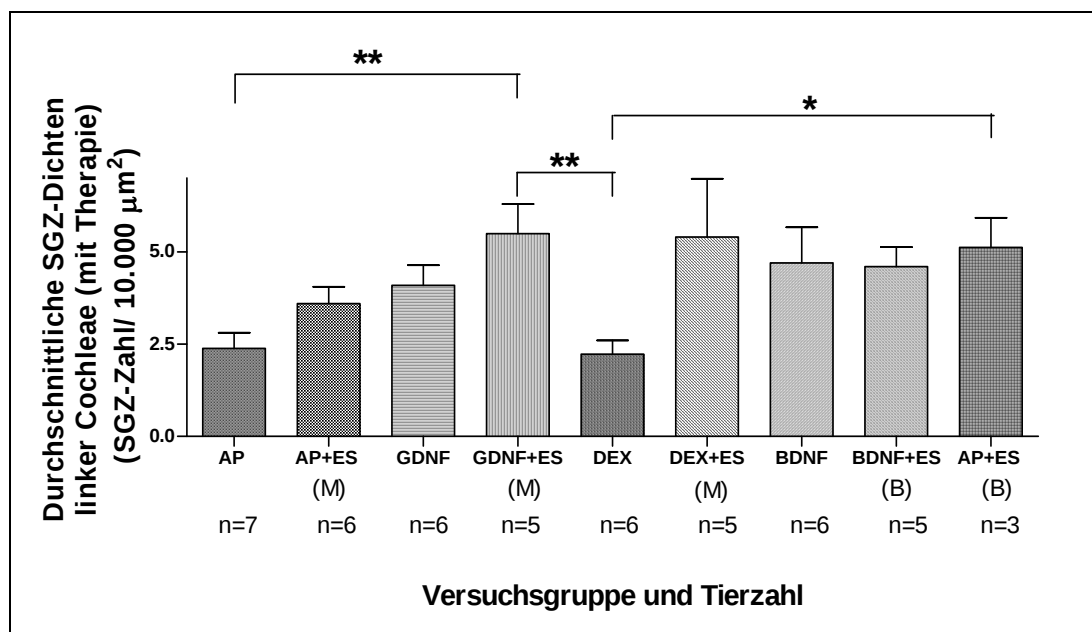


Abb. 19: Darstellung der durchschnittlichen SGZ-Dichten und der zugehörigen Standardfehler linker ertaubter Cochleae aller Versuchsgruppen. Es waren statistisch signifikante Unterschiede zwischen der GDNF+ES-Gruppe und der AP-Gruppe ($p < 0,01$) und der DEX-Gruppe ($p < 0,01$), sowie zwischen der DEX-Gruppe und der AP+ES(B)-Gruppe ($p < 0,05$) feststellbar ($p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, (M) = monopolare Stimulation, (B) = bipolare Stimulation).

5.4.3 Interner Vergleich der Dichten der Spiralganglienzellen rechter und linker ertaubter Cochleae der Tiere einer Experimentalgruppe

Zur Untersuchung der Effekte der verschiedenen Versuchsbedingungen auf das SGZ-Überleben innerhalb einer Versuchsgruppe wurden die durchschnittlichen SGZ-Dichten rechter ertaubter aber ansonsten unbehandelter Cochleae und linker ertaubter behandelter Cochleae der Tiere einer Experimentalgruppe miteinander verglichen. Diese Gegenüberstellung zeigte teilweise erhebliche Unterschiede (t-Test für abhängige Stichproben,

Abb. 20). In nahezu allen Versuchsgruppen lag die SGZ-Dichte der linken Cochleae über derjenigen der Rechten. Ausnahmen bildeten die singular mit artifizieller Perilymphe und Dexamethason behandelten Gruppen. Hier lag die durchschnittliche SGZ-Dichte der linken behandelten Seite unterhalb der der rechten Seite. In der AP-Gruppe betrug die durchschnittliche SGZ-Dichte der linken Seite 2,38 SGZ/ 10.000 μm^2 und die der rechten Seite 2,84 SGZ/ 10.000 μm^2 . Die linken Cochleae der DEX-Gruppe wiesen eine durchschnittliche SGZ-Dichte von 2,23 SGZ/ 10.000 μm^2 auf, wohingegen die SGZ-Dichte der rechten Cochleae bei 2,79 SGZ/ 10.000 μm^2 lag.

Wie Abbildung 20 zeigt, lag die linksseitige SGZ-Dichte in der BDNF-Gruppe und der AP+ES(B)-Gruppe oberhalb der rechtsseitigen (BDNF: 4,70 vs. 3,60 SGZ/ 10.000 μm^2 ; AP+ES(B): 5,12 vs. 3,93 SGZ/ 10.000 μm^2). Der statistische Vergleich der rechten und linken Cochleae beider Gruppen führte zu keinen signifikanten Unterschieden (BDNF: $p = 0,1169$; AP+ES(B): $p = 0,0609$).

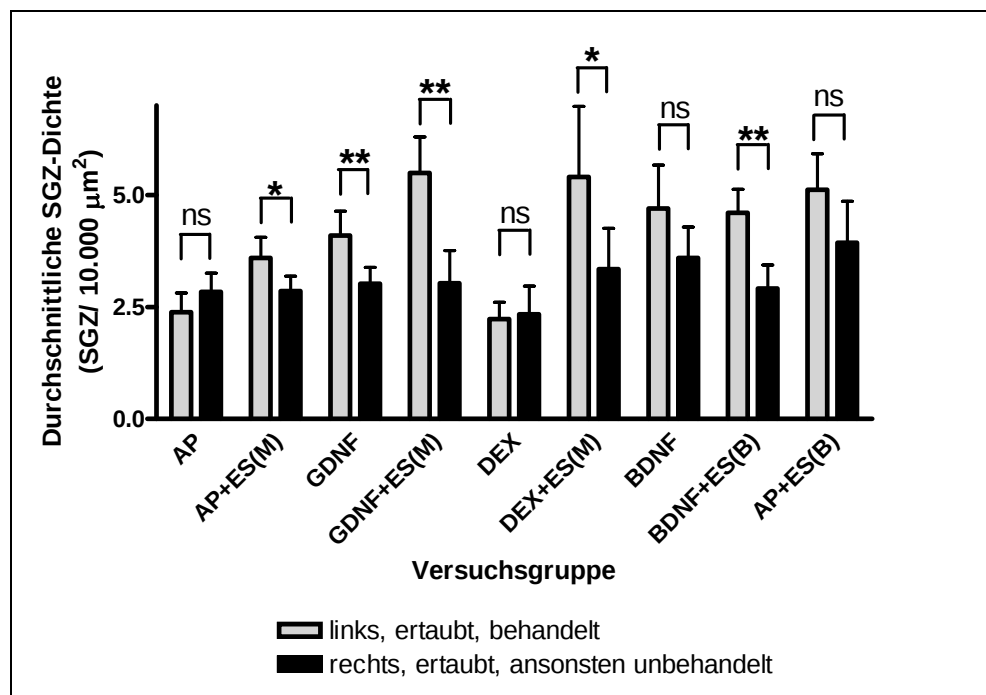


Abb. 20: Darstellung der durchschnittlichen SGZ-Dichten (SGZ-Zahl/ 10.000 μm^2 , Mittelwert $\pm$ Standardfehler) der Cochleae ertaubter Meerschweinchen nach linksseitiger intracochleaerer Behandlung mittels AP, AP+ES(M), GDNF, GDNF+ES, BDNF, BDNF+ES, AP+ES(B), DEX oder DEX+ES verglichen mit der assoziierten ertaubten, ansonsten unbehandelten rechten Cochlea. Signifikante Unterschiede nach Anwendung des t-Tests für abhängige Stichproben sind mittels eckiger Klammern über den jeweiligen Säulen dargestellt ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$, ns = nicht signifikant, (M) = monopolare Stimulation, (B) = bipolare Stimulation).

Beide nicht mit einem NTF behandelten, aber elektrisch stimulierten Gruppen, AP+ES(M) und DEX+ES, wiesen auf der linken Seite eine statistisch signifikant höhere durchschnittliche SGZ-Dichte auf als auf der rechten Seite ($p < 0,05$). In der AP+ES(M)-Gruppe stand die linksseitige SGZ-Zahl von 3,60 SGZ/ 10.000 μm^2 derjenigen der rechten Seite von 2,86 SGZ/ 10.000 μm^2 gegenüber. Die DEX+ES Cochleae verfügten über eine durchschnittliche SGZ-Zahl von 2,23 SGZ/ 10.000 μm^2 , wohingegen die assoziierten rechten Seiten 2,79 SGZ/ 10.000 μm^2 aufwiesen. Beide mit Wachstumsfaktor und ES behandelten Gruppen sowie die GDNF-Gruppe zeigten beim Vergleich der linken und rechten Seiten eine statistische Signifikanz von $p < 0,01$. In diesen Gruppen fanden sich durchschnittliche Zellzahlen von 4,60 vs. 2,92 SGZ/ 10.000 μm^2 (BDNF+ES, $p = 0,0051$), 5,49 vs. 3,03 SGZ/ 10.000 μm^2 (GDNF+ES, $p = 0,0010$) und 4,10 vs. 3,01 SGZ/ 10.000 μm^2 (GDNF, $p = 0,008$).

5.4.4 Überleben der Spiralganglienzellen der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe

Gemäß der eingangs formulierten Hypothese eines gesteigerten SGZ-Überlebens (GDNF, BDNF, ES) bzw. eines nicht beeinträchtigten SGZ-Überlebens (Dexamethason) nach Ertaubung wurden den Tieren die jeweiligen Faktoren intracochleaer verabreicht (100 ng/ml GDNF, 50 ng/ml BDNF, 100 ng/ml DEX).

Zur vergleichenden Untersuchung der Effekte der verschiedenen Interventionen auf die SGZ-Population wurden die Daten aller Experimentalgruppen denen der Kontrollgruppe gegenüber gestellt. Dieser Vergleich ermöglicht die Beurteilung, der effektivsten zur SGZ-Protektion nach 21 Tagen Taubheit geeigneten Behandlungsmethode.

Als Kontrollgruppe dienten 7 linksseitig mit einem monopolaren Elektrodemodell implantierte Tiere. Ab dem 21. Versuchstag wurde ihnen durch das Mikropumpensystem artifizielle Perilymphe in die Scala tympani geleitet. Die mittlere Dichte protektierter SGZ dieser Gruppe lag bei -0,45 Zellen/ 10.000 μm^2 (Abb. 21). Auch die DEX-Gruppe wies einen negativen Wert für die durchschnittliche Dichte protektierter SGZ auf (-0,10 SGZ/ 10.000 μm^2). Der Vergleich beider Datensätze ergab keine statistischen Signifikanzen. Ebenso verhielt es sich mit der alleinigen BDNF-Behandlung, welche mit 1,10 SGZ/ 10.000 μm^2 eine nicht signifikant unterschiedliche aber tendenziell höhere SGZ-Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte. Die monopolare elektrische Stimulation führte zu einer statistisch signifikanten Protektion der SGZ gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$), wobei die durchschnittliche Dichte protektierter SGZ der

AP+ES(M)-Gruppe 0,74 SGZ/ 10.000 μm^2 betrug. Der Vergleich der ermittelten durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ der Kontrollgruppe und der mit der bipolaren Elektrode rein intracochleaer elektrisch stimulierten Gruppe (AP+ES(B)) ergab eine Erhöhung der SGZ-Überlebensrate von 0,64 Zellen in den AP+ES(B)-behandelten Cochleae und somit eine signifikante Differenz mit $p < 0,05$.

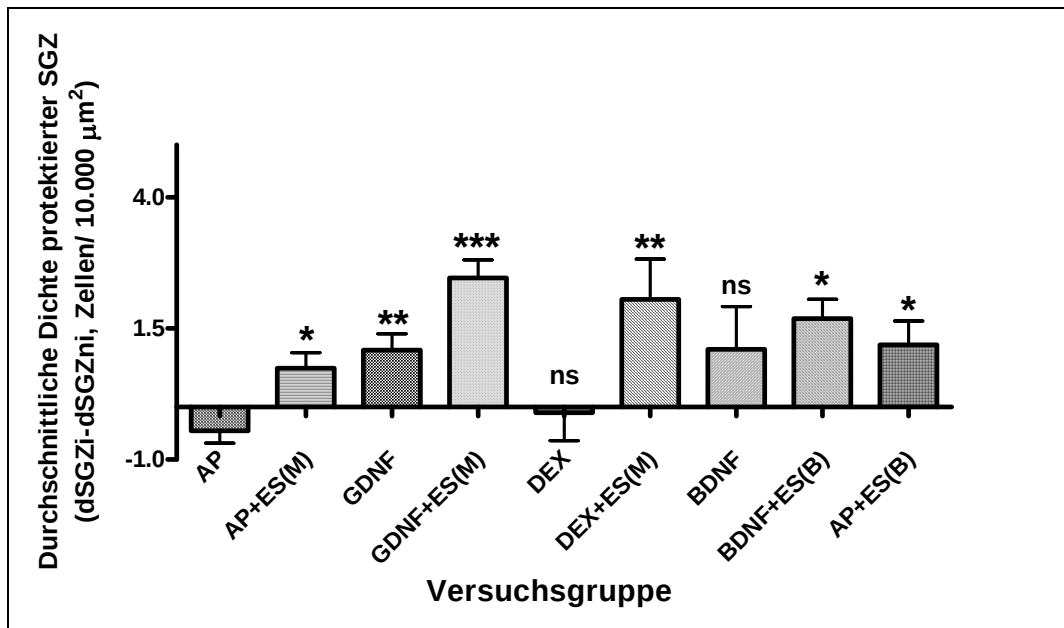


Abb. 21: Darstellung der durchschnittlichen Dichten und des jeweiligen Standardfehlers protektierter SGZ (Summe der durchschnittlichen SGZ-Dichte der therapierten Cochlea und nicht therapierten Cochleae, dSGZi-dSGZni) aller Experimentalgruppen nach 48 Tagen Taubheit und 27 Tagen (Substanz) bzw. 24 Tagen (ES) Therapiedauer. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (AP) sind über den jeweiligen Säulen dargestellt ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$, ns = nicht signifikant, (M) = monopolare Stimulation, (B) = bipolare Stimulation).

Für den Kombinationsstimulus aus bipolarer elektrischer Stimulation und BDNF-Applikation (BDNF+ES) konnte ebenfalls ein signifikant gesteigertes SGZ-Überleben im Vergleich zur AP-Gruppe mit $p < 0,05$ demonstriert werden (1,68 SGZ/ 10.000 μm^2 vs. -0,45 SGZ/ 10.000 μm^2). Die mittlere Dichte protektierter SGZ betrug bei GDNF-behandelten Tieren 1,085 SGZ/ 10.000 μm^2 und bei DEX+ES behandelten 2,05 SGZ/ 10.000 μm^2 . Beide Behandlungsmethoden führten zu signifikanten Unterschieden verglichen mit der durchschnittlichen SGZ-Dichte der AP-Gruppe ($p < 0,01$). Die mit $p < 0,001$ höchste statistische Signifikanz erzielte der Vergleich der durch-

schnittlichen Dichte protektierter SGZ der Kontrollgruppe mit der der GDNF+ES-Gruppe. Hier stand die Dichte protektierter SGZ/ 10.000 μm^2 von -0,45 (AP) derjenigen der GDNF+ES-Gruppe von 2,46 SGZ/ 10.000 μm^2 gegenüber.

5.4.5 Protektive Effekte der Einzel- und Kombinationsstimuli auf die Spiralganglienzellen im Vergleich

Zur Untersuchung der Effekte der verzögert nach Ertaubung applizierten Faktoren GDNF und BDNF sowie des Glukokortikoids Dexamethason auf die Spiralganglienzell-Population wurde systemisch ertaubten Meerschweinchen über eine Dauer von 27 Tagen linksseitig intracochleaer mit GDNF, BDNF bzw. DEX therapiert.. Zusätzlich wurden die Effekte einer alleinigen monopolaren und bipolaren elektrischen Stimulation und die einer Kombinationsstimulation mit GDNF, BDNF und Dexamethason untersucht. Die SGZ-Dichten-Differenz zwischen der behandelten linken Cochlea und der ertaubten, aber ansonsten unbehandelten, rechten Cochlea eines Tieres gibt die Dichte protektierter SGZ in diesem Individuum an. Die durchschnittliche Dichte der protektierter SGZ der Tiere einer Gruppe kann mit der der übrigen Gruppen verglichen werden. Der statistische Vergleich der durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ aller Experimentalgruppen mittels des multiplen Gruppenvergleichs mit Adjustierung nach Bonferroni lässt eine Beurteilung des Protektionsvermögens jeder einzelnen Gruppe zu.

5.4.5.1 GDNF

GDNF behandelte Cochleae zeigten mit einer durchschnittlichen Dichte von 1,08 protektierten SGZ/ 10.000 μm^2 eine ähnliche Zellzahl wie AP+ES(B) (1,19 SGZ/ 10.000 μm^2) und BDNF (1,10 SGZ/ 10.000 μm^2) behandelte Cochleae. Der statistische Vergleich der SGZ-Dichten der GDNF-Gruppe und der Kontrollgruppe (-0,45 SGZ/ 10.000 μm^2) zeigte mit $p < 0,01$ einen hoch signifikanten Unterschied (Abb. 22). Auch gegenüber der GDNF+ES-Gruppe (2,45 SGZ/ 10.000 μm^2) zeigte die GDNF-Gruppe eine signifikante Differenz in der SGZ-Zahl pro Fläche ($p < 0,05$). Tendenziell zeigte sich in der mittleren SGZ-Dichte der GDNF-Gruppe ein leichter Anstieg der überlebenden Spiralganglienzellen im Vergleich zur AP+ES(M) (-0,74 SGZ/ 10.000 μm^2) und DEX-Gruppe (-0,10 SGZ/ 10.000 μm^2), beziehungsweise ein leichter Abfall der überlebenden SGZ im Vergleich zur BDNF+ES- (1,68 SGZ/ 10.000 μm^2) und DEX+ES-Gruppe (2,05 SGZ/ 10.000 μm^2), der sich jedoch als nicht signifikant unterschiedlich darstellte.

5.4.5.2 GDNF+ES

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die GDNF+ES behandelten Cochleae eine um 2,91 SGZ/ 10.000 μm^2 erhöhte SGZ-Dichte (Abb.22). In der statistischen Auswertung ergab dies einen hoch signifikanten Unterschied mit $p < 0,001$. Die Gegenüberstellung der mittleren SGZ-Dichte der GDNF+ES behandelten Cochleae mit der der AP+ES(M) behandelten zeigte, dass die GDNF+ES behandelten Cochleae eine 3,3mal höhere Dichte protektierter SGZ aufwiesen als die AP+ES(M)-Cochleae (2,46 SGZ/ 10.000 μm^2 vs. 0,74 SGZ/ 10.000 μm^2 , $p < 0,01$). Auch im Vergleich zur DEX-Gruppe (-0,11 SGZ/ 10.000 μm^2) ergibt die statistische Auswertung eine Signifikanz von $p < 0,01$. Gegenüber der durchschnittlichen SGZ-Dichte in GDNF behandelten Cochleae (1,08 SGZ/ 10.000 μm^2) zeigte die GDNF+ES behandelte Gruppe einen statistisch signifikanten Unterschied in der Dichte überlebender SGZ mit $p < 0,05$. Abbildung 22 zeigt, dass die durchschnittliche SGZ-Dichte GDNF+ES-behandelter Cochleae auch augenscheinlich über derjenigen der BDNF-, BDNF+ES-, AP+ES(B)-, DEX- und DEX+ES-behandelten lag. Doch der statistische Vergleich der Dichte-Zahlen ergab hier keine Signifikanzen.

