

**Aus der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik, Poliklinik und Plastische
Operationen der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz**

Lokalisation und Quantifizierung von 4-Hydroxynonenal in der Kochlea
des Meerschweinchens nach Applikation von Gentamicin

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**vorgelegt von
Tiemo Dustin Kern
aus Frankfurt am Main**

Mainz, 2012

**Wissenschaftlicher
Vorstand:**

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12.03.2013

Ich widme diese Dissertation
meinen liebevollen Eltern
und
meinem wunderbaren Bruder

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1. Anatomie und Physiologie des Innenohres	3
2.1.1. Cochlea	3
2.1.1.1. Cortisches Organ	5
2.1.1.2. Laterale Wand: Stria vascularis und Spirales Ligament	9
2.1.1.3. Limbus	11
2.1.1.4. Nervenfasern, Spiralganglionzellen und Schwannzellen	14
2.1.2. Vestibularorgan	15
2.2. Gentamicin in der Hals-, Nasen-, Ohren-Heilkunde	17
2.2.1. Pharmakologie der Aminoglykoside	17
2.2.2. Nebenwirkungen der Aminoglykoside	18
2.2.2.1. Gentamicin-induzierte Ototoxizität	19
2.2.2.2. Klinische Betrachtung der Ototoxizität	22
2.2.3. Applikationsformen	23
2.2.3.1. Systemische Therapie	23
2.2.3.2. Lokale Therapie	24
2.2.3.3. Vergleich der Applikationsformen	24
2.2.4. Gentamicin in der Therapie von Erkrankungen des Innenohres	25
2.2.4.1. Morbus Ménière: Symptome, Ätiologie und Therapie	25
2.3. Schädigung der Cochlea durch Radikale	28
2.3.1. Schädigung durch ROS	28
2.3.2. Schädigung durch RNS	29
2.3.3. Antioxidative Abwehr	30
2.3.4. Radikalbildung durch Gentamicin	30
2.3.5. 4-Hydroxynonenal	31
2.3.5.1. 4-HNE im Innenohr	33
3. Material und Methoden	35
3.1. Art und Anzahl der Versuchstiere	35
3.2. Gruppeneinteilung der Versuchstiere	35

3.2.1. Kontrollen	36
3.2.2. Substanzapplikation	36
3.2.3. Übersicht der Tierbehandlung	36
3.3. Narkose	37
3.4. Präparation und Gewebefixierung	37
3.5. Immunhistochemische Aufarbeitung für die Lichtmikroskope	38
3.6. Quantifizierung im Lichtmikroskop	39
3.7. Statistische Auswertung	40
3.8. Beschreibung der graphischen Darstellungen	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Immunhistochemische Lokalisation von 4-HNE in der Cochlea	42
4.1.1. Lokalisation von 4-HNE in Kontrolltieren	43
4.1.2. Lokalisation von 4-HNE einen Tag nach Gentamicin-Applikation	44
4.1.2.1. Lateralwand	44
4.1.2.2. Cortisches Organ	45
4.1.2.3. Limbus	45
4.1.2.4. Spiralganglionzellen	47
4.2. Quantifizierung der Expression von 4-HNE	48
4.2.1. Verteilung der Werte für jede Region	48
4.2.2. Type 3 Tests of Fixed Effects	49
4.2.3. Stria vascularis	51
4.2.3.1. Vergleich der Gesamtwindungen	51
4.2.3.2. Vergleich der Einzelwindungen	52
4.2.3.3. Vergleich der Gesamtgruppen	53
4.2.3.4. Vergleich der Windungen untereinander	54
4.2.3.5. Vergleich der Cochleae innerhalb der Versuchstiergruppen	54
4.2.4. Spirales Ligament	54
4.2.4.1. Vergleich der Gesamtwindungen	54
4.2.4.2. Vergleich der Einzelwindungen	55
4.2.4.3. Vergleich der Gesamtgruppen	56
4.2.4.4. Vergleich der Windungen untereinander	56
4.2.4.5. Vergleich der Cochleae innerhalb der Versuchstiergruppen	56
4.2.5. Cortisches Organ	57
4.2.5.1. Vergleich der Gesamtwindungen	57

4.2.5.2. Vergleich der Einzelwindungen	57
4.2.5.3. Vergleich der Gesamtgruppen	58
4.2.5.4. Vergleich der Windungen untereinander	58
4.2.5.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen	58
4.2.6. Nervenfasern	59
4.2.6.1. Vergleich der Gesamtwindungen	59
4.2.6.2. Vergleich der Einzelwindungen	59
4.2.6.3. Vergleich der Gesamtgruppen	60
4.2.6.4. Vergleich der Windungen untereinander	60
4.2.6.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen	60
4.2.7. Fibrozyten im Limbus	61
4.2.7.1. Vergleich der Gesamtwindungen	61
4.2.7.2. Vergleich der Einzelwindungen	61
4.2.7.3. Vergleich der Gesamtgruppen	62
4.2.7.4. Vergleich der Windungen untereinander	62
4.2.7.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen	62
4.2.7. Interdentalzellen	62
4.2.8.1. Vergleich der Gesamtwindungen	62
4.2.8.2. Vergleich der Einzelwindungen	63
4.2.8.3. Vergleich der Gesamtgruppen	63
4.2.8.4. Vergleich der Windungen untereinander	63
4.2.8.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen	63
4.2.9. Spiralganglionzellen	64
4.2.9.1. Vergleich der Gesamtwindungen	64
4.2.9.2. Vergleich der Einzelwindungen	64
4.2.9.3. Vergleich der Gesamtgruppen	64
4.2.9.4. Vergleich der Windungen untereinander	64
4.2.9.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen	64
4.3. Korrelationen	65
4.3.1. Vergleich Stria vascularis vs. Spirales Ligament	65
4.3.2. Vergleich Interdentalzellen vs. Fibrozyten im Limbus	66
5. Diskussion	68
5.1. Diskussion der methodischen Ansätze	69
5.2. Interanimale Variabilität	71

5.2.1. Interanimale Variabilität innerhalb einer Tierspezies	71
5.2.2. Interanimale Variabilität zwischen verschiedenen Tierspezies	72
5.3. Expression von 4-HNE nach Applikation von Aminoglykosiden	73
5.3.1. Beeinflussung durch die Wirkdauer	75
5.3.2. Korrelationen der 4-HNE-Expression	77
5.3.3. Genomische Wirkungen	78
5.3.4. Nichtgenomische Wirkungen	82
5.4. Ausblick	85
6. Zusammenfassung (dt.)	86
7. Literaturverzeichnis	87
8. Anhang	98
9. Danksagung	107
10. Lebenslauf	108

Abkürzungsverzeichnis

4-HNE	4-Hydroxynonenal
ABR	Auditory Brainstem Response
AEP	Akustisch evoziertes Potential
ÄHZ	äußere Haarzelle(n)
AP-1	Activating-Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	Compound Action Potential
CED	Cronische Entzündliche Darmerkrankung
CO	Cortisches Organ
CT	Cortischer Tunnel
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
Daxx	Death-associated Protein
DHK	Dihydrokainat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco-phosphate-buffered-salinesolution
DZ	Deiters-Zellen
EAAC-1	Excitatory Amino Acid Carrier 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
GCL	Glutamat Cystein Ligase
GLAST	Glutamate-Aspartate Transporter
GLT-1	Glutamat-1-Transporter
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GSH	Glutathion
GSH _e	Glutathion-Monoethyl-Ester
GSH-Px	Glutathion Peroxidase
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HF	helle Fibrozyten
His	Histidin

IDZ	Interdentalzelle(n)
IHZ	innere Haarzelle(n)
IP ₃	Inositoltrisphosphat
ISZ	innere Sulcuszelle(n)
K	Kalium
LDL	Low-density Lipid
LF	Limbus-Fibrozyten
Lys	Lysin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDA	Malondialdehyd
mAChR	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
mRNA	messenger-RNA
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF	Nervenfasern
NFκB	Nuclear-Factor-kappa B
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGFR β	Platelet-derived Growth Factor Receptor β
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PZ	Pfeiler-Zellen
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
rRNA	ribosomale-RNA
SF	Stellatafibrozyt(en)
SGZ	Spiralganglionzelle(n)
SOD	Superoxiddismutase
SL	Spirale Ligament
SLF	supralimbische Fibrozyt(en)
SOS	L-Serin-O-Sulfat
SV	Stria Vascularis
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TBOA	Threo-beta-benzyloxyaspartat
TBS	Tris-buffered-salinesolution

TKR	Tyrosinkinase-Rezeptor(en)
TNFR	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor(en)
VGLUT1	vesicular Glutamate Transporter

1. Einleitung und Zielsetzung

Viele physiologische als auch pathologische Prozesse im Innenohr können heute auf die Wirkung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS) und reaktiven Stickstoffverbindungen (reactive nitrogen species = RNS) zurückgeführt werden. Die pathologischen Veränderungen resultieren meist aus einem erhöhten oxidativem Stress, der zu einem Ungleichgewicht zwischen ROS/RNS-bedingten oxidativen und anti-oxidativen Mechanismen / Prozessen führt. Die Zunahme der reaktiven Verbindungen übersteigt dabei die Kompensationsmöglichkeiten der natürlichen, zellulären, anti-oxidativen Abwehr, wodurch schließlich die Schädigung nicht mehr abgewendet werden kann. Die Ursachen für eine solche Zunahme sind vielfältig. Für das Innenohr wurde bereits gezeigt, dass sowohl eine gesteigerte Lärmexpression als auch die Applikation von ototoxischen Substanzen, wie z.B. von Gentamicin, metabolische Veränderungen herbeiführen. Die Zellen werden dabei auf verschiedenen Ebenen geschädigt. Hierbei kommt es zu Veränderungen an der DNA, den Proteinen und der Zellmembran. Die Verbindung 4-Hydroxynonenal (4-HNE) wird heute allgemein als Marker einer Zellschädigung angenommen.

4-HNE entsteht als Endprodukt der Lipid-Peroxidation. Die Lipid-Peroxidation stellt eine von ROS oder RNS ausgelöste Kettenreaktion dar, die an den zellulären Membranen beginnt. Durch sie werden die Membranen destabilisiert und es kommt zum Austritt von Ionen. Das gebildete 4-HNE bindet als Toxin an unterschiedliche Proteine und entfaltet über verschiedene bekannte Signal- und Regulationswege seinen zytotoxischen Effekt. Beispielsweise wirkt 4-HNE als Inhibitor der DNA-, RNA-, Proteinsynthese und von mehreren Transportproteinen in der Zellmembran. Außerdem ist 4-HNE ein wichtiger Mediator, der die, durch oxidativen Stress hervorgerufene, Apoptose in Gang setzt. Untersuchungen am Innenohr konnten bereits zeigen, dass der 4-HNE-Gehalt im zeitlichen Verlauf nach Lärmexposition ansteigt. Es ist jedoch z. Zt. nicht bekannt, ob diese gesteigerte 4-HNE-Bildung auch nach intratympanaler Gentamicin-Applikation zu verzeichnen ist und, inwieweit sich der 4-HNE-Level im zeitlichen Verlauf nach Gentamicin-Applikation ändert. Zudem ist noch unklar, ob alle Regionen der Cochlea in vergleichbarem Maße betroffen sind.

In der folgenden Arbeit wurden deshalb quantitative Veränderungen der 4-HNE-Bildung in sieben verschiedenen Regionen der Cochlea (Stria Vascularis, Spirales Ligament, Cortisches Organ, Nervenfasern, Fibrozyten und Interdentalzellen

des Limbus, sowie Spiralgaglionzellen) 1,2 und 7 Tage nach Gentamicingabe erfasst.

Ziele der Dissertation

Ziele der Dissertation waren in einem tierexperimentellen Ansatz zu prüfen:

- ob eine gesteigerte 4-HNE-Bildung mit dem Hörverlust korreliert,
- ob eine gesteigerte 4-HNE-Bildung im zeitlichen Verlauf nach Gentamicin-Applikation zu verzeichnen ist,
- in welchem Umfang sich das zelluläre 4-HNE-Muster ändert
- in welchem Maße sich die 4-HNE-Bildung in den verschiedenen Regionen des Innenohrs unterscheidet.

Hierzu wurde die Intensität der 4-HNE-Markierung immunhistochemischer Anfärbung für die sieben Bereiche der Cochlea am Meerschweinchentiermodell lichtmikroskopisch erfasst und die Färbeintensität mittels PC-gesteuerter Auswertprogramme ermittelt.

2. Literaturdiskussion

2.1. Anatomie und Physiologie des Innenohres

Das Ohr umfasst alle anatomischen Strukturen, die dem Hören und dem Gleichgewicht dienen. Beide Sinnessysteme sind sowohl anatomisch als auch funktionell eng miteinander verbunden und dienen sowohl der zwischenmenschlichen Kommunikation als auch der Orientierung im Raum.

Die im Felsenbein (Pars petrosa), einem Teil des temporalen Schädelknochens, liegenden Sinnesorgane für Gleichgewicht und Gehörn, die gemeinsam das Innenohr bilden, werden bedingt durch ihren komplexen Aufbau auch als Labyrinth bezeichnet. Das Hörsinnesorgan des Innenohres ist die Hörschnecke (Kochlea). Das für den Gleichgewichtssinn zuständige Vestibularorgan setzt sich aus drei Bogengängen, der Macula utriculi und der Macula sacculi zusammen. Diese sind bei allen Säugetieren vorhanden.

2.1.1. Kochlea

Die funktionelle Anatomie der Kochlea mit ihrem charakteristischen, zweckorientierten Aufbau erlaubt uns das Hören. Die Kochlea besteht aus einem knöchernen Kanal, der sich beim Menschen zweieinhalb Mal etagenartig um seine knöcherne Achse, dem Modiolus windet. Betrachtet man die Kochlea im Querschnitt, werden dadurch drei Windungen sichtbar. Die Kochlea des Meerschweinchens windet sich im Unterschied dazu dreieinhalb Mal um den Modiolus, wodurch sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Gewebeschnitten insgesamt bis zu vier Windungen ergaben (Abb. 1). Der Modiolus enthält die Nerven und Gefäße. Das äußere Erscheinungsbild der Kochlea ähnelt dem Gehäuse einer Weinbergschnecke und führte zu ihrer Namensgebung. Ein Querschnitt durch den Schneckenkanal zeigt drei membranöse Kompartimente, die stockwerkartig angeordnet sind. Die Scala media liegt dabei im Zentrum und wird durch die oberhalb befindliche Scala vestibuli und die unterhalb liegende Scala tympani begrenzt. Alle drei anatomischen Räume sind flüssigkeitsgefüllt. Die Scala vestibuli und die Scala tympani enthalten Perilymphe und sind an der Schnecken spitze durch das Helicotrema miteinander verbunden. Die im Querschnitt dreieckige Scala media wird hingegen durch Endolympe ausgefüllt und endet blind. Die Reissner-Membran stellt die obere Abgrenzung zur Scala vestibuli dar. An der Seite des endolymphatischen Raums befinden sich die Stria vascularis und das Spirale Ligament, die als Lateralwand zusammengefasst werden.

Die Stria vascularis ist für die Produktion der Endolymphe verantwortlich. Der Boden der Scala media wird durch die Basilarmembran gebildet, auf der sich auch das Cortische Organ befindet. Das Cortische Organ repräsentiert das eigentliche Hörsinnesorgan, da sich hier die dafür nötigen Sinneszellen befinden (Schünke et al 2006¹⁰⁹, Raphael und Altschuler 2003⁹⁵).

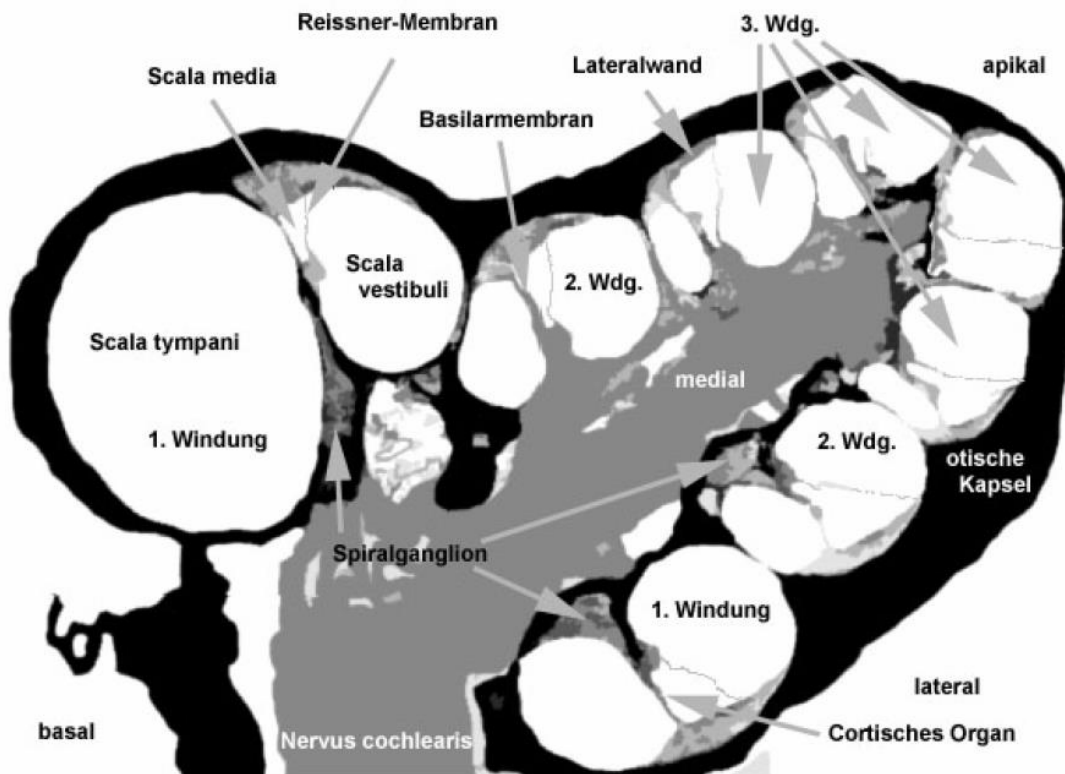


Abb. 1: Medianschnitt durch die Kochlea vom Meerschweinchen. Die einzelnen Strukturen sind in diesem Schema benannt. Medial liegt der Modiolus, lateral die Kapsel, welche die Cochlea umgibt.

Peri- und Endolymphe unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung voneinander. Die Perilymphe enthält viel Natrium (Natriumkonzentration zwischen 115 und 180 mmol/l) und wenig Kalium (Kaliumkonzentration unter 10 mmol/l). Sie ist somit in ihrer Zusammensetzung einer extrazellulären Flüssigkeit vergleichbar. Die Synthese der Perilymphe erfolgt vermutlich durch eine Ableitung des Liquor cerebrospinalis und durch eine Ultrafiltration des Blutes. Die Ionenverhältnisse in der Endolymphe ähneln der Zusammensetzung einer intrazellulären Flüssigkeit. Sie besitzt eine hohe Kaliumkonzentration von 150 mmol/l und eine niedrige Natriumkonzentration von 1 mmol/l (Bosher und Warren 1968¹⁴). Die Bildung der Endolymphe findet durch Energie verbrauchende Ionentransportvorgänge in der Stria

vascularis statt. Die ungewöhnlich hohe Kaliumkonzentration sorgt dafür, dass die Endolymphe gegenüber den übrigen Extrazellulärräumen des Körpers stark positiv geladen ist (etwa 85 mV). Dieses ständig vorhandene Potential heißt endokochleäres Potential. Zum Intrazellärraum der inneren und äußeren Haarzellen ergibt sich eine Potentialdifferenz die von 125 mV bis 155 mV reicht. Sie ist die treibende Kraft, die bei der mechanoelektrischen Transduktion den Ionenfluss in die Haarzellen des Cortischen Organs möglich macht (Schmidt, Lang und Thews 2005¹⁰⁵).

Der menschliche Hörbereich umfasst Frequenzen von 16 bis 20.000 Hz. Wird das Ohr mit einer Frequenz dieses Bereiches beschallt, sorgt die Gehörknöchelchenkette im Mittelohr für die Weiterleitung des Schalls zum Innenohr. Damit dies gelingt, ist der Steigbügel (Stapes), das letzte Knöchelchen dieser Kette, über seine Fussplatte mit dem ovalen Fenster verbunden, das den Eintritt zur Scala vestibuli darstellt. Die Schwingungen des Stapes führen zu einer Volumenverschiebung der Perilymphe. Zum Druckausgleich ist die Scala tympani über das runde Fenster ebenfalls mit dem Mittelohr in Verbindung. Daraufhin kommt es zu einem Ausweichen der Perilymphe nach oben und unten, das sich entlang der Cochlea bis zum Helicotrema fortpflanzt. Dieses Phänomen der wellenförmigen Ausbreitung wird als Wanderwelle bezeichnet. Die Durchschwankungen lenken die Basilarmembran so aus, dass sie durch eine spezifische Frequenz an genau einem bestimmten Ort ihre maximale Auslenkung erfährt. Diesen Zusammenhang ermöglichen die Eigenschaften der Basilarmembran, die sehr elastisch ist und deren Breite zur Schnecken spitze hin zunimmt. Daraus ergibt sich, dass hohe Frequenzen ihr Amplitudenmaximum an der Schneckenbasis haben und niedrige Frequenzen im Verlauf zum Apex. Die Registrierung der Töne an unterschiedlichen Orten wird als Tonotopie bezeichnet (Boenninghaus 2007¹², Holley 2005⁵⁸).

2.1.1.1. Cortisches Organ

Das Cortische Organ ist das eigentliche Hörsinnesorgan, das dem Menschen die Umwandlung von mechanischen Wellen in ein elektrisches Signal gestattet (Abb. 2). Dieser Prozess wird mechanoelektrische Transduktion genannt und wird erst durch den charakteristischen Aufbau möglich. Das Cortische Organ ist ein Konglomerat aus Zellen, die sich grob in zwei verschiedene Gruppen einteilen lassen. Auf der einen Seite gibt es die Haarzellen (Hörsinneszellen) und auf der anderen Seite die Stützzellen (in der englischen Fachliteratur „Supporting Cells“ genannt). Dieser komplette Zellverbund liegt auf der Basilarmembran innerhalb der

Scala media und wird von der azellulären Tektorialmembran, die am Limbus verankert ist, überdacht.

Die dem Cortischen Organ Halt gebenden Stützzellen sind die Hensen-Zellen, Claudius-Zellen, bis zu fünf Reihen Deiters-Zellen (DZ), äußere und innere Pfeilerzellen (Abb. 2). Den seitlichen Abschluss des Cortischen Organs zur Lateralwand hin bilden die Hensen- und die Claudius-Zellen. Zusammen mit den Deiters-Zellen sollen diese Zelltypen an dem Recycling der Kaliumionen aus den äußeren Haarzellen beteiligt sein und eine Zwischenstation bei dem Transport dieser Ionen zur Stria vascularis darstellen. Die Deiters-Zellen fassen die äußere Haarzelle ein und dienen ihr als „Sitz“. Nach oben strecken sie einen dünnen Fortsatz aus, der am apikalen Pol zusammen mit den äußeren Haarzellen eine flache Kopfplatte bildet. Diese Kopfplatte trägt den Namen Membrana reticularis. Medial, zum Limbus hin gelegen, finden sich die äußeren und inneren Pfeilerzellen, durch die der Cortische Tunnel entsteht. Alle Interzellulärräume und der Cortische Tunnel sind mit Perilymphe ausgefüllt (Raphael und Altschuler 2003⁹⁵).

Die Sinneszellen des Cortischen Organs sind nach ihrer Lage zueinander benannt. Lateral vom Cortischen Tunnel befinden sich die äußeren Haarzellen (ÄHZ) und medial davon die inneren Haarzellen (IHZ). Im Ohr können ca. 15500 dieser Zellen nachgewiesen werden. Davon stellen die äußeren Haarzellen mit 12000 die Mehrheit. Von den inneren Haarzellen gibt es demnach 3500.

Die ÄHZ sind in drei bis vier Reihen angeordnet und werden unmittelbar von den Deiters-Zellen gestützt. Die apikale Seite der ÄHZ steht in Kontakt mit der Endolymphe. Der restliche Teil der Zelle wird durch die Membrana reticularis von der Endolymphe getrennt. Durch sie entsteht eine Diffusionsbarriere, die den Extrazellulärraum des Cortischen Organs gegenüber dem Endolymphraum abriegelt. Dies gelingt mit Hilfe von festen Zellverbindungen, tight-junctions, die zwischen apikaler Membran der ÄHZ und apikalem Ausläufer der Deiters-Zellen bestehen. Lateral der ÄHZ befindet sich ein Zellverbund aus zahlreichen Stützzellen (Hensen- und Claudius-Zellen). Medial gibt es einen solchen Stützverbund nicht, denn auf dieser Seite besteht direkter Kontakt zu den Interzellulärräumen. Daraus leitet sich ab, dass die ÄHZ während den Auslenkungen durch die Wanderwelle große mechanische Belastungen aushalten müssen. Gleichzeitig besitzen sie einen hohen zytoplasmatischen Binnendruck, der ihre Empfindlichkeit auf intensive Schalleinwirkung steigert (Fredelius et al. 1990⁴⁴). Die Nervenversorgung der ÄHZ

befindet sich auf ihrer basalen Seite. Sie sind zu 5 % afferent und zu 95 % efferent innerviert.

Die medial gelegene IHZ sind einreihig angeordnet. Auch bei ihnen wird die Diffusionsbarriere zwischen Endolymphe und Perilymphe eingehalten. Während das apikale Ende in den Endolymphraum ragt, wird der basolaterale Anteil von Interzellulärflüssigkeit umspült. Im Vergleich mit den ÄHZ sind die IHZ in Bezug auf mechanische Belastung weniger empfindlich, da sie äußerst stabil von Stützzellen eingefasst werden und weiter medial im Cortischen Organ liegen. Die Innervation erfolgt ebenso am basalen Ende. Die prozentuale Aufteilung der Nervenfasern unterscheidet sich allerdings erheblich von den ÄHZ. Die IHZ erhalten eine Versorgung, die zu 95 % afferent ist. Diese Tatsache macht sie zu den eigentlichen primären Hörsinneszellen, in denen die akustischen Schallwellen in elektrische Reize übersetzt und codiert werden. Die Weiterleitung des entstehenden Reizmusters geschieht durch den N. vestibulocochlearis, den achten Hirnnerven (Holley 2005⁵⁸).

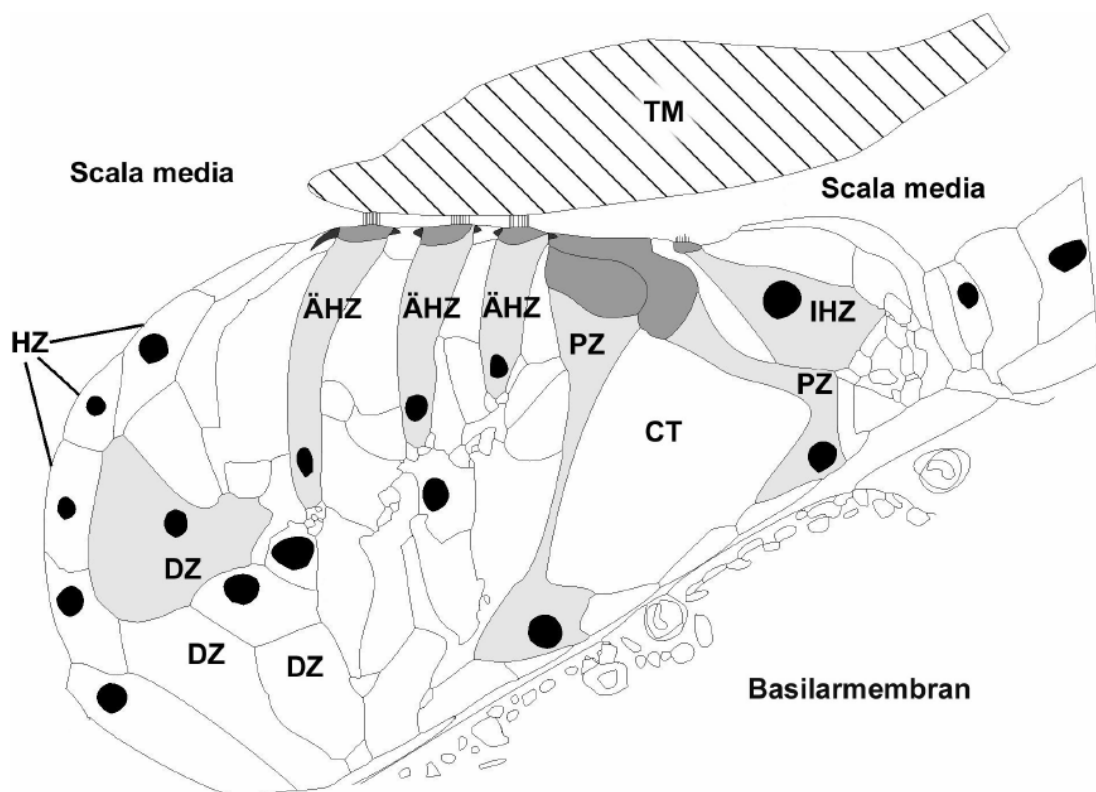


Abb. 2 : Cortisches Organ. Dieses Schema zeigt das Cortische Organ mit seinen relevanten Strukturen: Äußere Haarzellen (ÄHZ), Cortischer Tunnel (CT), Deiters-Zellen (DZ), Hensen-Zellen (HZ), Innere Haarzellen (IHZ), Pfeilerzellen (PZ), Tectorialmembran (TM).

Erst das funktionelle Zusammenspiel der Haarzellen, d.h. zwischen äußeren und inneren Haarzellen, ermöglicht die Bildung von entsprechenden Nervenreizen durch die IHZ. Die ÄHZ haben primär die Aufgabe eines kochleären Verstärkermechanismus, der Voraussetzung für die normalerweise sehr niedrige Hörschwelle ist. Auf der apikalen Membran der Haarzellen befinden sich pro Zelle zwischen 50 und 100 Stereozilien, die eigentlich genau genommen als Stereovilli bezeichnet werden sollten. Stereozilien sind bis zu 8 µm lange Ausstülpungen der Membran. Im Inneren befinden sich mehrere Hundert miteinander verknüpfte Aktinfilamente, die den Zilien ihre Steifigkeit verleihen. Stereozilien sind in mehreren Reihen V-förmig organisiert und können bis zu 8 µm lang sein. Sie sind nach Größe angeordnet, wobei die Spitzen der kürzeren Stereozilien mit den Enden der längeren Nachbarn über „Tip-Links“ (Spitzenfäden) verbunden sind. Während die längsten Stereozilien der ÄHZ die darüberliegende Tektorialmembran berühren, haben die Membranausstülpungen der IHZ keinen Kontakt zu ihr, sondern befinden sich frei im Endolymphraum. Entsteht im Innenohr eine Wanderwelle, sorgt die Tektorialmembran für periodische Abscherungen der Stereozilien am Ort ihrer maximalen Auslenkung (Amplitudenmaximum). Durch diese Deflektion geraten die Tip-Links unter Zug, worauf sich Kationen-Kanäle in der apikalen Membran öffnen. Es resultiert ein Kaliumionen-Einstrom, der durch die Membranpotentialdifferenz angetrieben wird. Dieser elektrische Prozess wird in oszillierende Längenänderungen der gesamten Zelle übersetzt. Für diese sogenannte Elektromotilität ist ein Motorprotein (Prestin), das hochkonzentriert in der lateralen Zellmembran lokalisiert ist, verantwortlich. Prestin ändert im Laufe dieses Vorgangs spannungsabhängig seine Konformation. Der sich ergebende Effekt ist eine Amplifikation der Spitze der Wanderwelle, wodurch die Endolymphströmung unterhalb der Tektorialmembran massiv zunimmt. Diese Strömung deflektiert die Stereozilien der IHZ, was erneut Kaliumionen apikal einströmen lässt (Schmidt, Lang und Thews 2005¹⁰⁶). Die resultierende Depolarisation öffnet Kalziumkanäle, die sich in der basalen Zellmembran befinden (Zhang et al. 1990¹³⁷). Aus der Perilymphe des Cortischen Tunnels gelangen jetzt Kalziumionen in die IHZ, die die Transmittervesikel mit der basalen Membran verschmelzen lassen. Glutamat wird in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, diffundiert zur postsynaptischen Membran und bindet an Rezeptoren der afferenten Nervenfasern (Khimich et al. 2005⁶⁵). Die entstehenden Aktionspotentiale werden über die Spiralganglionzellen ins zentrale Nervensystem geleitet. Der kochleäre Verstärkungsprozess, dem die Elektromotilität zu Grunde

liegt, ermöglicht im Endeffekt die Verarbeitung von relativ schwachen akustischen Reizen durch die IHZ (Belyantseva et al. 2000⁵).

2.1.1.2. Laterale Wand: Stria vascularis und Spirales Ligament

Die Laterale Wand ist die äußere Begrenzung der Scala media. Sie setzt sich aus zwei Strukturen zusammen, die direkt nebeneinander liegen. Die Stria vascularis ist in Kontakt mit dem Endolymphraum, wohingegen das Spirale Ligament keinen unmittelbaren anatomischen Bezug zur Endolymphe hat.

Die Stria vascularis ist ein von Kapillaren durchzogenes, epithelartiges Gewebe aus drei Zellschichten. Von medial nach lateral reihen sich eine Marginal-, eine Intermediär- und eine Basalzellschicht aneinander.

Die Marginalzellen bilden durch zellverbindende Proteinkomplexe wie Desmosomen und vor allem „tight-junctions“ eine Barriere zum Endolymphraum. Eine Vermischung mit der Interzellulärflüssigkeit, die sich innerhalb der Stria vascularis befindet, ist somit nicht möglich. Die apikale Zellmembran der Marginalzellen besitzt kleine Membranausstülpungen, die sich Mikrovilli nennen. Durch sie vergrößert sich diese Oberfläche enorm, wodurch zahlreiche Transportproteine eingelagert werden können. Die Produktion der Endolymphe mit ihrem charakteristischen Ionenverhältnissen wird vor allem durch zwei wichtige Transporter ermöglicht. Sowohl der Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransporter (Crouch et al. 1997²²) als auch die Natrium-Kalium-ATPase (Erichsen et al. 1996³²) sorgen für eine hohe Kaliumkonzentration und folglich für die Ausbildung des endokochleären Potentials. Die basolaterale Oberfläche ist durch unzählige mitochondrienreiche Falten gekennzeichnet, die sich um Kapillaren winden.

Die Intermediärzellen sind modifizierte Melanozyten, die keine Verbindung zur Endolymphe besitzen. Sie bilden eine diskontinuierliche Schicht, wobei sich ihre Membranausläufer mit denen der Marginalzellen durchflechten. Die Intermediärzellen sind deutlich ärmer an Mitochondrien. Die Interaktion mit den Marginalzellen dient funktionell der Aufrechterhaltung des Ionentransports.

Die Basalzellen sind in einer durchgehenden Lage angeordnet, die durch „tight-junctions“ den Extrazellulärraum der Stria nach basal verschließt. Dadurch bilden sie die Grenze zum lateral liegenden Spiralen Ligament.

Das Spirale Ligament wird medial von der Stria vascularis und lateral von der otischen Kapsel, die die Cochlea einschließt, begrenzt. Zellulär setzt sich das Spirale Ligament aus fünf Typen von Fibrozyten zusammen (Spicer und Schulte 1998¹¹⁷).

Zahlreiche Kapillaren ziehen hindurch und bilden ein verzweigtes Gefäßsystem. Das Spirale Ligament ist eine äußerst wichtige Station innerhalb des Ionentransports in Richtung der Stria. Außerdem ist der laterale Anteil der Basalmembran am Spiralen Ligament befestigt. Kontraktile Filamente, die in den Fibrozyten gefunden wurden, lassen die Überlegung zu, dass die Steifigkeit der Basalmembran möglicherweise den akustischen Bedingungen aktiv angepasst werden kann (Raphael und Altschuler 2003⁹⁵).

Die verschiedenen Typen von Fibrozyten sind einfach von eins bis fünf durchnummeriert. Die Typ I Fibrozyten grenzen direkt an die Basalzellschicht der Stria vascularis. Zwischen diesen Zellen existieren „gap junctions“. „Gap junctions“ sind Membranproteinkomplexe, die durch ihre charakteristische Anordnung innerhalb der Lipidmembranen einen Tunnel bilden, der zwei Intrazelluläräume auf direktem Wege verbindet. Die Typ II Fibrozyten zeigen einen großen Reichtum an Mitochondrien und haben fingerförmige Ausläufer, mit denen sie Kontakt zu den Typ I Fibrozyten als auch den Basalzellen aufnehmen. Auch zwischen diesen Zellen können „gap junctions“ nachgewiesen werden. Diese Kopplung der Zellen durch Membranproteinsysteme lässt die Vermutung zu, dass die Fibrozyten des Spiralen Ligaments Bestandteil eines Ionentransportsystems sind, das der Erzeugung des endokochleären Potentials dient (Hirose und Liberman 2003⁵⁵). Die Typ III Fibrozyten liegen der otischen Kapsel an. Typ IV Fibrozyten finden sich unterhalb der Basalmembran in Nachbarschaft zur Scala tympani. Typ V Fibrozyten bilden das obere Ende des Spiralen Ligaments und liegen oberhalb der Reissner-Membran der Scala vestibuli an.