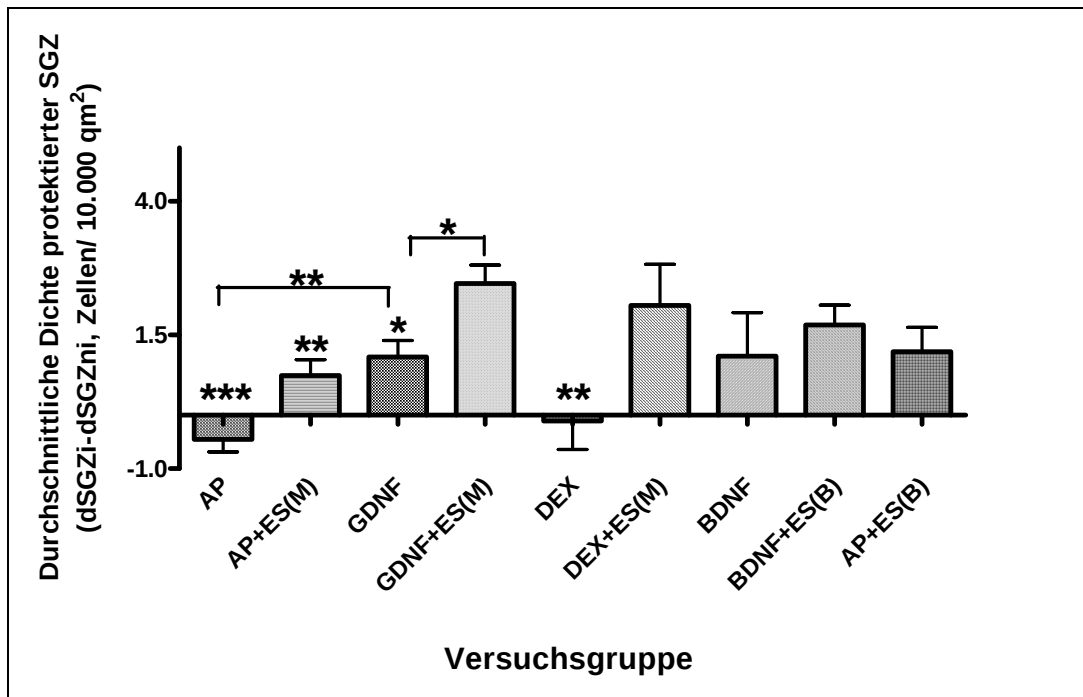


Abb. 22: Darstellung der Mittelwerte und Standardfehler der durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ aller Versuchsgruppen (mittlere SGZ-Dichte der implantierten, therapierten Cochleae abzüglich der durchschnittlichen SGZ-Dichte der assoziierten ertaubten, nicht implantierten kontralateralen Cochleae, dSGZi-dSGZni). Mittels multiplem Gruppenvergleich mit Adjustierung nach Bonferroni werden die Werte der GDNF- und GDNF+ES-Gruppe statistisch mit denen der übrigen Experimentalgruppen verglichen. Statistisch signifikante Unterschiede zur GDNF+ES-Gruppe sind über den jeweiligen Säulen dargestellt, während diejenigen der GDNF-Gruppe separat mittels eckiger Klammern verdeutlicht sind. Nicht signifikante Vergleiche werden nicht dargestellt ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$, (M) = monopolare elektrische Stimulation, (B) = bipolare elektrische Stimulation).

5.4.5.3 BDNF

Die Dichten protektierter SGZ der Tiere der BDNF-Gruppe variierten zwischen -0,84 und 4,07 SGZ/ 10.000 μm^2 , wobei der Durchschnitt bei 1,10 SGZ/ 10.000 μm^2 lag. Im statistischen Vergleich (multipler Gruppenvergleich mit Adjustierung nach Bonferroni) der Dichte-Werte der überlebenden SGZ der BDNF-Gruppe mit denen der anderen Experimentalgruppen konnten keinerlei Signifikanzen festgestellt werden.

5.4.5.4 BDNF+ES

Cochleae welche zeitgleich mit BDNF und ES behandelt wurden zeigten eine mittlere Dichte protektierter SGZ von 1,69 SGZ/ 10.000 μm^2 . Im Vergleich mit der AP-Gruppe (-0,45 SGZ/ 10.000 μm^2) und der DEX-Gruppe (-0,11 SGZ/ 10.000 μm^2) findet sich jeweils einen statistisch signifikanter Unterschied von $p < 0,05$ (Abb. 23). Alle anderen Vergleiche ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede.

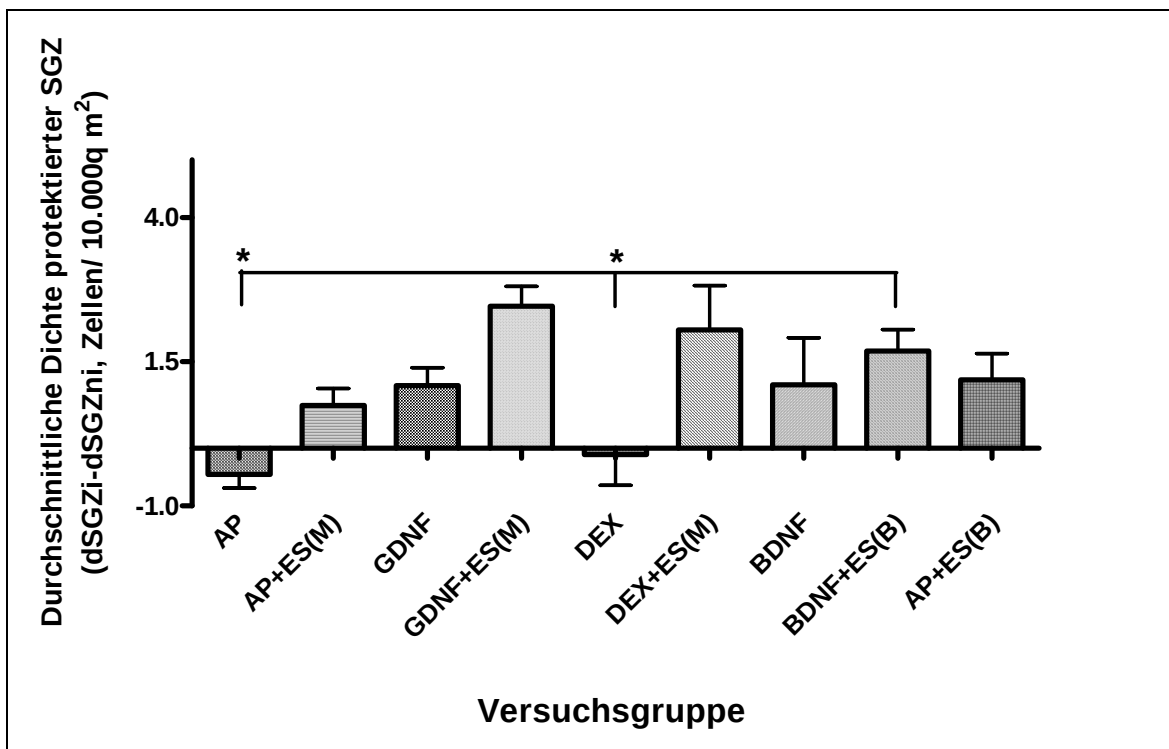


Abb. 23: Statistischer Vergleich der durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ der BDNF+ES behandelten Experimentalgruppe mit denen der übrigen Gruppen (mittlere SGZ-Dichte der implantierten, therapierten Cochleae abzüglich der durchschnittlichen SGZ-Dichte der assoziierten ertaubten, nicht implantierten kontralateralen Cochleae, dSGZi-dSGZni). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie der Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede waren im Vergleich mit der Kontrollgruppe und der DEX-Gruppe nachweisbar ($p < 0,05 = *$), alle übrigen Vergleiche waren nicht signifikant. ((M) = monopolare Stimulation, (B) = bipolare Stimulation)

5.4.5.5 AP+ES(M)

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (AP) lag die durchschnittliche SGZ-Dichte der mit artifizieller Perilymphe behandelten und gleichzeitig mit monopolarer elektrischer Stimulation versorgten Tiere (AP+ES(M)) signifikant höher ($-0,45$ SGZ/ $10.000 \mu\text{m}^2$ vs. $0,74$ SGZ/ $10.000 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$; Abb. 24). Auch die statistische Gegenüberstellung von AP+ES(M)-Daten und denen der GDNF+ES-Gruppe ($2,46$ SGZ/ $10.000 \mu\text{m}^2$) zeigte signifikante Unterschiede ($p < 0,01$). Hier lag die mittlere SGZ-Dichte der AP+ES(M)-behandelten Cochleae unterhalb der der GDNF+ES-behandelten.

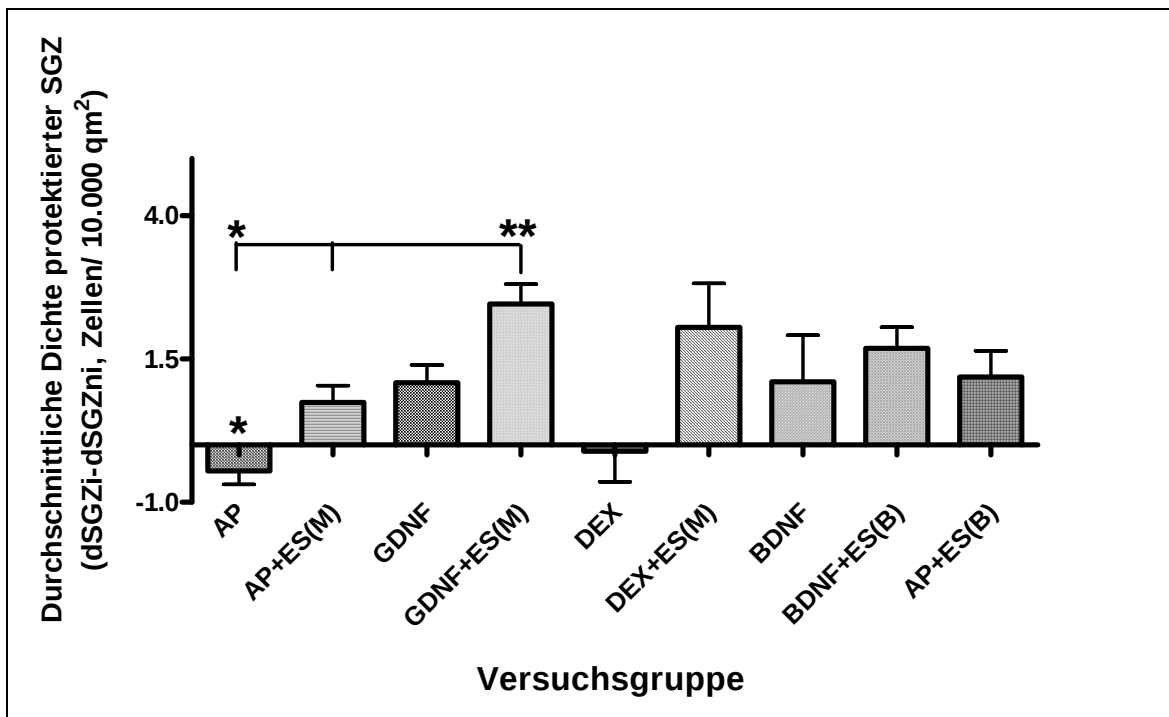


Abb. 24: Statistischer Vergleich der durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ der AP+ES(M)- und AP+ES(B)-behandelten Cochleae mit denen der übrigen Gruppen (mittlere SGZ-Dichte der implantierten Cochleae abzüglich der durchschnittlichen SGZ-Dichte der kontralateralen ertaubten, nicht implantierten Cochleae, dSGZi-dSGZni). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte sowie der Standardfehler. Die durchschnittliche SGZ-Dichte der mit der monopolaren Elektrode versorgten Tiere (AP+ES(M)) zeigte gegenüber der AP- und der GDNF+ES-Gruppe statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$, welche mittels eckiger Klammern dargestellt sind. Eine statistisch signifikante Differenz der mittleren SGZ-Dichte ist auch im Vergleich der AP+ES(B)-Gruppe mit der AP-Gruppe feststellbar und oberhalb der betreffenden Säule abgebildet ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; (M) = monopolare Stimulation, (B) = bipolare Stimulation).

5.4.5.6 AP+ES(B)

Die mittlere Dichte protektierter SGZ der mit einem bipolaren Elektroden-Mikropumpensystem versorgten und stimulierten Tiere lag bei 1,19 SGZ/ 10.000 μm^2 . Bei Anwendung des multiplen Gruppenvergleichs mit Adjustierung nach Bonferroni war gegenüber der durchschnittlichen SGZ-Dichte der Kontrollgruppe (-0,45 SGZ/ 10.000 μm^2) eine Signifikanz mit $p < 0,05$ feststellbar (Abb. 24).

5.4.5.7 DEX

Cochleae die über 27 Tage hinweg mit Dexamethason behandelt wurden wiesen eine durchschnittliche SGZ-Dichte von 2,23 SGZ/ 10.000 μm^2 auf, die zugehörigen rechten Cochleae zeigten hingegen 2,33 SGZ/ 10.000 μm^2 . Dies bedeutet, dass in dieser Experimentalgruppe die mittlere Dichte protektierter SGZ -0,11 SGZ/ 10.000 μm^2 betrug. Im statistischen Vergleich mit den durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ der anderen Versuchsgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede gegenüber der DEX+ES-Gruppe ($p < 0,05$), der BDNF+ES-Gruppe ($p < 0,05$) und der GDNF+ES-Gruppe ($p < 0,01$) (Abb. 25).

5.4.5.8 DEX+ES

Die durchschnittliche Dichte protektierter SGZ der DEX+ES-Gruppe lag mit 2,05 SGZ/ 10.000 μm^2 zwischen der der GDNF+ES-Gruppe und der der BDNF+ES-Gruppe.

Gegenüber der DEX-Gruppe (-0,11 SGZ/ 10.000 μm^2) und der AP-Gruppe (-0,45 SGZ/ 10.000 μm^2) zeigt die DEX+ES-Gruppe eine höhere Zahl protektierter SGZ, wobei dieser Unterschied im Falle des Vergleichs mit der AP-Gruppe zu einer statistischen Signifikanz mit $p < 0,01$, und im Vergleich mit der DEX-Gruppe zu einer statistischen Signifikanz mit $p < 0,05$ führte (Abb. 25).

Abbildung 26 zeigt beispielhafte mikroskopische Aufnahmen der Rosenthalschen Kanäle aller Versuchsgruppen.

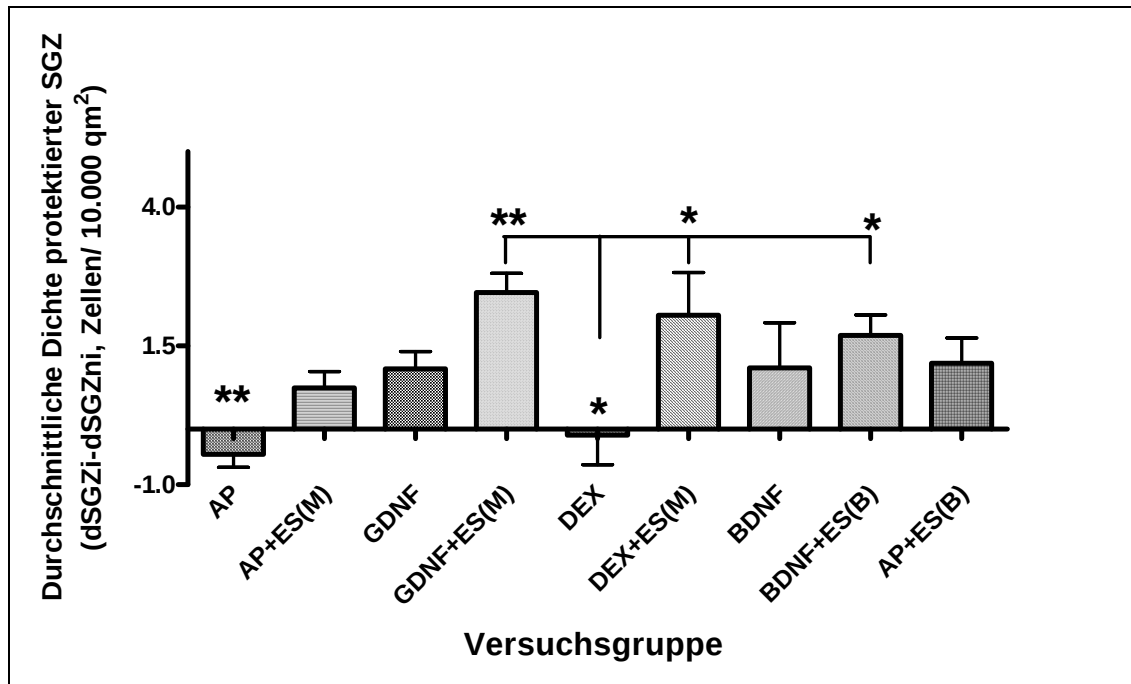


Abb. 25: Effekte einer singulären Behandlung mit 100 ng DEX und einer Kombination derselben mit monopolarer elektrischer Stimulation im Vergleich zu den anderen Experimentalgruppen. Dargestellt ist der statistische Vergleich der durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ der DEX- und der DEX+ES-Gruppe mit denen der übrigen Gruppen (mittlere SGZ-Dichte der implantierten Cochleae abzüglich der durchschnittlichen SGZ-Dichte der kontralateralen ertaubten, nicht implantierten Cochleae, dSGZi-dSGZni). Die durchschnittliche SGZ-Dichte der mit Dexamethason behandelten Tiere (DEX) zeigte gegenüber der GDNF+ES-Gruppe einen statistisch signifikanten Unterschied mit $p < 0,01$. Auch gegenüber der BDNF+ES-Gruppe und der DEX+ES-Gruppe waren signifikante Differenzen in der SGZ-Dichte feststellbar ($p < 0,05$). Der statistische Vergleich der mittleren SGZ-Dichte der DEX+ES-Versuchsgruppe mit denen der anderen Gruppen führte sowohl die DEX-Gruppe als auch die AP-Gruppe betreffend zu signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Auf Unterschiede zur DEX-Gruppe bezogene Signifikanzen sind mittels Klammern dargestellt, auf die DEX+ES bezogene sind oberhalb der betreffenden Säule abgebildet. ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; (M) = monopolare Stimulation, (B) = bipolare elektrische Stimulation)