Typ I, II, IV und V Fibrozyten sind alles bedeutende Stationen, die den, in der Fachliteratur als lateralen „recycling pathway“ bezeichneten (Abb. 3), Rücktransport der Kaliumionen möglich machen (Spicer und Schulte 1991¹¹⁶, 1996¹¹⁹, 1998¹¹⁷). Erster Schritt des Kalium-Recyclings ist die Aufnahme der Kaliumionen aus der Perilymphe des Cortischen Organs in die benachbarten Stützzellen. Diese leiten das Kalium bis in den Interzellulärraum des Spiralen Ligaments. Dort werden sie von den Typ II Fibrozyten aufgenommen und entweder direkt oder über Typ I Fibrozyten durch „gap junctions“ an die Basalzellen der Stria vascularis weitergegeben. Am Ende pumpen die Marginalzellen die Kaliumionen zurück in die Scala media und der Kreislauf kann von neuem beginnen. Die gesamte Transportkette wird durch den Konzentrationsgradienten und die Pumpleistung der Natrium-Kalium-ATPase in Gang gehalten, was den Mitochondrienreichtum einiger der zwischengeschalteten

Zelltypen erklärt. Auch die Typ IV und Typ V Fibrozyten beteiligen sich am Kalium-Recycling. Sie nehmen die Ionen von den angrenzenden Räumen der Scala tympani und vestibuli auf und führen sie über Typ I Fibrozyten der Stria vascularis zu.

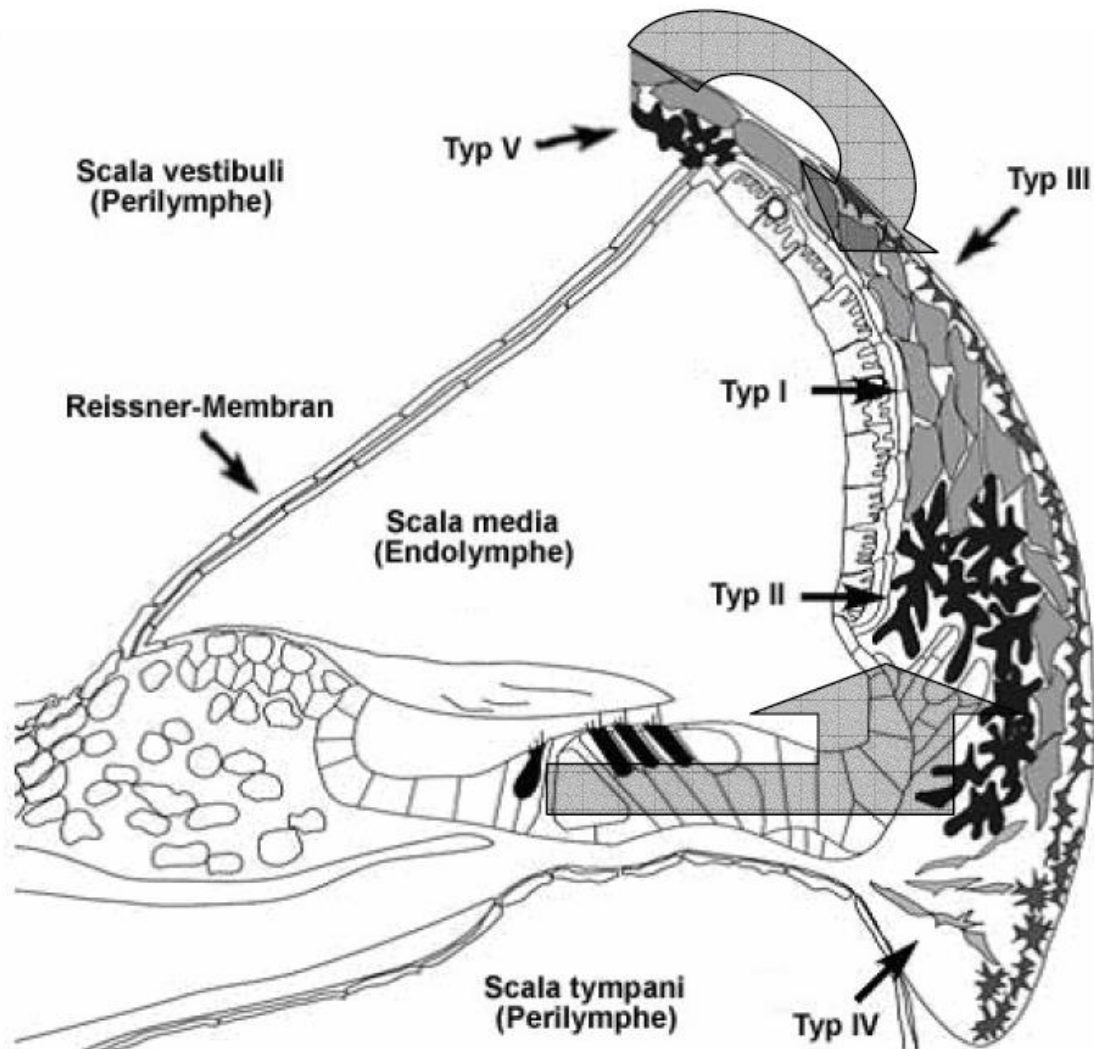


Abb. 3: Fibrozyten im Spiralen Ligament. Das Schema zeigt die Lokalisation der verschiedenen Typen von Fibrozyten im Spiralen Ligament. Die zwei Pfeile stellen den Weg des lateralen Kalium-Recyclings dar (modifiziert nach Hirose und Liberman 2003⁵⁵).

2.1.1.3. Limbus

Der Limbus bildet die mediale Ecke der, im Querschnitt, dreieckigen Scala media. Die Organisation von drei unterschiedlichen Zelltypen verleiht dem Limbus seine Struktur. Die Zelltypen sind die inneren Sulcuszellen, die Interdentalzellen und die Fibrozyten.

Die inneren Sulcuszellen (ISZ) bilden eine Epithelschicht, die den Limbus in Richtung der lateralen gelegenen IHZ abschließt. Zwischen den IHZ und den ISZ liegen die Grenzzellen. Die Epithelfunktion der ISZ und der Grenzzellen wird durch zahlreiche tight-junctions deutlich, die zwischen den Zellen bestehen. Je nachdem in welchem Abschnitt der Kochlea die ISZ betrachtet werden, unterscheiden sie sich in Größe und Morphologie. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie durch „gap junctions“ miteinander verknüpft sind, was ihnen möglicherweise eine Bedeutung bei Ionen-transportmechanismen gibt (Spicer und Schulte 1998¹¹⁷).

Verfolgt man den Verlauf der ISZ nach medial, führen sie zu den Interdentalzellen (IDZ), die das Dach des Limbus bilden. Die IDZ enden am medialen Ansatzpunkt der Reissnerschen Membran. Auch bei ihnen verändert sich die Morphologie im weiteren Verlauf der Kochlea. Sie können in drei Subtypen eingeteilt werden, die nach ihrer Lage zueinander benannt sind: mediale, zentrale und laterale IDZ. Die Subtypen bilden „gap junctions“ untereinander aus und zeigen eine hohe Dichte an Natrium-Kalium-ATPase in ihrer Zellmembran (Kikuchi et al. 1995⁶⁶, Spicer und Schulte 1998¹¹⁷).

Die im Limbus vorkommenden Fibrozyten lassen sich in drei Typen gliedern (Spicer und Schulte 1998¹¹⁷). Die Typ I Fibrozyten befinden sich im lateralen Teil des Limbus und sind von den ISZ, den lateralen und den zentralen IDZ begrenzt. Die kleinen Membranausstülpungen, die sie zu den benachbarten Zellen ausstrecken, verleihen ihnen eine sternenförmige Morphologie, weswegen sie auch Stellatafibrozyten genannt werden. Typ II Fibrozyten werden auch als supralimbische Fibrozyten (SLF) bezeichnet. Dies leitet sich von ihrer Lage ab. Sie befinden sich oberhalb der Reissnerschen Membran und gegenüber den Typ V Fibrozyten des Spiralen Ligaments. Wie diese grenzen die Typ II Fibrozyten an den Perilymphraum der Scala vestibuli. Typ III Fibrozyten werden in der englischen Literatur „light fibrocytes“ oder übersetzt helle Fibrozyten genannt (HF) (Kimura et al. 1990⁶⁷). Dies lässt sich auf ihr Färbeverhalten zurückführen. Sie befinden sich im medialen Teil des Limbus und liegen unterhalb der medialen IDZ. Ein Netzwerk aus Kapillaren durchzieht die Typ III Fibrozyten. Typ I und Typ II Fibrozyten besitzen nachweislich viele Natrium-Kalium-ATPasen in ihren Zellmembranen.

Analog des lateralen Kalium-Recyclingsystems über die Lateralwand, deuten viele histologische Untersuchungen darauf hin, dass ein medialer Recyclingweg für Kaliumionen über den Limbus besteht (Abb. 4). Daran sind alle drei Zelltypen dieser Region beteiligt. Die durch einen akustischen Reiz in die IHZ einströmenden

Kaliumionen werden basolateral abgegeben (Zidanic und Brownell 1994¹³⁸) und von den benachbarten Grenzzellen aufgenommen. Diese geben die Kaliumionen an die ISZ weiter, die wiederum den Transport an die Typ I Fibrozyten fortsetzen. Über die Stellatafibrozyten gelangen die Ionen schließlich zu den lateralen und zentralen Interdentalzellen, die deren Ausschleusung in den Endolymphraum ermöglichen. Genauso wie beim lateralen „recycling pathway“ liegt dem Ionentransport ein, mit Hilfe der Natrium-Kalium-ATPase erzeugter, Konzentrationsgradient zu Grunde (Spicer et al. 2000¹²⁰). Außerdem konnte ein Strom aus Kaliumionen über die medial im Limbus gelegenen Zelltypen nachgewiesen werden. Dabei werden Kaliumionen von den SLF aus der Perilymphe der Scala vestibuli aufgenommen und den hellen Fibrozyten zugeführt. Diese ermöglichen den Weitertransport an die medialen IDZ, die letztlich die Kaliumionen in die Scala media abgeben. Diese Transportkette ähnelt dem Kreislauf der Ionen über die Typ IV und V Fibrozyten des Spiralen Ligaments (Spicer und Schulte 1997¹¹⁸).

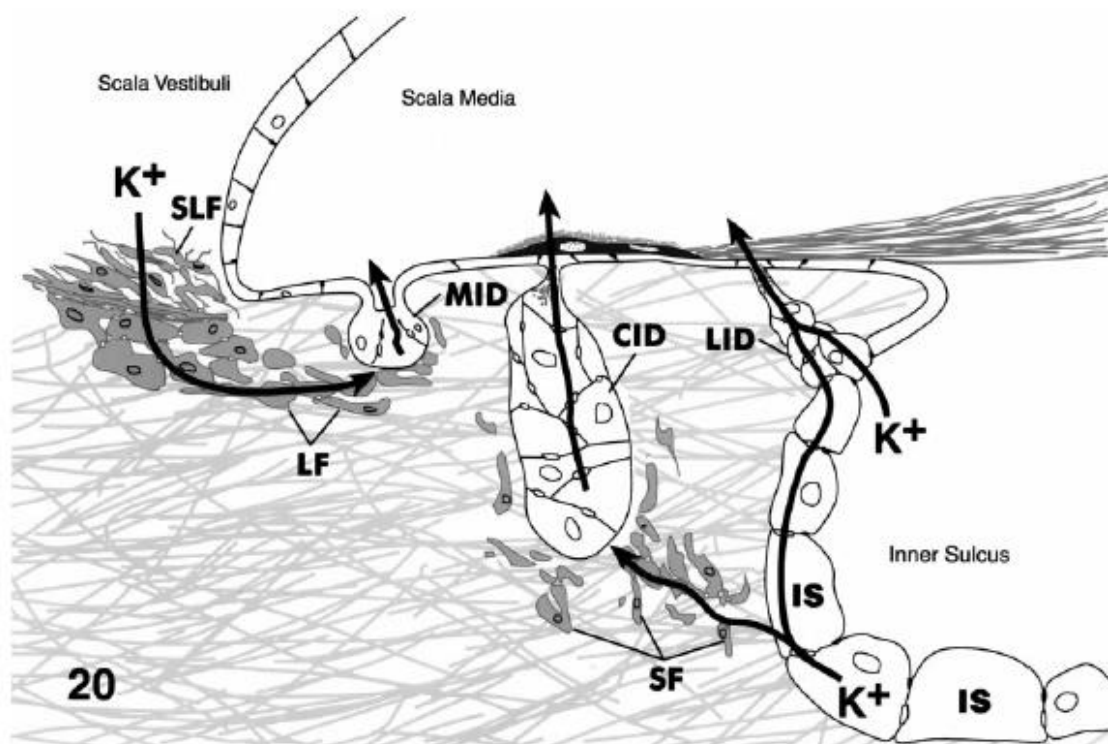


Abb. 4: Fibrozyten im Limbus. Das Schema zeigt die Lokalisation der verschiedenen Zelltypen im Limbus: helle Fibrozyten (LF), innere Sulcuszellen (IS), laterale Interdentalzellen (LID), mediale Interdentalzellen (MID), Stellatafibrozyten (SF), supralimbische Fibrozyten (SLF) und zentrale Interdentalzellen (CID). Die Pfeile illustrieren den Weg des medialen Kalium-Recyclings (Spicer et al. 2000¹²⁰).

2.1.1.4. Nervenfasern, Spiralganglionzellen und Schwannzellen

Die Nervenfasern verlaufen unterhalb der Fibrozyten des Limbus und verbinden dabei die sich lateral befindlichen äußeren sowie inneren Haarzellen mit den medial liegenden Ganglionzellen. Die Nervenfasern bestehen sowohl aus Afferenzen als auch aus Efferenzen. Die Bezeichnung der Ganglien als Spiralganglionzellen (SGZ) leitet sich von ihrer Funktion ab. Es existieren zwei Typen von SGZ.

Die Typ I SGZ bilden mit 95 % die Mehrheit der Nervenzellen im Ganglion. Sie sind relativ groß und zählen zur Gruppe der bipolaren Nervenzellen. Die Erregung der Typ I SGZ findet durch die IHZ statt. Dabei wurde folgende Beobachtung gemacht. Eine SGZ ist immer nur mit einer Haarzelle in Verbindung, wohingegen eine Haarzelle bis zu 20 SGZ kontaktieren kann (Liberman et al. 1990⁷⁴). Der Nachweis von verschiedenen spontanen Aktivitäten hat zur Unterteilung der Typ I SGZ in Typ A, Typ B und Typ C geführt. Typ A Ganglionzellen haben eine hohe, Typ B eine mittlere und Typ C eine niedrige Spontanaktivität. Jede einzelne IHZ steht dabei in Verbindung mit Typ I SGZ aller Subtypen, wobei zu erwähnen ist, dass die Aufteilung ungleichmäßig ist. Bei lateral gelegenen IHZ finden sich mehrheitlich Verbindungen zu SGZ vom Typ A, während bei medial lokalisierten IHZ die Verbindungen zu SGZ vom Typ C zahlreicher sind (Merchan-Perez und Liberman 1996⁸²).

Die Typ II SGZ stellen die restlichen 5 % der Nervenzellen des Ganglions dar. Sie sind kleiner und gehören zur Gruppe der pseudounipolaren Nervenzellen. Außerdem zeigen ihre Nervenfortsätze eine geringere Myelinisierung, als dies bei den SGZ vom Typ I der Fall ist. Die Typ II SGZ stehen ausschließlich mit den ÄHZ in Kontakt. Funktionell sind sie Bestandteil des medialen olivocochleären Reflexes. Dieser Reflex bildet eine efferente Feedback-Schleife und ist für die Regulation des cochleären Verstärkungsprozesses der ÄHZ verantwortlich (Brown et al. 1991¹⁶).

Schwannzellen umgeben die hier erwähnten Nervenfasern. Sie gehören in die Gruppe der peripheren Gliazellen, deren Aufgabe es ist, die elektrische Isolierung des Axons einer peripheren Nervenzelle herzustellen. Die dafür notwendigen Myelinscheiden entstehen durch breitflächige Ausläufer der Schwannzellen, die das Axon spiralförmig umwickeln. Die zahlreichen Ausläufer einer Schwannzelle ermöglichen die Ausbildung von mehreren Myelinscheiden an unterschiedlichen Axonen zur gleichen Zeit. Dies ist auch der Grund, weswegen Schwannzellen eine beachtliche Größe von über 100 µm haben.

2.1.2. Vestibularorgan

Im Labyrinth des Innenohres befinden sich zusätzlich zum Hörorgan die Endorgane des Bewegungs- und Lagesinns. Sie bilden das Vestibularorgan (Gleichgewichtsorgan). Zum Vestibularorgan zählen die drei Bogengänge sowie die Macula sacculi und die Macula utriculi. Während die Bogengänge einzeln von einer knöchernen Hülle umgeben sind, sind die Macula sacculi und utriculi gemeinsam in einer Knochenkapsel, dem Vestibulum, eingefasst. Alle Strukturen des membranösen Labyrinths des Vestibularorgans sind mit Endolymphe ausgefüllt (Schünke et al. 2006¹⁰⁸).

Die drei halbkreisförmigen Bogengänge sind in den drei Hauptebenen des Raumes ausgerichtet und reagieren auf Drehbeschleunigungen. Entsprechend ihrer Stellung zueinander bezeichnet man sie als lateralen, vorderen und hinteren Bogengang. Am Ursprung eines jeden Bogenganges befindet sich eine Erweiterung, die Ampulla genannt wird. In jeder Bogengangsampulle gibt es eine in sie hineinragende Bindegewebsleiste mit der Bezeichnung Crista ampullaris. Sie macht etwa ein Drittel des Ampullenlumens aus und auf ihr sitzen die von Stützzellen eingefassten Sinneszellen. Die Sinneszellen besitzen, vergleichbar der Haarzellen des Cortischen Organs, an ihrem apikalen Pol viele Stereozilien (ca. 80 Stück). Zusätzlich ist jede Sinneszelle apikal mit einem einzelnen Kinozilium ausgestattet, das im Inneren aus einem Stützgerüst aus Mikrotubuli besteht. Sowohl das Kinozilium als auch die Stereozilien ragen in eine gallertartige, mukopolysaccharidhaltige „Kuppel“, die Cupula, hinein. Sie reicht bis ans Dach der Ampulle und schließt sie endolymphdicht ab. Bei Drehbewegungen des Kopfes in einer Ebene eines Bogenganges kommt es durch die Trägheit der Endolymphe zur Auslenkung der Cupula. Diese Auslenkung schert die Stereozilien der Sinneszellen ab, wodurch diese adäquat gereizt werden. Im Rahmen der mechanoelektrischen Transduktion folgt ein Kaliumstrom in die Sinneszellen, worauf Glutamat basal ausgeschüttet wird und die resultierenden Nervenimpulse über den N. vestibularis zum Zentralnervensystem übertragen werden. Eine Deflektion der Stereozilien in Richtung des Kinoziliums erhöht dabei die Impulsfrequenz, wohingegen eine Ablenkung vom Kinozilium die Impulsfrequenz herabsetzt.

Macula utriculi und sacculi sind für die Wahrnehmung von Linearbeschleunigungen zuständig. Dafür steht der Utriculus in einer waagerechten und der Sacculus in einer senkrechten Ausrichtung. Innerhalb dieser beiden Strukturen befindet sich jeweils ein oval angeordnetes Feld von Sinnes- und

Stützzellen. Vergleichbar mit den Haarzellen der Bogengänge sind die Sinneszellen der Makulaorgane mit zahlreichen Zilien ausgestattet, die in die Otolithenmembran eingebettet sind. Ähnlich wie die Cupula in der Ampulle ist die Otolithenmembran eine Gallertschicht in deren Oberfläche allerdings Kristalle aus Kalziumcarbonat, die Otolithen, eingelagert sind. Daraus ergibt sich, dass die Otolithenmembran ein höheres spezifisches Gewicht besitzt als die Endolymphe. Bei linearer Beschleunigung zeren die Otolithen an der darunter liegenden Gallertmasse, was zu Scherbewegungen der Zilien führt. Die folgende mechanoelektrische Transduktion und die resultierende Veränderung der Impulsfrequenz gleicht den Prozessen der Sinneszellen in den Bogengängen (Schmidt, Lang und Thews 2005¹⁰⁷, Boenninghaus 2007¹¹).

2.2. Gentamicin in der Hals-, Nasen-, Ohren-Heilkunde

Gentamicin gehört als Aminoglykosid zur Gruppe der Antibiotika. Die Entdeckung der Aminoglykoside reicht bis in die 40er Jahre des 20. Jahrhunderts zurück (Schatz et al. 1944¹⁰⁴). Dabei wurde die antibakterielle Wirkung von Streptomycin gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien beobachtet. Das erste Antibiotikum dieser Substanzgruppe galt als lange gesuchtes Heilmittel gegen Tuberkulose und auch heute noch werden Aminoglykoside bei dieser Erkrankung eingesetzt. Kurz nach ihrer Entdeckung wurden allerdings ihre Nebenwirkungen im Rahmen einer klinischen Bewertung dieser Substanzklasse beschrieben und ihr nephrotoxisches und ototoxisches Potential aufgezeigt (Hinshaw und Feldman 1945⁵⁴). Trotzdem sind die Aminoglykoside bis heute die am meisten verwendeten Antibiotika weltweit, was auf ihre hohe Effizienz bei niedrigen Kosten zurückzuführen ist. Auf dem Gebiet der Hals-, Nasen-, Ohren-Heilkunde spielen die Aminoglykoside nicht nur auf Grund ihrer innenohrschädigenden Nebenwirkungen eine Rolle. Sie werden auch zu therapeutischen Zwecken eingesetzt wie beispielsweise bei der symptomatischen Behandlung des Morbus Ménière mit Gentamicin (Nedzelski et al. 1992⁸⁵).

2.2.1. Pharmakologie der Aminoglykoside

Aminoglykoside werden von Bakterien der Gattung Actinomyces produziert. Die aus Micromonospora-Arten gewonnenen Antibiotika werden mit der Endung „-micin“ versehen, wohingegen die aus Streptomyces-Arten isolierten Verbindungen auf „-mycin“ enden. Chemisch betrachtet, bestehen sie aus zwei Amino-zucker-Molekülen, die jeweils über glykosidische Bindungen an eine zentrale Hexose gekoppelt sind. Die angehefteten Amino-Gruppen der verschiedenen Ringe verleihen, zusammen mit den vorhandenen Hydroxyl-Gruppen, der gesamten Struktur ihre chemischen Eigenschaften.

Diese funktionellen Gruppen machen die Aminoglykoside zu polaren Molekülen, die sich in Wasser sehr gut lösen und somit als hydrophil gelten. Außerdem haben sie einen basischen Charakter. Die hydrophile Eigenschaft sorgt dafür, dass sie schlecht in Zellen eindringen und folglich nach oraler Einnahme kaum vom Darmlumen ins Blut gelangen. Nur ungefähr 1 % der oral aufgenommenen Dosis kann nach Passage des Darms im Blut nachgewiesen werden (Sande und Mandell 1990¹⁰²). Daraus lässt sich ableiten, dass man diese Gruppe von Antibiotika vorwiegend auf anderem Wege verabreicht. Die bevorzugten Formen der

Administration sind parenteral, durch intramuskuläre oder intravenöse Injektion, oder lokal, wie zum Beispiel bei der intratympanalen Applikation ins Innenohr. Die Ausscheidung der Aminoglykoside erfolgt auf Grund ihrer Polarität und eines kaum vorhandenen Metabolismus durch glomeruläre Filtration der Niere. Sie können die Blut-Hirn-Schranke, auch wenn die Meningen entzündet sein sollten, nicht überwinden. Die Penetration ins zentrale Nervensystem ist nur bei Neugeborenen möglich. Die Plazenta-Schranke stellt hingegen kein Hindernis dar, wodurch sie in den fetalen Kreislauf gelangen können (Rizzi und Hirose 2007⁹⁶).

Aminoglykoside wirken sehr effektiv gegen Gram-negative Bakterien, wobei sich ihre Wirkung in geringerem Maße auch auf Gram-positive Bakterien erstreckt. Diese Tatsache sorgt für ein breites Spektrum von Bakterien, die mit ihnen abgedeckt werden können. Anstatt nur das Wachstum von mikrobiellen Erregern zu hemmen, führen Aminoglykoside zum direkten Untergang von Bakterien. Sie wirken somit bakterizid und nicht bakteriostatisch. Die Aufnahme der Aminoglykoside in Bakterien geschieht initial durch Diffusion sowohl durch einen Wasserkanal als auch durch aktiven Transport. Daraufhin erreichen sie die prokaryotischen Ribosomen und interagieren mit der kleinen Untereinheit (30S Untereinheit). Dabei binden sie an die 16S ribosomale RNA (rRNA), aus der die kleine Untereinheit aufgebaut ist (Blanchard et al. 1998⁹). Der antibakterielle Wirkungsmechanismus beruht auf einer Störung der Protein-Synthese, bei der es zu Ablesefehlern an der messenger-RNA (mRNA) kommt. In der englischen Literatur wird dieser Vorgang als „misreading in translation“ bezeichnet. Die daraus hervorgehenden falschen Eiweiße werden in die Zytoplasmamembran eingelagert und führen zu funktionellen Störungen. Die Membran wird permeabel und der Bakterienzelle gehen essenzielle Bestandteile verloren wie beispielsweise Nukleotide (Roth et al. 1960⁹⁸) und Kaliumionen (Dubin und Davis 1961²⁹). Die genannten Schritte der Schädigung sind irreversibel und enden mit dem Absterben des Bakteriums (Forge und Schacht 2000⁴², Lüllmann, Mohr und Hein 2006⁷⁶).

2.2.2. Nebenwirkungen der Aminoglykoside

Die unerwünschten Ereignisse nach der Gabe von Aminoglykosiden lassen sich in akute und chronische Nebenwirkungen gliedern. Die akuten Nebenwirkungen können sich bereits nach einmaliger Applikation bemerkbar machen, während für die chronisch-toxischen Effekte eine Administration über einen längeren Zeitraum (Wochen bis Monate) notwendig ist.

Zu den akuten Nebenwirkungen zählt die Beeinträchtigung der neuromuskulären Übertragung, die schon in den 1950er Jahren beschrieben wurde (Vital-Brazil und Corrado 1957¹²⁷). Eine solche Störung an der motorischen Endplatte kann vor allem bei der intravenösen Injektion von hohen Konzentrationen auftreten. Außerdem besitzen Aminoglykoside akute, unerwünschte Wirkungen, die das Innenohr betreffen. Diese Prozesse werden im folgenden Kapitel erläutert.

Bei den chronischen Nebenwirkungen sind die Nephrotoxizität und die Ototoxizität zu berücksichtigen. Auf die Schädigung der Niere soll folgend etwas näher eingegangen werden. Die Schädigung des Innenohres wird im nächsten Abschnitt dieser Arbeit eingehender behandelt.

Die toxische Wirkung der Aminoglykoside auf die Niere muss vor allem bei älteren Patienten und bei Patienten, die bereits eine Schädigung der Niere aufweisen, beachtet werden, da es bei einer solchen Antibiotika-Therapie zum Nierenversagen in diesen Risikogruppen kommen kann. Die Nierenschädigung kommt auf folgendem Wege zustande. Die Aminoglykoside gelangen durch glomeruläre Filtration ins proximale Tubulussystem der Niere. Sie binden an das Membranprotein Megalin, mit dessen Hilfe sie durch Endozytose ins Innere der Zelle aufgenommen werden. Dort verschmelzen die Endosomen mit Lysosomen, wodurch die Aminoglykoside in Lysosomen angereichert werden. Die dortige Interaktion mit Phospholipiden führt zur Bildung und Akkumulation von Myeloid-Körpern in den Lysosomen. Diese Veränderungen sind gefolgt von einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembran der proximalen Tubuluszellen, die schließlich absterben (Rougier et al. 2004⁹⁹). Klinisch wird der Patient durch einen langsamen Anstieg der Konzentration des Serum-Kreatinins und einen hypoosmolaren Urin auffällig (Gilbert 1995⁴⁹). Um die schädigenden Einflüsse zu minimieren, werden mehrere Methoden angewendet. Die wiederholte Gabe von hohen Dosen eines Aminoglykosides innerhalb längerer Zeitintervalle hat sich im klinischen Alltag als praktikables Vorgehen erwiesen (Barclay et al. 1999²). Durch die einmalige Zufuhr der Tagesdosis verringert sich beispielsweise die Akkumulation des Antibiotikums in der Niere. Ein weiterer Ansatz ist die zusätzliche Verabreichung eines antioxidativen Wirkstoffes wie zum Beispiel dem Deferoxamin (Ben Ismail et al. 1994⁶).

2.2.2.1. Gentamicin-induzierte Ototoxizität

Das ototoxische Potential der Aminoglykoside kann nach dem Ort der maximalen Organschädigung weiter unterteilt werden. Jedes dieser Antibiotika ist in

der Lage eine Schädigung sowohl in der Cochlea als auch im Vestibularorgan zu induzieren. Typischerweise wird aber je nach verwendetem Wirkstoff eines dieser Organe im Innenohr mehr geschädigt als das andere. Bei Gentamicin, Tobramycin und Streptomycin ist die vestibulotoxische Wirkung stärker ausgeprägt, während bei Amikacin und Neomycin die cochleotoxische Wirkung überwiegt (Matz 1993⁸⁰).

Weiterhin kann man die unerwünschten Wirkungen in akute und chronische Prozesse gliedern. Die nachfolgend aufgeführten Schädigungsmechanismen beziehen sich auf Gentamicin und sind für dieses Aminoglykosid nachgewiesen worden.

Akute Effekte einer Gentamicin-Behandlung können kurze Zeit nach ihrer Applikation aufgezeigt werden. Zum einen kann sich Gentamicin am basalen Pol der äußeren Haarzellen des Cortischen Organs anreichern. Dort dringt es nicht in die Zelle ein, sondern blockiert spannungsgesteuerte Calciumkanäle, was vermutlich zu einer verminderten Freisetzung von Neurotransmittern führt (Dulon et al. 1989³¹). Zum anderen sorgt es für eine Blockade von Transduktionskanälen, die in den Spitzen der Stereozilien lokalisiert sind. Dieses Hindernis für einen Ionenstrom in die Haarzelle findet sich sogar schon bei relativ niedrigen Konzentrationen des Medikaments (Kroese et al. 1989⁶⁸). Zu berücksichtigen ist der fehlende Einfluss dieser beiden akuten Effekte auf die Lebensdauer der Haarzellen. Ein Absterben von Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Die eigentliche Ototoxizität, bei der ein Untergang von Haarzellen beobachtet werden kann, ist eine chronische Nebenwirkung des Gentamicins. Sie manifestiert sich im Laufe oder im Anschluss an eine mehrere Tage oder Wochen dauernde systemische Behandlung und ist irreversibel. Die Cochleotoxizität tritt bei bis zu 20 % der Patienten auf, wohingegen die Vestibulotoxizität ungefähr 15 % der Patienten betrifft (Lerner et al. 1986⁷²). Neuere Analysen der vorliegenden Daten zeigen allerdings eine deutlich niedrigere Inzidenzrate von 2-5 % (Roland 2003⁹⁷). In Entwicklungsländern wird die Inzidenz der Ototoxizität bedingt durch die häufige Anwendung von Aminoglykosiden noch deutlich höher eingeschätzt.

In den meisten Fällen bestimmen die Dosis und die Dauer der Behandlung das Ausmaß der ototoxischen Wirkung. Weitere anerkannte Risikofaktoren sind ein hohes Lebensalter, Lärmeinwirkung und eine eingeschränkte Nierenfunktion (Black und Pesznecker 1993⁷). Eine Interaktion zwischen unterschiedlichen Medikamenten, beispielsweise die Kombination von einem Aminoglykosid und einem Schleifendiuretikum, stellt eine weitere Gefahr dar (West et al. 1973¹³⁰). Mittlerweile

wurde sogar eine erbliche Anfälligkeit gegenüber Aminoglykosiden beschrieben, bei der eine einzelne Injektion des Medikaments zu einem Hörverlust führen kann. Die entsprechende Mutation liegt in der ribosomalen RNA der Mitochondrien (Prezant et al. 1993⁹²).

Der toxische Effekt des Gentamicins spiegelt sich in frühen morphologischen Zellveränderungen wider. Dazu gehören die Abrundung und Schwellung der Haarzellen, das Anschwellen der Mitochondrien, die Bildung von Lysosomen und Inklusionskörpern, das Anschwellen und die Lyse afferenter Nervenendigungen (Hirose et al. 2004⁵⁶). Im weiteren Verlauf zeigen sich morphologische Eigenschaften des programmierten Zelltods, der Apoptose. Dazu zählt die Verdichtung des Chromatins, die Pyknose des Zellkerns, die Formation von apoptotischen Vesikeln und deren Aufnahme durch benachbarte Zellen. Die Aktivierung von wichtigen Enzymen der apoptotischen Signalkaskade, den Caspasen, durch Aminoglykoside ist bereits bekannt. Matsui et al. (2003⁷⁹) zeigten in einer Studie auf, dass die Inhibition von bestimmten Caspasen dem Tod der Haarzellen vorbeugen kann.

Der erste Schritt der Gentamicin-induzierten Ototoxizität beinhaltet dessen Aufnahme in die sensorischen Zellen des Innenohres. Zunächst interagiert es mit der negativ geladenen, apikalen Membran der Haarzelle. Anschließend erfolgt die Aufnahme ins Zellinnere über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Dieser Mechanismus ist anscheinend von der Anwesenheit des Proteins Myosin VIIA abhängig. Ohne dieses Protein erfolgt keine Akkumulation des Antibiotikums in der Zelle und es findet kein Zelluntergang statt (Forge et al. 1999⁴¹). Nach der Aufnahme von Gentamicin in Vesikel findet man es in Lysosomen wider. Durch die ständige Aufnahme und Ansammlung scheinen die Lysosomen zu rupturieren und das Medikament im Zytosol zu verteilen, was schließlich im Zelltod endet (Hashino et al. 1997⁵⁰). Auf die molekularen Abläufe, die zur Apoptose führen, und die daran beteiligten Radikale wird im Verlauf dieser Arbeit noch detailliert eingegangen. Histopathologisch betrachtet wird eine Vielzahl an Haarzellen, während der programmierte Zelltod abläuft, in die Scala media abgegeben. Dieser Vorgang wird in der englischsprachigen Fachliteratur als „extrusion“ bezeichnet (Hirose et al. 2004⁵⁶). Durch ihn wird gewährleistet, dass sich die Stützzellen bei der Abgabe der Sinneszellen in den Endolymphraum unmittelbar aneinanderlagern, wodurch keine Vermischung der Endolymph und der Perilymphe des Cortischen Organs stattfindet. Dabei bilden sie erneut interzelluläre Zellkontakte aus. Als Folge tritt an die Stelle der

Haarzellen ein nicht-spezialisiertes Plattenepithel (Forge und Schacht 2000⁴², Rizzi und Hirose 2007⁹⁶).

Aber nicht nur die Bereiche der Sinnesepithelien zeigen pathologische Veränderungen. Auch andere Strukturen der Cochlea sind betroffen. Die Stria vascularis wird dünner und verliert einige Marginalzellen (Hawkins 1973⁵¹). Zudem gibt es eine progressive Destruktion von Nervenfasern und einen zunehmenden Verlust von Spiralganglionzellen.

2.2.2.2. Klinische Betrachtung der Ototoxizität

Die Cochleotoxizität präsentiert sich symptomatisch in Patienten als Hörverlust, der zuerst die hohen Frequenzen betrifft und der mit einem Tinnitus assoziiert sein kann (Fausti et al. 1984³⁸). Diese Beobachtung ist durch den Ort der Schädigung begründet. Initial werden äußere Haarzellen geschädigt, die in der basalen Windung sitzen, wo die hohen Tonfrequenzen registriert werden (Priuska und Schacht 1997⁹⁴). Mit fortlaufender Medikamentenbehandlung setzt sich der Schaden in Richtung des Apex der Cochlea fort und betrifft auch innere Haarzellen. Dadurch breitet sich der Hörverlust auf die niedrigeren Frequenzen aus. Innerhalb der drei Reihen der äußeren Haarzellen sind primär Zellen der innersten Reihe betroffen, worauf sich der Schaden nach lateral auf die anderen beiden Reihen ausdehnt. Die Cochleotoxizität wird zu Beginn meist gar nicht von den Patienten bemerkt, da sich die hohen Frequenzen außerhalb des Sprachbereichs befinden. Diese Tatsache ist der Grund, warum der beginnende Hörverlust vom Arzt durch eine Tonaudiometrie-Untersuchung meist nicht erfasst werden kann, weil dabei diese Frequenzen nicht getestet werden. Dagegen ist eine Untersuchung der otoakustischen Emissionen eine objektive und sensitive Methode, um die Dysfunktion der äußeren Haarzellen nachzuweisen (Mulheran und Degg 1997⁸³). Ein Alternative zu den OAE ist der BERA-Test (Brainstem Evoked Response Audiometry), mit dem die neuronale Aktivität vom Innenohr bis zum Hirnstamm erfasst wird.