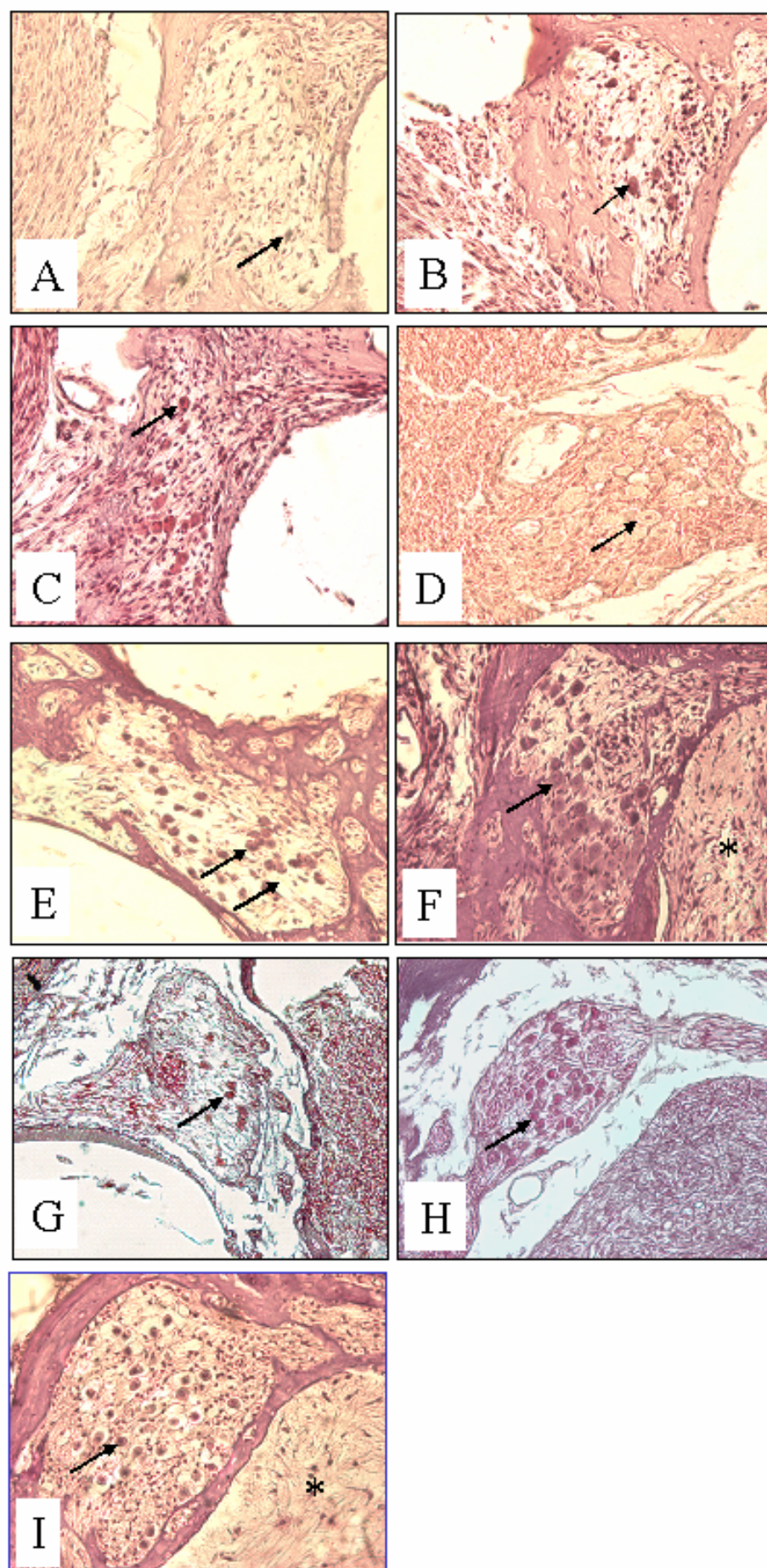


Abb. 26: Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen der Rosenthalschen Kanäle aller Versuchsgruppen (A – I) zur Darstellung der Spiralganglienzellen. Die Pfeile verweisen auf repräsentative Spiralganglienzellen der jeweiligen Behandlungsgruppe. A: AP-Gruppe. Diese repräsentative Darstellung belegt, dass die Cochleae dieser Versuchsgruppe nahezu keine intakten SGZ aufwiesen. Der Pfeil deutet auf eine degenerierte Spiralganglienzelle. B: AP+ES(M)-Gruppe. Die Aufnahme zeigt, dass in dieser Gruppe, im Vergleich zu der AP-Gruppe (A), intakte, überlebende SGZ vorhanden waren. C: GDNF-Gruppe. Die mikroskopische Aufnahme zeigt, verglichen mit der Abbildung der AP+ES(M)-Gruppe, ein vermehrtes Überleben der SGZ. D: GDNF+ES-Gruppe. Die Darstellung belegt die in dieser Gruppe ermittelte hohe SGZ-Dichte. Der Rosenthalsche Kanal besteht fast ausschließlich aus intakten SGZ. E: BDNF-Gruppe. Deutlich ist das Vorhandensein überlebender SGZ zu erkennen. Der Vergleich dieser Aufnahme mit C untermauert die annähernd gleiche SGZ-Dichte beider Experimentalgruppen. F: BDNF+ES-Gruppe. Die Abbildung zeigt beispielhaft die in dieser Versuchsgruppe beobachtete hohe SGZ-Zahl, v. a. im Vergleich mit den anderen Teilabbildungen. G: DEX-Gruppe. Dieses Bild veranschaulicht die in dieser Versuchsgruppe ermittelte geringe SGZ-Zahl. H: DEX+ES-Gruppe. Es ist eine relativ große Zahl intakter SGZ zu sehen. Auf die Größe des Rosenthalschen Kanals bezogen spiegelt diese Darstellung die hohe durchschnittliche Dichte überlebender SGZ in dieser Versuchsgruppe wider. I: AP+ES(B)-Gruppe. Der Großteil der hier dargestellten SGZ zeigt deutliche Anzeichen einer Degeneration. Dennoch sind einige intakte Zellen erkennbar, welche die in dieser Gruppe ermittelte SGZ-Dichte erklären. Die Sterne markieren Bindegewebsbildung in der Scala tympani. Vergrößerung A bis I: 200fach.

5.5 Dexamethason-Wirkung auf das Bindegewebswachstum und die Effekte der elektrischen Stimulation

Die Tiere zweier Versuchsgruppen bekamen über 27 Tage, nach der Implantation eines monopolaren Elektroden-Mikropumpensystems, 100 ng/ml Dexamethason intracochleaer appliziert. Eine dieser Gruppen wurde additiv für 24 Tage elektrisch stimuliert.

5.5.1 Effekte von Dexamethason auf das Bindegewebswachstum nach Implantation eines monopolaren Elektroden-Mikropumpensystems

Sechs Versuchstieren wurde ausschließlich Dexamethason verabreicht. Diese Gruppe diente der Beurteilung des Einflusses einer Applikation von 100 ng/ml DEX auf die Bindegewebsneubildung nach Implantation eines Elektroden-Mikropumpensystems. Die Auswertung des Bindegewebswachstums erfolgte in allen Versuchsgruppen qualitativ. Aufgrund der Lokalisation des Bindegewebes (BDG) wurde zwischen intracochleaerer Neubildung und solcher in der Bulla unterschieden. Das Bindegewebswachstum im Mittelohr wurde mit 0 = kein Bindegewebe (Abb. 27), + = Bildung eines dünnen BDG-Schlauches um die Elektrode, ++ = Bildung eines stark ausgeprägten Bindegewebsschlauches um die Elektrode und +++ = Ausbreitung des Bindegewebes im Mittelohr beschrieben. Für den intracochleaeren Bereich wurde eine Gradierung von 0 = kein Bindegewebe, + = schwache Bindegewebsneubildung, ++ = starke Bindegewebsneubildung und +++ = vollständige Füllung der Sc. tympani mit Bindegewebe angewendet (Abb. 28).

Tabelle 3 zeigt, dass zwei der mit DEX behandelten Tiere keine Bindegewebsneubildung in den untersuchten Strukturen aufwiesen. Bei zwei Tieren hatte sich ein feines bindegewebiges Häutchen um die Elektrode gebildet und die histologischen Cochleaschnitte zeigten eine vollständige Füllung der Sc. tympani mit Bindegewebe. Ein weiteres Tier wies einen stark ausgeprägten Bindegewebsschlauch um die Elektrode auf, wohingegen in der Cochlea keine Anzeichen für Bindegewebsbildungen zu finden waren. Das letzte Tier dieser Versuchsgruppe zeigte sowohl in der Bulla als auch in der Cochlea massives Bindegewebswachstum, wobei sich das BDG im Mittelohr zu knöchernen Trabekeln, welche sich durch das Lumen zogen, differenziert hatte.

Diese Aufschlüsselung der, in mit Dexamethason behandelten Cochleae aufgefundenen, Bindegewebsneubildungen verdeutlicht, wie breit gefächert, von nicht vorhanden, bis hin zu vollständiger Ausfüllung der jeweiligen Struktur, sich das Bindegewebswachs-

tum in dieser Experimentalgruppe darstellte. Auch in den anderen Versuchsgruppen reichte die Beurteilung des BDG-Wachstums von nicht vorhanden bis maximaler Ausbildung. Tabelle 2 verdeutlicht, dass bei einem Vergleich der DEX-behandelten Innenohren mit denen der anderen Versuchsgruppen keine das Bindegewebswachstum betreffenden Tendenzen beobachtet werden konnten.

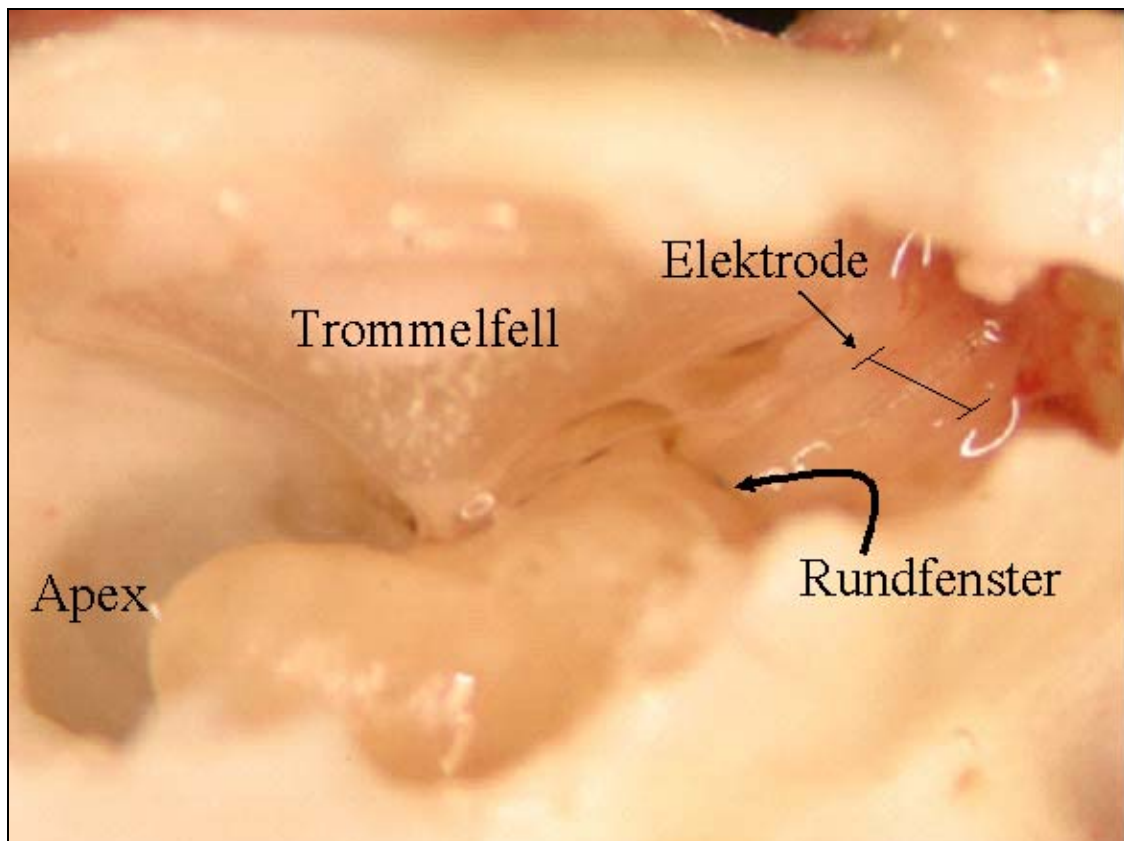


Abb. 27: Darstellung eines eröffneten Felsenbeines mit Sicht auf das Trommelfell, die Cochlea und die inserierte Elektrode. Dies ist eine beispielhafte Darstellung für ein Tier dessen BDG-Wachstum im Mittelohr mit 0 bewertet wurde (Cochlea D12L). Die Flüssigkeitsansammlung ist durch die Präparation in PBS bedingt.

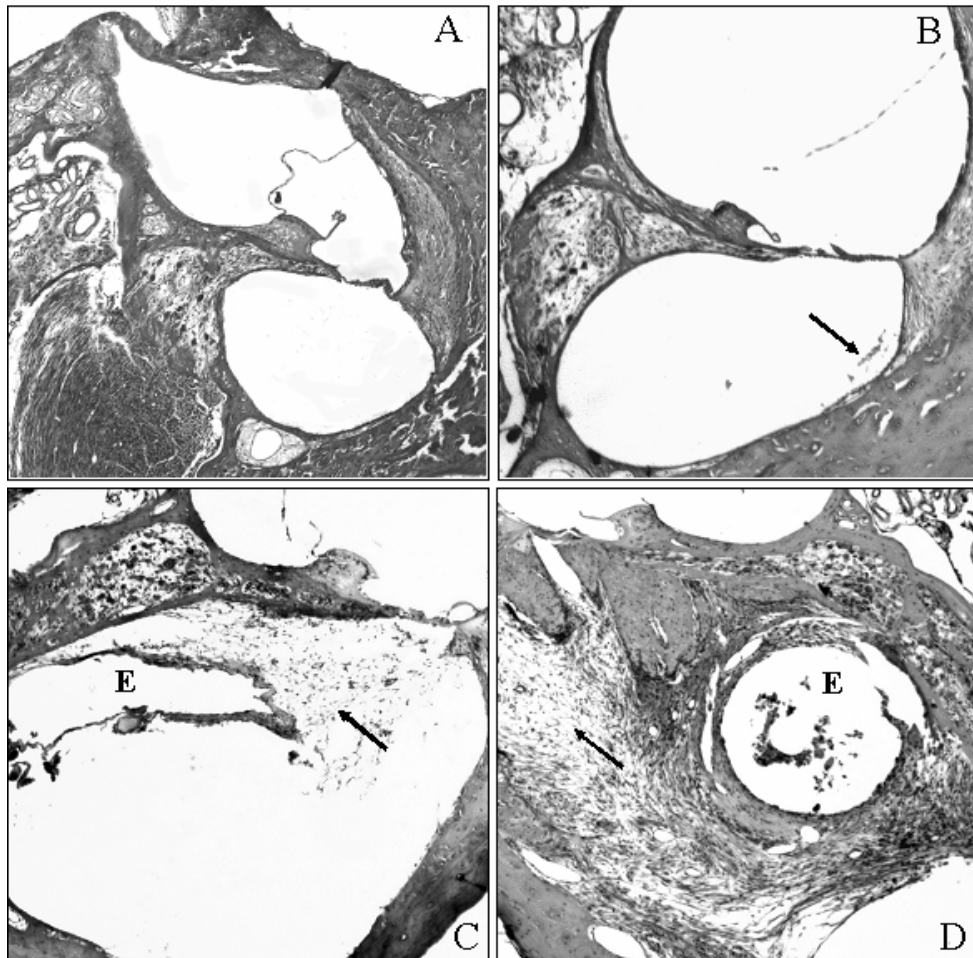


Abb. 28: Beispielhafte Darstellungen der vier unterschiedlichen Kategorien der Bindegewebsneubildung in der Cochlea. A: keine Bindegewebsneubildung =0; B: schwache Bindegewebsneubildung =+; C: starke Bindegewebsneubildung =++; D: vollständige Füllung der Sc. tympani mit Bindegewebe =+++. Die Pfeile weisen auf das vorhandene Bindegewebe; E: Elektrodenkanal; Aufgrund der Elektrodenkanäle in den Bildern C und D kann zudem auf die Lage der Elektrode in der Sc. tympani geschlossen werden. Je näher die Elektrode am Modiolus platziert wird, desto näher befindet sie sich auch an den Zielzellen der elektrischen Stimulation und der Faktorapplikation, den Spiralganglienzellen, und kann so optimal wirken. Anhand der in den Teilabbildungen C und D erkennbaren, durch das Bindegewebe gebildeten Kanäle, lässt sich auf eine Elektrodenpositionierung direkt unterhalb des Rosenthalschen Kanals am Modiolus schließen. Vergrößerung: 40fach.

Tab. 3: Beurteilung des Bindegewebes in den implantierten Cochleae und den zugehörigen Mittelohren. Erläuterung: Bulla: 0 = kein Bindegewebe, + = Bildung eines dünnen BDG-Schlauches um die Elektrode, ++ = Bildung eines stark ausgeprägten Bindegewebsschlauches um die Elektrode, +++ = Ausbreitung des BDG im Mittelohr; Cochlea: 0 = kein Bindegewebe, + = schwache Bindegewebsneubildung, ++ = starke Bindegewebsneubildung, +++ = vollständige Füllung der Sc. tympani mit Bindegewebe.

Versuchsgruppe	Tier	Bulla	Cochlea	Anmerkungen
AP	79	+	+	
	68	++	++	
	67	++	0	
	65	++	+++	
	20		+++	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	18		0	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	15		0	Die Bulla wurde nicht beurteilt
AP+ES(M)	78	+	+	
	75	0	+++	
	74	+	+++	
	73	++	+++	
	72	+	+++	
	69	++	+++	
GDNF	32	0	++	
	34		+++	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	35		0	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	36		0	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	56		0	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	60		+++	Die Bulla wurde nicht beurteilt
GDNF+ES	23	+	+++	
	39		+++	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	41	+++	+++	
	42		++	Die Bulla wurde nicht beurteilt
	53		0	Die Bulla wurde nicht beurteilt
BDNF	B01	0	0	
	B02	+		Cochlea nicht beurteilbar
	B09	0	0	
	B12	++		Cochlea nicht beurteilbar
	B15	++	+++	
	B25	+	++	
BDNF+ES	B04			
	B24	++	++	
	B26	0	+++	
	B27	+	0	
	B28	+	+++	
AP+ES(B)	B35	+		
	B36	++	+++	
	B46	+	+++	

Tab. 3 (Fortsetzung)

Versuchsgruppe	Tier	Bulla	Cochlea	Anmerkungen
DEX	D05L	0	0	
	D06L	0	0	
	D15L	+	+++	
	D17L	+++	0	
	D18L	+++	+++	Mittelohr mit knöchernen Trabekeln durchzogen
	D19L	+	+++	
DEX+ES	D02L	++	+++	
	D11L	++	++	
	D12L	0	+++	
	D16L	++	+++	
	D25L	++	+++	

5.5.2 Wirkung von Dexamethason auf die Effekte der elektrischen Stimulation

Um die Wirkung von Dexamethason auf den, das Überleben der SGZ beeinflussenden, Effekt der elektrischen Stimulation zu untersuchen, wurden fünf Meerschweinchen mit einer Kombination aus Dexamethason (100 ng/ml) und elektrischer Stimulation (250 pps, 100 μ s pro Phase, 40% duty cycle, 8dB oberhalb der elektrischen HS) versorgt. Die in den so behandelten Cochleae ermittelten durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ wurden mit denen aus mit artifizieller Perilymphe und elektrischer Stimulation durch das gleiche Implantatmodell behandelten Tieren verglichen (Abb.29).

Die durchschnittliche Spiralganglienzell-Dichte der AP+ES(M)-Tiere betrug 0,74 Zellen/ 10.000 μ m², die der DEX+ES-Gruppe 2,05 SGZ/ 10.000 μ m². Die Überlebensrate in den mit DEX und ES behandelten Cochleae war zwar augenscheinlich höher als die in den mit monopolarer elektrischer Stimulation behandelten Cochleae (Abb. 29), jedoch ergab die statistische Auswertung in diesem Fall keinen signifikanten Unterschied.