Die Vestibulotoxizität äußert sich in Gleichgewichtsstörungen und, seltener, in Schwindelattacken (Black und Pesznecker 1993⁷). Ist der Verlust des Gleichgewichts auf ein Innenohr beschränkt, kann der Patient einen Nystagmus haben, bei dem die langsame Phase zum betroffenen Ohr weist. Sollte sich ein Verlust in beiden Vestibularorganen eingestellt haben, äußert dieser Zustand beim Patienten in einem ataktischen Gangbild und in einem Gleichgewichtsverlust bei Drehung des Kopfes.

Außerdem kann der Eindruck erweckt werden, dass sich ruhende Objekte bei Kopfbewegungen scheinbar bewegen. Die Schädigung im Vestibularsystem ist primär bei den Haarzellen auf der Spitze der Crista ampullaris, der Macula sacculi und der Macula utriculi nachweisbar (Forge und Schacht 2000⁴², Rizzi und Hirose 2007⁹⁶).

2.2.3. Applikationsformen

Bei der Behandlung von Erkrankungen des Innenohres (vorwiegend des Morbus Ménière) mit Gentamicin haben sich zwei unterschiedliche Applikationsformen als wirksam und klinisch praktikabel herausgestellt. Zur Anwendung kommen die systemische (intravenös oder per os) und die lokale Therapie.

2.2.3.1. Systemische Therapie

Die erste Möglichkeit, das Innenohr mit Gentamicin zu behandeln, ist die systemische Gabe. Um die schlechte Absorption im Darm zu umgehen, wird das Antibiotikum meistens parenteral (intravenös) verabreicht. Anschließend gelangt es mit dem Blutstrom zum Innenohr, wo es zwischen 30 Minuten und 3 Stunden dauert, bis ein konstanter Pegel erreicht wird (Tran Ba Huy 1986¹²⁴). Der Konzentrationslevel im Innenohr bleibt relativ niedrig. Es macht nur ein Zehntel der maximalen Spitzenwerte, die im Blut erreicht werden, aus. Das Eindringen ins Innere des Labyrinthsystems gelingt zunächst über die Perilymphe, wobei dieser Prozess schnell abläuft. Die Penetration in die Endolymphe läuft wesentlich langsamer ab. Die Entfernung des Gentamicins aus dem Blut dauert trotz der höheren Konzentration deutlich kürzer als die Entfernung aus dem Innenohr. Die Halbwertszeit für das Blut beträgt fünf Stunden, wohingegen die Flüssigkeiten und Gewebe des Innenohres eine Halbwertszeit von 30 Tagen und mehr aufweisen (Tran Ba Huy 1986¹²⁴). In manchen äußeren Haarzellen kann sogar noch elf Monate nach einer nicht-toxischen Behandlung Gentamicin nachgewiesen werden (Dulon et al. 1993³⁰). Imamura und Adams konnten 2003⁶⁰ den Nachweis erbringen, dass die Aufnahme von Gentamicin durch sämtliche Zelltypen des Innenohres stattfindet. Ihre Experimente widerlegten die verbreitete Annahme, dass vorwiegend die sensorischen Sinnesepithelzellen das Medikament aufnehmen. Eine starke Anreicherung konnte in der Stria vascularis, im Spiralen Ligament und in der Limbus-

Region aufgezeigt werden. Spiralganglionzellen hatten eine moderate Aufnahme des Antibiotikums mit vergleichbar kurzer Akkumulationsdauer.

Im klinischen Alltag hat sich mittlerweile die einmalige Gabe einer höheren Dosis von Gentamicin pro Tag durchgesetzt. In der englischen Literatur „once-daily dosing“ genannt. Die dreimalige Gabe des Medikaments am Tag wird zunehmend weniger angewendet. Beim once-daily dosing wird eine größere Menge verabreicht und längere Zeitintervalle zwischen den Applikationen eingehalten. Dadurch werden höhere Spitzenwerte im Blut erreicht, wobei der Konzentrationsspiegel dazwischen niedriger ausfällt. Dieses Vorgehen soll dem Innenohr mehr Zeit geben, um das Aminoglykosid aus dem Gewebe zu entfernen und somit die Ototoxizität verringern (Contopoulos-Ioannidis et al. 2004²¹).

2.2.3.2. Lokale Therapie

Die zweite Möglichkeit einer Innenohrbehandlung mit Gentamicin ist die lokale Applikation. Diese kann mit zwei verlässlichen Methoden durchgeführt werden.

Bei der intratympanalen Applikation wird das Arzneimittel durch das Trommelfell in das dahinter liegende Mittelohr injiziert. Anschließend folgt die Diffusion des Wirkstoffes durch die Membran des runden Fensters in die Perilymphe der Scala tympani. Wanamaker et al. konnten 1998¹²⁸ eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Innenohrschädigung von der transtympanal verabreichten Gentamicin-Menge aufzeigen. Eine Steigerung der Gentamicin-Dosis resultierte dabei in einer stärkeren Schädigung der Haarzellen in der Cochlea und im Vestibularorgan.

Bei der intrakochleären Gabe wird ein Mikrokatheter mit einer osmotischen Pumpe verbunden und direkt in der Cochlea platziert. Mit Hilfe dieses Mechanismus kann das Gentamicin, ohne über die Membran des runden Fensters diffundieren zu müssen, in die Perilymphe appliziert werden. Dadurch ist die Dosis, die letztlich das Innenohr erreicht, sogar besser steuerbar (Brown et al. 1993¹⁵, Okuda et al. 2004⁸⁶).

Das Muster der Gentamicin-Anreicherung in den Zellen des Innenohres entspricht hierbei dem Muster, das sich nach systemischer Applikation ergeben hat (siehe vorigen Abschnitt „Systemische Therapie“).

2.2.3.3. Vergleich der Applikationsformen

Becvarovski et al. untersuchten 2002^{3, 4} in zwei getrennten Studien die Konzentration von Gentamicin in der Flüssigkeit des Innenohres nach systemischer

und nach lokaler Applikation. Nach intravenöser Gabe des Antibiotikums (80 mg Gentamicin) lagen die höchsten Werte zwischen 3,3 mg/L und 3,8 mg/L, wobei der Serumspiegel im Blut einen Spitzenwert von 10,5 mg/L zeigte. Bei der direkten Applikation von 20 mg Gentamicin ans runde Fenster im Mittelohr wurde ein Maximalwert von 16 mg/L im Innenohr gemessen und selbst nach 90 Minuten lag die Konzentration des Medikaments noch bei bis zu 14 mg/L. Da die Methodik der Flüssigkeitsgewinnung bei beiden Untersuchungen gleich war, kann man Rückschlüsse auf die zwei verschiedenen Applikationsformen ziehen. Nach lokaler Therapie scheint der Anteil des verabreichten Gentamicins, der schließlich im Innenohr nachgewiesen werden kann, deutlich höher auszufallen als bei der systemischen Gabe.

2.2.4. Gentamicin in der Therapie von Erkrankungen des Innenohres

2.2.4.1. Morbus Ménière: Symptome, Ätiologie und Therapie

Der Morbus Ménière ist eine Erkrankung des Innenohres, die sich aus einer symptomatischen Trias zusammensetzen kann. Zu den drei charakteristischen Symptomen gehören Drehschwindel, einseitiger Hörverlust und Tinnitus. Diese Symptome treten schubweise auf, wobei der Patient lange Episoden ohne Beschwerden haben kann. Gerade zu Beginn stellt sich der Morbus Ménière oft nicht mit der kompletten Symptom-Trias dar, was die Diagnosestellung und die Abgrenzung zu anderen Krankheiten erschwert. Der episodisch auftretende Drehschwindel ist anfallsartig und kann von wenigen Minuten bis zu mehreren Stunden dauern. Häufig wird er von Übelkeit und Erbrechen begleitet. Er wird auch in Ruhe wahrgenommen und verschlimmert sich bei Bewegungen. Der Hörverlust betrifft bei dieser Erkrankung meistens die tiefen Frequenzen des Hörbereiches und geht mit einem Tinnitus einher (Paparella 1991⁸⁷). Fast alle Patienten erleben ein Druck- oder Völlegefühl im Ohr, das der Attacke, ähnlich einer Aura, vorausgeht und diese initial begleitet. Wichtige Tests, die die Diagnose des Morbus Ménière unterstützen, sind die Audiometrie und die Nystagmographie. Ein MRT dient dem Ausschluss eines pathologischen Prozesses hinter der Cochlear (Sajjadi und Paparella 2008¹⁰¹).

Eine histopathologische Begründung für die Krankheit ist der endolymphatische Hydrops. Dabei führt ein endolymphatischer Stau zu einem Druckanstieg im Labyrinth. Vermutlich liegt dem Hydrops eine Obstruktion nahe dem endolymphatischen Sack zu Grunde, wo die Endolymphe absorbiert wird (Paparella

und Djalilian 2002⁸⁸). Die exakte Ursache ist allerdings noch nicht bekannt. Weiterhin werden Störungen der Endolymphproduktion, der Endolymphabsorption, genetische Anomalien und virale Infektionen diskutiert, was wahrscheinlich auf ein multifaktorielles Geschehen hinweist.

Eine Heilung des Morbus Ménière ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Die effektive Behandlung besteht aus mehreren Schritten und Bausteinen, die bei Therapieversagen aufeinander aufbauen.

Die Akutbehandlung beinhaltet die Gabe von Dimenhydrinat (Vomex), um die Übelkeit während eines Anfalls zu lindern. Eine weitere Option ist die intramuskuläre oder intravenöse Injektion von Methylprednisolon (Cortison), das den Drehschwindel und den Hörverlust kontrollieren soll. Gefolgt wird diese akute Verabreichung von einer oralen Cortison-Therapie über ca. zwei Wochen. Sollte ein solches Schema den Hörverlust nicht aufhalten, kann eine intratympanale Applikation von Cortison (Prednisolon oder Dexamethason) durchgeführt werden. Die Effektivität dieser Therapie zeigten Garduno-Anaya et al. 2005⁴⁷.

Bei der dauerhaften Behandlung sollten dem Patienten zunächst Änderungen des Lebensstiles nahe gelegt werden. Dafür sollte er den Konsum von Kaffee, Schokolade, Tabak und Alkohol vermeiden, die alle in negativem Zusammenhang mit dem Morbus Ménière stehen. Außerdem sollte die Aufnahme von Salz auf maximal zwei Gramm pro Tag reduziert werden.

Eine Reduktion von Schwindelattacken konnte außerdem nach Einleitung einer Immuntherapie bei Patienten mit Allergie beobachtet werden (Derebery 1997²⁵).

Es stehen auch destruktive Behandlungen durch die transtympanale Applikation von Gentamicin zur Verfügung. Dabei möchte man sich die toxische Wirkung des Gentamicins auf das Vestibularorgan zu Nutze machen, um das Symptom des Drehschwindels einzuschränken. Die Schädigung erstreckt sich allerdings nicht nur auf das Sinnesepithel des Vestibularorgans sondern auch auf die Sinneszellen der Cochlea. Dadurch ergibt sich als Nebenwirkung dieser Behandlungsform ein beginnender oder zunehmender Hörverlust der Patienten. Mittlerweile existieren einige Modifikationen dieser Therapie-Methode. Bei Driscoll et al. (1997²⁷) erfolgte eine einmalige intratympanale Injektion von niedrig dosiertem Gentamicin (10-80 mg) bei 23 Patienten. 84 % der Behandelten hatten in den darauf folgenden sechs Monaten keine Episoden von Drehschwindel. McFeely et al. (1998⁸¹) behandelten zwischen 1992 und 1996 25 Patienten mit intratympanal

verabreichtem Gentamicin (40 mg/ml). Ein vollständiges Verschwinden des Drehschwindels konnte bei 88 % nachgewiesen werden. Bei weiteren 12 % verbesserte sich das Symptom deutlich. Bei 20 % wurde ein klinisch signifikanter Hörverlust und bei 8 % eine Taubheit festgestellt. De Stefano et al. (2007²⁶) analysierten die Behandlungsergebnisse bei 55 Patienten. In ihrer Studie wurde Gentamicin (40 mg/ml) drei Mal in Intervallen von zwölf Stunden intratympanal appliziert. Die Resultate zeigten in 60 % der Fälle eine völlige Kontrolle und in 16 % eine sehr gute Kontrolle des Drehschwindels. Bei 17 % der Patienten nahm der Hörverlust zu. Aus diesen Studien lässt sich ableiten, dass eine Indikation für die intratympanale Gentamicin-Therapie die Kontrolle des Drehschwindels in bereits gehörgeschädigten Ohren darstellt. Eine misslungene Operation des Endolymphatischen Sacks kann ein zusätzlicher Grund für die Einleitung dieser Therapie sein (Marzo und Leonetti⁷⁸).

Weitere Behandlungsoptionen stellen die Operation des endolymphatischen Sacks, die Durchtrennung des Nervus vestibularis und die Labyrinthektomie dar.

2.3. Schädigung der Cochlea durch Radikale

Freie Radikale sind Atome, Moleküle oder Ionen die ein ungepaartes Elektron besitzen. Durch das freie Elektron sind sie gewöhnlich reaktionsfreudiger als das ursprüngliche Molekül, dem sie entstammen. Aus diesem Grund können sie oxidative Kettenreaktionen initiieren und unterstützen, die für Schädigungen von Innenohrstrukturen verantwortlich sind. Ursachen, bei denen es zu einer gesteigerten Bildung von freien Radikalen kommt, sind unter anderen eine übermäßige Schallexposition und ototoxische Medikamente (wie zum Beispiel Gentamicin). Die Gruppe der freien Radikale kann in ROS (reactive oxygen species) und RNS (reactive nitrogen species) unterteilt werden (Evans und Halliwell 1999³⁷).

2.3.1. Schädigung durch ROS

Die Gemeinsamkeit aller ROS ist der Sauerstoff, der als Bestandteil in ihren Molekülen vorkommt. Dabei werden dieser Gruppe sowohl wirkliche Radikale wie das Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) und das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) als auch so genannte Nonradicals (Nicht-Radikale) wie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zugeordnet. Nonradicals können oxidative Kettenreaktionen in Gang halten und sorgen für die Bildung von weiteren reaktiven Verbindungen. In den Zellen entstehen die ROS in der Atmungskette der Mitochondrien. Bei den zur oxidativen Phosphorylierung führenden Prozessen, durch die schließlich ATP gebildet wird, fällt das Superoxid-Anion $O_2^{\cdot-}$ als Nebenprodukt an (Fridovich 1986⁴⁵). Diese Tatsache macht deutlich, dass jede Zelle in geringem Maße ROS auf physiologischem Weg bildet. Sollte sie jedoch zusätzlich in oxidativen Stress geraten, entstehen größere Mengen an Radikalen. Diesem oxidativen Stress können beispielsweise Entzündungen oder die Gabe von gewissen Medikamenten zu Grunde liegen. Darauf folgt die gesteigerte Entstehung von $O_2^{\cdot-}$ durch das Enzym NAD(P)H-Oxidase. Die Superoxid-Dismutase wandelt das $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 um. In Anwesenheit von Eisen-Ionen (Fe^{2+}) reagiert das H_2O_2 zu OH^{\cdot} (Dröge 2002²⁸). Das Hydroxylradikal ist eines der schädlichsten Radikale und reagiert unmittelbar mit zahlreichen Zellstrukturen. Der DNA werden Doppelstrangbrüche zugefügt. Proteine werden chemisch verändert, sodass sie von der Zelle abgebaut werden. Die Reaktion mit Phospholipiden der Zellmembran resultiert in der Zerstörung der Zelle.

In unterschiedlichen Studien konnten ROS im Innenohr gefunden werden. Yamashita et al. (2004¹³⁴) konnten ROS in der Cochlea nach vorausgegangener Lärmexposition nachweisen. Dabei korrelierte der progressive Verlust von Haarzellen

mit der Entstehung der Radikale. Jiang et al. (2007⁶³) zeigten mit ihren Untersuchungen, dass die ROS-Menge mit zunehmendem Alter im Innenohr ansteigt. Auch hier lässt sich ein Zusammenhang zwischen ROS und einer Schädigung der Cochlea vermuten, da die Hörleistung mit steigendem Lebensalter abnimmt.

ROS sind aber nicht nur Bestandteil von pathologischen Prozessen, sondern beteiligen sich ebenfalls an der Regulation von physiologischen Mechanismen. Sie verstärken zum Beispiel die Immunantwort nach der Interaktion von Immunzellen mit einem Antigen oder sie können den programmierten Zelltod einleiten (Dröge 2002²⁸).

2.3.2. Schädigung durch RNS

Alle RNS besitzen Stickstoff in ihrer Molekülstruktur. Zu dieser Gruppe zählen Stickstoffmonoxid (NO), Nitrit (NO₂⁻), Nitrat (NO₃⁻), Nitritradikal (NO₂[·]), Peroxynitrit (ONOO⁻) und Nitrosoperoxycarbonat (ONOOOCO₂⁻) (Whiteman et al. 2002¹³¹). Das NO als einer der wichtigsten Vertreter der RNS wird von verschiedenen Isoformen der NOS gebildet. Seine toxischen Wirkungen können in direkte und indirekte Effekte eingeteilt werden (Espey et al. 2002³⁵). Direkte Effekte sind Reaktionen, in denen NO direkt mit einer biologischen Zielstruktur reagiert. Die Reaktion mit Hämoglobin und dessen Umformung zu Methämoglobin soll hier als Beispiel dienen. Indirekte Effekte sind Reaktionen, in denen sich NO zuerst mit einem Reaktionspartner verbindet, bevor es andere Strukturen in der Zelle modifiziert. Kommt es beispielsweise durch oxidativen Stress zur verstärkten Synthese von ROS, kann eine Reaktion zwischen NO und O₂⁻ stattfinden, wobei Peroxynitrit (ONOO⁻) entsteht. Peroxynitrit kann daraufhin mit Phospholipiden der Zellmembran reagieren und die Lipid Peroxidation einleiten (Virág et al. 2003¹²⁶). Die Zwischen- und Endprodukte der Lipid Peroxidation sammeln sich in der Membran an, destabilisieren sie und greifen Proteine an, die in der Membran lokalisiert sind. Außerdem kann das Peroxynitrit Enzyme und die DNA schädigen. Niedrige Konzentrationen von ONOO⁻ führen zur Apoptose, während hohe Konzentrationen die Nekrose induzieren.

In der Cochlea können RNS nach Lärmeinwirkung auf das Ohr nachgewiesen werden (Yamashita et al. 2004¹³⁴).

Das Stickstoffmonoxid dient der Zelle aber natürlicherweise auch als intra- und extrazellulärer Botenstoff, der zahlreiche physiologische Abläufe steuert. Die von NO ausgehende Signalkaskade in der glatten Gefäßmuskulatur endet in der Relaxation der Muskelzellen und in der Erniedrigung des Gefäßtonus. Außerdem reduziert es

die Expression von Adhäsionsmolekülen in der endothelialen Zellmembran. Diese biochemischen Wirkungen hat man sich bereits bei der Therapie der Angina pectoris zu Nutze gemacht, wo man NO als Spray akut verabreichen kann (Förstermann und Münzel 2006⁴⁰).

2.3.3. Antioxidative Abwehr

Eine Voraussetzung für eine Zellschädigung durch ROS/RNS ist ein Missverhältnis zwischen einem Anstieg der Radikale und der antioxidativen Abwehr. Das Gleichgewicht kann sich über zwei Wege in Richtung der Radikale verschieben. Sowohl eine Überproduktion an ROS/RNS als auch ein Verlust oder partielle Verminderung an Antioxidantien können zu oxidativem Stress führen.

Die Zellen haben mehrere antioxidative Abwehrmechanismen entwickelt, um Radikale abzufangen und zu entfernen. Dazu gehören Enzyme, die vorwiegend intrazellulär lokalisiert sind, und niedermolekulare Moleküle, die intra- und extrazellulär zu finden sind. Zu den Enzymen zählt die bereits erwähnte Superoxid Dismutase (SOD), die $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 umformt. Hinzu kommen die Glutathion Peroxidase (GSH-Px) und die Katalase, die beide H_2O_2 entfernen, indem sie es zu Wasser umwandeln. Die niedermolekularen Antioxidantien sind Moleküle, die Radikale binden und somit die oxidativen Kettenreaktionen unterbrechen können. Dabei werden sie selbst zu reaktiven Verbindungen, die allerdings deutlich weniger schädlich für die Zelle sind. In die Gruppe der niedermolekularen Antioxidantien gehören Glutathion (GSH), Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E) und Harnsäure (Evans und Halliwell 1999³⁷).

Den Nachweis, dass antioxidative Enzyme im Innenohr vorkommen, erbrachten Zelck et al. 1993¹³⁶. Sie fanden SOD und GSH-Px in der Kochlea des Meerschweinchens. Hoffman et al. (1988⁵⁷) konnten aufzeigen, dass eine intrazelluläre Reduktion von GSH in der Kochlea die Ototoxizität von Aminoglykosiden potentiert.

2.3.4. Radikalbildung durch Gentamicin

Die Entstehung von ROS und RNS durch Gentamicin setzt die Freisetzung von dem Antibiotikum in den entsprechenden Zellen der Kochlea voraus. Nach dem Zerfall der Lysosomen erscheint der Wirkstoff im Zytosol. Anschließend scheint das Gentamicin in Interaktion mit Polyphosphoinositiden der Lipidmembran zu treten, zu denen es eine hohe Bindungsaffinität hat. Polyphosphoinositide sind stark polare

Phospholipide, die als eine Quelle für Arachidonsäure dienen. Die Korrelation zwischen der Ototoxizität und der Bindung an Phosphoinositiden ist gut belegt (Lodhi et al. 1980⁷⁵). Neben der Verbindung mit diesen Membranlipiden hat Gentamicin noch eine zweite Bindungsdomäne für Eisen-Ionen (Fe^{2+}). Dadurch bildet sich ein Eisen-Aminoglykosid Komplex, der die Arachidonsäure als Elektronenspender verwendet (Priuska und Schacht 1995⁹³). Anschließend folgt die Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und die oxidativen Kettenreaktionen werden gestartet. Des Weiteren entstehen Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit (ONOO^-) (Takumida et al. 1999¹²²). Eisen-Ionen spielen eine entscheidende Rolle bei der ototoxischen Schädigung durch ROS/RNS. Conlon und Smith konnten 1998¹⁹ zeigen, dass eine parallele Gabe von Gentamicin und Eisen eine stärkere funktionelle Schädigung der Kochlea nach sich zieht als eine einfache Gentamicin-Gabe. In einer weiteren Studie wiesen Conlon et al. (1998¹⁸) eine Abnahme der Ototoxizität bei gleichzeitiger Gabe eines Eisen-bindenden Wirkstoffes, dem Deferoxamin, nach.

Die Bildung der Radikale, und besonders des Peroxynitrits, in enger Nachbarschaft zur Lipidmembran ist der Ausgangspunkt für die Lipid Peroxidation. Sowohl ROS und RNS als auch Zwischen- und Endprodukte der Lipid Peroxidation können daraufhin bestimmte Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität verändern. Als Beispiele seien hier NF- κ B und AP-1 genannt. Die folgende Regulation der Genexpression leitet die Neurodegeneration in Form der Apoptose ein (Contestabile 2001²⁰).

Das zeitliche Schädigungsmuster, dem zufolge die äußeren Haarzellen der basalen Kochlea vor den äußeren Haarzellen der apikalen Regionen geschädigt werden, wurde in dieser Arbeit bereits erwähnt. Der Grund für diese Beobachtung scheint eine stärkere Anfälligkeit der Haarzellen der basalen Windung für freie Radikale zu sein. Diese Anfälligkeit lässt sich scheinbar auf niedrigere, intrazelluläre Glutathionspiegel in basalen ÄHZ zurückführen, die die Widerstandsfähigkeit gegenüber ROS und RNS einschränkt (Sha et al. 2001¹¹³).

2.3.5. 4-Hydroxynonenal

4-Hydroxynonenal (4-HNE) ist ein reaktives Aldehyd, das bei der Lipid Peroxidation von Phospholipidmembranen entsteht. Weitere Aldehyde, die bei diesem Vorgang produziert werden, sind Malonaldehyd und 4-Hydroxyhexenal (Esterbauer et al. 1991³⁶). Das 4-HNE-Molekül enthält drei funktionelle Gruppen, die

seine hohe Reaktivität erklären (Abb. 5). Es sind eine CC-Doppelbindung und eine CO Carbonyl-Gruppe vorhanden, die dem Kohlenstoff-Atom an Stelle drei (C₃) eine partiell positive Ladung verleihen. Diese positive Ladung wird durch eine Hydroxy-Gruppe (OH) an dem vierten Kohlenstoff-Atom (C₄) noch verstärkt. Diese Eigenschaften machen 4-HNE zu einem elektrophilen Molekül, das ein Bestreben hat, mit nukleophilen Verbindungen zu reagieren (Petersen und Doorn 2004⁹⁰). 4-HNE hat sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften. Für die biologischen Effekte ist es von Bedeutung, dass die Lipophilie stärker ausgeprägt ist als die Hydrophilie.

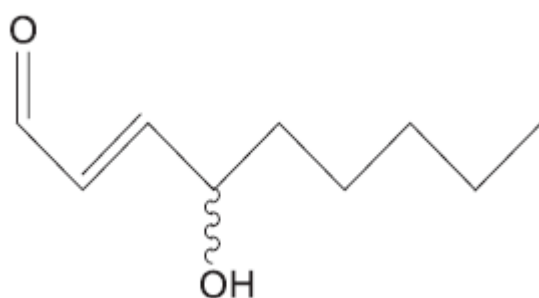


Abb. 5: Strukturformel des Moleküls 4-HNE (Petersen und Doorn 2004⁹⁰)

Sobald 4-HNE in der Zelle vorkommt, kann es mit zahlreichen Strukturen reagieren, wozu Proteine, Lipide und Nukleinsäuren zählen. Quantitativ betrachtet, stellen Proteine und Peptide die wichtigste Gruppe von biologischen Zielbiomolekülen dar. Dabei reagiert 4-HNE mit drei verschiedenen Aminosäuren der Proteinseitenketten. Diese Aminosäuren sind Cystein (Cys), Histidin (His) und Lysin (Lys). Das Ausmaß der Reaktivität mit diesen drei Proteinresten kann folgendermaßen angegeben werden: Cys \geq His > Lys. Die Modifikationen an Proteinen können sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse beeinflussen (Petersen und Doorn 2004⁹⁰). Die Interaktion mit Lipiden ist am stärksten mit Phosphatidylethanolamin und, in geringerer Ausprägung, mit Phosphatidylserin. Auf Ebene der DNA finden Reaktionen mit allen vier Basen statt. Allerdings unterscheidet sich auch hier die Ausprägung der Reaktivität: Guanin > Cytosin > Adenin > Thymin (Poli et al. 2008⁹¹).

Die Beobachtungen, dass 4-HNE zytotoxische Auswirkungen hat, wurden bereits von Esterbauer et al. 1991³⁶ zusammengetragen. Der Zelltod wird dabei von einer Vielzahl von Effekten begleitet wie z.B. der Lipid-Peroxidation, der Inhibition von DNA-, RNA- und Protein-Synthese oder der Störung der Kalzium-Homöostase.

Kruman et al. (1997⁶⁹) erbrachten den Nachweis, dass 4-HNE die durch oxidativen Stress induzierte Apoptose in Nervenzellen vermittelt. In ihren Experimenten leiteten Konzentrationen von 2 µM bis 10 µM 4-HNE den programmierten Zelltod von Nervenzellen aus dem Hippocampus der Ratte ein. Des Weiteren konnten sie den anti-apoptotischen Effekt von Glutathion nachweisen, das 4-HNE bindet und somit dessen Zytotoxizität deutlich verminderte. Generell, scheint 4-HNE bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen eine bedeutende Rolle innerhalb des Pathomechanismus einzunehmen. Das Auftreten von diesem Aldehyd wurde bereits beim Morbus Parkinson (Yoritaka et al. 1996¹³⁵) und beim Morbus Alzheimer (Sayre et al. 1997¹⁰³) nachgewiesen.

Die jeweiligen biochemischen Signalwege, die 4-HNE bei der Apoptose einschlägt, sind noch Gegenstand derzeitiger Forschung. Diskutiert wird der Einfluss des Aldehyds auf die Signaltransduktion über Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und über NF-κB. Zu berücksichtigen ist hierbei ferner, dass 4-HNE die Kaskaden scheinbar nicht nur pathologisch beeinflusst. In subtoxischen Konzentrationen scheint es über diese Wege die Widerstandsfähigkeit der Zelle gegenüber oxidativem Stress erhöhen zu können (Petersen und Doorn 2004⁹⁰).

Keller et al. (1997⁶⁴) konnten einen weiteren Mechanismus aufzeigen, der dem zytotoxischen Effekt von 4-HNE zu Grunde liegt. 4-HNE ist in der Lage, die Lipid-Peroxidation zu induzieren und am Laufen zu halten. Damit ist dieses Aldehyd nicht nur Produkt sondern auch Initiator dieser oxidativen Kettenreaktion.

2.3.5.1. 4-HNE im Innenohr

Die Substanz 4-HNE dient in sensorischen Nervenzellen als Biomarker für ROS/RNS-induzierte Schädigungen (Kruman et al. 1997⁶⁹). In den meisten Studien wird die Anwesenheit von 4-HNE durch immunhistochemische Nachweisverfahren verifiziert. Die Antikörper erkennen hierbei in der Regel Verbindungen zwischen dem Aldehyd und einer Aminosäure.

Das Molekül 4-HNE entsteht als Folge von oxidativem Stress in sensorischen Zellen der Cochlea (Huang et al. 2000⁵⁹). Bei diesem Vorgang wird vermutet, dass der Aldehyd ein wichtiger Bestandteil der Signalkaskade ist, die zur Apoptose der Haarzellen führt. Yamashita et. al konnten 2004¹³⁴ 4-HNE in Haarzellen und in Stützzellen des Cortischen Organs von Meerschweinchen nach Lärmexposition nachweisen. Dabei wurde eine maximale Anreicherung an den Tagen sieben bis zehn nach Lärmbelastung gefunden. In Innenohren, die keinem oxidativen Stress

ausgesetzt waren, war keine Färbung erkennbar. Bei Fetoni et al. ging 2009³⁹ der Nachweis von 4-HNE im Innenohr nach akustischem Trauma mit einer Hörschädigung einher. Die immunreaktive Färbung war an beiden Messzeitpunkten (erster und siebter Tag) in allen Strukturen der Cochlea stark erhöht. Die Strukturen des Vestibularorgans zeigten hingegen nur eine geringe Färbung. Der Hörverlust wurde mittels der auditory brainstem response (ABR) ermittelt. Eine zunehmende Anreicherung von 4-HNE in Zellen der Cochlea mit steigendem Alter von Mäusen wurde von Jiang et al. 2007⁶³ beobachtet. Auch in dieser Studie zeigte sich eine Immunreaktivität für diesen Biomarker nicht nur in Haarzellen sondern auch in Stützzellen des Cortischen Organs (Deiters- und Pfeiler-Zellen), deren Färbeintensität sogar stärker ausfiel. Im weiteren Verlauf waren schließlich Spiralganglionzellen, die Stria vascularis und das Spirale Ligament gefärbt. Den Nachweis von 4-HNE im Cortischen Organ nach Aminoglykosid-Gabe erbrachte Jiang et al. 2005⁶². Nach sieben Tagen von subkutan verabreichtem Aminoglykosid war die immunreaktive Färbung in den Haarzellen und in den Stützzellen am intensivsten ausgeprägt.

Ruiz et al. (2006¹⁰⁰) konnten einen 4-HNE-induzierten Verlust von äußeren und inneren Haarzellen nachweisen. In ihrer Studie wurden Cochleae von Ratten explantiert und in vitro mit unterschiedlichen Dosen von 4-HNE behandelt. Dabei resultierte diese Exposition in einem Dosis-abhängigen Verlust von beiden Haarzell-Typen. Je höher die Dosis desto höher war der Verlust. Zudem waren die basalen Haarzellen empfindlicher gegenüber einer 4-HNE-Schädigung als die apikalen Haarzellen. Dieser Gradient entspricht dem nachweisbaren Basis-zu-Apex-Muster von Aminoglykosiden und freien Radikalen. Außerdem demonstriert diese Studie die Effektivität der schützenden Wirkung von einem Glutathion-Monoethyl-Ester (GSH_e) gegenüber der Ototoxizität von 4-HNE. GSH_e liefert den auditorischen Haarzellen das nötige Glutathion, um 4-HNE abzufangen und den Zelluntergang einzuschränken.

3. Material und Methoden

3.1. Art und Anzahl der Versuchstiere

Die Versuche wurden mit 35 pigmentierten (tricolor) Meerschweinchen des Züchters „Charles River“ (Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Wie Manthey und Behl 2006⁷⁷ aufzeigten, ist diese Geschlechtsselektion notwendig, um den Einfluss des Sexualhormons 17-beta-Östrogen auf die Versuchspopulation zu minimieren.

Nur gesunde Tiere mit guten Preyer Reflexen und keinem Nachweis einer Mittelohrerkrankung wurden benutzt. Der Preyer Reflex stellt, nach Böhmer 1988¹⁰ einen Test des Gehörs dar, bei dem man beispielsweise durch Fingerschnippen oder Händeklatschen am Ohr des Versuchstieres das Gehör orientierend prüfen kann. Den Ausschluss einer Hörminderung erbrachte eine AEP-Messung (akustisch evozierte Potentiale) bei allen Tieren. Diese Messung hat sich als Standardverfahren des hiesigen Labors etabliert.

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Tierversuchsanlage der Universitätsmedizin Mainz unter Berücksichtigung eines Tag / Nacht Rhythmus von 12:12 Stunden gehalten. Die Betreuung erfolgte durch geschulte Tierpfleger und entsprach, genauso wie die Haltung, die verschiedenen Behandlungsschritte und die hygienischen Bedingungen, den gesetzlichen Vorgaben. Diese wurden von der zuständigen Aufsichtsbehörde kontrolliert. Bei Versuchsbeginn lag das Körpergewicht der Tiere bei 200 bis 400 g.

3.2. Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Die nachfolgenden Versuche sind Bestandteil einer übergeordneten Arbeit zur Erforschung der Pathologie der Cochlea. Die Tierexperimente waren bereits im Vorfeld durchgeführt worden (Kapitel 3.2 bis 3.3). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der histologischen Aufarbeitung und der folgenden Analyse der Innenohrpräparate (Kapitel 3.4 und folgende). Es erfolgte eine randomisierte Zuteilung zu den einzelnen Gruppen.

3.2.1. Kontrollen

Fünf Tiere bildeten die Kontroll-Gruppe, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter dem Gruppenbuchstaben A geführt wird. Den Tieren dieser Kontroll-Gruppe wurde keine Behandlung zugeführt. Die Haltung entsprach den gleichen Bedingungen wie die Haltung der anderen Versuchstiere.

3.2.2. Substanzapplikation

Die Substanzapplikation erfolgte, mit Ausnahme der Gruppe A, bei allen weiteren Gruppen (Gruppe B, Gruppe C und Gruppe D). Ein Volumen von 0,1 ml Substratlösung wurde diesen Gruppen unter mikroskopischer Kontrolle beidseitig intratympanal gespritzt. Die Substratlösung bestand aus 4 mg Gentamicin (4mg/Ohr/Tier, Ratiopharm, Ulm, Deutschland).

Bei Gruppe B erfolgte die Organentnahme einen Tag, bei Gruppe C zwei Tage und bei Gruppe D sieben Tagen nach Applikation des Antibiotikums.

3.2.3. Übersicht der Tierbehandlung

Gruppen-Buchstabe	Anzahl der ausgewerteten Ohren	Anzahl der ausgewählten Schnitte	Gentamicin-Applikation	Gentamicin-Einwirkzeit
A	5	15	nein	∅
B	8	24	ja	1 d
C	12	36	ja	2 d
D	10	30	ja	7 d
gesamt	35	105		

3.3. Narkose

Für die AEP-Messungen und die Substanzapplikationen wurden die Meerschweichen narkotisiert. Die Betäubung setzte sich aus einer intraperitonealen Injektion von 175 mg/kg Körpergewicht Esketaminhydrochlorid (Ketanest, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 10 mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) zusammen.