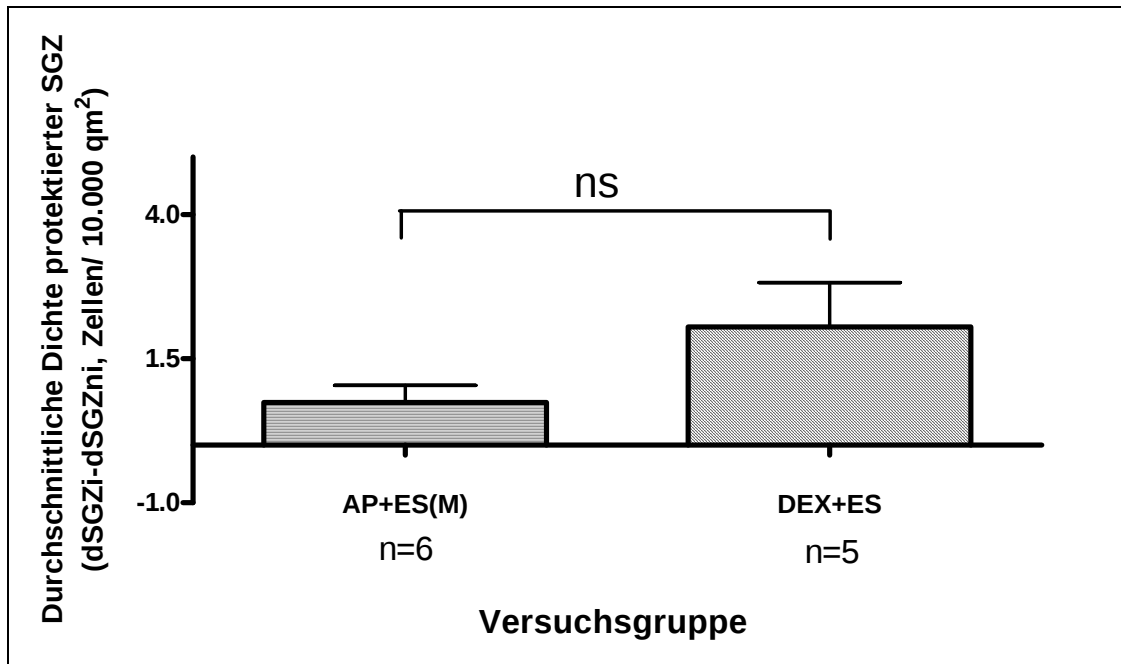


Abb. 29: Darstellung der durchschnittlichen Dichten protektierter SGZ sowie des zugehörigen Standardfehlers der AP+ES(M)-Gruppe und der DEX+ES-Gruppe. (dSGZi-dSGZni = mittlere SGZ-Dichte der implantierten Cochleae abzüglich der durchschnittlichen SGZ-Dichte der kontralateralen ertaubten, nicht implantierten Cochleae; ns = nicht signifikant; n = Anzahl der Tiere)

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte unterschiedlicher, verzögert nach Ertaubung beginnender, lokaler Therapien des Innenohres auf die Funktionalität der Cochlea und die Überlebensrate der Spiralganglienzellen (SGZ) zu untersuchen. Die Nervenwachstumsfaktoren glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) und brain-derived neurotrophic factor (BDNF) wurden als Einzelstimuli und Kombinationsstimuli mit elektrischer Stimulation (ES) appliziert. Zur Bestimmung der Funktionalität der Cochlea wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Um die neuroanatomischen Auswirkungen der Interventionsmethoden zu untersuchen, wurden die mittleren Dichten der überlebenden SGZ quantitativ erfasst. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses lokal verabreichten Dexamethasons (DEX) auf den das Überleben der SGZ beeinflussenden Effekt der elektrischen Stimulation. Weiterhin sollte die Wirkung des Dexamethasons auf die Bindegewebsneubildung nach der Implantation des Elektroden-Mikropumpensystems untersucht werden.

Als Versuchstiere wurden Meerschweinchen gewählt, da für dieses Modell eine Reihe von Vorarbeiten existieren und ein entsprechendes ototoxisches Ertaubungsmodell etabliert ist (WEST et al. 1973).

6.1 Auswirkungen der unterschiedlichen Interventionsmethoden auf die Funktionalität der Cochlea

Die in der vorliegenden Studie präsentierten Ergebnisse der Messungen der akustisch evozierten auditorischen Hirnstammpotentiale (AABR) belegen die erfolgreiche Ertaubung mittels Kanamycin und Ethacrynsäure. In den, dem Ertaubungseingriff folgenden, Messungen waren sowohl positive als auch negative Schwankungen der Hörschwellen von 5 oder 10 dB zu beobachten. Diese sind durch Messfehler zu erklären. Eine Verbesserung der akustischen Hörschwellen durch die verschiedenen Behandlungsmethoden war nicht zu registrieren und aufgrund der irreparablen Haarzellschädigung auch nicht zu erwarten.

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Physiologie der SGZ und den Erfolg von Cochlea-Implantaten. Fehlen die SGZ, können durch das Cochlea-Implantat keine elektrisch evozierten Potentiale der aufsteigenden Hörbahn generiert werden. Der Erhalt vieler SGZ stellt damit ein wichtiges Ziel zur Verbesserung der Funktion der Cochlea-Implantate dar. Mittels Messung elektrisch evozierter akustischer Hirnstammpotentiale (EABR) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die funktionale Effektivität der Interventionsmethoden in den elektrisch stimulierten Versuchstieren untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen dem ermittelten Überleben der SGZ und der Veränderung der elektrischen Hörschwellen im Versuchsverlauf. Ein Absinken der Hörschwelle bedeutete hierbei eine Verbesserung, ein Anstieg der Reizschwelle eine Verschlechterung der cochleaeren Funktion.

Die GDNF+ES-Gruppe wies sowohl die höchste Dichte überlebender SGZ als auch die stärkste Erniedrigung der EABR-Hörschwelle auf. Auch die Tiere, welche mit artifizieller Perilymphe und bipolarer elektrischer Stimulation behandelt wurden (AP+ES(B)-Gruppe) zeigten eine hohe mittlere Dichte der SGZ und ein stetiges Sinken der Hörschwelle während des Versuchsverlaufs. Die mittleren Hörschwellen der DEX+ES-Gruppe und der BDNF+ES-Gruppe stiegen im Versuchsverlauf zunächst an, vielen bis zum 48. Tag jedoch auf einen niedrigeren Wert als den am 21. Versuchstag gemessenen ab. Korrelierend zeigten beide Gruppen hohe Überlebensraten der SGZ. In der monopolar stimulierten Versuchsgruppe (AP+ES(M)-Gruppe) verschlechterte sich die durchschnittliche Hörschwelle verglichen mit der Ausgangshörschwelle um 30 μV und die Dichte der überlebenden SGZ war, verglichen mit den anderen elektrisch stimulierten Gruppen, die niedrigste.

Eine Reihe möglicher singulärer oder additiv wirkender Mechanismen kommen für die Verbesserungen der elektrischen Hörschwellen in Frage. Zunächst zeigen die Ergebnisse, dass die Wachstumsfaktoren und die elektrische Stimulation die Dichte der überlebenden SGZ im Vergleich zu unbehandelten Cochleae erhöht. Somit stehen der elektrischen Stimulation vermehrt vitale Neuronen zur Depolarisation zur Verfügung. Dies erniedrigt die elektrische Hörschwelle, da eine geringere Stromstärke zur Potentialänderung erforderlich ist.

Weiterhin ist durch *in vitro* Experimente (LEFEBVRE et al. 1994; WEFSTAEDT 2006) und *in vivo* Studien (STAECKER et al. 1996; WISE et al. 2005) bekannt, dass neurotrophe Faktoren Neuritenaussprossungen fördern können. Wenn sich dieses Wachstum in Richtung der Elektrode bewegt, wie es STAECKER et al. (1996)

demonstrieren konnten, kann vermutet werden, dass dies auch in einer Reduktion der EABR-Hörschwellen resultiert.

BDNF hat zusätzlich einen großen Effekt auf die Aktionspotentialbildung und die Verteilung der Kalium-Kanäle in den SGZ der Säugetiere (ADAMSON et al. 2002). Zudem ist bekannt, dass BDNF durch Aktivierung einer Natrium-Ionen-Weiterleitung Neuronen des zentralen Nervensystems depolarisiert (BLUM et al. 2002; KAFITZ et al. 1999). Veränderungen der Verteilung und Durchlässigkeit der Ionenkanäle können zu einer Erniedrigung der neuralen Schwellen führen.

Die Ergebnisse der AP+ES(M)-Gruppe stimmen mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen, welche über eine Zunahme der EABR-Hörschwelle während des Implantationszeitraumes in ertaubten Meerschweinchen berichteten, überein (SHEPHERD et al. 2005; SHINOHARA et al. 2002). Die Verschlechterung der Hörschwelle beruht wahrscheinlich auf dem fortschreitenden Prozess der SGZ-Degeneration nach Ertaubung. Die gemessenen durchschnittlichen Hörschwellen der BDNF+ES-Gruppe zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die der AP+ES(M)-Gruppe, sinken zum Versuchsende jedoch auf einen niedrigeren Wert ab, als zum Zeitpunkt der Implantation. Es ist davon auszugehen, dass zunächst die Degeneration der SGZ und die damit verbundene Erhöhung der EABR-Hörschwelle überwiegt, dann jedoch die Wirkung des BDNF verstärkt hervor tritt.

Die präsentierten Daten belegen eine, durch die Kombination aus Wachstumsfaktoren und elektrischer Stimulation hervorgerufene, Verbesserung der Funktionalität der Cochlea. Die Erniedrigung der elektrischen Hörschwelle nach Anwendung der Kombinationsstimuli steht in direktem Zusammenhang zu der klinischen Anwendung von Cochlea-Implantaten. Je niedriger die elektrische Hörschwelle liegt, desto geringer ist die zur Generierung von Höreindrücken benötigte Stromstärke. Zum einen ist durch eine minimierte Stromstärke eine anatomisch genauere Stimulation der cochleaeren Strukturen möglich. Bei hohen Stimulusintensitäten besteht ein großes elektrisches Feld, welches unter Umständen angrenzende Strukturen wie den Nervus facialis oder das Gleichgewichtsorgan mitbeeinflusst. Zum anderen erniedrigt sich durch eine geringere Stromstärke der Energieverbrauch. Dies hat praktische Vorteile für die Patienten, da sich die Batterielebensdauer erhöht.

6.2 Überleben der Spiralganglienzellen in den ertaubten, nicht implantierten Cochleae

Um auszuschließen, dass die einseitige cochleäre Applikation der neurotrophen Faktoren Einfluss auf die kontralaterale Cochlea ausübt, wurden die Überlebensraten der SGZ der ertaubten, nicht implantierten Cochleae miteinander verglichen. Frühere Untersuchungen konnten unilateral intracochleär applizierte Substanzen auch in der assoziierten kontralateralen Cochlea detektieren, beziehungsweise deren biologische Wirkungen auch kontralateral nachweisen (LALWANI et al. 1997, 1998; STÖVER et al. 2000b). Die Ursache hierfür wird in der Substanzausbreitung aus der Perilymphe der inokulierten Sc. tympani, über den *Ductus cochlearis* in den Liquor, und von dort, über den kontralateralen *Ductus cochlearis* zur gegenüberliegenden Cochlea gesehen (STÖVER et al. 2000b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die durchschnittlichen Dichten der überlebenden SGZ der ertaubten, nicht implantierten Cochleae in allen Versuchsgruppen dieser Studie nahezu identisch waren. Die Gegenüberstellung der mittleren Dichte der Neuronen der linken Cochleae der verschiedenen Therapiegruppen jedoch zeigte statistisch signifikante Differenzen. Ebenso statistisch signifikant fiel der Vergleich der durchschnittlichen Dichten überlebender SGZ der linken (behandelten Cochleae) abzüglich der der assoziierten rechten Cochleae aus. Dies lässt den Schluss zu, dass die linksseitigen Substanzapplikationen keinen Einfluss auf die kontralateralen Cochleae hatten.

Um sicher zu stellen, dass die durchschnittlichen Dichten, durch die Interventionen überlebender, SGZ verglichen wurden, nutzten wir die rechtsseitig detektierte Dichte der SGZ als Basiswert der Zelldichte. Dieser Basiswert gab, da von der jeweiligen Therapie unbeeinflusst, das Überleben der SGZ nach 48 Tagen Taubheit je Tier wieder. Auf diesen Wert wurde die durchschnittliche, durch Implantation, Substanzapplikation und/oder elektrische Stimulation manipulierte Dichte der SGZ der kontralateralen Cochlea bezogen. Die Differenz der Dichten der SGZ der linken und rechten Cochlea eines Tieres gab die durch die jeweils angewendete Intervention überlebenden Spiralganglienzellen pro Tier an. Der Vergleich der durchschnittlichen Dichten der überlebenden SGZ jeder Experimentalgruppe erlaubte die Beurteilung des protektiven Effekts der jeweiligen Therapie auf die SGZ nach dreiwöchiger Ertaubung.

6.3 Beurteilung der Dichten überlebender Spiralganglienzellen in den mit AP und DEX behandelten Cochleae

Zwei Versuchsgruppen wurden weder Nervenwachstumsfaktoren appliziert noch wurden sie elektrisch stimuliert. Eine dieser Gruppen wurde mit artifizieller Perilymphe behandelt (AP-Gruppe). Die Dichte der überlebenden SGZ dieser Gruppe diente als Basiswert für die Beurteilung der Überlebensraten der SGZ der anderen Versuchsgruppen. Die zweite Gruppe wurde mit Dexamethason behandelt (DEX-Gruppe). Anhand dieser Gruppe sollte das Bindegewebswachstum in implantierten Cochleae untersucht werden. Zudem stellte sie eine Vergleichsgruppe zur Beurteilung des in der DEX+ES-Gruppe ermittelten Überlebens der SGZ dar. Beide Gruppen (AP- und DEX-Gruppe) geben die Dichte überlebender SGZ nach 48 Tagen Taubheit und Manipulation durch die Insertion des Elektrodenträgers wieder.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die AP-Gruppe als auch die DEX-Gruppe in den implantierten Cochleae eine geringere durchschnittliche Dichte der überlebenden SGZ aufweist, als in den jeweils zugehörigen kontralateralen Cochleae. Der Vergleich der durchschnittlichen Dichten überlebender SGZ der AP-Gruppe und der DEX-Gruppe ergab keinen signifikanten Unterschied. Da davon auszugehen ist, dass sowohl artifizielle Perilymphe als auch Dexamethason, in einer Konzentration von 100 ng/ml, keine toxische Wirkung auf die Spiralganglienzellen hatten (SHIRWANY et al. 1998; TAKEMURA et al. 2004), lässt sich vermuten, dass der Vorgang der Applikation von Substanzen und/oder die chirurgische Intervention zu einer gesteigerten Degeneration der SGZ führten. Diese Vermutung wird von SHEPHERD et al. (2005) unterstützt, welche in ertaubten und mit AP behandelten Cochleae eine geringere Dichte überlebender SGZ vorfanden, als in den assoziierten ertaubten, aber ansonsten unbehandelten Cochleae.

Im Rahmen der Auswertung des SGZ-Überlebens wurde neben der Kontrolle der Zerstörung des Cortischen Organs und des Bindegewebswachstums in der Scala tympani auch auf eventuelle Beschädigungen der intracochleaeren Strukturen durch das Implantat geachtet. Obwohl histologisch keine Defekte identifiziert wurden kämen dennoch Mikroläsionen der Stria vascularis, welche Störungen der Homöostase der Perilymphe bedingen könnten, in Frage. Eine verschlechterte oder unterbleibende Nährstoffversorgung der Nervenzellen und somit eine beschleunigte Degeneration gegenüber der nicht implantierten Seite wäre die Folge. Zukünftige mikrostrukturelle

Untersuchungen der Cochlea könnten hier möglicherweise zusätzliche Informationen ergeben.

6.4 Bewertung der Spiralganglien-Überlebensrate nach chronischer elektrischer Stimulation

Zur Untersuchung der Effekte einer drei Wochen nach Ertaubung verzögert einsetzenden elektrischen Stimulation (ES) auf das Überleben der SGZ wurden Meerschweinchen mit einem Elektroden-Mikropumpensystem versorgt. Um zusätzlich die Auswirkung der Positionierung der Elektrodenkontakte zu untersuchen, wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. Eine Gruppe wurde mit einem monopolaren Elektroden-Mikropumpensystem implantiert (AP+ES(M)-Gruppe) und eine zweite Gruppe mit einem bipolaren Modell (AP+ES(B)-Gruppe).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die durchschnittliche SGZ-Dichte der mit elektrischer Stimulation therapierten Cochleae der AP+ES(B)-Gruppe höher lag als die der assoziierten nicht therapierten Cochleae. Die mittlere Überlebensrate der SGZ der AP+ES(M)-Gruppe war in den elektrisch stimulierten Cochleae signifikant höher als in den zugehörigen ertaubten, aber ansonsten unbehandelten Cochleae ($p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede waren hinsichtlich des Protektionsvermögens der monopolaren und bipolaren Stimulationsmethode feststellbar.

Somit belegen die Daten, dass auch eine 24 Tage nach Ertaubung einsetzende chronische elektrische Stimulation die SGZ vor sekundärer Degeneration schützt. Zur Erzielung des gesteigerten Überlebens der SGZ kann demnach sowohl monopolare als auch bipolare Stimulation angewendet werden.

Dieses Resultat stellt eine wesentliche Ergänzung früherer Studien dar, welche den steigernden Effekt der elektrischen Stimulation auf die Überlebensrate der SGZ untersuchten. MITCHELL et al. (1997) stimulierten Meerschweinchen ab dem achten Tag nach Ertaubung und verwendeten die gleichen Stimulationsparameter wie in der vorliegenden Arbeit. Verglichen mit der Dichte der SGZ in den ertaubten Kontrollcochleae, zeigten die chronisch stimulierten Cochleae eine durchschnittliche Erhöhung der überlebenden SGZ von 25,7%. In der vorliegenden Studie resultierte die monopolare elektrische Stimulation, verglichen mit den zugehörigen Kontrollohren, in einer 25,87%igen Erhöhung der Dichte überlebender SGZ. Die bipolare elektrische Stimulation steigerte die Überlebensrate der SGZ in den implantierten Cochleae,

verglichen mit den zugehörigen Kontrollcochleae, um 30,27%. Dies entspricht annähernd den von MITCHELL et al. (1997) demonstrierten Daten, obwohl in der vorliegenden Studie ein um drei Wochen verzögerter Therapiebeginn vorlag. Aufgrund der unterschiedlichen Verzögerungszeiträume zwischen der Ertaubung und dem Therapiebeginn bei MITCHELL et al. (1997) und der vorliegenden Arbeit ist davon auszugehen, dass die von MITCHELL et al. (1997) ermittelten Dichten überlebender SGZ höher waren, als die in dieser Arbeit ermittelten Dichten. Jedoch gaben MITCHELL et al. (1997) keine absoluten Zellzahlen die Dichte der überlebenden SGZ betreffend an. Aufgrund der unvollständigen Daten ist kein Vergleich der von ihnen ermittelten absoluten Dichten der überlebenden SGZ mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Zellzahlen möglich.

Die in der vorliegenden Studie durch elektrische Stimulation bedingten Dichten überlebender SGZ und die von MITCHELL et al. (1997) veröffentlichten Daten, differieren von denen anderer Arbeitsgruppen. Sowohl LOUSTEAU (1987) als auch HARTSHORN et al. (1991) ermittelten in elektrisch stimulierten Meerschweinchen ein um mindestens 20% höheres Überleben der SGZ als in der vorliegenden Arbeit oder bei MITCHELL et al. (1997) detektierbar war. LOUSTEAU (1987) und HARTSHORN et al. (1991) stimulierten die Tiere ab dem zweiten Tag nach Ertaubung (1 Std./Tag) bzw. direkt beginnend nach der ototoxischen Behandlung (2 Std./ Tag). LOUSTEAU (1987) fand in den elektrisch stimulierten Cochleae eine um 59,07% höhere mittlere Dichte der SGZ als in den Kontrollcochleae. HARTSHORN et al. (1991) detektierten bei elektrisch stimulierten Tieren ein, verglichen zum Kontrollmaterial, durchschnittlich um 50% höheres Überleben der SGZ. Sowohl LOUSTEAU (1987) als auch HARTSHORN et al. (1991) stimulierten intermittierend für eine bzw. zwei Stunden am Tag. In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Versuchsmodell hingegen, erfolgte die elektrische Stimulation 24 Stunden am Tag. Somit ist davon auszugehen, dass die Dauer der elektrischen Stimulation nicht ausschlaggebend für die von LOUSTEAU (1987) und HARTSHORN et al. (1991) ermittelten höheren Dichten überlebender SGZ ist. Vielmehr lässt sich vermuten, dass das Fehlen einer Therapieverzögerung bei LOUSTEAU (1987) und HARTSHORN et al. (1991) der Grund für deren effektivere Protektion der SGZ von mehr als 20% im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen ist.

Eine längere Verzögerung des Therapiebeginns führt zu einer verstärkten Degeneration der SGZ und somit zu einer höheren Dichtereduktion (WEBSTER u. WEBSTER 1981).

Dies bedeutet, dass aufgrund der Degenerationskinetik bei verzögert einsetzender elektrischer Stimulation eine geringere Anzahl SGZ vorhanden ist, die durch die beginnenden Therapie vor Degeneration geschützt werden kann. Dementsprechend verringert sich abhängig von der bei Therapiebeginn vorhandenen Ausgangsdichte der SGZ auch die Dichte der überlebenden SGZ bei Beendigung der Behandlung.

Die Anzahl überlebender SGZ ist mit von entscheidender Bedeutung für die Effektivität eines Cochlea-Implantats. Die Verringerung des Ausmaßes der Degeneration der Zellen nach Ertaubung ist somit ein wichtiges Ziel. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch eine, nach Ertaubung verzögert einsetzende, elektrische Stimulation zu einem signifikant gesteigerten Überleben der SGZ führt. Da Cochlea-Implantat-Patienten in der Regel erst Wochen bis Monate nach Ertaubung mit einer Prothese versorgt werden, lassen unsere Ergebnisse darauf schließen, dass auch im Menschen durch die Stimulation mittels Cochlea-Implantat potentiell eine Protektion der verbliebenen Spiralganglienzellen möglich sein sollte.

6.5 Effekte einer verzögerten Therapie mittels neurotropher Faktoren auf das Überleben der Spiralganglienzellen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Gegenüberstellung der neuroanatomischen Reaktionen der ertaubten Cochlea auf eine 21 Tage nach Ertaubung verzögert einsetzende Therapie mittels Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF, 100 ng/ml) und Brain derived neurotrophic factor (BDNF, 50 ng/ml).

Die Ergebnisse belegen, dass eine chronische intracochleare Applikation rekombinanten GDNFs zu einer signifikanten Protektion der SGZ vor sekundärer Degeneration führt. Auch exogenes BDNF bewirkte eine Steigerung der Überlebensrate der SGZ verglichen zur Kontrollgruppe. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die untersuchten neurotrophen Faktoren (NTF) auch bei einer Therapieverzögerung von 21 Tagen eine Erhöhung der Dichte überlebender SGZ bewirken. In der BDNF-Gruppe variierten die Überlebensraten der SGZ der einzelnen Cochleae stark. Dies bedingte große Standardabweichungen, welche vermutlich dafür verantwortlich sind, dass bei der statistischen Auswertung, verglichen mit der Kontrollgruppe, keine Signifikanzen nachweisbar waren.

Die vorliegenden Ergebnisse erweitern zum Teil die Resultate anderer Arbeiten erheblich. MILLER et al. (1997) konnten zeigen, dass BDNF in einer Konzentration

von 50 ng/ml, sieben Tage nach Ertaubung verabreicht, einen signifikanten Schutz der SGZ vor Degeneration bietet. Auch bei 14 Tage verzögertem Behandlungsbeginn konnte eine Minderung der SGZ-Degeneration festgestellt werden (GILLESPIE et al. 2004), wobei in diesem Fall jedoch eine um den Faktor Tausend höhere Konzentration (65,2 µg/ml) verwendet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass BDNF auch bei einer Therapieverzögerung von drei Wochen, und unter Verwendung einer sehr viel niedrigeren Konzentration, eine starke Protektion der SGZ bewirken kann.

WEBSTER und WEBSTER (1981) untersuchten unterschiedliche Ertaubungsmethoden an Meerschweinchen. Sie demonstrierten, dass eine Kombination aus Kanamycin und Ethacrynsäure binnen 2 Wochen nach Behandlung zu einem signifikanten Verlust der Neuronen führt.

Den Ergebnissen von WEBSTER und WEBSTER (1981) folgend betrug die Behandlungsverzögerung in der vorliegenden Arbeit 21 Tage, so dass eine signifikante Spiralganglienzelldegeneration, wie sie in humanen CI-Patienten vorliegt, gewährleistet war.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, welche GDNF als erfolgreiche Substanz zur Protektion von SGZ nach Ertaubung identifizierten, zeigen die Zellzählungen der vorliegenden Arbeit in den GDNF-behandelten Cochleae eine geringere SGZ-Dichte von 4,09 Zellen/ 10.000 µm². YLIKOSKI et al. (1998) ermittelten im Rahmen ihrer Versuche $8,7 \pm 0,9$ SGZ auf 10.000 µm² Fläche der Rosenthal-schen Kanäle GDNF-behandelter Cochleae. YAGI et al. (2000) fanden ungefähr 25 SGZ und KANZAKI et al. (2002) durchschnittlich 9 SGZ auf 10.000 µm².

In den genannten Arbeiten wurde GDNF oder ein entsprechender GDNF-exprimierender Vektor entweder direkt nach Applikation ototoxischen Substanzen bzw. maximal 7 Tage nach Lärmexposition verabreicht.

Die Ursache für die Differenz bezüglich der SGZ-Überlebensraten verglichen mit unseren Ergebnissen liegt vermutlich in der von uns angewendeten längeren Therapieverzögerung von 21 Tagen begründet. Hintergrund dieser Annahme ist die Degenerationskinetik, welcher die Spiralganglienzellen unterliegen (WEBSTER u. WEBSTER 1981).

6.6 Beurteilung der protektiven Effekte einer verzögerten kombinierten Therapie aus Nervenwachstumsfaktoren und elektrischer Stimulation auf Spiralganglienzellen

Ein übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Effekte einer synchronen Therapie aus Nervenwachstumsfaktoren (NTF) und elektrischer Stimulation auf das Überleben der SGZ nach Ertaubung. Es sollte ermittelt werden, ob die Kombinationstherapie auch nach einem Verzögerungsintervall zwischen Ertaubung und Therapiebeginn protektiv auf überlebende SGZ wirkt. Zudem wurde die Fragestellung bearbeitet, ob der protektive Effekt der Kombination aus NTF und elektrischer Stimulation verglichen mit den jeweiligen Einzelinterventionen differiert. GDNF (100 ng/ml) und BDNF (50 ng/ml) wurden ab dem 21. Tag nach systemischer Ertaubung chronisch intracochleaer appliziert. Die elektrische Stimulation begann am 24. Versuchstag und wurde bis zum Versuchsende (Tag 48) fortgeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine synchrone Behandlung mit GDNF bzw. BDNF und einer elektrischen Stimulation in einer statistisch signifikanten Zunahme der überlebenden Spiralganglienzellen resultiert. Zudem belegen die Daten, dass dieser Effekt auch nach einer Therapieverzögerung von drei Wochen erreicht wird. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Kombinationstherapien einen effektiveren Schutz der SGZ bieten als die jeweiligen Einzelstimuli. Die GDNF+ES-Gruppe zeigte, verglichen mit der GDNF-Therapie, ein signifikant gesteigertes Überleben der SGZ. Der Vergleich der SGZ-Überlebensraten der GDNF+ES-Gruppe und der AP+ES(M)-Gruppe zeigte einen hoch signifikanten Unterschied. Die Erhöhung der Dichte der überlebenden SGZ durch den Kombinationsstimulus aus BDNF und elektrischer Stimulation übertraf jene, welche in der BDNF-Gruppe detektiert wurde um durchschnittlich 0,59 Zellen/ 10.000 μm^2 . Gegenüber der AP+ES(B)-Gruppe erhöhte sich die durchschnittliche Dichte der SGZ um 0,50 Zellen/ 10.000 μm^2 . Der Vergleich der Effekte der GDNF+ES- und BDNF+ES-Behandlung zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Vorangegangene Arbeiten untersuchten den, zwar nicht um Wochen nach Ertaubung verzögert einsetzenden, doch kombinierten Effekt aus zeitgleicher GDNF-Applikation und elektrischer Stimulation (KANZAKI et al. 2002). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, welches belegt, dass eine GDNF Behandlung in Kombination mit elektrischer Stimulation, verglichen zu den jeweiligen Einzeltherapien, ein signifikant gesteigertes

Überleben der SGZ bewirkt, stimmt grundsätzlich mit den Befunden von KANZAKI et al. (2002) überein. Kanzaki und Mitarbeiter ertaubten Meerschweinchen mittels Kanamycin und Ethacrynsäure, applizierten einmalig GDNF exprimierende adenovirale Vektoren (AdGDNF) und begannen die elektrische Stimulation acht Tage nach der ototoxischen Behandlung für 35 Tage. In diesem Versuchsregime zeigte die durchschnittliche Dichte der überlebenden SGZ der GDNF+ES-Gruppe verglichen mit derjenigen der GDNF-Gruppe und der ES-Gruppe eine signifikante Erhöhung mit $p < 0,05$. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Daten von KANZAKI et al. (2002) bezüglich des Vergleichs der GDNF+ES-Gruppe und der GDNF-Gruppe mit $p < 0,05$. Darüber hinaus zeigte der statistische Vergleich der Dichten der überlebenden SGZ in der GDNF+ES-Gruppe und der ES-Gruppe in der vorliegenden Arbeit mit $p < 0,01$ eine noch höhere Signifikanz.

Die Stimulationskonditionen waren in beiden Versuchsreihen, abgesehen von der verwendeten Stromstärke (Kanzaki: 100 μ A; hier: 8 dB oberhalb der elektrischen Hörschwelle), identisch. Die Signifikanzen zwischen der GDNF+ES- und der GDNF-Gruppe fielen bei beiden Experimenten gleich aus. Das legt die Vermutung nahe, dass die im Rahmen der beiden Experimente unterschiedlich stark ausgeprägten protektiven Effekte der GDNF+ES-Gruppe verglichen mit der ES-Gruppe (KANZAKI et al. 2002: $p < 0,05$; in der vorliegenden Arbeit: $p < 0,01$) in den unterschiedlichen Applikationsmethoden begründet liegt. Kanzaki und Mitarbeiter untersuchten die Effektivität der vektorvermittelten GDNF-Expression in der Cochlea und bewiesen, dass im Rahmen des Versuches eine GDNF-Synthese gewährleistet war. Doch diese Detektion erfolgte nur qualitativ. Bis heute bestehen kaum Möglichkeiten bei, durch virale Vektoren vermittelter, Proteinexpression die Freisetzungsrates und somit die Konzentration des synthetisierten Proteins im Innenohr zu bestimmen. KANZAKI et al. (2002) bewiesen mit ihrer Arbeit, dass GDNF in Kombination mit ES additiv protektierend auf SGZ wirkt. Dieses Erkenntnis lieferte einen neuen Ansatzpunkt zur Erforschung neuer Methoden zur Optimierung der Effektivität von Cochlea Implantaten. Um genauere Informationen bezüglich des betreffenden Proteins und seiner Wirkung, deren Mechanismen und eventueller toxischer Effekte zu erhalten, bedarf es der Kenntnis der verwendeten Konzentrationen. Mit dem Applikationssystem der Mikropumpen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das reine Protein in einer genau definierten Konzentration über einen exakt bestimmbaren Zeitraum am gewünschten Zielort freigesetzt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass 100 ng/ml GDNF, ab dem 21. Tag nach Ertaubung für einen Zeitraum von 4 Wochen chronisch intracochleaer injiziert, in Kombination mit elektrischer Stimulation zu einer hoch signifikanten Steigerung der Überlebensrate der Spiralganglienzellen führt.

Die in dieser Arbeit untersuchte Kombination aus BDNF und synchroner bipolarer elektrischer Stimulation resultierte, verglichen zu der Kontrollgruppe, in einer statistisch signifikanten Zunahme der Dichte der überlebenden SGZ. Diese Erhöhung der Dichte der Neuronen in der BDNF+ES-Gruppe übertraf auch die in der BDNF-Gruppe ermittelte durchschnittliche Dichte überlebender SGZ. Die Zunahme des trophischen Effektes des exogenen BDNFs auf die SGZ durch die chronische elektrische Stimulation wurde auch im Rahmen vorhergehender Arbeiten, welche keine Therapieverzögerung anwendeten, beschrieben (SHEPHERD et al. 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass auch eine drei Wochen nach akutem sensorineuralen Hörverlust verzögert einsetzende chronische Kombinationstherapie aus BDNF und elektrischer Stimulation den protektiven Effekt der alleinigen BDNF-Therapie auf die SGZ übertrifft.

Verschiedene Mechanismen, bzw. eine Kombination aus diesen, könnten für den additiven Effekt der Therapie aus neurotrophen Faktoren und elektrischer Stimulation ursächlich in Frage kommen. Zum einen ist bekannt, dass neuronale Aktivität, also auch der Stimulus der elektrischen Stimulation, durch Hochregulation der Transkription des BDNF-Gens, die Sekretion endogenen BDNFs in verschiedensten Neuronen steigert (ROCAMORA et al. 1996; NANDA u. MACK 2000; BALKOWIECK u. KATZ 2000; LU 2003). Zum anderen kann hochfrequente, durch elektrische Stimulation induzierte, neuronale Aktivität die Anzahl der BDNF spezifischen TrkB-Rezeptoren auf der Oberfläche von Neuronen des zentralen Nervensystems hochregulieren (MEYER-FRANKE et al. 1998; DU et al. 2000). Ebenso können die GDNF-Rezeptoren GFR- α 1 und – α 2 durch Depolarisation der Zellmembranen vermehrt exprimiert werden (DOXAKIS et al. 2000). Durch die erhöhte Rezeptorzahl kann die elektrische Stimulation zu einer verstärkten Wirkungsweise von BDNF und GDNF in den Spiralganglienzellen führen. Es ist jedoch zu bemerken, dass dieser Effekt die peripheren Neurone, und somit die Spiralganglienzellen betreffend, noch nicht nachgewiesen wurde.

Die beschriebenen Mechanismen können in einer, die Effekte der Applikation der exogenen neurotrophen Faktoren steigenden, trophischen Aktivität resultieren. Dies erklärt jedoch nicht die anatomisch teilweise bis zum Apex der Cochlea reichende Erhöhung der Dichte überlebender SGZ in den mit BDNF+ES und GDNF+ES therapierten Cochleae. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Elektrodenmodelle verwendet, welche lediglich die basale Windung der Cochlea direkt elektrisch stimulierten (Kontakte 1 und 4 der bipolaren Elektrode, Ballkontakt der monopolen Elektrode). Dennoch fand sich eine Protektion der SGZ in allen Windungen der Cochlea. Dieser weit gestreute trophische Effekt der elektrischen Stimulation, wurde im Rahmen anderer *in vivo* Versuche, welche den Effekt der elektrischen Stimulation untersuchten, als typisch, aber nicht erklärbar, beschrieben (LEAKE et al. 1999; MITCHEL et al. 1997).

Die vorliegenden Daten belegen, dass auch eine drei Wochen nach akutem sensorineuralen Hörverlust verzögert einsetzende Kombinationstherapie aus GDNF oder BDNF und elektrischer Stimulation den protektiven Effekt der jeweiligen Einzeltherapie auf die SGZ übertrifft. Dies ist eine neue und wichtige Erkenntnis. Für die potentielle humane Anwendung bedeutet dies, dass in einer klinischen Situation mit bereits zeitlich weit zurückliegender Ertaubung eine Kombinationstherapie aus GDNF und ES oder BDNF und ES sinnvoller sein könnte, als die jeweilige Einzeltherapie.

6.7 Bewertung des Bindegewebswachstums nach Dexamethason-Applikation

Die Reaktion des Innenohres auf das Cochlea-Implantat wird als Formation eines bindegewebigen Schlauches um den Elektrodenträger beschrieben. Zusätzlich können, abhängig vom Ausmaß des Insertionstraumas, Reaktionen wie Ossifikation oder Bildung von Narbengewebe an den intracochleaeren Strukturen auftreten. Diese Veränderungen wurden anhand von post mortem durchgeführten Felsenbeinhistologien beschrieben und werden als Resultat inflammatorischer Prozesse interpretiert. Dexamethason stellt eine potentielle Intervention zur Vermeidung dieser ungewollten Nebeneffekte der Implantation des Elektrodenträgers dar. Ab der Insertion der Elektrode wurden chronisch über 4 Wochen 100 ng/ml DEX in die Cochlea appliziert.

Obwohl Dexamethason bekannte antiinflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften besitzt, ließ sich ein solcher Effekt in den vorliegenden Untersuchungen

nicht nachweisen. Die Ergebnisse zeigen keine Unterschiede hinsichtlich des Bindegewebswachstums in implantierten Cochleae mit und ohne Dexamethasonapplikation.

Frühere Untersuchungen konnten eine biologische Wirkung des synthetischen Glukokortikoids Triamcinolon im Innenohr nachweisen (PAASCHE et al. 2006). Es wurden signifikante Reduktionen der Impedanzen bei Cochlea-Implantat-Patienten nach einmaliger Applikation einer 20 mg/ml Triamcinolon-Kristallsuspension untersucht. Aufgrund dieser Befunde vermuteten wir, dass sich die postoperative Bindegewebsneubildung durch Steroidgabe verringern lässt. Die hier ermittelten Ergebnisse können dies allerdings nicht bestätigen.

Es ist davon auszugehen, dass die operationsbedingten Entzündungsprozesse vier Wochen nach der Implantation der Elektrode beendet sind. Da das Dexamethason in der vorliegenden Studie bis zu diesem Zeitpunkt chronisch appliziert wurde, ist der Therapiezeitraum als Ursache für die fehlende Bindegewebsunterdrückung vermutlich auszuschließen.

Es muss allerdings bedacht werden, dass die Konzentration des Steroids in der vorliegenden Arbeit (100 ng/ml) eventuell zu gering gewählt war. SHIRWANY et al. (1998) zeigten, dass 1mg/ml Dexamethason, über vier Wochen einmal wöchentlich in das Innenohr appliziert, keinen pathologischen Effekt auf die Haarzellen ausübt und auch die akustischen Hörschwellen nicht signifikant verändert. Weitergehende Untersuchungen sollten klären, ob höhere Dexamethasonkonzentrationen als die in der vorliegenden Studie gewählten, eventuell geeignet sind, die für die Optimierung des Nerven-Elektrodenkontaktes gewünschte Bindegewebsreduktion zu erzielen. Auch ist die Verwendung von kristalloiden Suspensionen, wie von PAASCHE et al. (2006) beschrieben, eine weitere Möglichkeit einen reproduzierbaren pharmakologischen Effekt auf die Bindegewebsneubildung zu erzielen.

6.8 Einfluss von Dexamethason auf den Effekt der elektrischer Stimulation

Ein weiteres Teilziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Glukokortikoiden auf den protektiven Effekt der elektrischen Stimulation auf die SGZ. Hierfür wurden 100 ng/ml Dexamethason bei zeitgleicher elektrischer Stimulation in die Cochlea appliziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die alleinige monopolare elektrische Stimulation der Cochlea zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der mittleren Dichte überlebender SGZ führt ($p < 0,05$). Die Kombination der elektrischen Stimulation mit Dexamethason führt ebenso zu einer Protektion der SGZ ($p < 0,01$). Der direkte Vergleich beider Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied. Dieses Ergebnis belegt, dass Dexamethason keinen negativen Effekt auf die das Überleben der SGZ steigernde Wirkung der elektrischen Stimulation ausübt.

Dexamethason, in einer Konzentration von 100 ng/ml verabreicht, könnte in Verbindung mit Cochlea-Implantaten lokal als Antiinflammativum eingesetzt werden. Es würde den das Überleben der SGZ beeinflussenden Effekt der Depolarisation durch das Implantat nicht beeinträchtigen.

7 Zusammenfassung

Verena Scheper (2007):

Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen zum protektiven Effekt von Glial cell line-derived neurotrophic factor, Brain-derived neurotrophic factor, Dexamethason und Elektrostimulation auf Spiralganglienzellen ertaubter Meerschweinchen

Hörminderung und Taubheit stellen in den industrialisierten Nationen eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten dar. Die Behandlung taub geborener und ertaubter Patienten ist in den letzten Jahren durch die Einführung künstlicher elektronischer Innenohrprothesen, so genannter Cochlea-Implantate (CI), revolutioniert worden. Inzwischen ist die CI-Versorgung die weitläufig anerkannte Routinebehandlung von Patienten mit vollständigem sensorineuralen Hörverlust. Allerdings gibt es nach wie vor große individuelle Unterschiede hinsichtlich des Erfolges, der mit einem CI erreicht wird.