3.4. Präparation und Gewebefixierung

Die Tötung der Versuchstiere wurde am Ende der jeweiligen Behandlungszeiträume mit 448 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (Narcofen, Hallbergmoos, Deutschland) durchgeführt. Nach Dekapitation und Auftrennung der Schädeldecke wurden die Bullae, die medio-caudal der Ohrmuschel liegen, entnommen. Anschließend müssen die in den Bullae enthaltenen Kochleae möglichst schonend präpariert werden. Dies gelang durch Eröffnung des knöchernen Labyrinths unter dem Mikroskop und eine 24-stündige Behandlung in einer Fixierlösung aus 4 % Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,1 % Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 % Pikrinsäure (Sigma Aldrich, Steinheim am Albuch, Deutschland). Die Pikrinsäure war vorher mit einem 0,1 molaren Natriumphosphatpuffer (PBS) auf einen pH-Wert von 7,20 eingestellt worden. Nach 24 Stunden ersetzte der Sörensenpuffer (0,1 M bei pH 7,40) die Fixierlösung. Der Sörensenpuffer beinhaltete Dinatriumhydrogenphosphat und KH_2PO_4 und beugte eine Überfixierung des Gewebes vor. Die anschließende Verwendung einer EDTA-Lösung sorgte für die Dekalzifikation. Die Dauer der Entkalkung belief sich bei vier Grad Celsius auf drei Wochen, wobei die EDTA-Lösung täglich erneuert werden musste. Zur Vorbereitung der Proben auf die Einbettung in Paraffin mussten sie über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % und 100 % Isopropanol) und Xylol entwässert werden. Danach konnten sie in Paraffin eingebettet werden. Unter Verwendung eines Mikrotoms (Leica RM 2165) wurden 5 μm dicke Schnitte der Kochleae erstellt. Ein 37 Grad warmes Wasserbad ermöglichte die Glättung der Schnitte. Danach wurden sie auf Glasobjektträger gezogen, sodass sich am Ende der Fixierung drei Gewebeschnitte auf einem Objektträger nebeneinander anordneten.

3.5. Immunhistochemische Aufarbeitung für die Lichtmikroskope

Zunächst wurden die Schnitte mit Hilfe von Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 % und 70 % Isopropanol) entparaffiniert. Nach fünfminütigem Verbleib in kaltem Citratpuffer (90 % Aqua dest., 8,2 % 0,1 M Natriumcitrat und 1,8 % 0,1 M Zitronensäure bei pH 6,0) folgte die Hitze-induzierte Antigendemaskierung, bei der die Gewebeschnitte 40 Minuten in heißem Citratpuffer inkubiert wurden. Die endogene Peroxidation wurde durch das Eintauchen der Objektträger für 20 Minuten in 3 % H₂O₂ gelöst in Methanol blockiert. Die anschließende Präinkubation der Präparate bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit einer Lösung aus 10 % Normalserum der Ziege und 1 % Rinderserumalbumin in Natriumphosphatpuffer (BSA 1 %/PBS) bei pH 7,20 dauerte 45 Minuten. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden ebenfalls in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um eine Vermischung der unterschiedlichen Inkubationslösungen zu vermeiden, wurden zwischen die folgenden Abläufe immer wieder Waschschrte mit einem TBS/Tween Waschpuffer bestehend aus TBS, 0,05 % Tween-20 und NaCl ~ 147 mmol (pH 7,60) geschaltet. Danach wurde der primäre monoklonale Mouse IgG2B-Antikörper: 4-HNE (R&D Systems, Catalog Number: MAB3249, Minneapolis, MN, USA) in BSA 1%/PBS im Verhältnis 1:1500 gelöst. Auf zwei von drei Gewebeschnitten eines Glasobjektträgers wurden 40 µl dieser Lösung pipettiert, wohingegen auf den dritten Schnitt kein primärer Antikörper sondern DPBS (Dulbecco-phosphate-buffered-salinesolution) gegeben wurde und der somit als Negativkontrolle diente. Die auf diese Weise inkubierten Präparate wurden über Nacht bei vier Grad Celsius gelagert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Kochleae mit einem 400 mmol TBS-Puffer gewaschen. Die Lösung des sekundären Antikörpers Polyklonal Goat-Anti-Mouse (DAKO, Nr. E0433, Hamburg, Deutschland) in BSA 1%/PBS wurde im Verhältnis 1:250 angesetzt, auf die Schnitte gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach einer erneuten Waschung mit TBS-Puffer wurde die Färbung des sekundären Antikörpers durchgeführt. Dafür wurde Streptavidin-Peroxidase (DAKO, Nr. P0397, Hamburg, Deutschland) in BSA 1%/PBS im Verhältnis 1:200 gelöst, auf die Präparate pipettiert und für 30 Minuten einwirken lassen. Eine dreiminütige Behandlung mit Substrat DAB/H₂O₂ (1,85 mM, DAKO, Hamburg, Deutschland) schloss sich an. Die Gegenfärbung mit Hämalaun, das fünf Minuten auf den Schnitten verblieb, optimierte die Darstellung und Abgrenzbarkeit der Zellen der Kochlea. Zur Dehydratation wurden die Objektträger in eine aufsteigenden

Alkoholreihe und Xylol getaucht. Abschließend wurde ein Tropfen Entellan auf die Objektträger gegeben und Deckgläser der Größe 24mm mal 50 mm darauf platziert. Das Entellan sollte den Raum zwischen den Gewebeschnitten und dem Deckglas luftblasenfrei ausfüllen.

3.6. Quantifizierung im Lichtmikroskop

Für die digitalen Aufnahmen von bestimmten Gebieten der Schnitte wurde eine CCD-Farbvideokamera (Sony 3-CCD DXC-390P), die mit einem Mikroskop (Zeiss Axiovert 200) verbunden war, benutzt. Die einzelnen Aufnahmen beinhalteten die Lateralwand mit Stria vascularis und Ligamentum spirale, das Cortische Organ, den Limbus und der im Modiolus gelegenen Spiralganglionzellen. Zusätzlich wurde die Windung, in der sich die entsprechenden Gebiete befanden, berücksichtigt. Falls sich auf Grund der Schnittebene der Kochlea im Querschnitt vier Windungen ergeben haben, wurden die dazu gehörenden Aufnahmen der dritten Windung zugerechnet. Alle Gebiete wurden mit demselben Objektiv bei 40-facher Vergrößerung und mit derselben Beleuchtung (6.0 V) fotografiert. Die entstandenen Bilder wurden zunächst als BMP-Dateien auf einem Computer gespeichert und anschließend in JPG-Dateien umgewandelt. Von den Negativkontrollen auf den Objektträgern wurden keine Bilder angefertigt.

Nun konnten die Bilder am PC mit dem Programm Photoshop Elements (Version 5.1 für Windows, Adobe System, San Jose, CA, USA) bearbeitet und analysiert werden. Die Helligkeit und der Kontrast jedes Bildes wurden mit dem Helligkeit/Kontrast-Befehl des Programms auf 20:20 festgesetzt. Zunächst wurden mit dem „Lasso“ Werkzeug sieben Regionen aus den zuvor erwähnten Gebieten der Windungen entlang ihrer histologischen Grenzen ausgeschnitten. Die Regionen waren die Stria vascularis (SV), das Spirale Ligament (SL), das Cortische Organ (CO), die Interdentalzellen (IDZ), die Limbus-Fibrozyten (LF), die Nervenfasern (NF) und die Spiralganglionzellen (SGZ). Während die ersten sechs Regionen als Einheit aus ihrem entsprechenden Bild geschnitten wurden, wurde bei den Spiralganglionzellen jede einzeln mit dem „Lasso“ Cursor umfahren und folglich ausgeschnitten. Bevor jede einzelne Region auf einer Megafile-Datei gespeichert werden konnte, wurden unter Verwendung der Histogramm-Funktion der durchschnittliche Grauwert von ihr (nachfolgend Braunwert genannt) und dessen Gesamtfläche in Pixeln ermittelt. Danach wurde sie auf das Megafile kopiert, wobei jede Megafile-Datei nur eine Art von Region enthielt, die darauf von links nach rechts

und in absteigenden Reihen angeordnet waren. Um später die Differenz zum Hintergrund berechnen zu können, wurde der durchschnittliche Grauwert des Hintergrundes an einer gewebefreien Stelle auf dem Objektträger bestimmt. Als nächstes wurden die Bereiche einer einzelnen Region einer Behandlungsgruppe definiert, in denen eine Immunreaktion (Brauntöne) identifiziert werden konnte. Dazu wurde das entsprechende Megafile aufgerufen und das Werkzeug „Zauberstab“ ausgewählt. Die Toleranz der Farbabstufungen wurde auf Stufe 8 festgesetzt. Folgend wurden alle relevanten Farbabstufungen der Brauntöne mit dem „Zauberstab“ markiert. Anschließend wurden alle als braun identifizierbaren Pixel ausgeschnitten und in einem neuen Megafile (Netto-Megafile) eingefügt. Auch im Netto-Megafile wurden der durchschnittliche Braunwert und die Gesamtfläche in Pixeln jeder der sieben Regionen ausgerechnet. Als Referenzwerte dienten exemplarische Markierungen, die bei der Bearbeitung der restlichen Megafiles als Standard festgelegt wurden.

Des Weiteren wurden Excel-Tabellen angelegt, in denen alle erzeugten Daten eingetragen wurden. Jede Region wurde in einer eigenen Excel-Tabelle dokumentiert. Außerdem wurden die Daten für weitere Berechnungen genutzt. Die Differenz aus dem durchschnittlichen Braunwert und dem durchschnittlichen Grauwert des Hintergrundes wurde gebildet (X). Um den Anteil der immunreaktiven Fläche (komplette Fläche einer Region, die sich braun darstellte) an der Gesamtfläche ermitteln zu können, wurden der Quotient aus diesen Werten gebildet und als Prozentsatz an der Gesamtfläche angegeben (Y). Die Multiplikation der Werte X und Y ergab letztlich einen Zahlenwert, der die Intensität der gefärbten Fläche widerspiegelte und in willkürlichen Einheiten (wE) definiert wurde. Die quantitative Auswertung von Bildern, die von immunhistochemisch-gefärbten Gewebeschnitten aufgenommen wurden, unter Verwendung von einem Photoshop Programm beschrieb bereits Lehr et al. (1997⁷⁰, 1999⁷¹). Das eingesetzte Verfahren der Quantifizierung wurde bereits ausführlich publiziert (Heinrich et al. 2010⁵²).

3.7. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der erhobenen Werte erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde ermittelt, ob die gesamten Werte für jede einzelne Region der Cochlea einer Normalverteilung entsprechen. Das Verteilungsmuster wurde graphisch aufgetragen und durch die Kerndichteschätzung ergänzt. Die Kerndichteschätzung ermöglicht eine konsistente Schätzung der unbekanntenen Verteilung, woraus eine stetige

graphische Darstellung generiert werden kann. Zusätzlich wurde die Schiefe für die Verteilung der Werte bestimmt. Bei einer Schiefe zwischen -1 und +1 kann von einer symmetrischen Verteilung ausgegangen werden.

Im zweiten Schritt wurden die Unterschiede der Intensität der Flächen nach immunhistochemischer Färbung zwischen den Kontrolltieren und den mit Gentamicin behandelten Tieren mit einem gemischten linearen Modell analysiert. In diesem Modell wurden die intratympanal injizierte Gentamicin-Dosis (Behandlungseffekt), die Kochleawindung (Windungseffekt) sowie die Interaktion zwischen Injektion und Kochleawindung (Behandlungs-Windungseffekt) als fixe Effekte festgelegt. Zusätzlich wurde ein zufälliger Effekt, der durch wiederholte Messungen bei jedem Versuchstier entstand, in diesem Modell miteinbezogen. Durch diese Berücksichtigung wurden adjustierte p-Werte bestimmt, die bei der Auswertung der Ergebnisse als Grundlage dienten. Da die Analyse explorativ war, wurden keine Korrekturen für multiple Vergleiche durchgeführt. Die Werte müssen als deskriptiv betrachtet werden.

Im dritten Schritt wurden die Intensitätswerte sowie ihre Standardabweichungen in Graphen dargestellt. In diesen Graphen sind die p-Werte mit einem, zwei oder drei Sternen gekennzeichnet und repräsentieren eine Signifikanz von $\leq 0,05$, $\leq 0,01$ und $\leq 0,001$. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von SAP 9.2. PROC MIXED durchgeführt.

3.8. Beschreibung der graphischen Darstellungen

Zunächst werden die Mittelwerte für jede einzelne Region bei jeder Versuchstiergruppe beschrieben. Dabei werden alle drei Kochleawindungen der Innenohre einer Gruppe als Gesamtwindungen betrachtet. Im Anschluss werden die Behandlungsunterschiede der vier Versuchstiergruppen in jeder der drei Windungen ausgewertet. Im nächsten Schritt erfolgt die Analyse der Windungen des Innenohres, wobei für jede Windung die gesamten Gruppen zusammengeführt werden. Daraufhin wird auf die Unterschiede zwischen den Windungen innerhalb der Behandlungsgruppen eingegangen. Zusätzlich kommt noch die Beschreibung der Behandlungsunterschiede bei den verschiedenen Kochleae, die innerhalb einer einzelnen Versuchstiergruppe untersucht wurden.

Des Weiteren wird die Korrelation der erhobenen Färbeintensitäten der behandelten Ohren zwischen der Stria vascularis und des Spiralen Ligaments, und zwischen den Interdentalzellen und den Fibrozyten im Limbus beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1. Immunhistochemische Lokalisation von 4-HNE in der Kochlea

In dieser Arbeit wurde die 4-HNE Bildung in sieben verschiedene Regionen der Kochlea bestimmt: Stria vascularis (SV), Spirales Ligament (SL), Cortisches Organ (CO), Nervenfasern (NF), Limbus–Fibrozyten (LF), Interdentalzellen (IDZ) und Spiralganglionzellen (SGZ). In der Übersichtsaufnahme (Abbildung 6) ist die Lage dieser Regionen innerhalb einer Windung farblich markiert dargestellt: SV → Rot, SL → Blau, CO → Lila, NF → Grün, LF → Gelb, IDZ → Türkis und SGZ → Orange. Die Regionen SV und SL bilden gemeinsam die Lateralwand. Die Regionen LF und IDZ bilden zusammen den Limbus. Unterhalb des Limbus verlaufen die NF, die die Verbindung zwischen CO und SGZ darstellen.

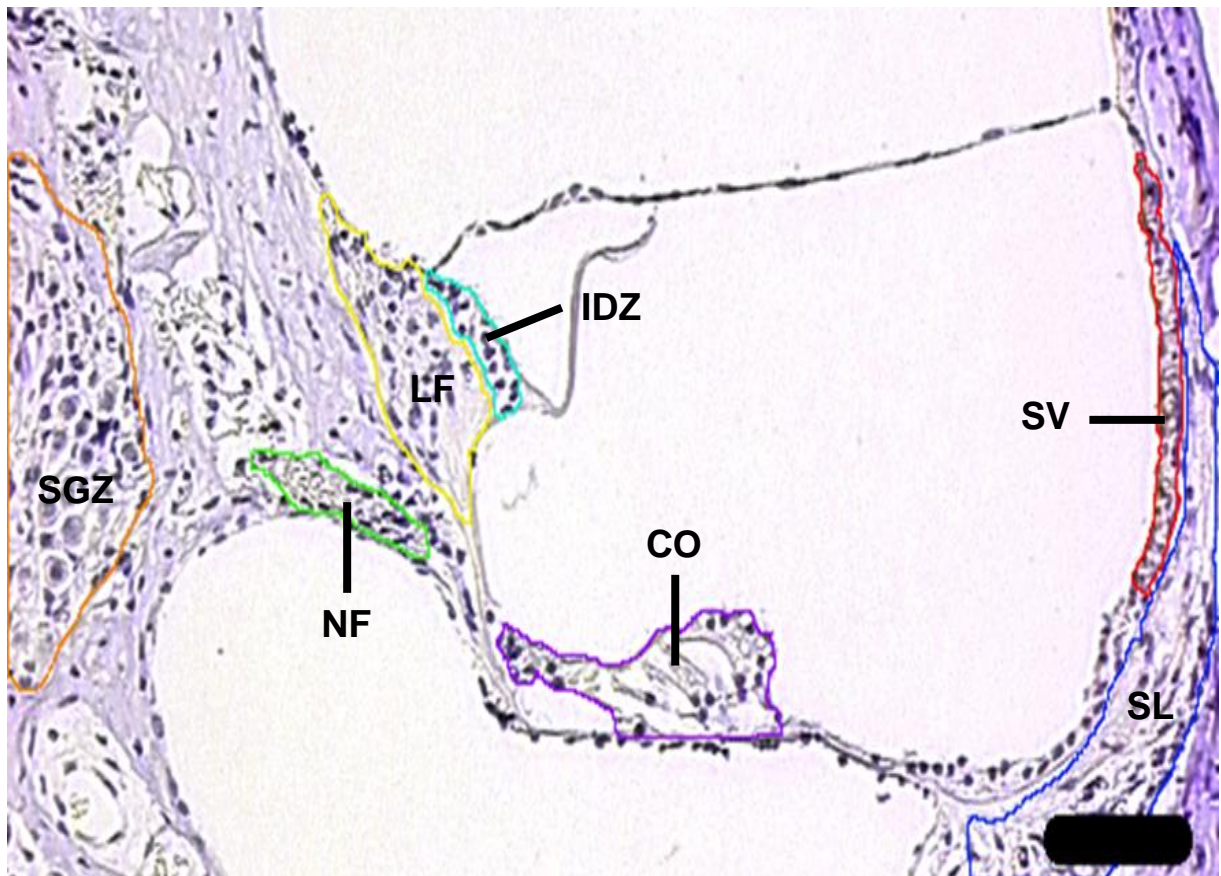


Abb. 6: Windung der Kochlea des Meerschweinchens im Querschnitt

Maßstab = 100µm

4.1.1. Lokalisation von 4-HNE in Kontrolltieren

In den Gewebeschnitten der unbehandelten Kontrolltiere (Gruppe A) konnte in keiner der sieben Regionen eine Immunreaktion für 4-HNE lichtmikroskopisch beobachtet werden (Abbildung 7).

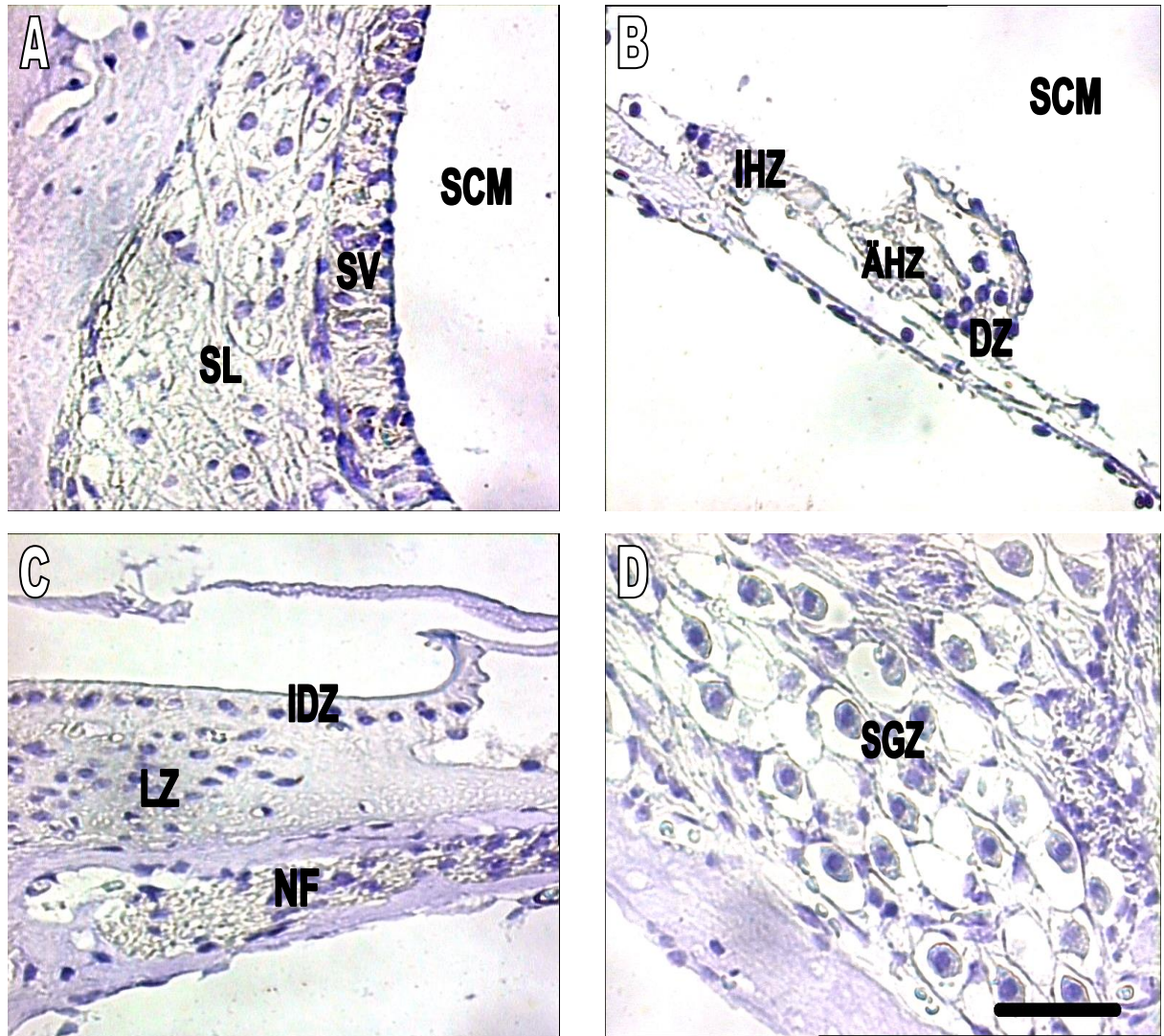


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung in verschiedenen Bereichen der Kochlea der Kontrolltiere (Gruppe A). A = Laterallwand mit Stria vascularis (SV), Spiralem Ligament (SL) und Scala media (SCM), B = Cortisches Organ mit äußeren Haarzellen (ÄHZ), inneren Haarzellen (IHZ), Deiterszellen (DZ) und Scala media (SCM), C = Limbus mit Nervenfasern (NF), Limbus-Fibrozyten (LF) und Interdentalzellen (IDZ), D = Spiralganglionzellen (SGZ).

Maßstab = 50µm

4.1.2. Lokalisation von 4-HNE nach Applikation von Gentamicin

4.1.2.1. Lateralwand

Bei allen Tieren, die Gentamicin erhalten hatten, konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine intensive Immunreaktion in der Lateralwand nachgewiesen werden (Abb. 8 B-D). Dabei färbte sich sowohl die SV als auch das SL an. Die Tiere der Gruppe B (Gentamicin über einen Tag) zeigten in beiden Strukturen eine starke Braunfärbung. Bei den Tieren der Gruppe C (Gentamicin über zwei Tage) ließ sich eine leichte Abnahme der Färbung beobachten. Am auffälligsten war die geringere Immunreaktion in der SV und im lateralen Anteil des SL im Vergleich zur Gruppe B (vergleiche Abb. 8 B mit 8 C). Die Gruppe D (Gentamicin über sieben Tage) zeigte wiederum eine sehr intensive Immunreaktivität in der kompletten Lateralwand. Im Vergleich zur Gruppe C waren keine Abstufungen des Färbeverhaltens zwischen SV und SL erkennbar. Die Intensität der Färbung zwischen Gruppe B und D hat eine ähnliche Ausprägung (vergleiche Abb. 8 B mit 8 D).

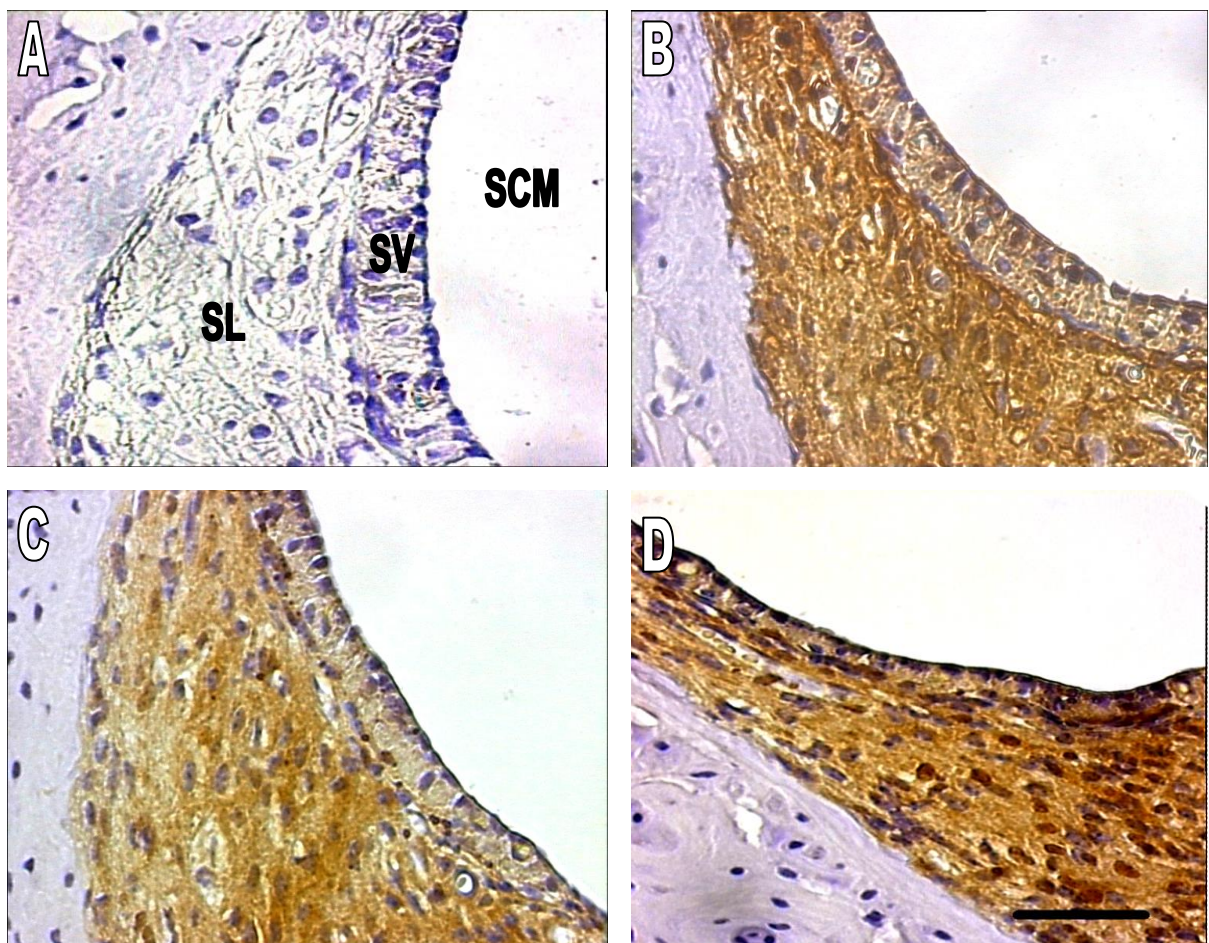


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung der Lateralwand. A = Gruppe A, B = Gruppe B, C = Gruppe C, D = Gruppe D.

Maßstab = 50µm

4.1.2.2. Cortisches Organ

Die Cortischen Organe der Gruppen B, C und D zeigten alle eine immunhistochemische Färbung (Abb. 9 B-D). Die Intensität der CO von Gruppe B und D war am höchsten und fiel vergleichbar stark aus (vergleiche Abb. 9 B mit D). Am intensivsten war das Zytoplasma der Haarzellen und der Deiter's-Zellen gefärbt. Die Immunreaktion der Gruppe C war im Vergleich zu den anderen beiden Behandlungsgruppen etwas schwächer ausgeprägt (Abb. 9 C).

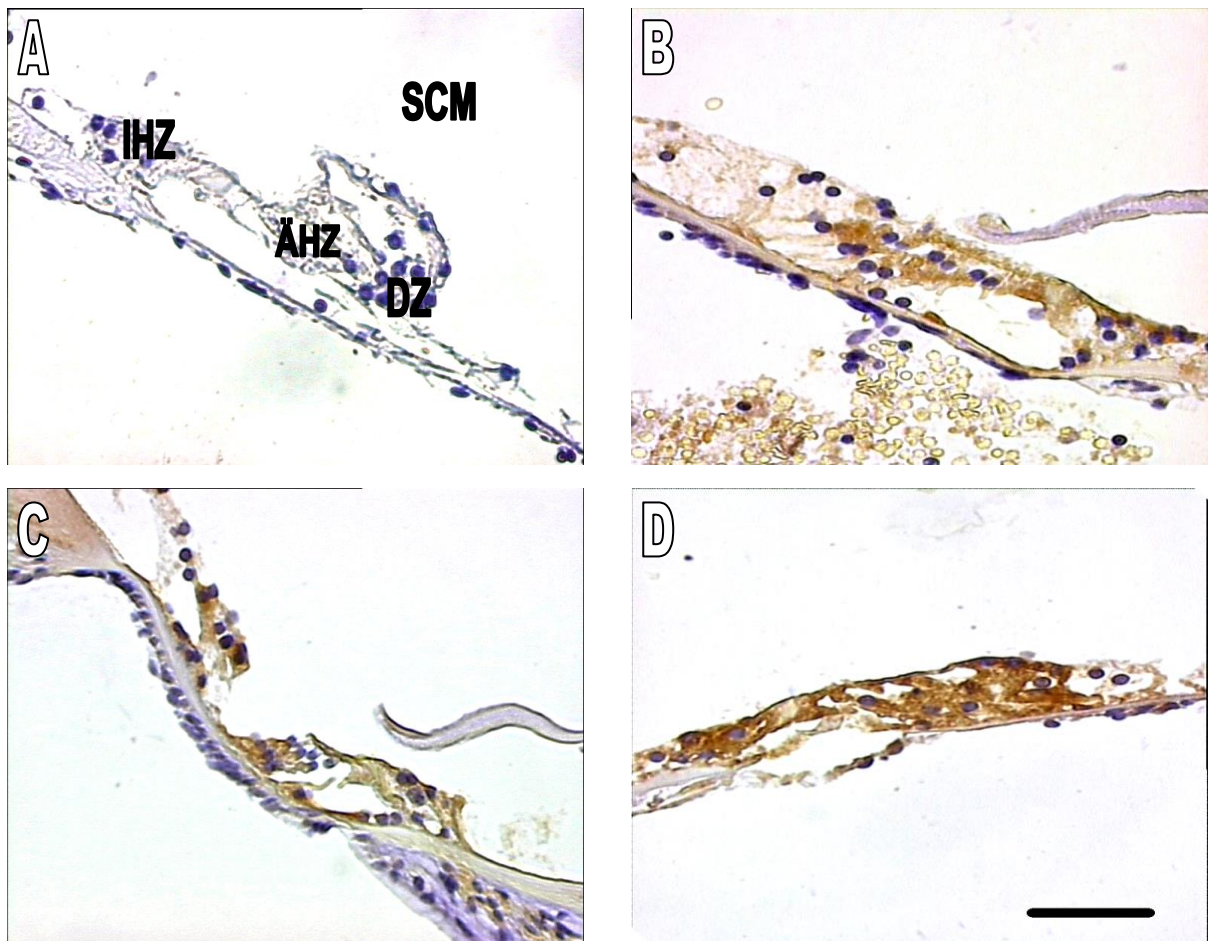


Abb. 9: Immunhistochemische Färbung des Cortischen Organs. A = Gruppe A, B = Gruppe B, C = Gruppe C, D = Gruppe D.

Maßstab = 50µm

4.1.2.3. Limbus

Der Nachweis für eine Immunreaktion im Limbus konnte ebenso erbracht werden (Abb. 10 B-D). Nach der Behandlung mit Gentamicin über einen Tag (Gruppe B) zeigte sich eine starke Immunfärbung der IDZ und der LF (Abb. 10 B).

Tiere der Gruppe C zeigten eine leicht abgeschwächte Braunfärbung im Vergleich mit Gruppe B und D (vergleiche Abb. 10 C mit 10 B und 10 D). Vor allem das Zytoplasma der IDZ wies weniger Immunreaktion auf. Die Limbus-Region der Gruppe D war sehr intensiv gefärbt und zeigte eine ähnliche Braunfärbung wie Gruppe B (vergleiche Abb. 10 D mit 10 B). Nach einer Behandlung über sieben Tage (Gruppe D) war das Zytoplasma der IDZ auch wieder intensiv gefärbt.

Als zusätzliche Region konnten auf diesen Schnitten die NF betrachtet werden. Die NF der Gruppe B waren intensiv gefärbt und zeigten auch die stärkste Braunfärbung im Vergleich mit den Gruppen C und D (vergleiche Abb. 10. B mit 10 C und 10 D). Die Immunfärbung der Gruppe C fiel schwach aus und war am niedrigsten von allen Behandlungsgruppen (Abb. 10 C). Die NF der Gruppe D waren stärker gefärbt als diejenigen der Gruppe C, erreichten aber nicht das Level der NF der Gruppe B (vergleiche Abb. 10 D mit 10 C und 10 B).

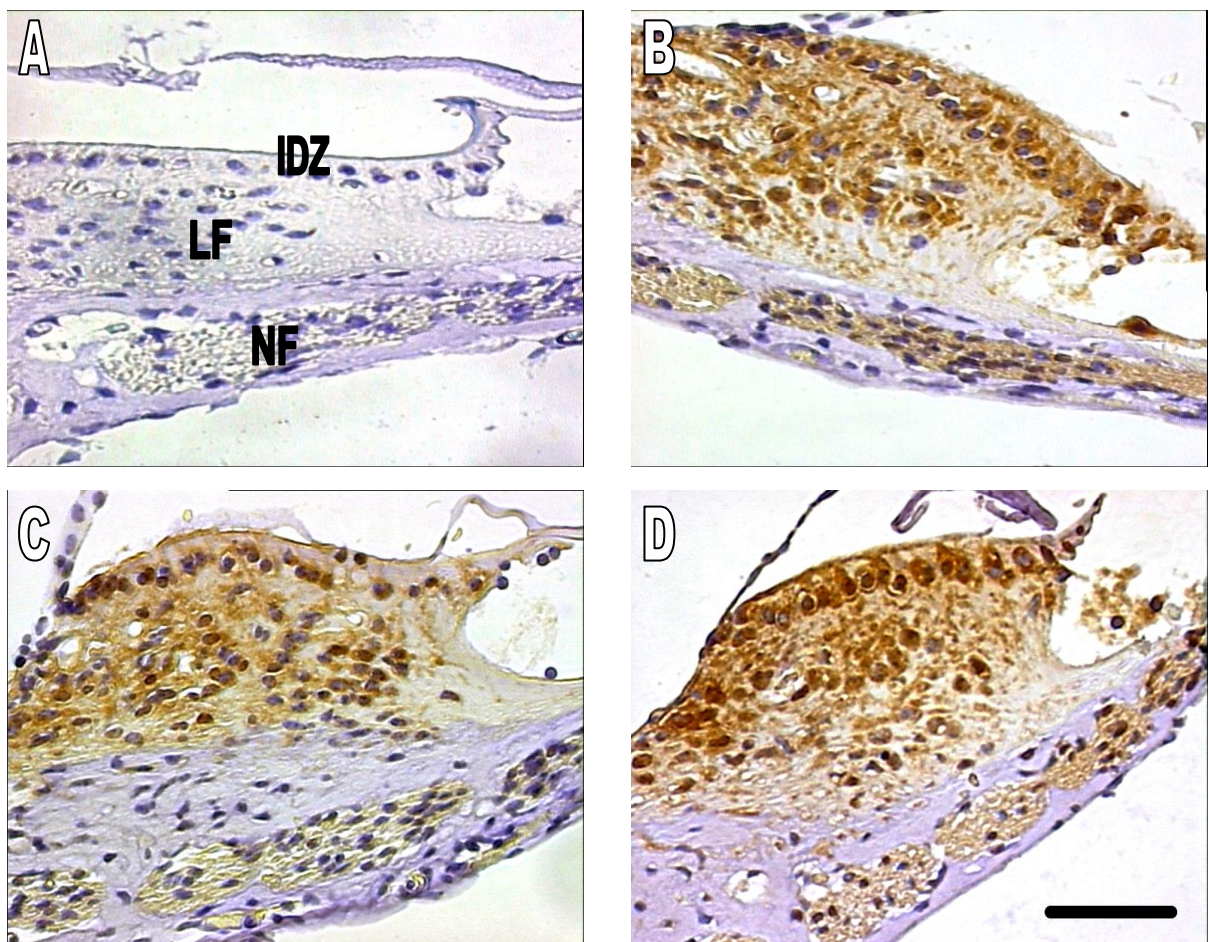


Abb. 10: Immunhistochemische Färbung des Limbus. A = Gruppe A, B = Gruppe B, C = Gruppe C, D = Gruppe D.

Maßstab = 50µm

4.1.2.4. Spiralganglionzellen

Bei den SGZ der Gruppe B war in jedem Zytoplasma eine Immunreaktion nachweisbar, wobei manche Zellen eine etwas stärkere Färbung zeigten als andere (Abb. 11 B). Die SGZ der Gruppe C zeigten die größte Variation der Braunfärbung. Einige Zellen waren relativ stark gefärbt, während in dem Zytoplasma von anderen SGZ kaum eine Färbung zu sehen war (Abb. 11 C). Das Gesamtbild dieser SGZ wies die schwächste Färbung im Vergleich zu den Schnitten der anderen Behandlungsgruppen auf (vergleiche Abb. 11 C mit 11 B und 11 D). Die intensivste Immunfärbung zeigten die SGZ der Gruppe D (Abb. 11 D). Dabei war das Zytoplasma aller SGZ nach einer siebentägigen Behandlung mit Gentamicin stark braun gefärbt.

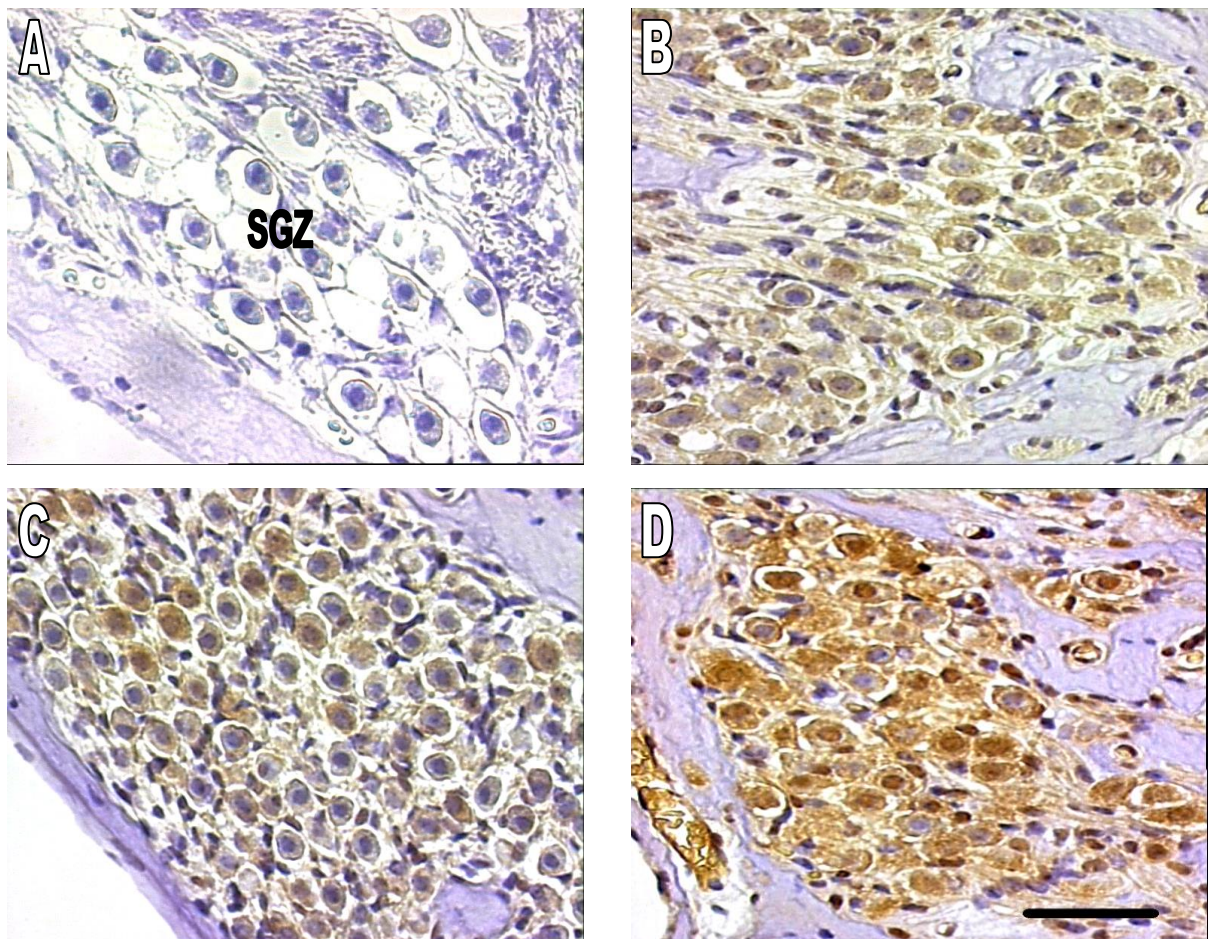


Abb. 11: Immunhistochemische Färbung der Spiralganglionzellen. A = Gruppe A, B = Gruppe B, C = Gruppe C, D = Gruppe D.

Maßstab = 50µm

4.2. Quantifizierung der Expression von 4-HNE

Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dieser Arbeit beschrieben, wobei auf die sieben zuvor erwähnten Regionen der Cochlea separat eingegangen wird.

4.2.1. Verteilung der Werte für jede Region

Bei der graphischen Darstellung des Verteilungsmusters der Werte für die Färbintensität ließ sich eine Normalverteilung für alle untersuchten Regionen beobachten (Abb. 12). In den Regionen Cortisches Organ, Stria vascularis, Spirales Ligament, Nervenfasern und Spiralganglionzellen lagen die Werte der Schiefe im Bereich zwischen -1 und +1 (Cortisches Organ = 0,1; Stria vascularis = 0,3; Spirales Ligament = 0,5; Nervenfasern = -0,8; Spiralganglionzellen = 0,6). Die Schiefe für die Region der Interdentalzellen beträgt 1,3. Für die Fibrozyten im Limbus errechnet sich eine Schiefe von 1,2.

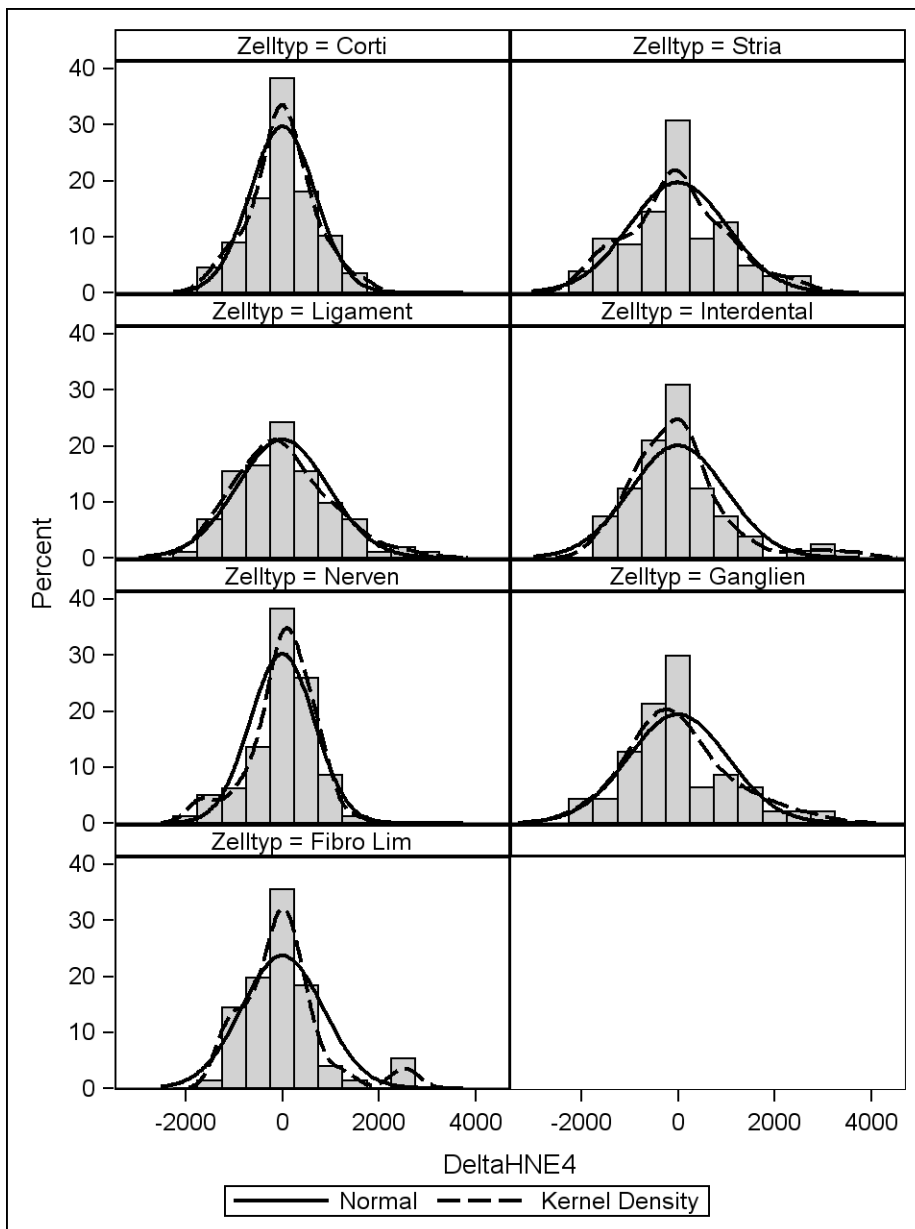


Abb. 12: Verteilung der Differenzen. Corti = Cortisches Organ, Stria = Stria vascularis, Ligament = Spirales Ligament, Interdental = Interdentalzellen, Nerven = Nervenfasern, Ganglien = Spiralganglionzellen, Fibro Lim = Fibrozyten im Limbus; Normal = Normalverteilung, Kernel Density = Kerndichteschätzung.

4.2.2. Type 3 Tests of Fixed Effects

Die Auswertung des gemischten linearen Modells in Form der Type 3 Tests of Fixed Effects zeigte für die Stria vascularis signifikante Unterschiede beim Behandlungs- ($p < 0,0001$) und beim Windungseffekt ($p = 0,01$). Für das Spirale Ligament ($p < 0,0001$), das Cortische Organ ($p < 0,0001$), die Nervenfasern ($p = 0,0005$), die Fibrozyten im Limbus ($p = 0,0222$) und die Interdentalzellen ließen sich signifikante Veränderungen beim Behandlungseffekt ermitteln.

Zelltyp: SV

Type 3 Tests of Fixed Effects

<i>Effect</i>	<i>Num DF</i>	<i>Den DF</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Behandlung</i>	3	77	16.72	<.0001***
<i>Windung</i>	2	77	4.90	0.0100**
<i>Behandlung*Windung</i>	6	77	0.37	0.8935

Zelltyp: SL

Type 3 Tests of Fixed Effects

<i>Effect</i>	<i>Num DF</i>	<i>Den DF</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Behandlung</i>	3	76	11.95	<.0001***
<i>Windung</i>	2	76	1.10	0.3380
<i>Behandlung*Windung</i>	6	76	0.20	0.9758

Zelltyp: CO

Type 3 Tests of Fixed Effects

<i>Effect</i>	<i>Num DF</i>	<i>Den DF</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Behandlung</i>	3	62	8.67	<.0001***
<i>Windung</i>	2	62	1.24	0.2976
<i>Behandlung*Windung</i>	6	62	0.74	0.6194

Zelltyp: NF

Type 3 Tests of Fixed Effects

<i>Effect</i>	<i>Num DF</i>	<i>Den DF</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Behandlung</i>	3	54	6.89	0.0005***
<i>Windung</i>	2	54	0.82	0.4453
<i>Behandlung*Windung</i>	6	54	0.11	0.9950

Zelltyp: LF

Type 3 Tests of Fixed Effects

<i>Effect</i>	<i>Num DF</i>	<i>Den DF</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Behandlung</i>	3	49	3.50	0.0222*
<i>Windung</i>	2	49	0.20	0.8226
<i>Behandlung*Windung</i>	6	49	0.07	0.9983

Zelltyp: IDZ

Type 3 Tests of Fixed Effects

<i>Effect</i>	<i>Num DF</i>	<i>Den DF</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Behandlung</i>	3	54	3.23	0.0295*
<i>Windung</i>	2	54	0.24	0.7847
<i>Behandlung*Windung</i>	6	54	0.16	0.9859

Zelltyp: SGZ

Type 3 Tests of Fixed Effects

<i>Effect</i>	<i>Num DF</i>	<i>Den DF</i>	<i>F Value</i>	<i>Pr > F</i>
<i>Behandlung</i>	3	26	2.90	0.0538
<i>Windung</i>	2	26	0.86	0.4346
<i>Behandlung*Windung</i>	5	26	0.23	0.9471

Abb. 13: Type 3 Tests of Fixed Effects. SV = Stria vascularis, SL = Spirales Ligament, CO = Cortisches Organ, NF = Nervenfasern, LF = Fibrozyten im Limbus, IDZ = Interdentalzellen, SGZ = Spiralganglionzellen. Signifikante Werte sind grau hinterlegt.

4.2.3. Stria vascularis

4.2.3.1. Vergleich der Gesamtwindungen

Beim Vergleich der 4-HNE-Expression der Gesamtwindungen für die Region der Stria vascularis (Abb. 13) ergaben sich signifikante Erhöhungen der Färbeintensität zwischen der Kontrollgruppe (Gruppe A) und der Gruppe B ($p < 0,0001$), zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe C ($p < 0,0001$), zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe D ($p < 0,0001$).

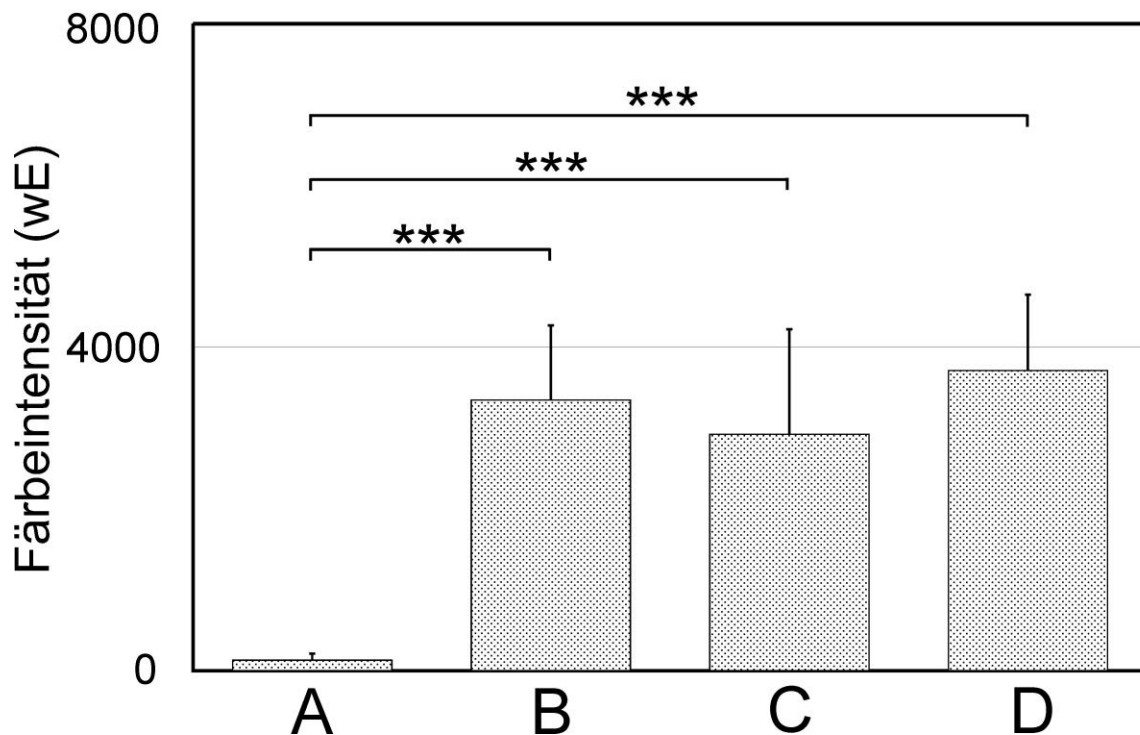


Abb. 13: Gesamtwindungen der Stria vascularis. A = Kontrollgruppe, B = Gentamicin für 1d, C = Gentamicin für 2d, D = Gentamicin für 7d.

4.2.3.2. Vergleich der Einzelwindungen

In der ersten Kochleawindung konnten signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und B ($p = 0,0055$), A und C ($p = 0,0043$) und A und D ($p = 0,0004$) festgestellt werden (Abb. 14). Innerhalb der zweiten Kochleawindung ergaben sich signifikante Anstiege von Gruppe A zu B ($p = 0,0017$), A zu C ($p = 0,0053$) und A zu D ($p < 0,0001$). Bei der Betrachtung der dritten Windung konnten signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und B ($p < 0,0001$), A und C ($p = 0,0004$) und A und D ($p < 0,0001$) ermittelt werden.

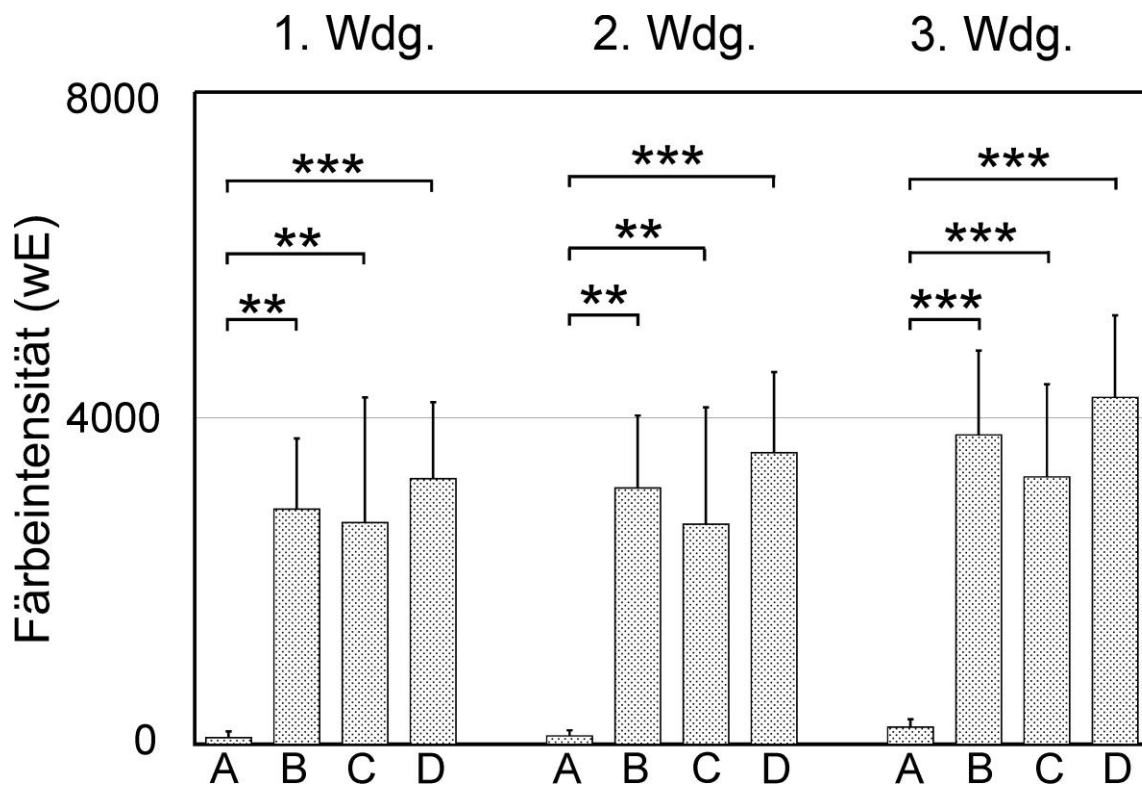


Abb. 14: Einzelwindungen der Stria vascularis

4.2.3.3. Vergleich der Gesamtgruppen

Die Braunfärbung der Gesamtgruppen (Abb. 15) zeigte einen signifikanten Anstieg von der ersten Windung zur dritten Windung ($p = 0,0104$).

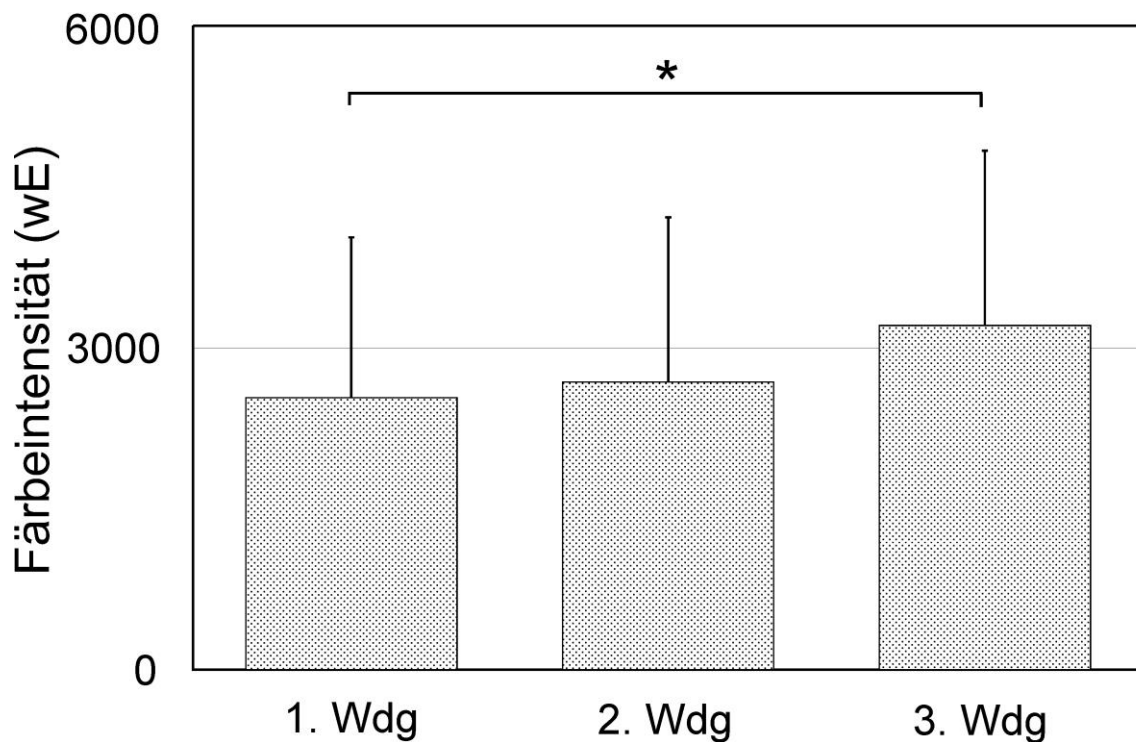


Abb. 15: Gesamtgruppen der Stria vascularis

4.2.3.4. Vergleich der Windungen untereinander

Es konnten keine signifikanten Differenzen aufgezeigt werden.

4.2.3.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen

In der Kontrolltiergruppe (Gruppe A) variierte die Färbeintensität der Stria vascularis bei den untersuchten Kochleae von 66 wE (C9307L) bis 263 wE (C9207R). Im Ganzen betrachtet war die Stärke der Braunfärbung in der Gruppe A deutlich geringer als in den Kochleae der mit Gentamicin behandelten Gruppen (B bis D).

Bei den Innenohren der Gruppe B reichte die Spannbreite der Immunreaktion von 1721 wE (C0806L) bis 4357 wE (C2706L). Sieben der acht Kochleae wiesen mehr als 2500 wE auf.

Die Kochleae der Gruppe C zeigten eine Färbung zwischen 1071 wE (C0706L) bis 5083 wE (C1506R). Acht von zwölf Kochleae lagen überhalb von 2500 wE, vier lagen darunter.

Die Immunfärbung der Innenohre der Gruppe D hatte eine Variation von 2126 wE (C0906L) bis 5054 wE (C1106R). Neun der zehn Kochleae wiesen eine Färbung auf, die über 2500 wE lag.

4.2.4. Spirales Ligament

4.2.4.1. Vergleich der Gesamtwindungen

Beim Vergleich der Gesamtwindungen (Abb. 16) ließ sich eine signifikant verstärkte Immunreaktion für 4-HNE von Gruppe A zu B ($p = 0,0001$), von Gruppe A zu C ($p = 0,0002$) und von Gruppe A zu D ($p < 0,0001$) feststellen.

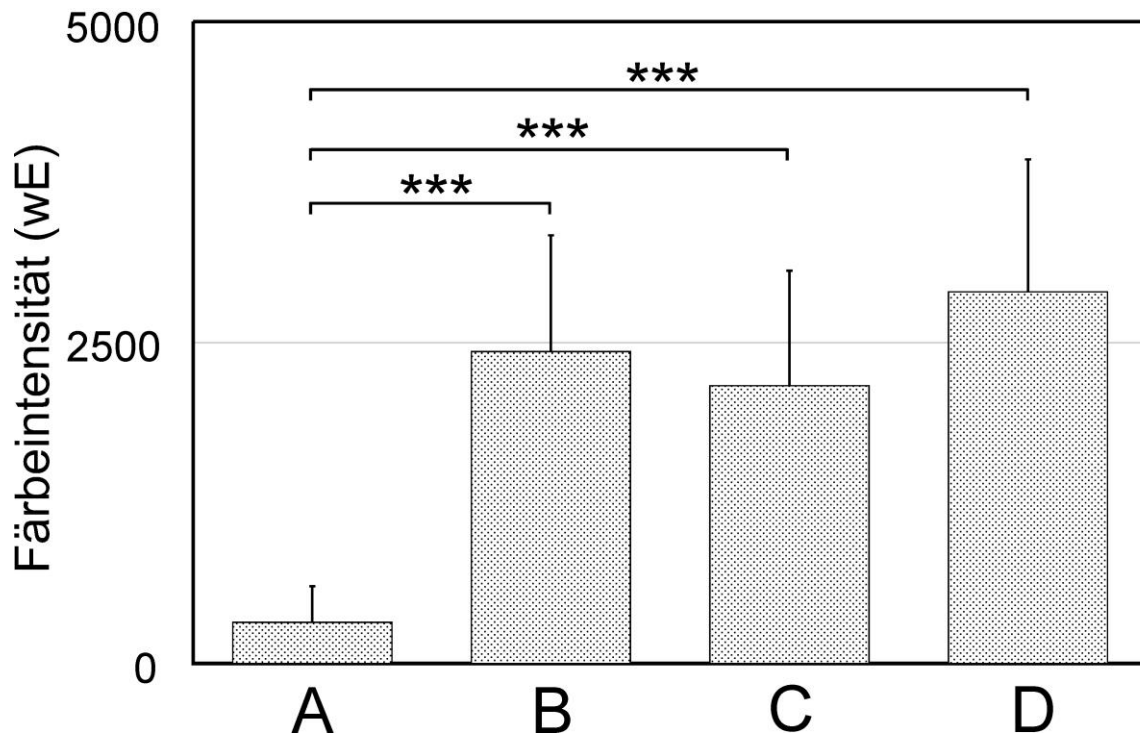


Abb. 16: Gesamtwindungen des Spiralen Ligaments. A = Kontrollgruppe, B = Gentamicin für 1d, C = Gentamicin für 2d, D = Gentamicin für 7d.

4.2.4.2. Vergleich der Einzelwindungen

Bei der Analyse der immunhistochemischen Färbung zeigte sich in der ersten Windung bezüglich Gruppe A signifikante Unterschiede zu Gruppe B ($p = 0,0279$), zu Gruppe C ($p = 0,0214$) und zu Gruppe D ($p = 0,0011$) (Abb. 17). Weiterhin konnten für die zweite Windung signifikante Unterschiede zwischen Gruppe A und B ($p = 0,0482$), A und C ($p = 0,0449$) und A und D ($p = 0,0016$) ermittelt werden. In der dritten Windung ergab sich eine signifikante Erhöhung der Immunfärbung von Gruppe A zu D ($p = 0,0140$).

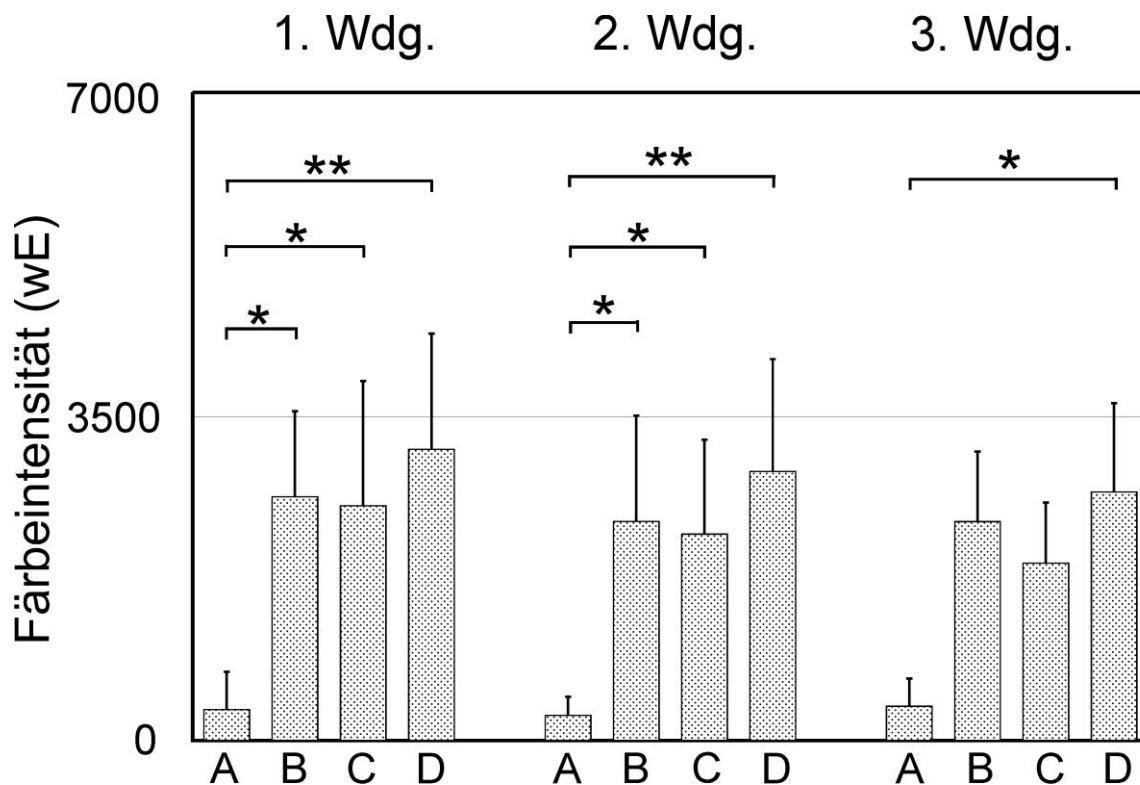


Abb. 17: Einzelwindungen des Spiralen Ligaments

4.2.4.3. Vergleich der Gesamtgruppen

Die Auswertung der Gesamtgruppen erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Windungen.

4.2.4.4. Vergleich der Windungen untereinander

Beim Vergleich der Windungen untereinander konnten keine signifikanten Differenzen aufgezeigt werden.

4.2.4.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen

In der Kontrolltiergruppe (Gruppe A) variierte die Färbeintensität des Spiralen Ligaments bei den untersuchten Kochleae von 59 wE (C9107R) bis 799 wE (C9207R). Im Ganzen betrachtet war die Stärke der Braunfärbung in der Gruppe A deutlich geringer als in den Kochleae der mit Gentamicin behandelten Gruppen (B bis D).

Bei den Innenohren der Gruppe B reichte die Spannbreite der Immunreaktion von 1368 wE (C0806L) bis 3979 wE (C0806R). Drei der acht Kochleae wiesen mehr als 2500 wE auf.

Die Kochleae der Gruppe C zeigten eine Färbung zwischen 667 wE (C0706L) bis 4162 wE (C1506R). Drei von zwölf Kochleae lagen überhalb von 2500 wE, neun lagen darunter.

Die Immunfärbung der Innenohre der Gruppe D hatte eine Variation von 1550 wE (C0906L) bis 4347 wE (C1206L). Sechs der zehn Kochleae wiesen eine Färbung auf, die über 2500 wE lag.

4.2.5. Cortisches Organ

4.2.5.1. Vergleich der Gesamtwindungen

Die Vergleiche der Gesamtwindungen (Abb. 18) ergaben eine signifikante erhöhte Braunfärbung von Gruppe A zu B ($p = 0,0036$), von Gruppe A zu C ($p = 0,0039$) und von Gruppe A zu D ($p < 0,0001$).

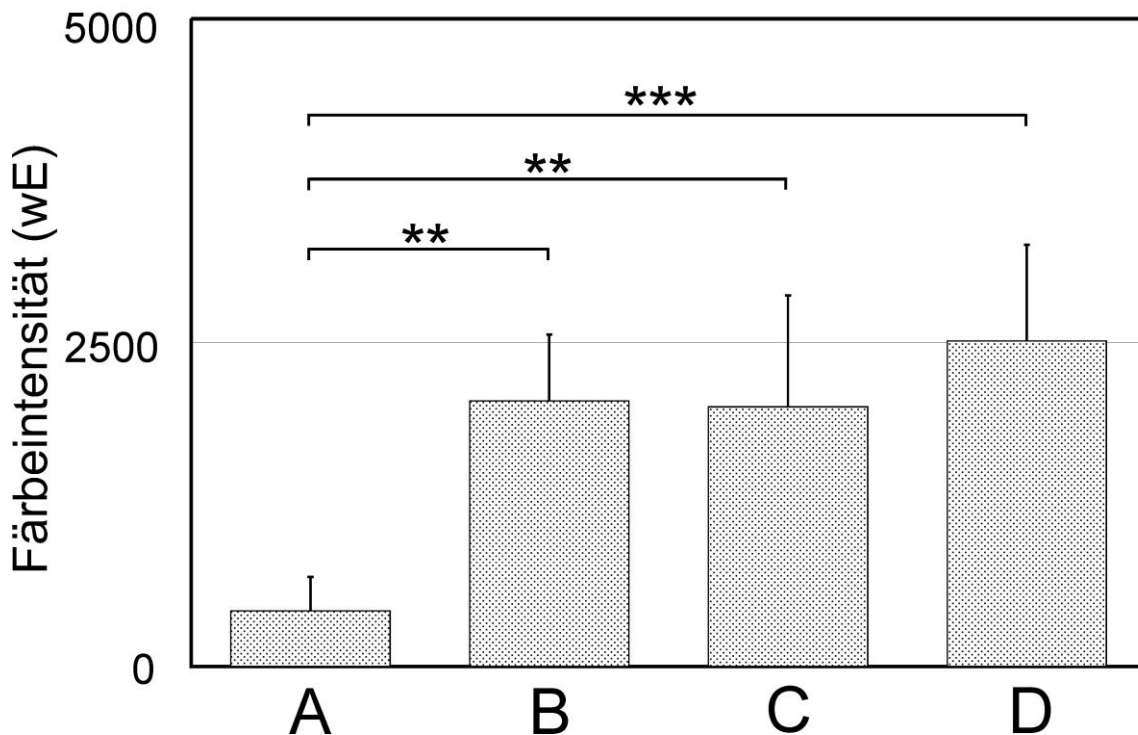


Abb. 18: Gesamtwindungen des Cortischen Organs. A = Kontrollgruppe, B = Gentamicin für 1d, C = Gentamicin für 2d, D = Gentamicin für 7d.

4.2.5.2. Vergleich der Einzelwindungen

In der ersten Windung ließ sich ein signifikanter Anstieg der Immunreaktion von Gruppe A zu Gruppe C ($p = 0,0258$) und von A zu D ($p = 0,0058$) feststellen (Abb. 19). Bei der Betrachtung der zweiten Windung ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und D ($p = 0,0013$) verzeichnen. Innerhalb der

dritten Windung ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und D ($p = 0,0222$).