Eine Erklärung für diese Variabilität könnte in der Anzahl der für eine elektrische Stimulation zur Verfügung stehenden Spiralganglienzellen (SGZ) liegen. Da das CI die Funktion der geschädigten Haarzellen durch eine direkte elektrische Stimulation der SGZ übernimmt, ist der Erfolg eines CI's auch von der Anzahl der für eine elektrische Stimulation zur Verfügung stehenden SGZ abhängig. Diese unterliegen nach Haarzellverlust einer Degeneration, welche mit der Dauer der Taubheitsphase fortschreitet. Neurotrophe Faktoren wie Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) und Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) sowie elektrische Stimulation bewirken, als Einzel- und Kombinationsstimuli direkt nach Ertaubung appliziert, eine Protektion der SGZ vor Degeneration. Unklar war vor der Durchführung dieser Arbeit, ob die Degeneration der SGZ auch bei verzögert einsetzender Therapie verlangsamt, oder gar gestoppt werden kann.

Neben einer möglichst großen Anzahl vitaler SGZ ist für eine optimale Versorgung mit einem CI eine enge Nerven-Elektroden-Interaktion von Bedeutung. Diese kann durch eine Minimierung implantationsbezogener Bindegewebsneubildung im Bereich der inserierten Elektrode verbessert werden. Dexamethason ist aufgrund seiner bekannten anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Eigenschaften bei lokaler Applikation

ins Innenohr potentiell geeignet, unerwünschte Bindegewebsbildungen im Bereich der implantierten CI-Elektroden zu minimieren und damit für eine verbesserte Nerven-Elektroden-Interaktion zu sorgen.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die quantitative Bestimmung der SGZ-Überlebensraten sowie die Untersuchung der Funktionalität der Cochlea nach fortgeschrittener Taubheit. Zusätzlich sollte die Wirkung Dexamethasons auf die Gewebsreaktionen nach Elektrodeninsertion sowie auf den das SGZ-Überleben steigernden Effekt der elektrischen Stimulation untersucht werden. Folgende experimentelle Bedingungen wurden an 49 Meerschweinchen untersucht:

- Einzelstimuli: GDNF (100 ng/ml, n=6), BDNF (50 ng/ml, n=6), Dexamethason (100 ng/ml, n=6), monopolare (AP+ES(M), n=6) und bipolare (AP+ES(B), n=3) elektrische Stimulation (ES)
- Kombinationsstimuli: GDNF+ES(M, n=5), BDNF+ES(B, n=5),
Dexamethason+ES(M, n=5)
- Kontrollgruppe: artifizielle Perilymphe (AP, n=7)

Die Versuche wurden unter Anwendung nachfolgender Methoden und Konditionen durchgeführt:

- Elektrophysiologische Bestimmung der akustischen (AABR) und elektrischen (EABR) Hörschwellen
- Mikrochirurgische systemische Ertaubung
- Implantation der Elektroden-Mikropumpensysteme
- Pumpenwechsel
- Materialgewinnung
- Histologische quantitative Bestimmung der Dichten der SGZ
(Zahl der protektierten SGZ/ 10.000 μm^2)

Tag 0: Messung der akustischen Hörschwelle, Ertaubung; Tag 5: Messung der akustischen Hörschwelle; Tag 21: Messung der akustischen Hörschwelle, Implantation; Tag 24: Beginn der elektrischen Stimulation (stimulierte Tiere); Tag 28: Messung der elektrischen Hörschwelle, Justierung des Stimulators (stimulierte Tiere); Tag 34: Messung der elektrischen Hörschwelle, Justierung des Stimulators (stimulierte Tiere), Pumpenwechsel; Tag 41: Messung der elektrischen Hörschwelle, Justierung des Stimulators (stimulierte Tiere); Tag 48: Messung der elektrischen Hörschwelle (stimulierte Tiere), Materialgewinnung, Aufarbeitung der Cochleae, mikroskopische quantitative Bestimmung der Dichten überlebender SGZ.

Die Ergebnisse der Arbeit belegen ein verbessertes Überleben der SGZ nach 3 Wochen verzögerter Anwendung von GDNF ($p < 0,01$; $1,08 \pm 0,76$ SGZ/ 10.000 μm^2) im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($-0,45 \pm 0,61$ SGZ/ 10.000 μm^2). Die BDNF-Therapie führte gegenüber der Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Erhöhung der SGZ-Überlebensrate ($1,10 \pm 2,93$ SGZ/ 10.000 μm^2). Der Vergleich der protektiven Effekte der beiden Nervenwachstumsfaktoren zeigte keinen Unterschied. Die monopolare und die bipolare elektrische Stimulation führten, verzögert nach Ertaubung initiiert, zu einer gesteigerten Überlebensrate der SGZ ($p < 0,05$; AP+ES(M): $0,74 \pm 0,72$ SGZ/ 10.000 μm^2 , AP+ES(B): $1,19 \pm 0,79$ SGZ/ 10.000 μm^2). Auch die elektrischen Hörschwellen der chronisch stimulierten Versuchsgruppen zeigten im Versuchsverlauf eine Verbesserung. Die Kombinationstherapie aus neurotrophen Faktoren und elektrischer Stimulation bewirkte, trotz der verzögerten Therapieeinleitung, einen zum Teil hoch signifikanten synergistischen, die SGZ protektierenden, Effekt (GDNF+ES: $p < 0,001$; $2,46 \pm 0,76$ SGZ/ 10.000 μm^2 ; BDNF+ES: $p < 0,05$; $1,69 \pm 0,82$ SGZ/ 10.000 μm^2). Dieser spiegelte sich auch funktionell in einer Reduktion der elektrischen Hörschwelle im Versuchsverlauf wider. Die Dexamethasonapplikation konnte postoperatives Gewebewachstum nicht verhindern. Die Kombination Dexamethasons mit elektrischen Stimulation führte zu einer Protektion der SGZ ($p < 0,01$; $2,05 \pm 1,72$ SGZ/ 10.000 μm^2). Somit übt Dexamethason keinen negativen Effekt auf die das Überleben der SGZ steigernde Wirkung der elektrischen Stimulation aus.

Diese Ergebnisse sind innovativ und haben ein großes klinisches Anwendungspotential. Die gewählten Versuchsbedingungen entsprechen viel eher der klinischen Situation, bei der eine Cochlea-Implantat-Versorgung ebenfalls erst mit einem zeitlichen Verzug nach Ertaubung durchgeführt wird. Die gewonnenen Daten belegen, dass die nach Ertaubung einsetzende Degeneration der SGZ mit verzögert initiierten Therapien positiv beeinflusst werden kann. Die kombinierte Intervention aus Nervenwachstumsfaktoren und elektrischer Stimulation erwies sich, im Vergleich zu den jeweiligen Einzelstimuli, als hochgradig geeignet diesen Effekt hervorzurufen. Die Ergebnisse sind sehr ermutigend hinsichtlich einer zukünftigen klinischen Anwendung einer elektrischen Stimulation des Hörnerven durch ein Cochlea-Implantat bei gleichzeitiger lokaler Applikation von Nervenwachstumsfaktoren zur Steigerung der Effektivität der Implantate.

8 Summary

Verena Scheper (2007):

Electrophysiological and histological investigations into the protective effect of glial cell-line derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor, dexamethasone and electrical stimulation on spiral ganglion cells of deafened guinea pigs

Hearing loss – ranging from mild hearing loss to total deafness – is one of the most widespread diseases in the industrialised countries. The treatment of individuals with congenital or acquired deafness has been revolutionized in the past years by the introduction of artificial electronic inner ear prostheses, so-called cochlear implants (CI). Meanwhile cochlear implantation has become widely accepted as routine treatment for patients with complete sensorineural hearing loss. However, there are still large individual differences in the level of success achieved with a cochlear implant.

One explanation for this variability could lie in the number of spiral ganglion cells (SGC) available for electrical stimulation. As the CI takes over the function of the damaged hair cells by means of direct electrical stimulation of the SGC, the success of a CI also depends on the number of SGC available for electrical stimulation. After hair cell loss, these undergo degeneration, which progresses with ongoing deafness. Neurotrophic factors such as glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as well as electrical stimulation, if applied as single and combined stimuli directly after the onset of deafness, protect SGC from degeneration. Prior to starting this work it was not clear whether SGC degeneration can be slowed down or even stopped if the commencement of therapy is delayed.

Apart from the fact that as large a number of vital SGC as possible must be available, good nerve-electrode interaction is of great importance in order to achieve optimum results with a cochlear implant. This can be improved by minimising implantation-related connective tissue growth around the inserted electrode. Due to its well-known anti-inflammatory and antiproliferative effects after local application into the inner ear, dexamethasone is potentially suitable to reduce unwanted connective tissue growth around implanted CI electrodes and thus enhances improved nerve-electrode interaction.

The aims of this work were the quantitative determination of SGC survival rates and the investigation of cochlear functionality following advanced deafness. In addition, the effect of dexamethasone on the tissue reaction after electrode insertion and on SGC survival following electrical stimulation was to be examined. The following experimental conditions were tested in 49 guinea pigs:

- single stimuli: GDNF (100 ng/ml, n=6), BDNF (50 ng/ml, n=6), Dexamethasone (100 ng/ml, n=6), monopolar (AP+ES(M), n=6) and bipolar (AP+ES(B), n=3) electrical stimulation (ES)
- combined stimuli: GDNF+ES(M, n=5), BDNF+ES(B, n=5),
dexamethasone +ES(M, n=5)
- control group: artificial perilymph (AP, n=7)

The experiments were conducted while applying the following methods and conditions:

- electrophysiological determination of acoustic (AABR) and electrical (EABR) auditory thresholds
- microsurgical systemic deafness
- implantation of electrode-micropump-systems
- pump exchange
- recovery of material
- histological quantitative determination of SGC densities (number of protected SGC/ 10,000 μm^2)

Day 0: measurement of the acoustic auditory threshold, deafening; day 5: measurement of the acoustic auditory threshold; day 21: measurement of the acoustic auditory threshold, implantation; day 24: commencement of electrical stimulation (stimulated animals); day 28: measurement of the electrical auditory threshold, adjustment of the stimulator (stimulated animals); day 34: measurement of the electrical auditory threshold, adjustment of the stimulator (stimulated animals), pump exchange; day 41: measurement of the electrical auditory threshold, adjustment of the stimulator (stimulated animals); day 48: measurement of the electrical auditory threshold (stimulated animals), recovery of material, histological preparation of the cochleae, microscopic quantitative determination of the densities of surviving SGC.

The results of this work indicate increased SGC survival after GDNF application has been delayed for three weeks ($p < 0.01$; 1.08 ± 0.76 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$) in comparison to the control group (-0.45 ± 0.61 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$). BDNF therapy did not result in an increased SGC survival rate (1.10 ± 2.93 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$). The comparison of the protective effect of both nerve growth factors showed no difference. Monopolar and bipolar electrical stimulation, if initiated after a delay following the onset of deafness, led to an increased SGC survival rate ($p < 0.05$, AP+ES(M): 0.74 ± 0.72 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$, AP+ES(B): 1.19 ± 0.79 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$). The electrical auditory thresholds of the chronically stimulated test group also improved during the experiment. Despite delayed initiation of therapy, the combined therapy consisting of neurotrophic factors and electrical stimulation resulted in a considerably significant synergistic SGC-protecting effect (GDNF+ES: $p < 0.001$; 2.46 ± 0.76 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$); BDNF+ES: $p < 0.05$; 1.69 ± 0.82 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$). This effect was also reflected functionally in a reduction of the electrical auditory threshold during the experiment. Dexamethasone application was not able to prevent postoperative tissue growth but in combination with monopolar electrical stimulation increased SGC survival was detected ($p < 0.01$; 2.05 ± 1.72 SGC/ $10,000 \mu\text{m}^2$). Therefore dexamethasone has no negative effect on the SGC-protective effect of the electrical stimulation.

These results are innovative and have great potential for clinical application. The experimental conditions chosen correspond to the clinical situation where cochlear implantation is performed after some delay following the onset of deafness. The data gathered suggest that SGC degeneration after the onset of deafness can be positively influenced with delayed therapy. Combined intervention of nerve growth factors and electrical stimulation proved highly suitable to achieve this effect, even more so than the single stimuli. These results are very promising towards future clinical application of electrical stimulation of the auditory nerve induced by a cochlear implant with simultaneous local application of nerve growth factors to increase the implant's effectivity.

9 Literaturverzeichnis

ABBAS, P. J. (1988):

Electrophysiology of the auditory system.

Clin Phys Physiol Meas 9, 1-31

ADAMSON, C. L., M. A. REID u. R. L. DAVIS (2002):

Opposite actions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on firing features and ion channel composition of murine spiral ganglion neurons.

J Neurosci 22, 1385-1396

ALLEN, J.B. (1980):

Cochlear micromechanics—a physical model of transduction.

J Acoust Soc Am 68, 1660-1670.

ALTSCHULER, R. A., Y. CHO, J. YLIKOSKI, U. PIRVOLA, E. MAGAL u.

J. M. MILLER (1999):

Rescue and regrowth of sensory nerves following deafferentation by neurotrophic factors.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 884, 305 – 311

ARAKI, S., A. KAWANO, L. SELDON, R. K. SHEPHERD, S. FUNASAKA u.

G. M. CLARK (1998):

Effects of chronic electrical stimulation on spiral ganglion neuron survival and size in deafened kittens.

Laryngoscope 108, 687 – 695

ARENAS, E., M. TRUPP, P. AKERUD u. C. F. IBANEZ (1995):

GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo.

Neuron 15, 1465 – 1473

BALKOWIEC, A. u. D. M. KATZ (2000):

Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ.

J Neurosci 20, 7417-7423

BALLARD, P. L., J. D. BAXTER, S. J. HIGGINS, G. G. ROUSSEAU u.

G. M. TOMKINS (1974):

General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues.

Endocrinology 94, 998-1002

BALOH, R. H., M. G. TANSEY, P. A. LAMPE, T. J. FAHRNER, H. ENOMOTO, K.

S. SIMBURGER, M. L. LEITNER, T. ARAKI, E. M. JOHNSON, JR. u.

J. MILBRANDT (1998):

Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex.

Neuron 21, 1291-1302

- BARDE, Y. A., D. EDGAR u. H. THOENEN (1982):
Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.
Embo J 1, 549-553
- BÈKÈSY, G. von (1970):
Travelling waves as frequency analysers in the cochlea.
Nature 225 (239), S. 1207-1209
- BICHLER, E. (1984):
Some morphological features of neurons in the rat spinal ganglion.
Arch Otorhinolaryngol 240, 243-248
- BLUM, R., K. W. KAFITZ u. A. KONNERTH (2002):
Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9.
Nature 419, 687-693
- BOENNINGHAUS H. G. (1993):
Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- BOENNINGHAUS H. G. u. T. LENARZ (2004).
Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde für Studierende der Medizin.
12. Auflage. Verlag Springer, Berlin, Heidelberg
- BREDBERG, G. (1977):
The innervation of the organ of Corti. A scanning electron microscopic study.
Acta Otolaryngol 83, 71-78
- BROWN, J. N., J. M. MILLER, R. A. ALTSCHULER u. A. L. NUTTALL (1993):
Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear.
Hear Res 70, 167-72
- BUJ-BELLO, A., V. L. BUCHMAN, A. HORTON, A. ROSENTHAL u.
A. M. DAVIES (1995):
GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons.
Neuron 15, 821-828
- CLARK, G. M., P. J. BLAMEY, A. M. BROWN, P. A. GUSBY, R. C. DOWELL,
B. K. FRANZ, B. C. PYMAN, R. K. SHEPHERD, Y. C. TONG u. R. L. WEBB
(1987):
The University of Melbourne–nucleus multi-electrode cochlear implant.
Adv Otorhinolaryngol 38, V-IX, 1-181
- COOPER, D. M., N. MONS u. J. W. KARPEN (1995):
Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling.
Nature 374, 421-424
- COOPER, G. u. A. L. SCHILLER (1975):
Anatomy of the guinea pig.
Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.

- D'MELLO, S. R., C. GALLI, T. CIOTTI u. P. CALISSANO (1993):
Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP.
Proc Natl Acad Sci U S A 90, 10989-10993
- DOXAKIS, E., S. WYATT u. A. M. DAVIES (2000):
Depolarisation causes reciprocal changes in GFR(alpha)-1 and GFR(alpha)-2 receptor expression and shifts responsiveness to GDNF and neurturin in developing neurons.
Development 127, 1477-87
- DU, J., L. FENG, F. YANG u. B. LU (2000) :
Activity- and Ca(2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons.
J Cell Biol 150, 1423-1434
- DUAN, M. L., M. ULFENDAHL, G. LAURELL, A. S. COUNTER, I. PYYKKO, E. BORG u. U. ROSENHALL (2002):
Protection and treatment of sensorineural hearing disorders caused by exogenous factors: experimental findings and potential clinical application.
Hear Res 169, 169-178
- FAY, R. R. (1988):
Hearing in Vertebrates: a psychophysics databook.
Verlag Hill-Fay, Winnetka, Il.
S. 375-378
- FEHM, H.L. (1990)
in: D. Nolte (Hrsg.): Glukokortikoide bei obstruktiven Atemwegserkrankungen: eine aktuelle Bestandsaufnahme.
Verlag de Gruyter, Berlin, S. 11-22
- GALLI, C., O. MEUCCI, A. SCORZIELLO, T. M. WERGE, P. CALISSANO u. G. SCHETTINI (1995):
Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis.
J Neurosci 15, 1172-1179
- GANTZ, B. J., G. G. WOODWORTH, J. F. KNUTSON, P. J. ABBAS u. R. S. TYLER (1993):
Multivariate predictors of audiological success with multichannel cochlear implants.
Ann Otol Rhinol Laryngol 102, 909-916
- GAO, W. Q. (1999):
Role of neurotrophins and lectins in prevention of ototoxicity.
Ann N Y Acad Sci 884, 312-327
- GHOSH, A., J. CARNAHAN u. M. E. GREENBERG (1994):
Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons.
Science 263, 1618-1623

GILLESPIE, L. N., G. M. CLARK, P. F. BARTLETT u. P. L. MARZELLA (2003):
BDNF-induced survival of auditory neurons in vivo: Cessation of treatment leads to
accelerated loss of survival effects.
J Neurosci Res 71, 785-790

GILLESPIE, L. N., G. M. CLARK u. P. L. MARZELLA (2004):
Delayed neurotrophin treatment supports auditory neuron survival in deaf guinea pigs.
Neuroreport 15, 1121-1125

GILLESPIE, L. N., u. R. K. SHEPHERD (2005):
Clinical application of neurotrophic factors: the potential for primary auditory neuron
protection.
Eur J Neurosci 22, 2123-2133

GREEN, S. u. P. CHAMBON (1986) :
A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors.
Nature 324, 615-617

HACK, N., H. HIDAKA, M. J. WAKEFIELD u. R. BALAZS (1993):
Promotion of granule cell survival by high K⁺ or excitatory amino acid treatment and
Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase activity.
Neuroscience 57, 9-20

HANSEN, M. R., X. M. ZHA, J. BOK u. S. H. GREEN (2001):
Multiple distinct signal pathways, including an autocrine neurotrophic mechanism, con-
tribute to the survival-promoting effect of depolarization on spiral ganglion neurons in
vitro.
J Neurosci 21, 2256-2267

HANSON, M. G., JR., S. SHEN, A. P. WIEMELT, F. A. MCMORRIS u.
B. A. BARRES (1998):
Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in
vitro.
J Neurosci 18, 7361-7371

HANSON, P. I. u. H. SCHULMAN (1992):
Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases.
Annu Rev Biochem 61, 559-601

HARTSHORN, D. O., J. M. MILLER u. R. A. ALTSCHULER (1991).
Protective effect of electrical stimulation in the deafened guinea pig cochlea.
Otolaryngol Head Neck Surg 104, 311-319

HAYNES, B. F., M. I. KAISER-KUPFER, P. MASON u. A. S. FAUCI (1980):
Cogan syndrome: studies in thirteen patients, long-term follow-up, and a review of the
literature.
Medicine (Baltimore) 59, 426-441