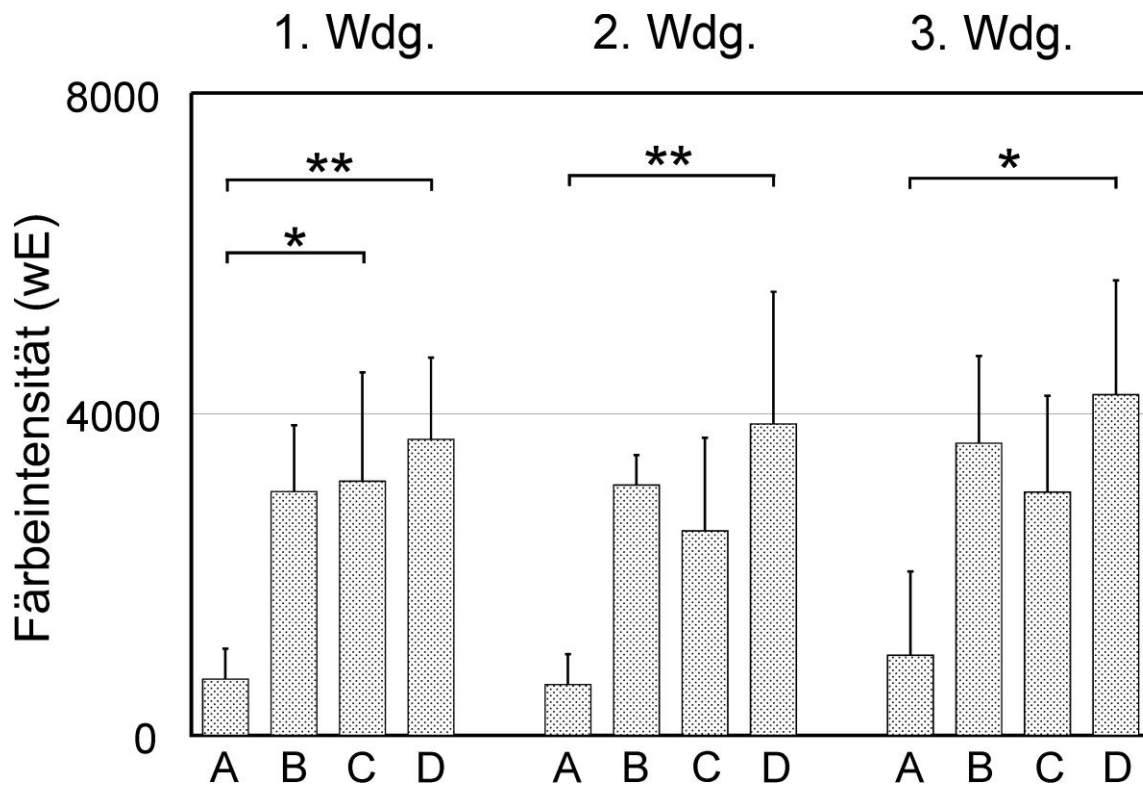


Abb. 19: Einzelwindungen des Cortischen Organs

4.2.5.3. Vergleich der Gesamtgruppen

Aus der Analyse der Gesamtgruppen resultierten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Intensität der Braunfärbung.

4.2.5.4. Vergleich der Windungen untereinander

Beim Vergleich der Windungen untereinander waren keine signifikanten Änderungen entstanden.

4.2.5.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen

In der Kontrolltiergruppe (Gruppe A) variierte die Färbeintensität des Cortischen Organs bei den untersuchten Kochleae von 140 wE (C9407L) bis 830 wE (C9207R). Im Ganzen betrachtet war die Stärke der Braunfärbung in der Gruppe A deutlich geringer als in den Kochleae der mit Gentamicin behandelten Gruppen (B bis D).

Bei den Innenohren der Gruppe B reichte die Spannbreite der Immunreaktion von 908 wE (C0806L) bis 2631 wE (C1906R). Nur eine der acht Kochleae wies mehr als 2500 wE auf.

Die Kochleae der Gruppe C zeigten eine Färbung zwischen 380 wE (C0706L) bis 3619 wE (C1506R). Zwei von zwölf Kochleae lagen überhalb von 2500 wE, zehn lagen darunter.

Die Immunfärbung der Innenohre der Gruppe D hat eine Variation von 1422 wE (C0906L) bis 3877 wE (C1106R). Fünf der zehn Kochleae wiesen eine Färbung auf, die über 2500 wE lag.

4.2.6. Nervenfasern

4.2.6.1. Vergleich der Gesamtwindungen

Beim Betrachten der graphischen Darstellung der Gesamtwindungen (Abb. 20) stellten sich die Gruppen B ($p = 0,0033$), C ($p = 0,0131$) und D ($p = 0,0004$) signifikant intensiver immungefärbt dar als Gruppe A.

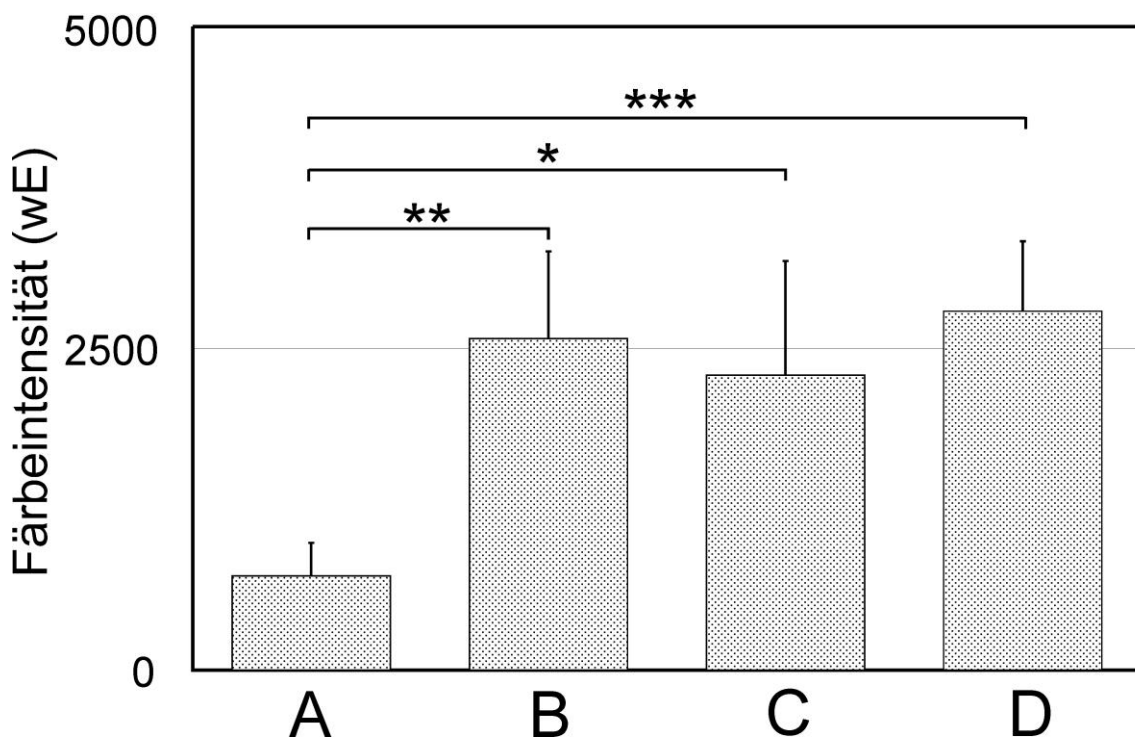


Abb. 20: Gesamtwindungen der Nervenfasern. A = Kontrollgruppe, B = Gentamicin für 1d, C = Gentamicin für 2d, D = Gentamicin für 7d.

4.2.6.2. Vergleich der Einzelwindungen

Die Immunreaktion war in der ersten Windungen von Gruppe A zu B ($p = 0,034$) und A zu D ($p = 0,0053$) signifikant angestiegen (Abb. 21). In der zweiten

Windung zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und D ($p = 0,0155$). In der dritten Windung konnten keine signifikanten Veränderungen ermittelt werden.

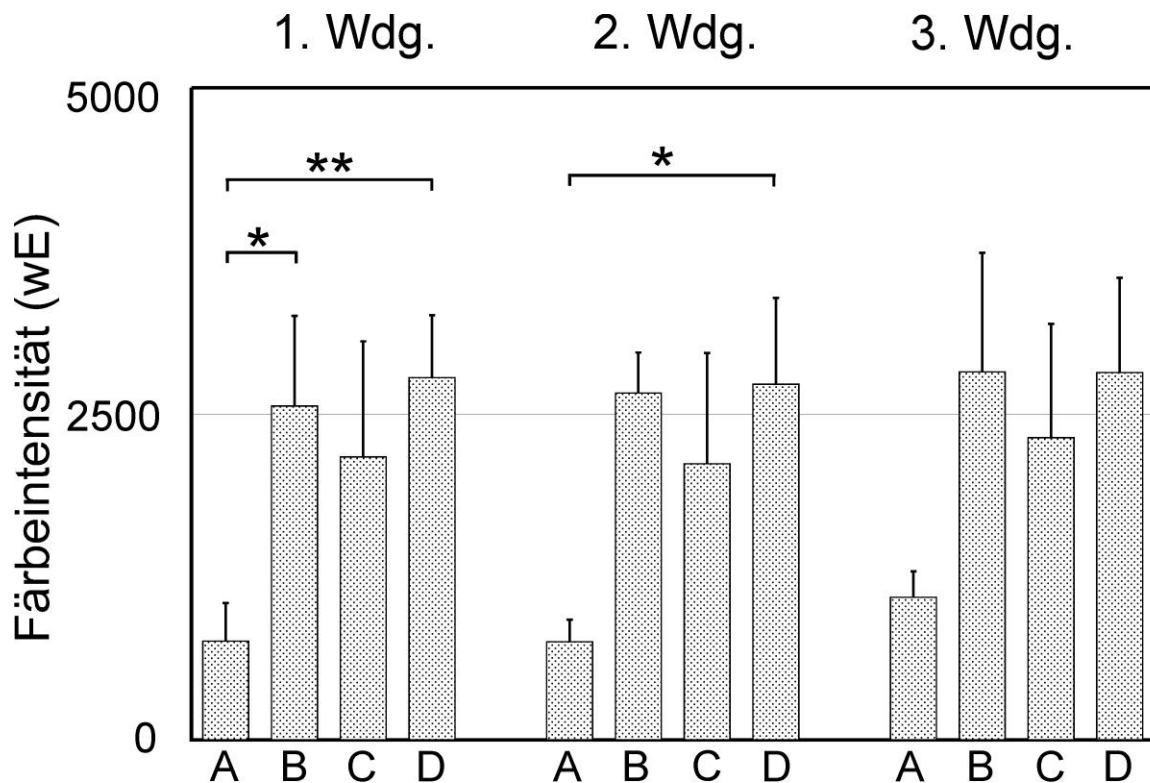


Abb. 21: Einzelwindungen der Nervenfasern

4.2.6.3. Vergleich der Gesamtgruppen

Die unterschiedlichen Braunfärbungen der Gesamtgruppen waren nicht signifikant.

4.2.6.4. Vergleich der Windungen untereinander

Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Windungen.

4.2.6.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen

In der Kontrolltiergruppe (Gruppe A) variierte die Färbeintensität der Nervenfasern bei den untersuchten Kochleae von 448 wE (C9107R) bis 1000 wE (C9207R). Im Ganzen betrachtet war die Stärke der Braunfärbung in der Gruppe A deutlich geringer als in den Kochleae der mit Gentamicin behandelten Gruppen (B bis D).

Bei den Innenohren der Gruppe B reichte die Spannbreite der Immunreaktion von 988 wE (C0806L) bis 3192 wE (C2706L). Sechs der acht Cochleae wiesen mehr als 2500 wE auf.

Die Cochleae der Gruppe C zeigten eine Färbung zwischen 536 wE (C0706L) bis 3710 wE (C1506R). Sechs von zwölf Cochleae lagen überhalb von 2500 wE, die andere Hälfte lag darunter.

Die Immunfärbung der Innenohre der Gruppe D hatte eine Variation von 1783 wE (C0906L) bis 3529 wE (C1106R). Sieben der zehn Cochleae wiesen eine Färbung auf, die über 2500 wE lag.

4.2.7. Fibrozyten im Limbus

4.2.7.1. Vergleich der Gesamtwindungen

Die Analyse der Gesamtwindungen (Abb. 22) zeigte ausschließlich einen signifikanten Anstieg der Färbintensität zwischen Gruppe A und Gruppe D ($p = 0,0134$).

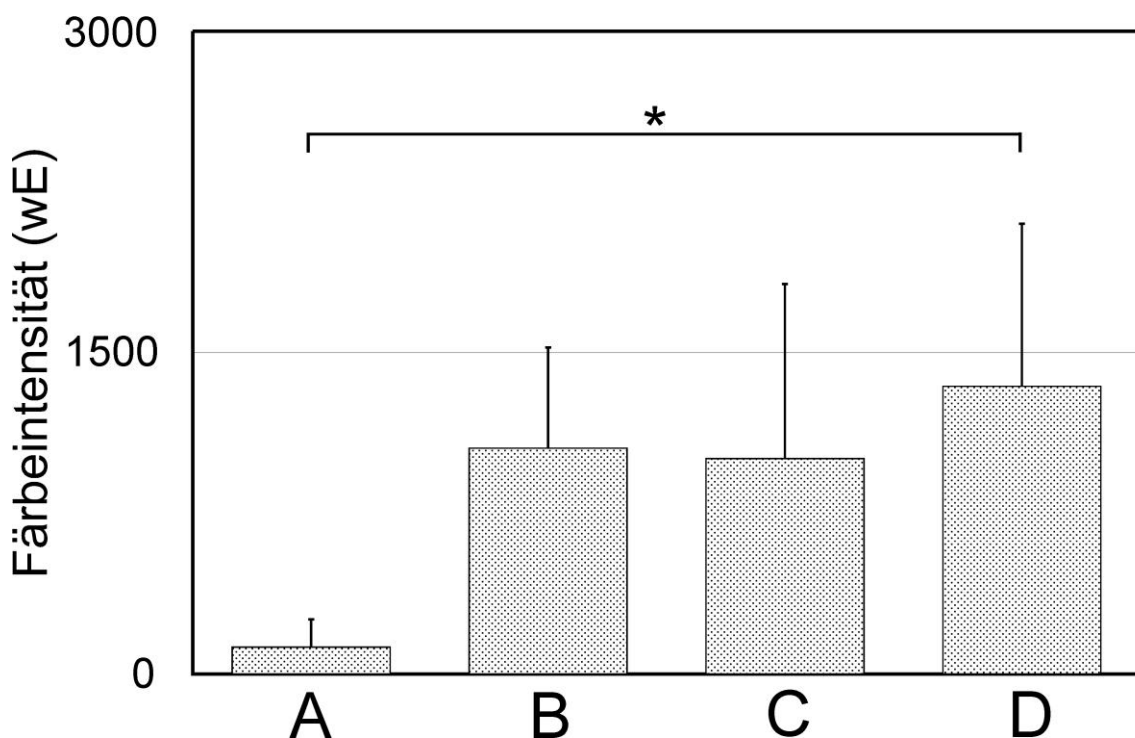


Abb. 22: Gesamtwindungen der Fibrozyten im Limbus. A = Kontrollgruppe, B = Gentamicin für 1d, C = Gentamicin für 2d, D = Gentamicin für 7d.

4.2.7.2. Vergleich der Einzelwindungen

Bei der Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

4.2.7.3. Vergleich der Gesamtgruppen

Die Auswertung ergab keine signifikanten Variationen zwischen den Gesamtgruppen.

4.2.7.4. Vergleich der Windungen untereinander

Die Betrachtung der Daten zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Immunfärbung zwischen den Windungen.

4.2.7.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen

In der Kontrolltiergruppe (Gruppe A) variierte die Färbeintensität der Fibrozyten im Limbus bei den untersuchten Kochleae von 28 wE (C9407L) bis 455 wE (C9207R). Im Ganzen betrachtet war die Stärke der Braunfärbung in der Gruppe A deutlich geringer als in den Kochleae der mit Gentamicin behandelten Gruppen (B bis D).

Bei den Innenohren der Gruppe B reichte die Spannbreite der Immunreaktion von 281 wE (C0806L) bis 2208 wE (C2706L). Alle acht Kochleae wiesen weniger als 2500 wE auf.

Die Kochleae der Gruppe C zeigten eine Färbung zwischen 27 wE (C0706L) bis 3862 wE (C1506R). Zwei von elf Kochleae lagen überhalb von 2500 wE, neun lagen darunter. Für die Kochlea C2106R konnte die Färbeintensität nicht bestimmt werden.

Die Immunfärbung der Innenohre der Gruppe D hatte eine Variation von 653 wE (C0906L) bis 4254 wE (C1106R). Eine der zehn Kochleae wies eine Färbung auf, die über 2500 wE lag.

4.2.8. Interdentalzellen

4.2.8.1. Vergleich der Gesamtwindungen

Bei der Betrachtung der Gesamtwindungen (Abb. 23) ergab sich eine signifikante Erhöhung der Brauntöne von Gruppe A zu Gruppe D ($p = 0,0213$).

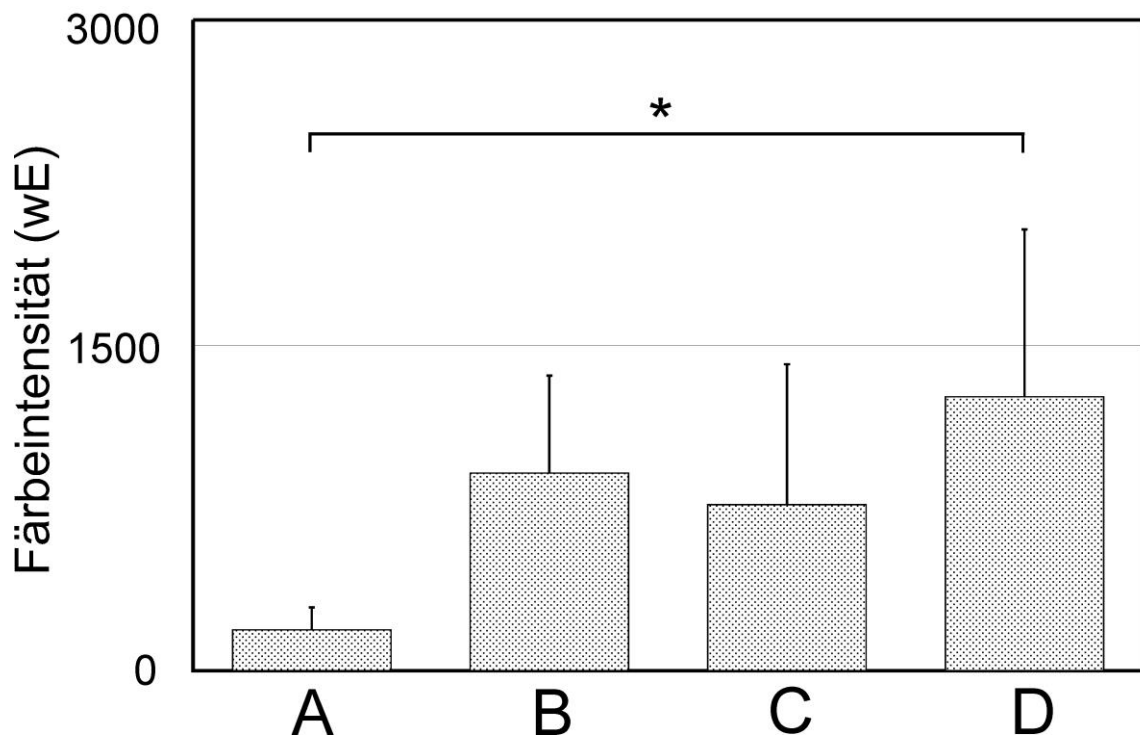


Abb. 23: Gesamtwindungen der Interdentalzellen. A = Kontrollgruppe, B = Gentamicin für 1d, C = Gentamicin für 2d, D = Gentamicin für 7d.

4.2.8.2. Vergleich der Einzelwindungen

Beim Vergleich der Gruppen innerhalb der einzelnen Windungen konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.2.8.3. Vergleich der Gesamtgruppen

Bei der Färbeintensität zwischen den Gesamtgruppen waren keine signifikanten Differenzen zu verzeichnen.

4.2.8.4. Vergleich der Windungen untereinander

Die Analyse erbrachte keine signifikanten Veränderungen der Stärke der Immunreaktion.

4.2.8.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen

In der Kontrolltiergruppe (Gruppe A) variierte die Färbeintensität der Interdentalzellen bei den untersuchten Kochleae von 77 wE (C9407L) bis 508 wE (C9207R). Im Ganzen betrachtet war die Stärke der Braunfärbung in der Gruppe A deutlich geringer als in den Kochleae der mit Gentamicin behandelten Gruppen (B bis D).

Bei den Innenohren der Gruppe B reichte die Spannbreite der Immunreaktion von 369 wE (C0806L) bis 2783 wE (C2706L). Nur eine der acht Kochleae wies mehr als 2500 wE auf.

Die Kochleae der Gruppe C zeigten eine Färbung zwischen 204 wE (C0706L) bis 3933 wE (C1506R). Zwei von zwölf Kochleae lagen überhalb von 2500 wE, zehn lagen darunter.

Die Immunfärbung der Innenohre der Gruppe D hatte eine Variation von 646 wE (C0906L) bis 5009 wE (C1106R). Vier der zehn Kochleae wiesen eine Färbung auf, die über 2500 wE lag.

4.2.9. Spiralganglionzellen

4.2.9.1. Vergleich der Gesamtwindungen

Die statistische Berechnung für die Gesamtwindungen erbrachte keine signifikanten Veränderungen für die Färbeintensität der Brauntöne.

4.2.9.2. Vergleich der Einzelwindungen

Beim Vergleich der Gruppen innerhalb der einzelnen Windungen konnten keine signifikanten Differenzen aufgezeigt werden.

4.2.9.3. Vergleich der Gesamtgruppen

Der Vergleich der Gesamtgruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Windungen.

4.2.9.4. Vergleich der Windungen untereinander

Die Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Windungen innerhalb jeder einzelnen Behandlungsgruppe.

4.2.9.5. Vergleich der Kochleae innerhalb der Versuchstiergruppen

In der Kontrolltiergruppe (Gruppe A) variierte die Färbeintensität der Spiralganglionzellen bei den untersuchten Kochleae von 81 wE (C9407L) bis 518 wE (C9207R). Im Ganzen betrachtet war die Stärke der Braunfärbung in der Gruppe A deutlich geringer als in den Kochleae der mit Gentamicin behandelten Gruppen (B bis D).

Bei den Innenohren der Gruppe B reichte die Spannbreite der Immunreaktion von 2029 wE (C2706R) bis 3468 wE (C1906R). Zwei der vier Kochleae wiesen mehr

als 2500 wE auf. In den vier anderen Kochleae waren keine Spiralganglionzellen darstellbar.

Die Kochleae der Gruppe C zeigten eine Färbung zwischen 73 wE (C0706L) bis 3138 wE (C2006R). Nur eine der fünf Kochleae lag überhalb von 2500 wE, die restlichen vier lagen darunter. In sieben weiteren Innenohren waren die Spiralganglionzellen in den Gewebeschnitten nicht vorhanden.

Die Immunfärbung der Innenohre der Gruppe D hatte eine Variation von 898 wE (C0906L) bis 5069 wE (C1106R). Drei der sieben Kochleae wiesen eine Färbung auf, die über 2500 wE lag. In drei Kochleae konnten keine Spiralganglionzellen dargestellt werden.

4.3. Korrelationen

4.3.1. Vergleich Stria vascularis vs. Spirales Ligament

Der Vergleich der Färbeintensitäten zwischen den beiden Regionen der Lateralen Wand zeigte eine Korrelation der Werte (Abb. 24). Niedrige Werte in der Stria vascularis gingen mit niedrigen Werten im Spiralen Ligament einher. Entsprechendes traf auf hohe Werte in beiden Regionen zu. Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen dabei die niedrigsten Färbeintensitäten auf. Bis auf ein Tier, das über 2d Gentamicin erhalten hatte, waren für alle anderen behandelten Tiere in beiden Regionen höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Innerhalb der elf Tiere, die die höchsten Werte der 4-HNE-Färbung zeigten (Abb. 20 rechts oben), waren drei Tiere über 1d, zwei Tiere über 2d und sechs Tiere über 7d mit Gentamicin behandelt worden.

Vergleich SV vs. SL

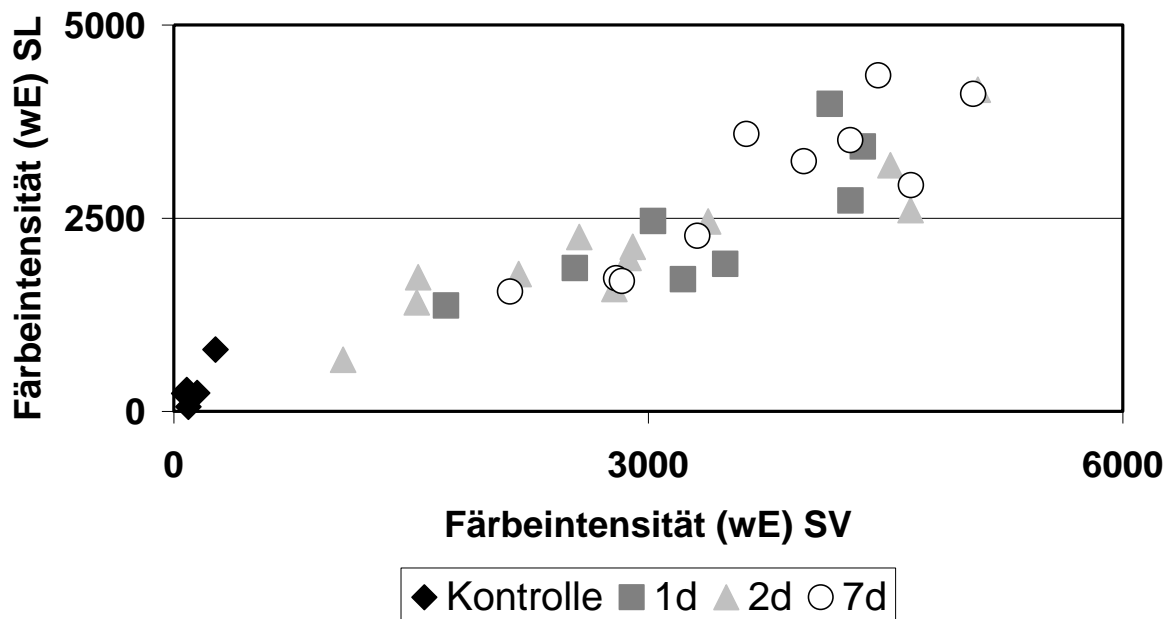


Abb. 24: Korrelation zwischen der Färbeintensität der Stria vascularis (SV) und des Spiralen Ligaments (SL).

4.3.2. Vergleich Interdentalzellen vs. Fibrozyten im Limbus

Der Vergleich der Färbeintensitäten zwischen den Interdentalzellen und den Fibrozyten im Limbus ergab eine Korrelation der Werte (Abb. 25). Niedrige Werte in den Interdentalzellen gingen mit niedrigen Werten in den Fibrozyten im Limbus einher. Entsprechendes traf auf hohe Werte in beiden Regionen zu. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigten hierbei die niedrigsten Färbeintensitäten. Drei Tiere der Behandlungsgruppen (ein Tier 1d und zwei Tiere 2d Gentamicin) erbrachten Werte, die denen der Kontrollgruppe entsprachen. Die beiden Tiere, die die höchsten Werte der 4-HNE-Färbung zeigten (Abb. 21 rechts oben), waren über 2d und 7d mit Gentamicin behandelt worden.

Vergleich IDZ vs. LF

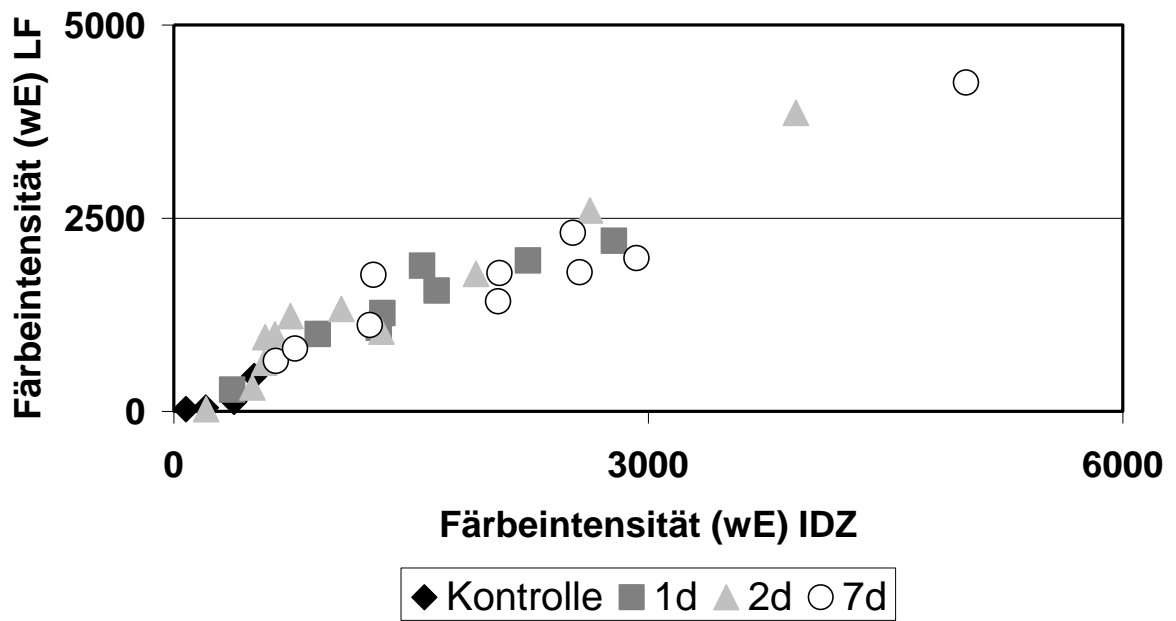


Abb. 25: Korrelation zwischen der Färbeintensität der Interdentalzellen und der Fibrozyten im Limbus.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verteilungsmuster von 4-HNE immunhistochemisch in sieben Regionen der Cochlea 1, 2 und 7 Tage nach Gentamicin-Applikation bestimmt.

Die lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte konnte eine deutlich stärkere immunhistochemische Färbung bei allen drei Gentamicin-behandelten Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen untersuchten Regionen aufzeigen. Die Beobachtung bestätigte sich zum großen Teil durch die statistische Analyse für die Gesamtwindungen. Vier der sieben Regionen zeigten einen deutlichen Anstieg der Färbeintensität beim Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den drei Behandlungsgruppen. Diese Regionen waren die Stria vascularis, das Spirale Ligament, das Cortische Organ und die Nervenfasern. Innerhalb der Interdentalzellen konnte nur zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe D (Gentamicin für 7 Tage) eine signifikante Erhöhung ermittelt werden. Genauso verhielten sich die entsprechenden Gruppen bei den Fibrozyten im Limbus, wo ebenfalls die Intensität der Brauntöne von der Kontrollgruppe zur Behandlungsgruppe D signifikant erhöht war. Lediglich bei den Spiralganglionzellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Der Vergleich der Einzelwindungen erbrachte in der ersten Windung sowohl für die Stria vascularis als auch für das Spirale Ligament signifikante Anstiege von der Kontrollgruppe zu allen mit Gentamicin-behandelten Gruppen. Im Cortischen Organ fanden sich in der gleichen Windung signifikante Erhöhungen von der Kontrollgruppe zur Behandlungsgruppe C (Gentamicin für 2 Tage) und der Behandlungsgruppe D. In den Nervenfasern zeigten sich signifikante Differenzen zwischen der unbehandelten Gruppe und der Behandlungsgruppe B (Gentamicin für 1 Tag) und D. In der zweiten Windung war in Bezug auf die Stria vascularis und das Spirale Ligament ebenfalls eine signifikant erhöhte Immunfärbung von der Kontrollgruppe zu allen behandelten Gruppen zu finden. Im Cortischen Organ und in den Nervenfasern ließen sich jeweils signifikante Anstiege zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe D verzeichnen. Innerhalb der dritten Cochleawindung wiederholte sich für die Stria vascularis das Bild der signifikanten Anstiege von der Kontrollgruppe zu allen drei Behandlungsgruppen. In derselben Windung verstärkte sich die Intensität der Immunreaktion im Spiralen Ligament und

im Cortischen Organ zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe D signifikant.

Bei der Analyse der Gesamtgruppen konnte alleinig für die Region der Stria vascularis ein signifikanter Unterschied zwischen der ersten und dritten Windung nachgewiesen werden.

Die Analyse der Immunreaktion auf 4-HNE nach intratympanaler Applikation von Gentamicin in den drei Versuchstierpopulationen (Gruppe B, C und D) zeigte in allen untersuchten Regionen ein vergleichbares Muster. Eine Zusammenfassung der Werte der drei Einzelwindungen zeigte in allen drei Gruppen (Gruppe B, C und D) eine gesteigerte Färbeintensität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe A). Die 4-HNE-Expression der Gruppe C, bei der das Gentamicin zwei Tage einwirken konnte, wies die geringste Zunahme auf. Bei den Gruppen B und D ließ sich im Vergleich zur Gruppe C eine stärkere immunreaktive Färbung in allen Regionen der Cochlea feststellen, wobei die Gruppe D (Gentamicin-Einwirkung über sieben Tage) die höchsten Werte offenbarte. Das gleiche Muster der Färbeintensität von 4-HNE war bei der Auswertung der Einzelwindungen der Behandlungsgruppen zu verzeichnen. Beim Vergleich einer Cochlea-Region derselben Einzelwindung zwischen den drei Gruppen (B, C und D) wurden bei der Gruppe C niedrigere Werte gemessen als bei den Gruppen B und D. Die Gruppen B und D zeigten eine stärkere 4-HNE-Expression, wobei in den Einzelwindungen der Cochleae, die über sieben Tage dem Gentamicin ausgesetzt waren (Gruppe D), die höchsten Werte für die Braunfärbung ermittelt wurden. Dieses Bild wiederholt sich für alle sieben untersuchten Regionen, was durch die Diagramme der Einzelwindungen veranschaulicht wird. Eine einzelne Ausnahme dieses Muster der Immunfärbung muss allerdings vermerkt werden. Die Cortischen Organe in der ersten Windung der Gruppe B wiesen zusammengenommen eine schwächere Färbeintensität auf als diejenigen der Gruppe C.

5.1. Diskussion der methodischen Ansätze

Die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Meerschweinchen wurden alle unter gleichen konstanten Bedingungen in der zentralen Versuchstieranlage der Universitätsmedizin Mainz gehalten. Um die Anzahl der Versuchstiere gemäß den gesetzlichen Bestimmungen und im ethischen Konsens möglichst gering zu halten, dienten die behandelten Meerschweinchen für verschiedene Studien unserer Arbeitsgruppe. Die in unserer Gruppe eingesetzten immunhistochemischen

Nachweisverfahren haben den Vorteil, dass von einem Innenohr bis zu 100 Semidünnschnitte angefertigt, unterschiedlich markiert und ausgewertet werden können.

Im Laufe der immunhistochemischen Färbung der Gewebeschnitte können prinzipiell einige Fehlerquellen auftreten, die aber nach unserer Laborerfahrung zu vernachlässigen sind wie eine mögliche Kontamination der verwendeten chemischen Materialien und Lösungen mit Fremdstoffen. Um die Möglichkeit der Verunreinigung zu minimieren, wurden die verwendeten chemischen Substanzen in jeder Versuchsreihe neu angesetzt wie z.B. die zur Entparaffinierung verwendete absteigende Alkoholreihe, das der Gegenfärbung dienende Hämalaun oder die zur Entwässerung benutzte aufsteigende Alkoholreihe und das Xylol.

Eine weitere potentielle Fehlerquelle, die eine Reproduzierbarkeit der Färbung der Präparate beeinflussen könnte, sind die zeitlich unterschiedlichen Versuchsansätze. Das Problem besteht in der quantitativen Begrenzung der Menge der anzufärbenden Schnitte. Sämtliche Schnitte konnten nicht zum selben Zeitpunkt mit dem Antikörper inkubiert werden. Die Färbung erfolgte daher in acht Durchgängen an je zwei aufeinander folgenden Tagen. Hier könnten äußere Einflüsse wie variierende klimatische Bedingungen im Labor u.a. eine Rolle spielen bzw. „eine unterschiedliche Tagesform des Inkubators“. Sowie Bedingungen bei der Inkubation des primären Antikörpers über Nacht und zeitliche Unterschiede zwischen den Schritten innerhalb der Immunreaktion. Durch die unterschiedliche Einwirkzeit des primären Antikörpers kann eine Variabilität in der Färbeintensität der Gewebeschnitte von Versuch zu Versuch entstehen. Um diese Variabilität möglichst gering zu halten, wurden jeweils Schnitte verschiedener Behandlungsgruppen in den acht Durchgängen angefärbt. Dadurch sollten mögliche Unterschiede in der Färbeintensität in den vier Versuchstiergruppen ausgeglichen werden.

Die Digitalisierung aller Präparate auf den Objektträgern erfolgte standardisiert, wodurch methodische Fehler nahezu minimiert werden. Sämtliche Schnitte wurden mit demselben Objektiv, bei identischer Objektivvergrößerung (40x) und bei gleicher Belichtung (6.0 V) aufgenommen. Daraufhin wurden alle entstandenen Bilder in einem einheitlichen Dateiformat gespeichert. Für die Bearbeitung der Bilder mit dem Computerprogramm Photoshop Elements wurde ebenfalls ein Standard festgelegt. Bevor die Aufnahmen mit dem Programm bearbeitet wurden, wurden die Helligkeit der Bilder auf +20 und der Kontrast auf +20 eingestellt.

Die Einzelbilder wurden in einem Megafile zusammengestellt und auf eine Hintergrundebene fixiert. Zur Markierung der immunhistochemischen Reaktionen wurde ein „Farb-Toleranzwert von 8“ am PC eingestellt. Durch diese Wahl werden vom Programm alle Töne um einen ausgewählten Braunwert miterfasst. Durch Anklicken ausgewählter Brauntöne, d.h. brauner Pixel, mit dem Tool „Zauberstab“ wurden die Farbintensitäten auf dem gesamten Megafile markiert. Diese Vorgehensweise einer Farbtonmarkierung durch denselben Operator stellt sicher, dass ähnliche Brauntöne erkannt und durch das Computerprogramm erfasst werden. Trotzdem stellt diese Vorgehensweise keine absolute Erfassung der immunhistochemischen Reaktionen dar, sondern muss als semiquantitative Auswertung eingestuft werden. Die Ergebnisse sind daher keine absoluten Werte einer Markierung bzw. geben nicht die Konzentration einer Substanz wider, sondern zeigen relative Unterschiede zwischen Behandlungen bzw. Zellpopulationen auf.

5.2. Interanimale Variabilität

5.2.1. Interanimale Variabilität innerhalb einer Tierspezies

Die interanimale Variabilität beschreibt die Reaktionsbreite innerhalb einer Tierpopulation als Antwort auf einen inherenten oder externen Stimulus. Die interanimale Variabilität ist als deutlich stärkerer Einflussfaktor anzusehen als die zuvor diskutierten methodischen Fehlerquellen.

Eine interanimale Variabilität nach Lärmexposition konnte von Bohne et al. 1999¹³ an Chinchillas beobachtet werden. In dieser Studie wurden die Tiere mit einer Frequenz von 4 kHz und einem Schalldruckpegel von 108 dB über einen Zeitraum von 1,25 Stunden beschallt. Bei den anschließenden Untersuchungen der Innenohre zeigten sich individuelle tierspezifische Unterschiede in der morphologischen Kochleaschädigung.

Eine Variation der funktionellen Kochleaschädigung innerhalb einer Rasse ist ebenso existent. Die unterschiedlich starken Veränderungen der Hörschwelle nach derselben Lärmexposition wurden für Mäuse und Meerschweinchen von Wang et al. 2002¹²⁹ beschrieben. Auch hierbei unterschied sich das Ausmaß der funktionellen Schädigung zwischen den Tieren einer Spezies.

Die unterschiedliche Anfälligkeit für Lärm innerhalb einer Rasse mag zwar partiell an der Variation der Stärke des akustischen Reflexes liegen, eher jedoch an individuellen genetischen Unterschieden innerhalb der Versuchstiergruppe (Erway et

al. 1996³³). Hierbei können das Alter der Versuchstiere und die Menge der applizierten Substanz eine Rolle spielen.

Die interanimale Variabilität lässt sich auch für die Aufnahme von Gentamicin in Zellen der Cochlea von unterschiedlich alten Mäusen zeigen (Dai et al. 2006²³). Zum Nachweis der Gentamicin-Aufnahme wurde das Aminoglykosid mit einem fluoreszierenden Stoff markiert. Dabei wurde Gentamicin in den äußeren und inneren Haarzellen von sechs Tage alten Mäusen stärker aufgenommen als in dieselben Zelltypen bei Tieren, die 21 bis 28 Tage alt waren. Die Autoren erklärten diese Beobachtung mit der Existenz einer unvollständig ausgeprägten Blut-Labyrinth Barriere in den Innenohren bei den sechs Tage alten Mäusen. Die altersspezifischen Unterschiede können demnach bezüglich des ototoxischen Ausmaßes eine entscheidende Rolle spielen.

Die interanimale Variabilität konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Als Beispiel sollen die Versuchstiere der Gruppe C dienen, die alle über zwei Tage mit Gentamicin behandelt wurden. Betrachtete man die Werte für die Stria vascularis, so umfassten sie Färbeintensitäten der 4HNE-Immunreaktion von 1071 wE bis 5083 wE. Der Mittelwert der Gesamtwindungen für diese Gruppe lag bei 2926 wE. Auch bei den anderen Behandlungsgruppen fand sich eine solche Variabilität zwischen den Tieren, wobei je nach Struktur der Cochlea die Spannbreite der Werte variierte.

5.2.2. Interanimale Variabilität zwischen verschiedenen Tierspezies

Eine ähnliche Variabilität trifft allerdings nicht nur auf Tiere derselben Rasse zu, sondern kann auch zwischen verschiedenen Spezies festgestellt werden. Bei Mäusen waren Unterschiede in den auditorischen Hirnstammpotentialen um das Fünffache geringer als bei Meerschweinchen (Wang et al. 2002¹²⁹). Diese Beobachtung wurde von den Autoren mit der größeren genetischen Homogenität innerhalb der Labormäuse (Inzuchtstamm) begründet im Vergleich zu der Meerschweinchenpopulation.

Weiterhin kann die Menge an appliziertem Aminoglykosid, die nötig ist, um bei Tieren verschiedener Spezies eine ototoxische Wirkung hervorzurufen, sehr unterschiedlich sein. Wu et al. demonstrierten 2001¹³², dass bei Mäusen höhere Dosen von Aminoglykosiden verwendet werden müssen, um eine Ototoxizität zu induzieren, als bei anderen Nagetieren. Dies wurde von den Autoren auf eine bessere pharmakokinetische Elimination dieser Antibiotikumgruppe bei Mäusen im Vergleich zu beispielsweise Meerschweinchen zurückgeführt.

5.3. Expression von 4-HNE nach Applikation von Aminoglykosiden

Die Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigte, dass unter Berücksichtigung aller Windungen ein Anstieg der 4-HNE-Expression nach lokaler Applikation von Gentamicin in allen drei Behandlungsgruppen (Gruppe B, C und D) in vier von sieben Regionen zu verzeichnen war. Diese Regionen waren die Stria vascularis, das Spirale Ligament, das Cortische Organ und die Nervenfasern. Zwei Bereiche zeichneten sich durch eine signifikante Erhöhung der Färbeintensität zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe D (Gentamicin für 7d) aus. Dies traf auf die Fibrozyten im Limbus und die Interdentalzellen zu. Für die Spiralganglionzellen ließen sich keinerlei signifikante Änderungen nachweisen.

Beim Vergleich der Gesamtgruppen zeigte sich ausschließlich für die Region der Stria vascularis eine signifikant erhöhte Färbeintensität von der ersten zur dritten Windung.

Die Tatsache, dass oxidativer Stress einen kausalen Faktor beim Aminoglykosid-induzierten Hörverlust oder bei der Ototoxizität darstellt, ist heute allgemein anerkannt (Forge und Schacht 2000⁴²). Die Aminoglykosid-vermittelte Bildung von ROS wird durch in vitro Untersuchungen gestützt, die den Nachweis für die Existenz eines Komplexes aus Gentamicin, Eisen-Ionen und Phospholipiden erbrachten (Priuska und Schacht 1995⁹³, Sha und Schacht 1999¹¹⁰). Dieser Komplex ist in der Lage durch seine charakteristische Zusammensetzung oxidative Kettenreaktionen, wie z.B. die Lipid Peroxidation, in Gang zu bringen. Außerdem wurde durch in vivo Studien zudem ein protektiver Effekt gegen die ototoxische Wirkung der Aminoglykoside durch Antioxidantien belegt, was als weiterer indirekter Beweis für eine vorausgehende Entstehung von ROS spricht (Sha und Schacht 1999¹¹¹, Wu et al. 2002¹³³).

Sha und Schacht 1999¹¹² untersuchten das Potential von unterschiedlichen Aminoglykosiden ROS sowohl zellulär als auch in einem zell-freien System zu bilden. Für den Nachweis der Entstehung von ROS in intakten Zellen wurden durch das Epstein-Barr-Virus transformierte lymphoblastoide Zellen und neutrophile Granulozyten verwendet. Jeder der beiden Zelltypen wurde in vier Lösungsansätzen mit jeweils einem von insgesamt vier Antibiotika inkubiert. Die verwendeten Aminoglykoside waren Gentamicin, Kanamycin, Neomycin und Streptomycin. Von jedem Aminoglykosid wurden 10mM in eine Lösung gegeben. Die gebildeten ROS wurden mit einem chemilumineszenten Marker (Lucigenin) nachgewiesen. Bei allen vier Aminoglykosiden war in beiden Zelltypen nach 50 min die Lumineszenz

signifikant erhöht, wobei Kanamycin und Gentamicin die höchsten Werte aufwiesen. Ein signifikanter Anstieg der Lumineszenz konnte auch in einem zell-freien nicht-enzymatischen System nach bereits 30 s nachgewiesen werden, in dem der Lösung Arachidonsäure zugesetzt wurde. Bei diesem Ansatz erbrachte Neomycin die stärkste lumineszente Reaktion vor Gentamicin und Kanamycin. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die verwendeten Aminoglykoside zur verstärkten Synthese von ROS beitragen können. Dabei scheint die Anwesenheit von Arachidonsäure eine wichtige Voraussetzung zu sein. Das Ausmaß der Lumineszenz lässt allerdings keine direkten Rückschlüsse auf das ototoxische Potential der verschiedenen Aminoglykoside zu. Inwieweit das Ausmaß der Bildung von 4-HNE durch unterschiedliche Aminoglykoside beeinflusst wird, könnte ein interessanter Gegenstand zukünftiger Forschung werden.

Die Studie von Jiang et al. 2005⁶² zeigte eine gesteigerte 4-HNE-Expression im Cortischen Organ des Innenohres nach der Gabe von einem Aminoglykosid-Antibiotikum (in dieser Studie wurde Kanamycin verwendet). Das Aminoglykosid wurde dabei zwei Mal täglich über eine Dauer von sieben Tagen subkutan gespritzt. Die Dosis betrug 700 mg Kanamycin pro kg Körpergewicht. Weitere erwähnenswerte Untersuchungen innerhalb dieser Studie waren die Erfassung der Morphologie des Cortischen Organs und die Bestimmung der auditorischen Funktion vor und nach siebentägiger Kanamycin-Behandlung. Nach dieser Zeit war eine gesteigerte immunreaktive Färbung für 4-HNE in den inneren Haarzellen, den äußeren Haarzellen und den Stützzellen nachweisbar, wobei 4-HNE ein Biomarker für die Lipid-Peroxidation ist. Die Untersuchungen dieser Forschungsgruppe unterstützen die Auffassung, dass Aminoglykoside die Bildung von ROS induzieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Nitrotyrosin, das ein Marker für Peroxynitrit (ONOO⁻) ist, nachweislich nicht erhöht war. Die histologische Analyse zeigte intakte Haarzellen nach der Antibiotika-Behandlung. Die Hörschwelle, die vor der Applikation 20 ± 4 dB betrug, war nach der Aminoglykosid-Gabe über sieben Tage nur gering heraufgesetzt auf 28 ± 6 dB. Eine funktionelle Beeinträchtigung scheint demnach in diesem Zeitraum noch nicht signifikant vorhanden zu sein.

Die Induktion der Lipid Peroxidation durch Aminoglykoside konnte auch in anderen Organsystemen aufgezeigt werden. Narayana konnte 2008⁸⁴ eine gesteigerte Lipid Peroxidation nach der Gabe von Gentamicin im Hoden von Ratten nachweisen. Das Gentamicin wurde dabei in zwei verschiedenen Mengen verabreicht. Zwei Versuchsgruppen wurden mit 3 mg pro kg Körpergewicht

behandelt und zwei weitere Gruppen wurden mit 5 mg pro kg Körpergewicht behandelt. Das Antibiotikum wurde ein Mal täglich für zehn Tage intraperitoneal injiziert. Das Resultat der Gentamicin-Behandlung war ein Dosis-abhängiger Anstieg der Konzentration von TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) am ersten Tag nach Injektion, wobei TBARS das Ausmaß der Lipid Peroxidation und des oxidativen Stress repräsentieren. Generell ging die Applikation des Aminoglykosids mit einer morphologischen und funktionellen Schädigung des Hodens einher.

Eine Studie von Parlakpinar et al. 2004⁸⁹ konnte zeigen, dass die Lipid Peroxidation wesentlicher Bestandteil der Aminoglykosid-induzierten Nephrotoxizität war. In den Versuchen dieser Studie erhielten Ratten einmalig 1,2 g pro kg Körpergewicht Amikacin, das intraperitoneal injiziert wurde. Das Ausmaß der Lipid Peroxidation erfolgte durch Bestimmung der Menge von Malondialdehyd (MDA) im Nierengewebe. MDA ist wie 4-HNE ein Produkt der Radikal-bedingten Lipid Peroxidation. Die einzelne Dosis von dem Aminoglykosid resultierte in einem akuten Schaden der Niere, der sich durch einen signifikanten Anstieg des Lipid-Peroxides MDA manifestierte. Gleichzeitig konnten schwere morphologische Schäden im Gewebe der Niere aufgezeigt werden. Pathologische Veränderungen zeigten sich im Lichtmikroskop sowohl innerhalb des Tubulussystems als auch in den Glomeruli. Im Epithel der Tubuli fanden sich Atrophien, Nekrosen und interstitielle Ödeme. Die Glomeruli waren hypozellulär und die enthaltenen Kapillaren dilatiert.

In der vorliegenden Arbeit, lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Entstehung von Produkten der Lipid Peroxidation und der Applikation eines Aminoglykosides erkennen. Diese Feststellung scheint sowohl für das Innenohr als auch für andere Organsysteme zu gelten, die Aminoglykosid-sensitiv sind. Durch welche biochemischen Mechanismen die Zwischen- und Endprodukte der Lipid Peroxidation die Homöostase der Zellen beeinflussen, wird in den nachfolgenden Kapiteln eingehender diskutiert.

5.3.1. Beeinflussung durch die Wirkdauer

Den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Gentamicin in das Innenohr und dessen Verteilung innerhalb der Kochlea nach lokaler Applikation beschrieben Imamura und Adams 2003⁶⁰. In ihren Experimenten wurde Gentamicin einmalig direkt auf das runde Fenster von Meerschweinchen gegeben. Die immunhistochemische Färbung fand mit einem monoklonalen Antikörper gegen Gentamicin statt und wurde lichtmikroskopisch erfasst. Bereits nach sechs Stunden

war in alle Regionen der Cochlea eine Immunfärbung zu erkennen. Diese Resultate zeigten, dass bereits nach wenigen Stunden eine Aufnahme von Gentamicin in sämtliche Regionen innerhalb des Labyrinths stattgefunden hatte (Laterale Wand, Cortisches Organ, Limbus, Nervenfasern und Spiralganglionzellen). Diese Färbung hielt in den meisten Zelltypen mindestens sieben Tage an, wobei in manchen Zellen noch nach sechs Monaten eine Immunreaktion nachgewiesen werden konnte (z.B.: äußere Haarzellen, Deiters Zellen oder Typ III Fibrozyten des Spiralen Ligaments). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Gentamicin sowohl in die erwähnten Zellen nach kurzer Zeitspanne aufgenommen werden kann als auch einen langen Effekt auf bestimmte Zelltypen ausüben könnte. Die Anreicherung des Antibiotikums in den Zellen ging mit einer Degeneration der Zelltypen einher. Die Resultate dieser Studie lassen sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Einklang bringen, da die Bildung von 4-HNE eine Folge der Gentamicin-Exposition ist.

Auch in dieser Arbeit war in allen Regionen eine Immunfärbung von 4-HNE nachweisbar. Die Beobachtung einer deutlichen 4-HNE-Expression bereits nach einem Tag Gentamicin-Behandlung, lässt darauf schließen, dass die Bildung von 4-HNE kurz nach der Aufnahme von Gentamicin in die verschiedenen Zellen initiiert werden muss.

Suzuki et al. stellten 2008¹²¹ den zeitlichen Bezug zwischen intratympanaler Gentamicin-Applikation und dem darauf folgenden apoptotischen Zelltod in der Cochlea des Meerschweinchens dar. Den Tieren wurde Gentamicin (40 mg/ml) direkt auf das runde Fenster sowie in das Mittelohr appliziert. Die Manifestation des Verlustes von äußeren Haarzellen begann zwölf Stunden nach Aminoglykosid-Gabe und entwickelte sich nach 24 und 48 Stunden zu einem signifikanten Schaden. Die Schädigung der inneren Haarzellen war im Vergleich mit den äußeren Haarzellen verzögert. Bei den inneren Haarzellen war ein Verlust nach 24 Stunden nachweisbar, der nach 48 Stunden signifikant wurde. Außerdem bestätigten ihre Untersuchungen, dass der Untergang von äußeren Haarzellen in den basalen Abschnitten der Cochlea beginnt und sich nach apikal fortsetzt. Zusätzlich wurden in der Studie die Veränderungen der Hörschwellen mit Hilfe von ABR bestimmt. In allen gemessenen Frequenzen war nach zwölf Stunden ein Anstieg der Hörschwelle feststellbar, d.h. eine Verschlechterung des Hörvermögens, der nach 24 Stunden noch deutlicher wurde. Aus dieser Studie lässt sich ableiten, dass es kurze Zeit nach Gentamicin-Aufnahme in die Zellen zu einer Initiation der apoptotischen Signalkaskade kommen kann, wobei die Apoptose mit einer resultierenden funktionellen Hörschädigung in

Zusammenhang gebracht werden kann. Bezieht man die vorliegende Arbeit mit ein, kann die Vermutung geäußert werden, dass 4-HNE ein wichtiger Mediator der Gentamicin-induzierten Apoptose ist. Allerdings scheint 4-HNE nicht nur in Haarzellen zelluläre Signalwege zu beeinflussen. Die 4-HNE-Expression in allen anderen Regionen der Cochlea sorgt dort vermutlich ebenfalls für biochemische Veränderungen in den unterschiedlichen Zelltypen.

5.3.2. Korrelationen der 4-HNE-Expression

In der vorliegenden Arbeit konnten Korrelationen der 4-HNE-Expression in zwei Regionen des Innenohres (Laterale Wand und Limbus) beobachtet werden. Dabei wurden alle untersuchten Tiere berücksichtigt. Die aufgetragenen Werte entsprachen der Braunfärbung der histologischen Strukturen in jeder einzelnen Cochlea. Innerhalb der Lateralen Wand wurde die Stria vascularis und das Spirale Ligament verglichen. Hierbei wurden die Färbeintensitäten der Stria vascularis auf der x-Achse und des Spiralen Ligaments auf der y-Achse aufgetragen. Die resultierende Korrelation illustriert Abb. 24.

Innerhalb des Limbus wurde der Vergleich zwischen Interdentalzellen (x-Achse) und den Fibrozyten im Limbus (y-Achse) erstellt. Die Korrelation der Färbeintensität ist in Abb. 25 dargestellt.

Die Diagramme zeigten, dass die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe die niedrigsten 4-HNE-Expressionen aufwiesen. Des Weiteren ergab sich aus den Korrelationen, dass die direkt benachbarten Strukturen eine ähnliche Ausprägung der 4-HNE-Bildung hatten. Die Färbeintensität in einer Struktur entsprach im selben Tier annähernd der Färbeintensität in der angrenzenden Struktur. In Bezug auf die Tiere der verschiedenen Behandlungsgruppen unterschied sich lediglich das Niveau auf dem 4-HNE exprimiert wurde. Einen stetigen Anstieg der Niveaus, je länger das Gentamicin einwirken konnte, war allerdings nicht zu beobachten. Beim Vergleich der beiden Korrelations-Diagramme miteinander, zeigten sich in der Lateralen Wand insgesamt höhere Werte für die Intensität der Immunfärbung als im Limbus. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Stria vascularis und das Spirale Ligament stärker von dem entstehenden 4-HNE-Molekül betroffen waren.

Die Beobachtung der korrelierenden Expressionen eines Moleküls in zwei unterschiedlichen Regionen des Innenohres bei Meerschweinchen wurde von Helling et al. 2011⁵³ gemacht. In ihren Untersuchungen wurde Gentamicin intratympanal verabreicht. Nach sieben Tagen wurden die Cochlea der Tiere entnommen und die

Konzentration von NO_2^- in der Lateralen Wand und des Cortischen Organs per Chemilumineszenz bestimmt. Der Gehalt an NO_2^- in beiden Regionen wurde in einem Korrelations-Diagramm dargestellt. Dabei zeigten drei von sieben Tieren niedrige Konzentrationen in beiden Regionen der Kochlea, wohingegen in drei anderen Tieren die Konzentrationen erhöht waren. Nur bei einem Tier ging ein niedriger Gehalt an NO_2^- im Cortischen Organ mit einem hohen Gehalt in der Lateralen Wand einher. Zusätzlich konnte aufgezeigt werden, dass alle Tiere, deren Kochleae bei der Präparation mit Doxycyclin behandelt wurden, reduzierte Werte von NO_2^- hatten. Diese Ergebnisse ließen die Autoren vermuten, dass die Tiere in unterschiedlichem Ausmaß nach einer Gentamicin-Applikation NO_2^- produzieren. Dabei zeigten alle Tiere in beiden Regionen entweder hohe oder niedrige Werte des Moleküls.

Diese Beobachtungen lassen sich mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit vereinbaren. Die Tiere scheinen in unterschiedlicher Ausprägung auf eine Gentamicin-Applikation mit einer 4-HNE-Produktion zu reagieren, wobei auch hier die Konzentrationen in den benachbarten Strukturen korrelieren. Die Einwirkdauer des Aminoglykosids ist dabei scheinbar kein entscheidender Faktor. Nur in der Lateralen Wand waren sechs der elf höchsten 4-HNE-Werte in Tieren zu finden, die über 7d mit Gentamicin behandelt wurden. Dieser angedeutete Trend ließ sich im Limbus nicht beobachten. Ob sich der 4-HNE-Gehalt nach der Gabe eines Medikaments oder eines antioxidativen Mittels vermindern würde, könnte Gegenstand kommender Untersuchungen werden.

5.3.3. Genomische Wirkungen

In den letzten Jahren hat sich die Ansicht etabliert, dass 4-HNE eine wichtige Rolle in der Regulation von zellulären Signalkaskaden spielt. Eine bedeutende Funktion, die in der Fachliteratur aktuell intensiv behandelt wird, ist die Vermittlung des Signals für den programmierten Zelltod. In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, dass 4-HNE zur Apoptose führen kann, entweder über einen membranständigen Rezeptor, was den extrinsischen Signalweg darstellt oder über intrazelluläre Signalmoleküle, was die intrinsische Signalkaskade aktiviert (Awasthi et al. 2008¹, Danial und Korsmeyer 2004²⁴).

Zu Beginn des extrinsischen Signalweges bindet 4-HNE an der extrazellulären Seite eines Todesrezeptors, dem Fas-Rezeptor, wodurch dieser aktiviert wird (Awasthi et al. 2008¹, Li et al. 2006⁷³). Der Fas-Rezeptor gehört zur Superfamilie der

Tumor Nekrose Faktor-Rezeptoren (TNFR). Das sich anschließende Signal wird durch den zytoplasmatischen Teil des Todesrezeptors vermittelt. Der aktivierte Fas-Rezeptor schaltet intrazelluläre Kinasen, wie die JNK, an. Die JNK sorgt für die Aktivierung der Caspase 3, das ein zentrales Enzym der Apoptose-Induktion ist (Abb. 26).

Neben diesem extrinsischen Signalweg, beteiligt sich 4-HNE am p53-abhängigen intrinsischen Signalweg (Sharma et al. 2008¹¹⁴). Die intrazelluläre Akkumulation von 4-HNE führt hierbei zur Phosphorylierung von p53. p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in inaktiver Form im Zytoplasma vorkommt. Sobald p53 phosphoryliert wird, erfolgt die Translokation in den Zellkern, wo der Transkriptionsfaktor an die DNA bindet und bestimmte Gene aktiviert, auch solche die zur Apoptose beitragen. Die Expression des p21-Gens führt zum Arrest des Zellzyklus (Abb. 26). Die Expression des Bax-Gens resultiert in der Aktivierung der Caspase 3, die mit der Ausführung des programmierten Zelltods beginnt (Sharma et al. 2008¹¹⁴).

Weitere Studien konnten nachweisen, dass 4-HNE auch noch mit anderen Rezeptoren in der Zellmembran interagieren kann. Eine wichtige Gruppe ist beispielsweise die Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (TKR), wozu die Gruppe der Wachstumsfaktor-Rezeptoren zählt. Escargueil-Blanc et al. beschrieben 2001³⁴ das 4-HNE die Fähigkeit hat mit dem platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) stabile Verbindungen einzugehen. In ihren Versuchen wurde 4-HNE durch die Oxidation von LDLs (low-density lipid particles) erzeugt und anschließend wurden glatte Muskelzellen aus Arterien des Hasen dem 4-HNE ausgesetzt. Darauf folgte die Formation eines 4-HNE-PDGFR β Komplexes und die Aktivierung des Rezeptors. Mit einem ähnlichen Versuchsansatz konnten Vacaresse et al 2001¹²⁵ eine Interaktion von 4-HNE mit dem epidermal growth factor receptor (EGFR) nachweisen. Auch hierbei wurde 4-HNE durch die Oxidation von LDLs produziert und glatten Muskelzellen aus Arterien zugeführt. Anschließend kam es zur Bindung von 4-HNE an dem EGFR und zu dessen Aktivierung. Welche Signalkaskaden durch diese Prozesse moduliert werden und welche Auswirkungen sie auf die Homöostase der Zellen haben, ist zurzeit noch unbekannt.

Die Wirkung von 4-HNE führt allerdings nicht zwangsläufig zur Destruktion der Zelle. 4-HNE beeinflusst ebenfalls Signalwege, die einen protektiven Effekt auf die Zelle haben. So konnten Jiang et al. 2005⁶² zeigen, dass die Applikation von einem Aminoglykosid (Kanamycin) den NF- κ B Signalweg in sensorischen Zellen des

Cortischen Organs aktiviert. Da diese Beobachtung mit der Bildung von 4-HNE assoziiert war, kann man vermuten, dass 4-HNE an der Modulation des NF- κ B Signals beteiligt war. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die NF- κ B Signalkaskade durch die Kanamycin-Behandlung in denjenigen Zellen aktiviert wurde, die die Behandlung überlebten. Diese Zelltypen, bei denen NF- κ B vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert wurde, waren die inneren Haarzellen und die Stützzellen. Im Gegensatz dazu fand in den äußeren Haarzellen keine Translokation des NF- κ B in den Zellkern statt, sodass aus dieser Beobachtung die Ursache für den Untergang der äußeren Haarzellen abgeleitet wurde.

Einen möglichen Mechanismus für das Fehlen der NF- κ B Translokation präsentierten Ji et al. 2001⁶¹. In unstimulierten Zellen, ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B im Zytoplasma an sein inhibitorisches Protein, dem I κ B α gebunden. Ein entsprechender Stimulus inaktiviert das I κ B α durch Phosphorylierung und anschließenden proteolytischen Abbau des inhibitorischen Proteins. Das NF- κ B ist daraufhin in der Lage, in den Zellkern zu gelangen und die Gen-Expression zu verändern. In der erwähnten Studie konnte aufgezeigt werden, dass 4-HNE die I κ B-Kinase inhibiert, wodurch die Phosphorylierung von I κ B α blockiert wird. Im unphosphorylierten Zustand bleibt NF- κ B mit seinem Inhibitor verbunden und kann keinen Einfluss auf die Expression der Gene nehmen. Obwohl dieser Mechanismus in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms und des Lungenkarzinoms nachgewiesen wurde, könnte er auch die fehlende Translokation in den äußeren Haarzellen des Cortischen Organs erklären.

Ein weiterer 4-HNE induzierter Signalweg, der dem programmierten Zelltod entgegenwirkt, geht von einem im Zellkern befindlichen death-associated protein (Daxx) aus. Sharma et al. 2008¹¹⁴ wiesen nach, dass moderate Konzentrationen von 4-HNE die Translokation von Daxx aus dem Zellkern ins Zytoplasma initiieren können. Im Folgenden bindet Daxx an den Fas-Rezeptor, inhibiert ihn und blockiert damit das apoptotische Signal (Abb. 26). Diese Signalkaskade könnte besonders für Zellen von Bedeutung sein, die sich in unmittelbarer Umgebung einer 4-HNE produzierenden Zelle befinden. Mit Hilfe der Daxx-Hemmung von Fas können sie die proapoptischen Einflüssen kontrollieren oder einschränken, wodurch ein zellübergreifender Untergang des Gewebes zunächst verhindert wird.

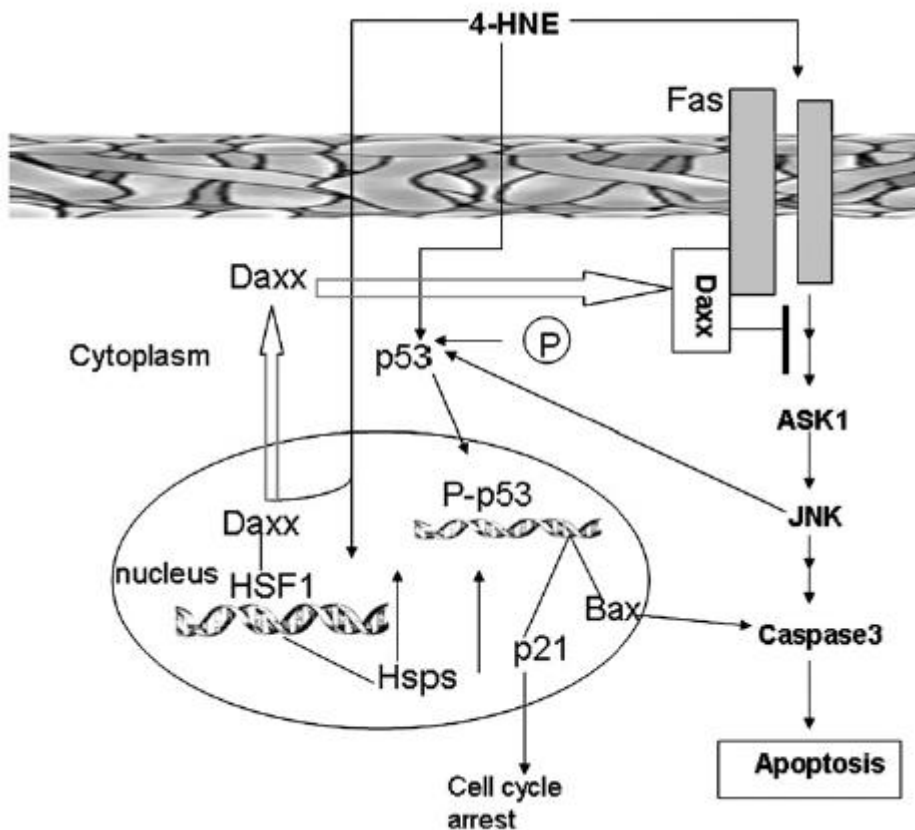


Abb. 26: Induktion und Inhibition der Apoptose durch 4-HNE. (Awasthi et al. 2008¹).

Hinzu kommt noch ein möglicher Einfluss von 4-HNE auf den Glutathion-Stoffwechsel. Glutathion ist ein wichtiges zellschützendes Agens, das ROS, wie beispielsweise OH^\cdot oder ONOO^- , binden und somit unschädlich machen kann (Evans und Halliwell 1999³⁷). Im Hinblick auf seine schützende Wirkung könnte es bei einer Gentamicin-Applikation die Zelle vor einer 4-HNE-Schädigung zu schützen. Nach einem vorübergehenden Abfall von GSH durch 4-HNE kommt es zu einer gesteigerten Synthese von GSH durch eine Induktion der Glutamat Cystein Ligase (GCL), die den ersten Schritt der de novo Synthese von GSH katalysiert (Forman et al. 2003⁴³). Die GSH-Menge in der Zelle steigt und es kann wieder mehr 4-HNE abgefangen werden. Der zeitliche Ablauf einer initialen Verminderung der GSH-Menge mit anschließender verstärkter Neubildung des Antioxidans könnte auch den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegen.

Die Schwankungen des GSH-Spiegels könnten erklären, warum die Immunfärbung der Gruppe B (ein Tag Gentamicin-Behandlung) sowohl in den Gesamtwindungen als auch in den Einzelwindungen stärker ausfiel als bei der Gruppe C (zwei Tage Gentamicin-Behandlung). Die verzögerte GSH-Synthese

könnte die geringere Immunfärbung auf 4-HNE nach zweitägiger Gentamicin-Applikation begründen.

4-HNE beeinflusst allerdings nicht nur die Menge von GSH, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von Glutathion S-Transferase (GST). GST ist ein antioxidativ wirkendes Enzym, das durch oxidativen Stress entstandene Moleküle mit GSH verbindet und diese somit unschädlich macht. GSTA4 stellt eine Isoform des GST dar, die die höchste Affinität für eine Konjugation von GSH mit 4-HNE hat. Tjalkens et al. konnten 1998¹²³ eine Induktion der Gen-Expression von GSTA4 durch 4-HNE an Zellkulturen nachweisen. In ihren Versuchen konnte die Forschungsgruppe zeigen, dass 4-HNE die Transkription des GSTA4-Gens in Hepatom-Zellen induziert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass durch die Gen-Expression mehr GSTA4-mRNA entsteht und die Menge von GSTA4-Protein in dem Gewebe ansteigt. Letzten Endes resultiert dieser Signalweg in einer signifikanten Steigerung der GSTA4-Aktivität, durch die mehr 4-HNE eliminiert werden kann.

Betrachtet man die Gesamtheit der genomischen Wirkungen von 4-HNE, so stehen die destruktiven Signale den protektiven Signalen gegenüber. Zusammengefasst geht man zurzeit davon aus, dass bei subtoxischen Konzentrationen von 4-HNE die protektiven Eigenschaften überwiegen. Sie helfen bei der Minimierung der potentiellen Zellschädigung durch das gebildete Aldehyd. Sollte 4-HNE allerdings einen gewissen Spiegel erreichen, überwiegt der apoptotische Signalweg und es wirkt zytotoxisch.

5.3.4. Nichtgenomische Wirkungen

Neben seinen verschiedenen Effekten auf die Expression von bestimmten Genen hat 4-HNE auch einige nichtgenomische Wirkungen. Es kann die Vermutung geäußert werden, dass die nichtgenomischen Wirkungen generell schneller eintreten als die genomischen Wirkungen, da eine Veränderung der Gen-Aktivität in der Regel mit einem zeitlich verzögerten Effekt verbunden ist.

In einer Studie von Siems et al. 1996¹¹⁵ konnte in Enzym-haltigen Lösungen des zerebralen Kortex des Schweins aufgezeigt werden, dass 4-HNE schnell mit zahlreichen SH-Gruppen der Na⁺-K⁺-ATPase reagiert. Die Na⁺-K⁺-ATPase ist ein in die Plasma-Membran eingelagertes Protein, das als Ionen-Pumpe tätig ist. Seine primären Funktionen sind die Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalium-Konzentration und die Exkretion von Natrium-Ionen. Die Bindung von 4-HNE an die

ATPase führt zu einer Konzentrations-abhängigen Inaktivierung der Pumpe. Bei einer 4-HNE-Konzentration von 120 μM liegt die Aktivität der ATPase bei 50 %. Eine Inhibition von Ionen-Pumpen wäre auch in den unterschiedlichen Strukturen der Cochlea nach Gentamicin-Applikation denkbar. Ganz besonders sollten hier diejenigen Pumpen in Betracht gezogen werden, die am lateralen und medialen Kalium-Recycling beteiligt sind (Spicer et al. 2000¹²⁰, Hirose und Liberman 2003⁵⁵). Eine Dysregulation dieser Ionen-Pumpen (einschließlich der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) könnte erheblich zur Kochleotoxizität und zum assoziierten Hörverlust beitragen. Die vorliegende Arbeit konnte die Entstehung von 4-HNE in der Lateralen Wand und dem Limbus nachweisen, wobei beide Regionen entscheidend in das K^+ -Recycling eingebunden sind.

Die Forschungsgruppe von Blanc et al. 1997⁸ konnte die Unterbrechung der intrazellulären Signalkaskade von muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChRs) und metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluRs) durch 4-HNE in zerebrokortikalen Neuronen der Ratte belegen. Die Bindung des entsprechenden Liganden an den mAChR oder den mGluR führt normalerweise zur Aktivierung eines Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteins (G-Protein) auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, das wiederum die Membran-assoziierte Phospholipase C (PLC) stimuliert. Die PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 interagiert dann mit Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum und sorgt für eine Kalzium-Freisetzung aus diesem Organell. 4-HNE behindert bei diesem Prozess die Kopplung der Rezeptoren in der Membran mit dem G-Protein, die Formation von IP_3 und die Freisetzung von Kalzium. Um diese Inhibition zu erreichen, genügten 4-HNE-Konzentrationen in dem Bereich von 0,1 bis 20 μM und eine Zeitspanne von nur 30 Minuten.