- HEGARTY, J. L., A. R. KAY u. S. H. GREEN (1997):
Trophic support of cultured spiral ganglion neurons by depolarization exceeds and is additive with that by neurotrophins or cAMP and requires elevation of $[Ca^{2+}]_i$ within a set range.
J Neurosci 17, 1959-1970
- HELLMICH, H. L., L. KOS, E. S. CHO, K. A. MAHON u. A. ZIMMER (1996):
Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions.
Mech Dev 54, 95-105
- HENDERSON, C. E., H. S. PHILLIPS, R. A. POLLOCK, A. M. DAVIES, C. LE-MEULLE, M. ARMANINI, L. SIMMONS, B. MOFFET, R. A. VANDLEN, L. C. SIMPSON u. ET AL. (1994):
GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle.
Science 266, 1062-1064
- HIMENO, C., M. KOMEDA, M. IZUMIKAWA, K. TAKEMURA, M. YAGI, Y. WEIPING, T. DOI, H. KURIYAMA, J. M. MILLER u. T. YAMASHITA (2002):
Intra-cochlear administration of dexamethasone attenuates aminoglycoside ototoxicity in the guinea pig.
Hear Res 167, 61-70
- HOLLENBERG, S. M., C. WEINBERGER, E. S. ONG, G. CERELLI, A. ORO, R. LEBE, E. B. THOMPSON, M. G. ROSENFELD u. R. M. EVANS (1985):
Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.
Nature 318, 635-641
- HOTH, S. u. T. LENARZ (1994):
Elektrische Reaktions-Audiometrie.
Springer-Verlag, Berlin
- HOTH, S. u. T. LENARZ (1997):
Otoakustische Emissionen.
2. Aufl. Verlag Thieme, Stuttgart
- HUANG, E. J. u. L. F. REICHARDT (2001):
Neurotrophins: roles in neuronal development and function.
Annu Rev Neurosci 24, 677-736
- INCESULU, A. u. J. B. NADOL, JR. (1998):
Correlation of acoustic threshold measures and spiral ganglion cell survival in severe to profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation.
Ann Otol Rhinol Laryngol 107, 906-911
- INGHAM, N. J., S. K. THORNTON, S. D. COMIS u. D. J. WITHINGTON (1998):
The auditory brainstem response of aged guinea pigs.
Acta Otolaryngol 118, 673-80

- JEWETT, D. L. (1970):
Volume-conducted potentials in response to auditory stimuli as detected by averaging in the cat.
Electroencephalogr Clin Neurophysiol 28, 609-618
- JYUNG, R. W., J. M. MILLER u. S. C. CANNON (1989):
Evaluation of eighth nerve integrity by the electrically evoked middle latency response.
Otolaryngol Head Neck Surg 101, 670-682
- KAFITZ, K. W., C. R. ROSE, H. THOENEN u. A. KONNERTH (1999):
Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors.
Nature 401, 918-921
- KAISER, P. K. u. S. A. LIPTON (1990):
VIP-mediated increase in cAMP prevents tetrodotoxin-induced retinal ganglion cell death in vitro.
Neuron 5, 373-381
- KANO, Y. U. A. STARR (1987):
Temporal relationship between single unit activity in superior olivary complex and scalp-derived auditory brainstem response in guinea pig.
Brain Res 419, 262-271
- KANZAKI, J., O. U. T u. N. TSUCHIHASHI (1993):
Steroid-responsive sensorineural hearing loss: combination therapy with prednisolone and Sairei-to.
ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 55, 24-29
- KANZAKI, S., T. STOVER, K. KAWAMOTO, D. M. PRIESKORN, R. A. ALTSCHULER, J. M. MILLER u. Y. RAPHAEL (2002):
Glial cell line-derived neurotrophic factor and chronic electrical stimulation prevent VIII cranial nerve degeneration following denervation.
J Comp Neurol 454, 350-360
- KLINKE, R. (1987):
Gleichgewichtssinn, Hören, Sprechen.
In: Schmidt-Thews (Hrsg): *Physiologie des Menschen*.
Verlag Springer, Berlin
- KOTZBAUER, P. T., P. A. LAMPE, R. O. HEUCKEROTH, J. P. GOLDEN, D. J. CREEDON, E. M. JOHNSON, JR. u. J. MILBRANDT (1996):
Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor.
Nature 384, 467 – 470
- KRAUS, N., D. I. SMITH, N. L. REED, L. K. STEIN u. C. CARTEE (1985):
Auditory middle latency responses in children: effects of age and diagnostic category.
Electroencephalogr Clin Neurophysiol 62, 343-351

KUANG, R., G. HEVER, G. ZAJIC, Q. YAN, F. COLLINS, J. C. LOUIS,
E. KEITHLEY u. E. MAGAL (1999):
Glial cell line-derived neurotrophic factor. Potential for otoprotection.
Ann N Y Acad Sci 884, 270-291

LALWANI, A. K., J. J. HAN, B. J. WALSH, S. ZOLOTUKHIN, N. MUZYCZKA u.
A. N. MHATRE (1997):
Green fluorescent protein as a reporter for gene transfer studies in the cochlea.
Hear Res 114, 139-147

LALWANI, A. K., J. J. HAN, C. M. CASTELEIN, G. J. CARVALHO u.
A. N. MHATRE (2002):
In vitro and in vivo assessment of the ability of adeno-associated virus-brain-derived
neurotrophic factor to enhance spiral ganglion cell survival following ototoxic insult.
Laryngoscope 112, 1325 – 1334

LEAKE, P. A., G. T. HRADEK, S. J. REBSCHER u. R. L. SNYDER (1991):
Chronic intracochlear electrical stimulation induces selective survival of spiral ganglion
neurons in neonatally deafened cats.
Hear. Res. 54, 251 – 271

LEAKE, P. A., R. L. SNYDER, G. T. HRADEK u. S. J. REBSCHER (1992):
Chronic intracochlear electrical stimulation in neonatally deafened cats: effects of
intensity and stimulating electrode location.
Hear. Res. 64, 99 – 117

LEAKE, P. A., G. T. HRADEK u. R. L. SNYDER (1999):
Chronic electrical stimulation by a cochlear implant promotes survival of spiral
ganglion neurons after neonatal deafness.
J. Comp Neurol. 412, 543 – 562

LEFEBVRE, P. P., B. MALGRANGE, H. STAECKER, M. MOGHADASS,
T. R. VAN DE WATER u. G. MOONEN (1994):
Neurotrophins affect survival and neuritogenesis by adult injured auditory neurons in
vitro.
Neuroreport 5, 865 – 868

LEHNHARDT, E., R.D. BATTMER, K. NAKAHODO u. R. LASZIG (1986):
Cochlear Implants.
HNO 34 (7), 271-279

LEHNHARDT, E., u. R. LASZIG (2001):
Praxis der Audiometrie.
8. Aufl. Verlag Thieme, Stuttgart

LEIBROCK, J., F. LOTTSPEICH, A. HOHN, M. HOFER, B. HENGERER, P.
MASIAKOWSKI, H. THOENEN u. Y. A. BARDE (1989):
Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor.
Nature 341, 149 – 152

- LENARZ, T. (1997):
Cochlear implants: what can be achieved?
Am J Otol 18, 2-3
- LENARZ, T. (1998):
Cochlear implants: selection criteria and shifting borders.
Acta Otorhinolaryngol Belg 52, 183-199
- LEONHARDT, H. (1990):
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
Verlag Thieme, Stuttgart, New York,
S. 317-327
- LI, L., C. W. PARKINS u. D. B. WEBSTER (1999):
Does electrical stimulation of deaf cochleae prevent spiral ganglion degeneration?
Hear. Res. 133, 27-39
- LIBERMANN, M.C. (1984):
Single-neuron labelling and chronic cochlear pathology. I. Threshold shift and
characteristic frequency shift.
Hearing Res. 16, 33-41
- LIN, L. F., D. H. DOHERTY, J. D. LILE, S. BEKTESH u. F. COLLINS (1993):
GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.
Science 260, 1130–1132
- LIN, L. F., T. J. ZHANG, F. COLLINS u. L. G. ARMES (1994):
Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic
factor.
J Neurochem 63, 758-768
- LINSDSAY, R. M. u. G. D. YANCOPOULOS (1996):
GDNF in a bind with known orphan: Accessory implicated in new twist.
Neuron 17: 571–574.
- LIPTON, P. U. R. KALIL (1995):
Neurotrophic factors-an overview.
Promega Notes 50: 18-22
- LOUGHLIN, S.E. u. J.H. FALLON (1993):
Neurotrophic Factors.
Verlag Academic Press, Inc., San Diego, CA
- LOUSTEAU, R. J. (1987):
Increased spiral ganglion cell survival in electrically stimulated, deafened guinea pig
cochleae.
Laryngoscope 97, 836-842
- LU, B. (2003):
BDNF and activity-dependent synaptic modulation.
Learn Mem 10, 86-98

MALGRANGE, B., P. LEFEBVRE, T. R. VAN DE WATER, H. STAECKER u. G. MOONEN (1996):

Effects of neurotrophins on early auditory neurones in cell culture.

Neuroreport 7, 913 – 917

MANESS, L. M., A. J. KASTIN, J. T. WEBER, W. A. BANKS, B. S. BECKMAN u. J. E. ZADINA (1994):

The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology.

Neurosci Biobehav Rev 18, 143-159

MARZELLA, P. L., L. N. GILLESPIE, G. M. CLARK, P. F. BARTLETT u.

T. J. KILPATRICK (1999):

The neurotrophins act synergistically with LIF and members of the TGF-beta superfamily to promote the survival of spiral ganglia neurons in vitro.

Hear. Res. 138, 73 – 80

MASON, I. (1996).

The GDNF receptor: Recent progress and unanswered questions.

Mol. Cell. Neurosci. 8, 112–119

MATSCHKE, R. G. u. P. PLATH (1988):

Cochlear implant for children? Possibilities—risks—prerequisites.

Laryngol Rhinol Otol (Stuttg) 67, 84-87

MC CABE, B. F. (1979):

Autoimmune sensorineural hearing loss.

Ann Otol Rhinol Laryngol. Juli 2004; 113(7):526-530

MEYER-FRANKE, A., G. A. WILKINSON, A. KRUTTGEN, M. HU, E. MUNRO, M. G. HANSON, JR., L. F. REICHARDT u. B. A. BARRES (1998):

Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons.

Neuron 21, 681 – 693

MILBRANDT, J., F. J. DE SAUVAGE, T. J. FAHRNER, R. H. BALOH,

M. L. LEITNER, M. G. TANSEY, P. A. LAMPE, R. O. HEUCKEROTH,

P. T. KOTZBAUER, K. S. SIMBURGER et al. (1998):

Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin.

Neuron 20, 245 – 253

MILLER, J. M., D. H. CHI, L. J. O'KEEFFE, P. KRUSZKA, Y. RAPHAEL u.

R. A. ALTSCHULER (1997):

Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss.

Int J Dev Neurosci 15, 631-643

MILLER, J. M., A. L. MILLER, T. YAMAGATA, G. BREDBERG u. R. A. ALTSCHULER (2002):

Protection and regrowth of the auditory nerve after deafness: neurotrophins, antioxidants and depolarization are effective in vivo.

Audiol Neurotol 7, 175-179

MILLER, A. L., D. M. PRIESKORN, R. A. ALTSCHULER u. J. M. MILLER (2003): Mechanism of electrical stimulation-induced neuroprotection: effects of verapamil on protection of primary auditory afferents. *Brain Res* 966, 218-230

MITCHELL, A., J. M. MILLER, P. A. FINGER, J. W. HELLER, Y. RAPHAEL u. R. A. ALTSCHULER (1997): Effects of chronic high-rate electrical stimulation on the cochlea and eighth nerve in the deafened guinea pig. *Hear Res* 105, 30-43

MOORE, M. W., R. D. KLEIN, I. FARINAS, H. SAUER, M. ARMANINI, H. PHILLIPS, L. F. REICHARDT, A. M. RYAN, K. CARVER-MOORE u. A. ROSENTHAL (1996): Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382, 76-9

MOU, K., C. L. HUNSBERGER, J. M. CLEARY u. R. L. DAVIS (1997): Synergistic effects of BDNF and NT-3 on postnatal spiral ganglion neurons. *J. Comp Neurol.* 386, 529 – 539

NADOL, J.B. JR. (1990): Synaptic morphology of inner and outer hair cells of the human organ of Corti. *J. Electron. Microsc. Tech.* 15 (2), S. 187-196

NADOL, J. B., JR. u. W. C. HSU (1991): Histopathologic correlation of spiral ganglion cell count and new bone formation in the cochlea following meningogenic labyrinthitis and deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100, 712-716

NAKAIZUMI, T., K. KAWAMOTO, R. MINODA u. Y. RAPHAEL (2004): Adenovirus-mediated expression of brain-derived neurotrophic factor protects spiral ganglion neurons from ototoxic damage. *Audiol. Neurotol.* 9, 135 – 143

NANDA, S. A. u. K. J. MACK (2000): Seizures and sensory stimulation result in different patterns of brain derived neurotrophic factor protein expression in the barrel cortex and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 78, 1-14

NI, D., R. K. SHEPHERD, H. L. SELDON, S. A. XU, G. M. CLARK u. R. E. MILLARD (1992): Cochlear pathology following chronic electrical stimulation of the auditory nerve. I: Normal hearing kittens. *Hear. Res.* 62, 63 – 81

OTTE, J., H. F. SCHUNKNECHT u. A. G. KERR (1978): Ganglion cell populations in normal and pathological human cochleae. Implications for cochlear implantation. *Laryngoscope* 88, 1231-1246

OHINATA, Y., J. M. MILLER, R. A. ALTSCHULER u. J. SCHACHT (2000):
Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea.
Brain Res. 878, 163 – 173

PAASCHE G, F. BOCKEL, G. TASCHE, A. LESINSKI-SCHIEDAT u. T. LENARZ (2006):
Changes of postoperative impedances in cochlear implant patients: the short-term effects of modified electrode surfaces and intracochlear corticosteroids
Otol. Neurotol. 27(5): 639-647

PENZLIN, H. (1991):
Informationsaufnahme und Verarbeitung.
In: H. PENZLIN (Hrsg.): Lehrbuch der Tierphysiologie.
5. Aufl., Verlag Fischer, Jena,
S. 429-449

PFINGST, B. E. U. D. SUTTON (1983):
Relation of cochlear implant function to histopathology in monkeys.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 405, 224 – 239

PICHEL, J. G., L. SHEN, H. Z. SHENG, A. C. GRANHOLM, J. DRAGO, A. GRINBERG, E. J. LEE, S. P. HUANG, M. SAARMA, B. J. HOFFER, H. SARIOLO u. H. WESTPHAL (1996):
Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF.
Nature 382, 73-76

PICKLES, J. O. u. D. P. COREY (1992):
Mechanoelectrical transduction by hair cells.
Trends. Neurosci. 15 (7), 254-259

PIRVOLA, U., J. YLIKOSKI, J. PALGI, E. LEHTONEN, U. ARUMAE u. M. SAARMA (1992):
Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 9915 – 9919

PITOVSKI, D. Z., M. J. DRESCHER u. D. G. DRESCHER (1994):
Glucocorticoid receptors in the mammalian inner ear: RU 28362 binding sites.
Hear Res 77, 216-220

PLATH, P. (1981):
Das Hörorgan und seine Funktion. Einführung in die Audiometrie
Verlag Marhold, Berlin

PRIUSKA, E. M. u. J. SCHACHT (1995):
Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex.
Biochem. Pharmacol. 50, 1749 – 1752

Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch (1994):
257. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin
S.353,354

QUN, L. X., U. PIRVOLA, M. SAARMA u. J. YLIKOSKI (1999):
Neurotrophic factors in the auditory periphery.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 884, 292 – 304

RASK-ANDERSEN, H., M. BOSTROM, B. GERDIN, A. KINNEFORS, G. NYBERG,
T. ENGSTRAND, J. M. MILLER u. D. LINDHOLM (2005):
Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in video demonstration of neural pro-
genitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion.
Hear Res 203, 180-191

REUTER, G. (1997):
Untersuchungen zur Aufhebung von neonataler akustischer Deprivation durch das
Cochlea Implantat: Sinnesersatz bei gehörlosen Kindern.
Hannover, Med. Hochschule, Habil.-Schr.

RISBERG, A. E. AGELFORS, B. LINDSTROM u. G. BREDBERG (1990):
Electrophonic hearing and cochlear implants.
Acta Otolaryngol. Suppl. Stockh. 469, 156-163

ROCAMORA, N., E. WELKER, M. PASCUAL u. E. SORIANO (1996):
Upregulation of BDNF mRNA expression in the barrel cortex of adult mice after
sensory stimulation.
J Neurosci 16, 4411-4419

ROMAND, M. R. u. R. ROMAND (1987):
The ultrastructure of spiral ganglion cells in the mouse.
Acta Otolaryngol 104, 29-39

RUBEL, E. W., u. B. FRITZSCH (2002):
Auditory system development: primary auditory neurons and their targets.
Annu. Rev. Neurosci. 25, 51 – 101

RYDEL, R. E. u. L. A. GREENE (1988):
cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic
and sensory neurons independently of nerve growth factor.
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 85, 1257-1261

SANCHEZ, M. P., I. SILOS-SANTIAGO, J. FRISEN, B. HE, S. A. LIRA u.
M. BARBACID (1996):
Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF.
Nature 382, 70-73

SCHMIDT-NIELSEN, K. (1999):
Information und Sinne.
In: K. SCHMIDT-NIELSEN (Hrsg.): Physiologie der Tiere.
Akademischer Verlag Spektrum, Heidelberg, Berlin,
S. 462-466

SEIFERLE, E. (1992):

Gleichgewichts- und Gehörorgan, Organum vestibulocochleare
in: R. Seiferle, A. Schummer u. E. Seiferle: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere.
3. Auflage Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, Band IV,
S. 444-472

SHAH, S. B., H. B. GLADSTONE, H. WILLIAMS, G. T. HRADEK u.
R. A. SCHINDLER (1995):

An extended study: protective effects of nerve growth factor in neomycin-induced
auditory neural degeneration.
Am J Otol 16, 310-314

SHEA, J. J. u. X. GE (1996):

Dexamethasone perfusion of the labyrinth plus intravenous dexamethasone for
Meniere's disease.
In: The Otolaryngologic Clinics of North America, Volume 29, Number 2, Update on
Otology and Neurotology, Part 1
Verlag W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA,
S. 353 – 358

SHEPHERD, R.K., S. HATSUSHIKA u. G.M. CLARK (1993):

Electrical stimulation of the auditory nerve: the effect of electrode position on neural
excitation.
Hear. Res. 66, S. 108-120

SHEPHERD, R. K., J. MATSUSHIMA, R. L. MARTIN u. G. M. CLARK (1994):

Cochlear pathology following chronic electrical stimulation of the auditory nerve: II.
Deafened kittens.
Hear Res 81, 150-66

SHEPHERD, R.K., C. TREBA, L. COHEN et al. (1997):

Peri-modiolar electrode arrays: a comparison of electrode position in the human tempo-
ral bone.
Proceedings of the XVI World congress of Otolaryngology, Head and Neck Surgery;
Sydney, Australia,
S. 205-209

SHEPHERD, R. K., N. LINAHAN, J. XU, G. M. CLARK u. S. ARAKI (1999):

Chronic electrical stimulation of the auditory nerve using non-charge-balanced stimuli.
Acta Otolaryngol. 119, 674 – 684

SHEPHERD, R. K., A. COCO, S. B. EPP u. J. M. CROOK (2005):

Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor
in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss.
J. Comp Neurol. 486, 145 – 158

SHINOHARA, T., G. BREDBERG, M. ULFENDAHL, I. PYYKKO, N. P. OLIVIOUS,
R. KAKSONEN, B. LINDSTROM, R. ALTSCHULER u. J. M. MILLER (2002):

Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals.
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 99, 1657-1660

- SHINOMORI, Y., D. S. SPACK, D. D. JONES u. R. S. KIMURA (2001):
Volumetric and dimensional analysis of the guinea pig inner ear.
Ann Otol Rhinol Laryngol 110, 91-8
- SHIRWANY, N. A., M. D. SEIDMAN u. W. TANG (1998):
Effect of transtympanic injection of steroids on cochlear blood flow, auditory sensitivity, and histology in the guinea pig.
Am J Otol 19, 230-235
- SHOJI, F., A. L. MILLER, A. MITCHELL, T. YAMASOBA, R. A. ALTSCHULER u. J. M. MILLER (2000 a):
Differential protective effects of neurotrophins in the attenuation of noise-induced hair cell loss.
Hear Res 146, 134-142
- SHOJI, F., T. YAMASOBA, E. MAGAL, D. F. DOLAN, R. A. ALTSCHULER u. J. M. MILLER (2000 b):
Glial cell line-derived neurotrophic factor has a dose dependent influence on noise-induced hearing loss in the guinea pig cochlea.
Hear Res 142, 41-55
- SPOENDLIN, H. (1975):
Retrograde degeneration of the cochlear nerve.
Acta Otolaryngol 79, 266-275
- SPOENDLIN, H. (1984):
Factors inducing retrograde degeneration of the cochlear nerve.
Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 112, 76-82
- STAECKER, H., R. KOPKE, B. MALGRANGE, P. LEFEBVRE u. T. R. VAN DE WATER (1996):
NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells.
Neuroreport 7, 889-894
- STELLATO, C. (2004):
Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids.
Proc. Am. Thorac. Soc. 1, 255 – 263
- STÖVER, T., T. L. GONG, Y. CHO, R. A. ALTSCHULER u. M. I. LOMAX (2000a):
Expression of the GDNF family members and their receptors in the mature rat cochlea.
Brain Res. Mol. Brain Res. 76, 25 – 35
- STÖVER, T., M. YAGI u. Y. RAPHAEL (2000b):
Transduction of the contralateral ear after adenovirus-mediated cochlear gene transfer.
Gene Ther 7, 377-383
- SUGAHARA, K., H. SHIMOGORI u. H. YAMASHITA (2001):
The role of acidic fibroblast growth factor in recovery of acoustic trauma.
Neuroreport 12, 3299-3302

SUTTON, D. u. J.M. MILLER (1983):
Cochlear implant effects on the spiral ganglion.
Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 92, S. 53-58

TAKEMURA, K., M. KOMEDA, M. YAGI, C. HIMENO, M. IZUMIKAWA, T. DOI,
H. KURIYAMA, J. M. MILLER u. T. YAMASHITA (2004):
Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea
pig.
Hear Res 196, 58-68

TAKUMIDA, M., R. POPA u. M. ANNIKO (1999):
Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure.
ORL J. Otorhinolaryngol. Relat Spec. 61, 63 – 70

TEN CATE, W. J., L. M. CURTIS, G. M. SMALL u. K. E. RAREY (1993):
Localization of glucocorticoid receptors and glucocorticoid receptor mRNAs in the rat
cochlea.
Laryngoscope 103, 865 – 871

TOMAC, A. u. E. LINDQUIST (1995)
Protection and repair of the nigrostriatal dopamine system by GDNF in vivo.
Nature 373, 335-339

TREANOR, J. J., L. GOODMAN, F. DE SAUVAGE, D. M. STONE, K. T. POULSEN,
C. D. BECK, C. GRAY, M. P. ARMANINI, R. A. POLLOCK, F. HEFTI, H. S. PHIL-
LIPS, A. GODDARD, M. W. MOORE, A. BUJ-BELLO, A. M. DAVIES, N. ASAI, M.
TAKAHASHI, R. VANDLEN, C. E. HENDERSON u. A. ROSENTHAL (1996):
Characterization of a multicomponent receptor for GDNF.
Nature 382, 80-83

TRUPP, M., M. RYDEN, H. JORNVALL, H. FUNAKOSHI, T. TIMMUSK, E.
ARENAS u. C. F. IBANEZ (1995):
Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for
avian and mammalian peripheral neurons.
J Cell Biol 130, 137-148

WEBSTER, M. u. D. B. WEBSTER (1981):
Spiral ganglion neuron loss following organ of Corti loss: a quantitative study.
Brain Res 212, 17-30

WEFSTAEDT, P., V. SCHEPER, T. LENARZ u. T. STÖVER (2005):
Brain-derived neurotrophic factor/glial cell line-derived neurotrophic factor survival
effects on auditory neurons are not limited by dexamethasone.
Neuroreport 16, 2011-2014

WEFSTAEDT, P. (2006):
Untersuchungen zu trophischen und protektiven Effekten neurotropher Faktoren
(Brain-derived neurotrophic factor, Glial cell line-derived neurotrophic factor), des
Glukocorticoids Dexamethason sowie elektrischer Stimulation auf kultivierte Spiral-
ganglienzellen der Ratte.
Hannover, tierärztl. Hochschule/med. Hochschule, Diss.

- WEST, B. A., R. E. BRUMMETT u. D. L. HIMES (1973):
Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. Severe cochlear damage in guinea pigs.
Arch Otolaryngol 98, 32-37
- WILLIAMS, L. R., G. INOUE, V. CUMMINS u. M. A. PELLEYMOUNTER (1996):
Glial cell line-derived neurotrophic factor sustains axotomized basal forebrain cholinergic neurons in vivo: dose-response comparison to nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 277, 1140 – 1151
- WISE, A. K., R. RICHARDSON, J. HARDMAN, G. CLARK u. S. O'LEARY (2005):
Resprouting and survival of guinea pig cochlear neurons in response to the administration of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3.
J Comp Neurol 487, 147-165
- XU, J., R. K. SHEPHERD, R. E. MILLARD u. G. M. CLARK (1997):
Chronic electrical stimulation of the auditory nerve at high stimulus rates: a physiological and histopathological study.
Hear. Res. 105, 1 – 29
- YAGI, M., S. KANZAKI, K. KAWAMOTO, B. SHIN, P. P. SHAH, E. MAGAL, J. SHENG u. Y. RAPHAEL (2000):
Spiral ganglion neurons are protected from degeneration by GDNF gene therapy.
J Assoc Res Otolaryngol 1, 315-325
- YAMAGATA, T., J. M. MILLER, M. ULFENDAHL, N. P. OLIVIOUS, R. A. ALTSCHULER, I. PYYKKO u. G. BREDBERG (2004):
Delayed neurotrophic treatment preserves nerve survival and electrophysiological responsiveness in neomycin-deafened guinea pigs.
J Neurosci Res 78, 75-86
- YAMASHITA, D., H. Y. JIANG, J. SCHACHT u. J. M. MILLER (2004):
Delayed production of free radicals following noise exposure.
Brain Res 1019, 201-209
- YLIKOSKI, J., U. PIRVOLA, J. VIRKKALA, P. SUVANTO, X. Q. LIANG, E. MAGAL, R. ALTSCHULER, J. M. MILLER u. M. SAARMA (1998):
Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma.
Hear Res 124, 17-26
- ZENNER, H. P. u. P. K. PLINKERT (1992):
A.C. and D.C. motility of mammalian auditory sensory cells—a new concept in hearing physiology.
Otolaryngol Pol 46, 333-349

ZENNER, H.P. (1994):

Physiologische und biochemische Grundlagen des normalen und gestörten Gehörs.

In: H. H. Naumann, J. Helms, C. Herberhold u. E. Kastenbauer (Hrsg.):
Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis.

Verlag Thieme, Stuttgart, S. 81-231

ZHENG, J. L., R. R. STEWART u. W. Q. GAO (1995):

Neurotrophin-4/5, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 promote survival of cultured vestibular ganglion neurons and protect them against neurotoxicity of ototoxins.

J Neurobiol 28, 330-40

ZHENG, J. L. u. W. Q. GAO (1996):

Differential damage to auditory neurons and hair cells by ototoxins and neuroprotection by specific neurotrophins in rat cochlear organotypic cultures.

Eur J Neurosci 8, 1897-1905

ZHOU J. u. J.A. CIDLOWSKI (2005):

The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses.

Steroids 70, 407 – 417

ZUO, J., L. M. CURTIS, X. YAO, W. J. TEN CATE, D. BAGGER-SJOBACK, M. HULTCRANTZ u. K. E. RAREY (1995):

Glucocorticoid receptor expression in the postnatal rat cochlea.

Hear. Res. 87, 220 – 227

10 Anhang

10.1 Reagenzien und Lösungen

Ameisensäure	Merck KgaA, Darmstadt
Artifizielle Perilymphe	Zusammensetzung siehe 9.4
BDNF „recombinant human“	R&D Systems, Wiesbaden
Benzol	Merck, Darmstadt
Dexamethason „Fortecortin® Inject 40mg“	Merck, Darmstadt
Entellan®	Merck, Darmstadt
Eosin G	Merck, Darmstadt
Ethanol zur Entwässerung	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt 70% zur Desinfektion	Medizinische Hochschule Hannover
GDNF „recombinant rat“	R&D Systems, Wiesbaden
Glutardialdehyd (GDA), 25%ig	Merck, Darmstadt
Guinea Pig Serum Albumin, GPSA	Sigma-Albricht Chemie GmbH, Steinheim
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt
Methylbenzoat	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Albricht Chemie GmbH, Steinheim
Paraffin	Merck, Darmstadt
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung „PBS Tabletten“	Invitrogen, GIBCO™, Paisley, Schottland
Tri-Natrium-Citrat	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

10.2 Laborbedarf, Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24x60	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalkanülen "BD Microlance TM 3", 22G x 1 ^{1/4} "-Nr. 12, 0,7 x 30mm	Becton-Dickinson, Fraga (Huesca)/Spanien
Einmalkanülen "100 Sterican [®] ", 27G x 1 ^{1/2} ", 0,4 x 12mm	Braun, Melsungen
Einmalspritze „Omnifix [®] -F“, Luer, steril, 1ml, 2ml, 5ml, 10ml	Braun, Melsungen
Einweg Skalpellklingen "Surgical blade stainless No. 11" und "No.21" Feather safety	Produkte für die Medizin AG, pfm, Köln
Färbegestelle und Färbebehälter	Omnilab, Gerden
Handschuhe aus Latex, SAFESKIN SATIN PLUS“ Gr. S	Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien
Infusionsgerät "Intrafix [®] Primeline Comfort"	Braun, Melsungen
Laborglaswaren (Erlenmeyerkolben, Bechergläser, Flaschen, etc.)	Omnilab, Gehrden/ VWR, Darmstadt
"Laborrasierklingen"	Omnilab, Gerden
Lithiumbatterien „renata CR 1632“ und „renata 1616“, 3V	Renata SA, Schweiz
Marderhaarpinsel Nr.1	Omnilab, Gerden
Mullkompressen, 5x5cm	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG., Rengsdorf
Nadelhalter Halsey, 13cm	Aesculap, Tuttlingen
Nahtmaterial nicht resorbierbar, „Seralon [®] “, 3/0	Serag Wiessner, Naila
Nahtmaterial resorbierbar, „Vicry [®] I“, 3/0	Ethicon GmbH, Norderstedt
Objektträger Super Frost Plus	Omnilab, Gerden
Operationshandschuhe „sempermed [®] supreme“, Gr. 6 ^{1/2}	Semperit Technische Produkte, Wien, Österreich

Pinzette „Adson“, 12cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Pinzette nach Dumas, gerade, extra spitz	VWR, Hannover
Pinzette „neoLab-Dumont INOX Nr. 3“	Fine Science Tools, Heidelberg
Pinzette „Dumont INOX Nr.5“	Fine Science Tools, Heidelberg
Pinzette „Dumont-Präzisions-Pinzette, Nr.7, gebogen“	Omnilab, Gerden
Pinzette „Uhrmacherpinzette, gebogen, 12cm, Nr.7“	Gelbrich, Isernhagen
Pipettenspitzen mit Filter, 0,5-10 µl „epT.I.P.S.“	Eppendorf , Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter, 101-1000 µl „TipOne“	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen mit Filter, 1-200 µl „TipOne“	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen mit Filter, 2-20 µl „ART [®] Gel 20P“	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Schere chirurgisch, fein, gerade	Omnilab, Gehrden
Schere chirurgisch, gerade	Aesculap, Tuttlingen
Sterilfilter zum Einmalgebrauch, 0,2 µm „Minisart [®] “	Sartorius, Göttingen
Sterilisierkassette	Gelbrich, Isernhagen
Wundspreader modifiziert nach Finsen	Aesculap, Tuttlingen
Zellkulturschale 60 x 15 „Nuncion TM “	Nunc TM , Wiesbaden
Zylinderschrauben, rostfrei, M2x4mm, M2x8mm, M3x12mm	Baumarkt

10.3 Geräte

Aqua tridest. Aufbereitungsanlage „SG Reinstwasser System Typ SG-RS90-4 UF“	Wasser und Regenerierstation, Barsbüttel
Auflichtstereomikroskop „MZ6“	Leica, Wetzlar
Autoklav „Typ 23“	Melag, Berlin
CCD-Camera „Color View XS“	Olympus, Hamburg
Computereinheit mit Software: „Analysis Ver. 3.2, SIS“, „MS Excel“, „MS Word“, „Graph Pad Prism 4“	Olympus, Hamburg
Infertmikroskop „Olympus CKX41“	Olympus, Hamburg
Kühlgefrierkombination „Typ 56134“, 4 °C, -20° C	Liebherr, Bieberach
Laborfeinwaage „Typ 2462“	Sartorius, Göttingen
Laborwaage „Typ 510-63“	Kern, Albstadt
Magnetrührer mit Heizplatte „RH basic“	IKA, Willmington, USA
Pipette, einstellbar „pipetman“ (0-2 µl, 1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson, Villers Le Bel/Frankreich
Rotationsmikrotom „Shandon Finesse® Mikrotom 315“	Thermo Electron Corporation
Schwingtisch „Labotron“	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Streckbad „GFL-1052 Paraffin-Streckbad“	Omnilab, Gehrden
Wärmeschrank	Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau

10.4 Herstellung von Lösungen

1. Artifizielle Perilymphe:

145 mM	NaCl (Natriumchlorid)	8.4738 g/L
2.7 mM	KCl (Kaliumchlorid)	0.2013 g/L
2.0 mM	MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	0.2408 g/L
1.2 mM	CaCl ₂ (Kalziumchlorid)	0.1764 g/L
5.0 mM	HEPES	1.1915 g/L

mit HPLC Wasser auf 1 Liter aufgefüllt, pH mittels N NaOH auf 7.4 eingestellt, Osmolarität 285-294 mOsm/L, in 4ml Aliquots (für die Befüllung der Pumpen mit AP) bzw. 50ml Aliquots (Aliquotierung von GDNF, BDNF und DEX) tiefgefroren, die Substanzen stammen von Merck, Darmstadt.

2. GDNF Aliquotierung für eine Konzentration von 100 ng/ml:

Lieferung: 10 µg lyophilisiert (9.1)

- 100ml AP herstellen bzw. auftauen (9.4.1) und sterilfiltrieren
- 0,5ml AP zum GDNF pipettieren und GDNF lösen
- 0,5ml GDNF-AP-Lösung zu den verbleibenden 99,5ml AP pipettieren
- Lösung 1/2Std. mit Rührfisch (9.2) auf Magnetrühr Tisch (9.3) gut mischen
- je 4ml der Lösung aliquotieren
- bei <-20°C 6 Monate haltbar

3. BDNF Aliquotierung für eine Konzentration von 50 ng/ml:

Lieferung: 5µg lyophilisiert (9.1)

- 100ml AP herstellen bzw. auftauen (9.4.1) und sterilfiltrieren
- 0,5ml AP zum BDNF pipettieren und BDNF lösen
- 0,5ml BDNF-AP-Lösung zu den verbleibenden 99,5ml AP pipettieren
- Lösung 1/2Std. mit Rührfisch (9.2) auf Magnetrühr Tisch (9.3) gut mischen
- je 4ml der Lösung aliquotieren
- bei <-20°C 6 Monate haltbar

4. DEX Aliquotierung für eine Konzentration von 100 ng/ml:

Lieferung: Fortecortin® : 5ml, 40mg/ml (9.1)

- 50ml AP herstellen bzw. auftauen (9.4.1) und sterilfiltrieren
- 49999,375µl (49ml + 999µl + 375 nl) AP in 50ml Glas pipettieren
- 625µl Fortecortin® hinzu pipettieren
- Lösung 1/2Std. mit Rührfisch (9.2) auf Magnetrühr Tisch (9.3) gut mischen
- je 4ml der Lösung aliquotieren
- bei <-20°C 6 Monate haltbar

5. Pumpenfülllösung für Befüllung von 3 Alzet-Pumpen Modell 2002:

- den benötigten 4ml Aliquot (AP = 9.4.1, GDNF = 9.4.2, BDNF = 9.4.3, DEX = 9.4.4) auftauen
- 5mg Guinea Pig Serum Albumin (GPSA, 9.1) mit Feinstwaage (9.3) abwiegen und im Aliquot in Lösung bringen;
- Aliquot-GPSA sofort zur Pumpenbefüllung (3.2.3) verwenden

6. Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS):

Zur Herstellung der phosphatgepufferten Kochsalzlösung (0,14 M NaCl, 0,01 M PO4 Puffer, 0,0003 KCl; pH 7,45) wurde eine Tablette PBS (9.1) in 500 ml

Reinstwasser (9.3) gelöst und anschließend steril filtriert (0,2 µm, (9.2)).

7. 20%ige Tri-Natriumcitrat Pufferlösung

1l Reinstwasser (9.3) wurden mit 200g 100%igen Tri-Natriumcitrat (9.1) vermischt.

8. Entkalker

Ansatz 1l: 650ml 20% ige Tri-Natriumcitrat (9.1)

350ml 90%ige Ameisensäure (9.1)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation

„Elektrophysiologische und histologische Untersuchungen zum protektiven Effekt von Glial cell line-derived neurotrophic factor, Brain-derived neurotrophic factor, Dexamethason und Elektrostimulation auf Spiralganglienzellen ertaubter Meer-schweinchen“

selbstständig verfasst habe. Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

1. Die Materialien und Geräte wurden von der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover (Leiter: Prof. Dr. Th. Lenarz) zur Verfügung gestellt.
2. Die Pflege der für diese Arbeit verwendeten Tiere sowie die Bereitstellung der Operationsräume erfolgte durch das Zentrale Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover (Leiter: Prof. Dr. H. J. Hedrich).
3. Die Cochlea-Elektroden-Mikropumpensysteme wurden von der Firma MedEl sowie von der Firma Cochlear Inc. entwickelt und zur Verfügung gestellt.
4. Das Schneiden der Cochleae sowie das nachfolgende Färben der histologischen Schnitte wurde dankenswerter Weise von Herrn P. Erfurt durchgeführt.
5. Die statistische Auswertung erfolgte unter Anleitung und Hilfe von Herrn Bernhard Vaske, Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderen Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation bei folgender Institution angefertigt: Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Hannover, den 20.02.2007

Verena Scheper

DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. T. Stöver danke ich herzlich für die Überlassung des äußerst interessanten Dissertationsthemas sowie für seine wertvollen Anregungen. Er war ein hervorragender Motivator, der viel Freiheit zur Entwicklung und Verwirklichung eigener Ideen ließ.

Herrn PD Dr. K.-H. Esser, meinem Doktorvater an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, gilt mein besonderer Dank für die sehr freundliche und unkomplizierte Betreuung meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Th. Lenarz, dem Leiter der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel. Seine beeindruckende Arbeits- und Berufsauffassung ist mir weiterhin ein großes Vorbild.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Peter Erfurt. Er hat mir durch seine unermüdliche geistige und praktische Unterstützung sowohl durch den Alltag als auch durch viele widrige Zeiten geholfen.

Meinen Kollegen Gentiana, Gerrit, Uta, Kirsten, Anke, Susanne, Patrick, Nurdanat sowie allen anderen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Den Tierpflegern, insbesondere K.-H. Napierski, P. Zerbe und K.-D. Reimann sowie den Tierärzten Prof. Dr. K. Otto und Dr. S. Glage des Zentralen Tierlabors danke ich für die liebevolle Betreuung meiner Meerschweinchen und die fachliche Beratung in Krisenzeiten.

Herrn Bernhard Vaske danke ich für die Beratung bei der Auswahl geeigneter statistischer Auswertungsmethoden.

Ich danke Georg, Anni, Denise, Conny, Rike und Mareike für Ihre einzigartige Freundschaft und Hilfsbereitschaft. Ohne Sie hätte ich es nervlich wohl kaum geschafft. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Meinen Eltern Gisela und Heinrich Scheper danke ich für die Ermöglichung meines Studiums und dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.