Des Weiteren konnten Keller et al. 1997⁶⁴ zeigen, dass 4-HNE die Aufnahme von dem erregenden Neurotransmitter Glutamat aus der Umgebung von Synapsen hemmt. Eine 4-HNE-Behandlung von Lösungen mit Synapsen der Ratte resultierte bei ihren Versuchen innerhalb einer Stunde in einem signifikanten Abfall der Glutamat-Aufnahme. Dafür genügte eine 4-HNE-Konzentration von 1 bis 10 μM . In diesem Zusammenhang konnte die Bindung von 4-HNE an ein Glutamat-Transport-Protein, dem GLT-1, nachgewiesen werden. GLT-1 ist ein Glutamat-Transporter von Astrozyten und spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Bereich (Gegelashvili und Schousboe 1998⁴⁸). Dieser

Mechanismus stellt eine potentielle Schädigung von Nervenzellen dar, da zu hohe Konzentrationen von Glutamat im synaptischen Spalt zur Neurodegeneration führen können.

Furness und Lawton 2003⁴⁶ untersuchten die Lokalisation und die Verteilung von zwei Glutamat-Transportern in der Cochlea von Meerschweinchen. Die untersuchten Transporter, GLAST (Glutamate-Aspartate Transporter) und VGLUT1 (vesicular Glutamate Transporter), wurden per Immunhistochemie mit entsprechenden Antikörpern dargestellt. Das GLAST-Molekül wurde zusätzlich mit Immunogold markiert und darauffolgend elektronenmikroskopisch betrachtet. Die Markierungen des GLAST-Moleküls zeigten die Anwesenheit des Transporters in den inneren Pfeilerzellen und den Stützzellen, die die inneren Haarzellen des cortischen Organs umgeben. Des Weiteren konnte die höchste Konzentration dieses Transporters im mittleren Abschnitt der Cochlea gemessen werden, während die Konzentration zur Basis und zum Apex zunehmend abnahm. Das VGLUT1-Molekül war im Zytoplasma der inneren Haarzellen lokalisiert, wobei sich die stärkste Färbung an der Basis dieses Zelltyps ergab. Ein Konzentrationsgradient für den VGLUT1 entlang der Cochlea wurde nicht gefunden. Im Innenohr von Säugetieren scheinen mehrere Typen von Glutamat-Transportern zu existieren, die für die Entfernung des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt verantwortlich sind. Eine Beeinflussung der Glutamat-Transporter durch 4-HNE im Innenohr wäre vorstellbar. Welche Transporter beeinflusst werden, welche Mechanismen zugrunde liegen und welche funktionellen Auswirkungen resultieren, könnte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Chen et al. 2010¹⁷ konnten zeigen, dass eine Blockade von Glutamat-Transportern im Innenohr von anästhesierten Mäusen die neuronale Reizschwelle heraufsetzt. Die Ohren der Mäuse wurden mit Lösungen infundiert, die verschiedene Hemmstoffe der Glutamat-Transporter enthielten. Die verwendeten Inhibitoren waren TBOA (Threo-beta-benzyloxyaspartat), SOS (L-Serin-O-Sulfat) und DHK (Dihydrokainat). TBOA blockiert die Transporter GLAST, GLT-1 und EAAC-1 (Excitatory Amino Acid Carrier 1). SOS hemmt die Transporter GLAST und EAAC-1. DHK blockiert selektiv den GLT-1-Transporter. Die neuronale Reizschwelle wurde per CAP (Compound Action Potential) bestimmt. Eine exogene Zufuhr von TBOA und Glutamat sowie von SOS und Glutamat ergaben jeweils eine heraufgesetzte neuronale Reizschwelle vor allem im hohen Frequenzbereich. Auch eine intensive akustische Stimulation (22,63 kHz bei 102 dB für 10 min.) eine Stunde nach einer

Infusion mit TBOA oder SOS erbrachte eine heraufgesetzte Reizschwelle. Die gleiche Vorgehensweise mit einer DHK-haltigen Lösung erbrachte keine Änderung der Reizschwelle. Diese Untersuchungen könnten zeigen, dass eine Blockierung sowohl des GLAST- als auch des EAAC-1-Transporters einen Pathomechanismus bei Schädigungen des Innenohrs darstellen. Eine ähnliche inhibierende Wirkung durch 4-HNE oder andere ROS mit konsekutiven funktionellen Veränderungen wäre denkbar.

5.4. Ausblick

Die Beteiligung von 4-HNE an biochemischen und molekularen Prozessen sowie an Veränderungen der Homöostase ist bisher an verschiedenen Zellmodellen gut belegt worden. Die eigenen Untersuchungen zeigten partielle Unterschiede in der Lokalisierung von 4-HNE innerhalb der Kochlea. Die anschließend durchgeführte quantitative Erfassung in den unterschiedlichen Regionen lieferte Daten, die zur Klärung der Ototoxizität von Gentamicin und weiteren Aminoglykosiden beitragen können. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse konnten einen Zusammenhang zwischen einer Behandlung mit Aminoglykosiden und der Bildung von 4-Hydroxynonenal im Innenohr nachweisen.

In zukünftigen Studien gilt es weiter zu prüfen, welche Regionen der Kochlea durch 4-HNE in besonderem Maße geschädigt werden, welche Zelltypen dabei betroffen sind, welche Pathomechanismen dahinter stecken und welche protektiven Maßnahmen ergriffen werden können, um die Kochleotoxizität einzudämmen.

6. Zusammenfassung

Einleitung und Literaturdiskussion: Gentamicin ist ein aus Bakterien gewonnenes Aminoglykosid-Antibiotikum, das seit vielen Jahren im klinischen Alltag zur Therapie von bakteriellen Infektionen und zur Behandlung des Morbus Ménière eingesetzt wird. Ein bedeutender, jedoch noch nicht vollständig verstandener, Pathomechanismus ist dabei die Entstehung von 4-HNE durch Lipid Peroxidation und die konsekutive Schädigung durch das gebildete Aldehyd. Ziel dieser Arbeit war es, die Beeinflussung der Expression von 4-HNE in sieben verschiedenen Regionen der Cochlea (SV, SL, CO, NF, LF, IDZ und SGZ) durch Gentamicin zu beschreiben und quantitativ zu ermitteln.

Material und Methoden: Die Meerschweinchen wurden in vier Gruppen unterteilt: eine unbehandelte Kontrollgruppe und je eine Gruppe 1, 2 und 7 Tage nach Gentamicin-Applikation. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Cochleae den Tieren entnommen, das Gewebe fixiert, geschnitten und auf Objektträgern aufgebracht. Die Schnitte wurden mit 4-HNE-Antikörpern behandelt und die Immunreaktion mikroskopisch lokalisiert und zelluläre quantitative Unterschiede am Computer berechnet.

Ergebnisse: Die Auswertung der Daten ergab signifikante Anstiege der Immunreaktion auf 4-HNE von der Kontrollgruppe zu allen drei Behandlungsgruppen in vier der sieben untersuchten Regionen (Stria vascularis, Spirales Ligament, Cortisches Organ und Nervenfasern). In zwei Bereichen (Fibrozyten im Limbus und Interdentalzellen) kam es zwischen Kontrollgruppe und nur einer Behandlungsgruppe D (7d) zu einer signifikanten Erhöhung. Lediglich die Spiralganglionzellen erbrachten keine signifikanten Differenzen. Der Vergleich der Einzelwindungen erbrachte für die Stria vascularis, das Spirale Ligament, das Cortische Organ und die Nervenfasern signifikante Anstiege innerhalb der drei Windungen von der Kontrollgruppe zu den drei Behandlungsgruppen. Bei der Stria vascularis zeigte sich als einzige Region eine signifikant erhöhte Immunfärbung in allen drei Einzelwindungen von der Kontrollgruppe zu allen Behandlungsgruppen. Beim Vergleich der Gesamtwindungen ließ sich ausschließlich für die Region der Stria vascularis von der ersten zur dritten Windung ein Anstieg der Braunfärbung feststellen. Zudem konnten Korrelationen der Färbeintensitäten einerseits zwischen den beiden Regionen der Lateralen Wand und andererseits zwischen zwei Zelltypen im Limbus aufgezeigt werden.

Diskussion: Die durch Gentamicin-gesteigerte 4-HNE-Expression kann durch genomische und nicht-genomische Prozesse hervorgerufen werden.

7. Literaturverzeichnis

- ¹ Awasthi YC, Sharma R, Sharma A, Yadav S, Singhal SS, Chaudhary P, Awasthi S. Self-regulatory role of 4-hydroxynonenal in signalling for stress-induced programmed cell death. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 111-118.
- ² Barclay ML, Kirkpatrick CMJ, Begg EJ. Once-daily aminoglycoside therapy. Is it less toxic than multiple daily doses and how should it be monitored? *Clin Pharmacokinet.* 1999; 36: 89-98.
- ³ Becvarovski Z, Bojrab DI, Michaelides EM, Kartush JM, Zappia JJ, LaRouere MJ. Round window gentamicin absorption: an in vivo human model. *Laryngoscope.* 2002; 112: 1610-1613.
- ⁴ Becvarovski Z, Michaelides EM, Kartush JM, Bojrab DI, LaRouere MJ. Rapid elevation of gentamicin levels in the human labyrinth following intravenous administration. *Laryngoscope.* 2002; 112: 1163-1165.
- ⁵ Belyantseva I, Adler H, Curi R, Frolenkov G, Kachar B. Expression and localization of prestin and the sugar transporter GLUT- 5 during development of electromotility in cochlear outer hair cells. *The Journal of Neuroscience.* 2000; 20: RC 116.
- ⁶ Ben Ismail TH, Ali BH, Bashir AA. Influence of Iron, deferoxamine and ascorbic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Gen Pharmacol.* 1994; 25: 1249-1252.
- ⁷ Black FO, Pesznecker SC. Vestibular ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am.* 1993; 26: 713-736.
- ⁸ Blanc EM, Kelly JF, Mark RJ, Waeg G, Mattson MP. 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, impairs signal transduction associated with muscarinic acetylcholine and metabotropic glutamate receptors: possible action on G alpha (q/11). *J Neurochem.* 1997; 69: 570-580.
- ⁹ Blanchard SC, Fourmy D, Eason RG, Puglisi JD. rRNA chemical groups required for aminoglycoside binding. *Biochemistry.* 1998; 37: 7716-7724.
- ¹⁰ Böhmer A. The Preyer reflex - an easy estimate of hearing function in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 1988; 106: 368-372.
- ¹¹ Boenninghaus HG, Lenarz T. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 13. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007: 15-26.
- ¹² Boenninghaus HG, Lenarz T. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 13. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007: 21-26.

- ¹³ Bohne BA, Harding GW, Nordmann AS, Tseng CJ, Liang GE, Bahadori RS. Survival-fixation of the cochlea: a technique for following time-dependent degeneration and repair in noise-exposed chinchillas. *Hear Res.* 1999; 134: 163-178.
- ¹⁴ Boshier SK, Warren RL. Observations on the electrochemistry of the cochlear endolymph of the rat: a quantitative study of its electrical potential and ionic composition as determined by means of flame spectrophotometry. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1968; 171: 227-247.
- ¹⁵ Brown JN, Miller JM, Altschuler RA, Nuttall AL. Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear. *Hear Res.* 1993; 70: 167-172.
- ¹⁶ Brown M, Pierce S, Berglund A. Cochlear-Nucleus Branches of Thick (Medial) Olivocochlear Fibers in the Mouse: A Cochleotopic Projection. *The Journal of Comparative Neurology.* 1991; 303: 300-315.
- ¹⁷ Chen Z, Kujawa SG, Sewell WF. Functional Roles of high-affinity glutamate transporters in cochlear afferent synaptic transmission in the mouse. *J Neurophysiol.* 2010; 103: 2581-2586.
- ¹⁸ Conlon BJ, Perry BP, Smith DW. Attenuation of neomycin ototoxicity by iron chelation. *Laryngoscope.* 1998; 108: 284-287.
- ¹⁹ Conlon BJ, Smith DW. Supplemental iron exacerbates aminoglycoside ototoxicity in vivo. *Hear Res.* 1998; 115: 1-5.
- ²⁰ Contestabile A. Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1: 553-568.
- ²¹ Contopoulos-Ioannidis DG, Giotis ND, Baliatsa DV, Ioannidis JP. Extended-interval aminoglycoside administration for children: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2004; 114: e111-e118.
- ²² Crouch J, Sakaguchi N, Lytle C, Schulte B. Immunohistochemical localization of the Na-K-Cl co-transporter (NKCC1) in the gerbil inner ear. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 1997; 45:773-778.
- ²³ Dai CF, Mangiardi D, Cotanche DA, Steyger PS. Uptake of fluorescent gentamicin by vertebrate sensory cells in vivo. *Hear Res.* 2006; 213: 64-78.
- ²⁴ Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004; 116: 205-219.
- ²⁵ Derebery JM. The role of allergy in Meniere's disease. *Otolaryngol Clin N Am.* 1997; 30: 1007-1016.

- ²⁶ De Stefano, Dispenza F, De Donato G, Caruso A, Taibah A, Sanna M. Intratympanic gentamicin: a 1-day protocol treatment for unilateral Meniere's disease. *Am J Otolaryngol* 2007; 28: 289-293.
- ²⁷ Driscoll CL, Kasperbauer JL, Facer GW, Harner SG, Beatty CW. Low-dose intratympanic gentamicin and the treatment of Meniere's disease: preliminary results. *Laryngoscope*. 1997; 107: 83-89.
- ²⁸ Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82: 47-95.
- ²⁹ Dubin DT, Davis BD. The effect of streptomycin on potassium flux in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1961; 52: 400-402.
- ³⁰ Dulon D, Hiel H, Aurousseau C, Erre JP, Aran JM. Pharmacokinetics of gentamicin in the sensory hair cells of the organ of Corti: rapid uptake and long term persistence. *C R Acad Sci (III)*. 1993; 316: 682-687.
- ³¹ Dulon D, Zajic G, Aran JM, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics impair calcium entry but not viability and motility in isolated cochlear outer hair cells. *J Neurosci Res*. 1989; 24: 338-346.
- ³² Erichsen S, Zuo J, Curtis L, Rarey K, Hultcrantz M. Na-K-ATPase alpha- and beta-isoforms in the developing cochlea of the mouse. *Hearing Research*. 1996; 100: 143-149.
- ³³ Erway LC, Shiau YW, Davis RR, Krieg EF. Genetics of age-related hearing loss in mice. III. Susceptibility of inbred and F1 hybrid strains to noise-induced hearing loss. *Hear Res*. 1996; 93: 181-187.
- ³⁴ Escargueil-Blanc I, Salayre R, Vacaresse N, Jurgens G, Darblade B, Arnal JF, Parthasarathy S, Negre-Salvayre A. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor β -receptor pathway. *Circulation*. 2001; 104: 1814-1821.
- ³⁵ Espey MG, Miranda KM, Thomas DD, Xavier S, Citrin D, Vitek MP, Wink DA. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 962: 195-206.
- ³⁶ Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and related Aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11: 81-128.
- ³⁷ Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 28: 19-40.

- ³⁸ Fausti SA, Rappaport BZ, Schechter MA, Frey RH, War TT, Brummett RE. Detection of aminoglycoside ototoxicity by high-frequency auditory evaluation: Selected case studies. *Am J Otolaryngol.* 1984; 5: 177-182.
- ³⁹ Fetoni AR, Ferraresi A, Picciotti P, Gaetani E, Paludetti G, Troiani D. Noise induced hearing loss and vestibular dysfunction in the guinea pig. *Int J Audiol.* 2009; 48: 804-810.
- ⁴⁰ Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006; 113: 1708-1714.
- ⁴¹ Forge A, Richardson GP, Kros CJ, Marcotti W, Becker D, Williams DS, Thorpe J, Fleming J, Brown SD, Steel KP. A missense mutation in myosin VIIA prevents aminoglycoside accumulation in early postnatal cochlear hair cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 884: 110-124.
- ⁴² Forge A, Schacht J. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol Neurootol.* 2000; 5: 3-22.
- ⁴³ Forman HJ, Dickinson DA, Iles KE. HNE-signaling pathways leading to its elimination. *Mol Aspects Med.* 2003; 24: 189-194.
- ⁴⁴ Fredelius L, Johansson B, Bagger-Sjoberg D, Wersall J. Time-related changes in the guinea pig cochlea after acoustic overstimulation. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1990; 99:369-378.
- ⁴⁵ Fridovich I. Superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 1986; 58: 61-97.
- ⁴⁶ Furness DN, Lawton DM. Comparative distribution of glutamate transporters and receptors in relation to afferent innervation density in the mammalian cochlea. *J Neurosci.* 2003; 23: 11296-11304.
- ⁴⁷ Garduno-Anaya M, Couthino De T, Hinojosa-Gonzalez R, Pane-Pianese C, Rios-Castaneda L. Dexamethasone inner ear perfusion by intratympanic injection in unilateral Meniere's disease: a two-year prospective, placebo-controlled, double-blind, randomized trial. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 133: 285-294.
- ⁴⁸ Gegelashvili G, Schousboe A. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res Bull.* 1998; 45: 233-238.
- ⁴⁹ Gilbert DN. In: Madnell GL, Bennett JE, Dolin R, Hrsg. *Principles and practice of infectious diseases.* 4. Auflage. New York, USA: Churchill Livingstone; 1995: 279-306.
- ⁵⁰ Hashino E, Sheron M, Salvi RJ. Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res.* 1997; 777: 75-85.
- ⁵¹ Hawkins JE. Ototoxic mechanisms: A working hypothesis. *Audiology.* 1973; 12: 383-393.

- ⁵² Heinrich UR, Selinova O, Schmidtmann I, Feltens R, Brieger J, Mann WJ. Noise exposure alters cyclooxygenase 1 (COX-1) and 5-lipoxygenase (5-LO) expression in the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol.* 2010; 130: 358-365.
- ⁵³ Helling K, Wodarczyk K, Brieger J, Schmidtmann I, Li H, Mann WJ, Heinrich UR. Doxycycline reduces nitric oxide production in guinea pig inner ears. *Auris Nasus Larynx.* 2011; 38: 671-677.
- ⁵⁴ Hinshaw HC, Feldman WH. Streptomycin in treatment of clinical tuberculosis: A preliminary report. *Proc Mayo Clin.* 1945; 20: 313-318.
- ⁵⁵ Hirose K, Libermann MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2003; 4: 339-352.
- ⁵⁶ Hirose K, Westrum LE, Cunningham DE, Rubel EW. Electron microscopy of degenerative changes in the chick basilar papilla after gentamicin exposure. *J Comp Neurol.* 2004; 470: 164-180.
- ⁵⁷ Hoffman DW, Whitworth CA, Jones-King KL, Rybak LP. Potentiation of ototoxicity by glutathione depletion. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1988; 97: 36-41.
- ⁵⁸ Holley M. The auditory system, hearing loss and potential targets for drug development. *Drug Discovery Today.* 2005; 1269-1282.
- ⁵⁹ Huang T, Cheng AG, Stupak H, Liu W, Kim A, Staecker H, Lefebvre PP, Malgrange B, Kopke R, Moonen G, Van De Water TR. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *Int J Dev Neurosci.* 2000; 18: 259-270.
- ⁶⁰ Imamura S, Adams JC. Distribution of gentamicin in the guinea pig inner ear after local or systemic application. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2003; 4: 176-195.
- ⁶¹ Ji C, Kozak KR, Marnett LJ. I κ B kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18223-18228.
- ⁶² Jiang H, Sha SH, Schacht J. NF-kappaB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity. *J Neurosci Res.* 2005; 79: 644-651.
- ⁶³ Jiang H, Talaska AE, Schacht J, Sha SH. Oxidative imbalance in the aging inner ear. *Neurobiol Aging.* 2007; 28: 1605-1612.
- ⁶⁴ Keller JN, Mark RJ, Bruce AJ, Blanc E, Rothstein JD, Uchida K, Waeg G, Mattson MP. 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience.* 1997; 80: 685-696.

- ⁶⁵ Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger E, Moser T. Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature*. 2005; 434, 889-894.
- ⁶⁶ Kikuchi T, Kimura R, Paul D, Adams J. Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis. *Anatomy and Embryology*. 1995; 191: 101-118.
- ⁶⁷ Kimura R, Nye C, Southard R. Normal and pathologic features of the limbus spiralis and its functional significance. *Ann. Otolaryngol*. 1990; 11: 99-111.
- ⁶⁸ Kroese ABA, Das A, Hudspeth AJ. Blockage of the transduction channels of hair cells in the bullfrog's sacculus by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res*. 1989; 37: 203-218.
- ⁶⁹ Kruman I, Bruce-Keller AJ, Bredesen D, Waeg G, Mattson MP. Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci*. 1997; 17: 5089-5100.
- ⁷⁰ Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusano G, Gown AM. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45: 1559-1565.
- ⁷¹ Lehr HA, van der Loos CM, Teeling P, Gown AM. Complete chromogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using Photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem*. 1999; 47: 119-126.
- ⁷² Lerner SA, Schmitt BA, Seligsohn R, Matz GJ. Comparative study of ototoxicity and nephrotoxicity in patients randomly assigned to treatment with amikacin or gentamicin. *Am J Med*. 1986; 80: 98-104.
- ⁷³ Li J, Sharma R, Patrick B, Sharma A, Jeyabal PV, Reddy PM, Saini MK, Dwivedi S, Dhanani S, Ansari NH, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC. Regulation of CD95 (Fas) expression and Fas-mediated apoptotic signalling in HLE B-3 cells by 4-hydroxynonenal. *Biochemistry*. 2006; 45: 12253-12264.
- ⁷⁴ Liberman M, Dodds L, Pierce S. Afferent and efferent innervation of the rat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *The Journal of Comparative Neurology*. 1990; 301: 443-460.
- ⁷⁵ Lodhi S, Weiner ND, Mechigian I, Schacht J. Ototoxicity of aminoglycosides correlated with their action on monomolecular films of polyphosphoinositides. *Biochem Pharmacol*. 1980; 29: 597-601.

- ⁷⁶ Lüllmann H, Mohr K, Hein L. Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen. 16. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006: 451-460.
- ⁷⁷ Manthey D, Behl C. From structural biochemistry to expression profiling: Neuroprotective activities of estrogen. *Neuroscience*. 2006; 183: 845-850.
- ⁷⁸ Marzo SJ, Leonetti JP. Intratympanic gentamicin therapy for persistent vertigo after endolymphatic sac surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002; 126: 31-33.
- ⁷⁹ Matsui JI, Haque A, Huss D, Messana EP, Alosi JA, Roberson DW, Cotanche DA, Dickmann JD, Warchol ME. Caspase inhibitors promote vestibular hair cell survival and function after aminoglycoside treatment in vivo. *J Neurosci*. 2003; 23: 6111-6122.
- ⁸⁰ Matz G. Aminoglycoside cochlear ototoxicity. *Otolaryngol Clin North Am*. 1993; 26: 705-712.
- ⁸¹ McFeely WJ, Singleton GT, Rodriguez FJ, Antonelli PJ. Intratympanic gentamicin treatment for Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 118: 589-596.
- ⁸² Merchan-Perez A, Liberman M. Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *The Journal of Comparative Neurology*. 1996; 371: 208-221.
- ⁸³ Mulheran M, Degg C. Comparison of distortion product OAE generation between a patient group requiring frequent gentamicin therapy and control subjects. *Br J Audiol*. 1997; 31: 5-9.
- ⁸⁴ Narayana K. An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *J Toxicol Sci*. 2008; 33: 85-96.
- ⁸⁵ Nedzelski JM, Bryce GE, Pfeleiderer AG. Treatment of Menière's disease with topical gentamicin: a preliminary report. *J Otolaryngol*. 1992; 21: 95-101.
- ⁸⁶ Okuda T, Sugahara K, Shimogori H, Yamashita H. Inner ear changes with intracochlear gentamicin administration in Guinea pigs. *Laryngoscope*. 2004; 114: 694-697.
- ⁸⁷ Paparella MM. Methods of diagnosis and treatment of Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1991; 485: 108-119.
- ⁸⁸ Paparella MM, Djalilian HR. Etiology, pathophysiology of symptoms, and pathogenesis of Meniere's disease. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002; 35: 529-545.

- ⁸⁹ Parlakpinar H, Koc M, Polat A, Vardi N, Ozer MK, Turkoz Y, Acet A. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by amikacin in rats. *Urol Res.* 2004; 32: 278-282.
- ⁹⁰ Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 937-945.
- ⁹¹ Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev.* 2008; 28: 569-631.
- ⁹² Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, Arnos KS, Cortopassi GA, Jaber L, Rotter JI. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat Genet.* 1993; 4: 289-294.
- ⁹³ Priuska EM, Schacht J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50: 1749-1752.
- ⁹⁴ Priuska EM, Schacht J. Mechanism and prevention of aminoglycoside ototoxicity: outer hair cells as targets and tools. *Ear Nose Throat J.* 1997; 76: 164-171.
- ⁹⁵ Raphael Y, Altschuler RA. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bulletin.* 2003; 60: 397-422.
- ⁹⁶ Rizzi MD, Hirose K. Aminoglycoside ototoxicity. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 15: 352-357.
- ⁹⁷ Roland PS. Characteristics of systemic and topical agents implicated in toxicity of the middle and inner ear. *Ear Nose Throat J.* 2003; 82 (Suppl 1): 3-8.
- ⁹⁸ Roth H, Amos H, Davis BD. Purine nucleotide excretion by *Escherichia coli* in the presence of streptomycin. *Biochim Biophys Acta.* 1960; 37: 398-405.
- ⁹⁹ Rougier F, Claude D, Maurin M, Maire P. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2004; 4: 153-162.
- ¹⁰⁰ Ruiz JW, Guzman J, Polak M, Eshraghi AA, Balkany TJ, Van De Water TR. Glutathione ester protects against hydroxynonenal-induced loss of auditory hair cells. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 135: 792-797.
- ¹⁰¹ Sajjadi H, Paparella MM. Meniere's disease. *Lancet.* 2008; 372: 406-414.
- ¹⁰² Sande MA, Mandell GL. Antimicrobial agents: The aminoglycosides. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, Hrsg. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* New York, USA: Pergamon Press; 1990: 1102.

- ¹⁰³Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1997; 68: 2092-2097.
- ¹⁰⁴Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1944; 55: 66-69.
- ¹⁰⁵Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.* 29. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005: 341-345.
- ¹⁰⁶Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.* 29. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005: 346-349.
- ¹⁰⁷Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.* 29. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005: 358-363.
- ¹⁰⁸Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *Prometheus: LernAtlas der Anatomie.* 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006: 148-153.
- ¹⁰⁹Schünke M, Schulte E, Schumacher U. *Prometheus: LernAtlas der Anatomie.* 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006: 150-151.
- ¹¹⁰Sha SH, Schacht J. Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 341-347.
- ¹¹¹Sha SH, Schacht J. Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity. *Lab Invest.* 1999; 79: 807-813.
- ¹¹²Sha SH, Schacht J. Stimulation of free radical formation by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res.* 1999; 128: 112-118.
- ¹¹³Sha SH, Taylor R, Forge A, Schacht J. Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Hear Res.* 2001; 155: 1-8.
- ¹¹⁴Sharma R, Sharma A, Dwivedi S, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC. 4-Hydroxynonenal self limits Fas-mediated DISC independent apoptosis by promoting export of Daxx from nucleus to cytosol and its binding to Fas. *Biochemistry.* 2008; 47: 143-156.
- ¹¹⁵Siems WG, Hapner SJ, van Kuijk FJ. 4-hydroxynonenal inhibits Na(+)-K(+)-ATPase. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 215-223.
- ¹¹⁶Spicer S, Schulte B. Differentiation of the inner ear fibrocytes according to their ion transport related activity. *Hearing Research.* 1991; 56: 53-64.
- ¹¹⁷Spicer S, Schulte B. Evidence for a medial K⁺ recycling pathway from inner hair cells. *Hearing Research.* 1998; 118: 1-12.

- ¹¹⁸Spicer S, Schulte B. Golgi-canalicular reticulum system in ion transporting fibrocytes and outer sulcus epithelium of gerbil cochlea. *The Anatomical Record*. 1997; 249: 117-127.
- ¹¹⁹Spicer S, Schulte B. The fine structure of spiral ligament cells relates to the ion return to stria and varies with place-frequency. *Hearing Research*. 1996; 100: 80-100.
- ¹²⁰Spicer S, Thomopoulos G, Schulte B. Structural evidence for ion transport and tectorial membrane maintenance in the gerbil limbus. *Hearing Research*. 2000; 143: 147-161.
- ¹²¹Suzuki M, Ushio M, Yamasoba T. Time course of apoptotic cell death in guinea pig cochlea following intratympanic gentamicin application. *Acta Otolaryngol*. 2008; 128: 724-731.
- ¹²²Takumida M, Popa R, Anniko M. Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1999; 61: 63-70.
- ¹²³Tjalkens RB, Luckey SW, Kroll DJ, Petersen DR. Alpha, beta-unsaturated aldehydes increase glutathione S-transferase mRNA and protein: correlation with activation of the antioxidant response element. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 359: 42-50.
- ¹²⁴Tran Ba Huy P, Bernard P, Schacht J. Kinetics of gentamicin uptake and release in the rat: Comparison of inner ear tissues and fluids with other organs. *J Clin Invest*. 1986; 77: 1492-1500.
- ¹²⁵Vacaresse N, Vieira O, Robbesyn F, Jurgens G, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2001; 132: 1777-1788.
- ¹²⁶Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*. 2003; 140-141: 113-124.
- ¹²⁷Vital-Brazil O, Corrado AP. The curariform action of streptomycin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1957; 120: 452-459.
- ¹²⁸Wanamaker HH, Gruenwald L, Damm KJ, Ogata Y, Slepecky N. Dose-related vestibular and cochlear effects of transtympanic gentamicin. *Am J Otol*. 1998; 19: 170-179.
- ¹²⁹Wang Y, Hirose K, Liberman MC. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2002; 3: 248-268.

- ¹³⁰West BA, Brummet RE, Himes DL. Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. *Arch Otolaryngol.* 1973; 98: 32-37.
- ¹³¹Whiteman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 962: 242-259.
- ¹³²Wu WJ, Sha SH, McLaren JD, Kawamoto K, Raphael Y, Schacht J. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hear Res.* 2001; 158: 165-178.
- ¹³³Wu WJ, Sha SH, Schacht J. Recent advances in understanding aminoglycoside ototoxicity and its prevention. *Audiol Neurootol.* 2002; 7: 171-174.
- ¹³⁴Yamashita D, Jiang HY, Schacht J, Miller JM. Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 2004; 1019: 201-209.
- ¹³⁵Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 2696-2701.
- ¹³⁶Zelck U, Nowak R, Karnstedt U, Koitschev A, Kacker N. Specific activities of antioxidative enzymes in the cochlea of guinea pigs at different stages of development. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993; 250: 218-219.
- ¹³⁷Zhang S, Robertson D, Yates G, Everett A. Role of L- type Ca (2+) channels in transmitter release from mammalian inner hair cells I. Gross sound- evoked potentials. *Journal of Neurophysiology.* 1999; 82: 3307-3315.
- ¹³⁸Zidanic M, Brownell W. Fine structure of the intracochlear potential field. I. The silent current. *Biophysical Journal.* 1994; 57: 1253-1268.

8. Anhang

8.1. Tabellarische Darstellung

Die Tabellen in diesem Kapitel listen alle ermittelten Werte der statistischen Untersuchungen auf. Zunächst werden die Mittelwerte tabellarisch dargestellt. Die darauf folgenden Tabellen zeigen die p-Werte des Vergleichs der Gesamtwindungen, der Einzelwindungen, der Gesamtgruppen und der Windungen untereinander. Die unterschiedlichen Signifikanz-Niveaus sind gekennzeichnet: Ein **fettgedruckter** p-Wert entspricht einem einfachen Signifikanzniveau von $\leq 0,05$ (in den Diagrammen mit einem * gekennzeichnet). Ein **fett- und kursivgedruckter** p-Wert bedeutet ein zweifaches Niveau $\leq 0,01$ (in den Diagrammen mit ** gekennzeichnet). Ein **fett- und kursivgedruckter, unterstrichener** p-Wert entspricht einem dreifachen Niveau $\leq 0,001$ (in den Diagrammen mit *** gekennzeichnet).

8.1.1. Mittelwerte

Tabellarische Darstellung der Mittelwerte für die sieben Regionen der Cochlea (Cortisches Organ, Stria vascularis, Spirales Ligament, Interdentalzellen, Nervenfasern, Spiralganglionzellen und Fibrozyten im Limbus).

Anhang 1: Mittelwerte

Zelltyp	N Obs	Variable	Mean	Std Dev	Skewness	Minimum	Lower Quartile	Median	Upper Quartile	Maximum
Corti	89	DeltaHNE4	0.0	671.8	0.1	-1646.4	-345.4	-5.8	412.9	1749.3
		DeltaLogHNE4	0.0	0.5	-1.2	-1.7	-0.2	0.1	0.3	1.0
Stria	104	DeltaHNE4	-0.0	1014.0	0.3	-1935.0	-576.1	-35.3	620.9	2727.4
		DeltaLogHNE4	0.0	0.4	-0.3	-1.2	-0.3	0.0	0.3	1.2
Ligament	103	DeltaHNE4	0.0	944.2	0.5	-1993.3	-669.2	-110.6	585.9	2859.4
		DeltaLogHNE4	-0.0	0.5	-0.6	-2.1	-0.3	0.0	0.3	1.7
Interdental	81	DeltaHNE4	-0.0	995.4	1.3	-1718.2	-670.8	-41.4	319.1	3734.4
		DeltaLogHNE4	0.0	0.7	-0.3	-1.6	-0.5	0.2	0.5	1.5
Nerven	81	DeltaHNE4	0.0	660.2	-0.8	-1904.6	-308.5	99.1	446.2	1540.1
		DeltaLogHNE4	0.0	0.4	-1.8	-1.4	-0.1	0.1	0.2	0.6
Ganglien	47	DeltaHNE4	0.0	1027.3	0.6	-2025.9	-698.4	-114.9	698.9	2812.4
		DeltaLogHNE4	-0.0	0.9	-0.1	-2.3	-0.3	0.1	0.5	1.9
Fibro Lim	76	DeltaHNE4	0.0	841.5	1.2	-1252.9	-529.0	-45.2	288.6	2685.7
		DeltaLogHNE4	-0.0	1.0	-1.4	-3.4	-0.4	0.1	0.5	1.7

8.1.2. Vergleich der Gesamtwindungen und der Einzelwindungen

Tabellarische Übersicht der Gesamt- und Einzelwindungen in der Reihenfolgen Stria vascularis, Spirales Ligament, Cortisches Organ, Nervenfasern, Fibrozyten im Limbus, Interdentalzellen und Spiralganglionzellen.

Anhang 2: Gesamt- und Einzelwindungen Stria vascularis

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>Adjp</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 2d	164.80	584.78	0.28	0.7788	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 3d	-373.34	607.72	-0.61	0.5408	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Kontrolle	2797.42	683.38	4.09	0.0001	0.0055
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 2d	444.96	584.78	0.76	0.4490	0.9998
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 3d	-432.46	607.72	-0.71	0.4789	0.9999
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Kontrolle	3036.08	683.38	4.44	<.0001	0.0017
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 2d	513.91	584.78	0.88	0.3822	0.9992
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 3d	-420.80	615.04	-0.68	0.4959	0.9999
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Kontrolle	3577.99	683.38	5.24	<.0001	<.0001
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Genta 3d	-538.14	548.57	-0.98	0.3297	0.9977
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Kontrolle	2632.62	631.36	4.17	<.0001	0.0043
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Genta 3d	-877.42	548.57	-1.60	0.1138	0.9041
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Kontrolle	2591.12	631.36	4.10	0.0001	0.0053
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Genta 3d	-934.70	556.67	-1.68	0.0972	0.8720
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Kontrolle	3064.08	631.36	4.85	<.0001	0.0004
Behandlung*Windung	1	Genta 3d	Kontrolle	3170.76	652.67	4.86	<.0001	0.0004
Behandlung*Windung	2	Genta 3d	Kontrolle	3468.54	652.67	5.31	<.0001	<.0001
Behandlung*Windung	3	Genta 3d	Kontrolle	3998.79	659.49	6.06	<.0001	<.0001
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 2d	374.56	493.26	0.76	0.4500	0.8724
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 3d	-408.87	513.58	-0.80	0.4284	0.8560
Behandlung	_	Genta 1d	Kontrolle	3137.16	559.55	5.61	<.0001	<.0001
Behandlung	_	Genta 2d	Genta 3d	-783.42	463.79	-1.69	0.0952	0.3364
Behandlung	_	Genta 2d	Kontrolle	2762.61	514.23	5.37	<.0001	<.0001
Behandlung	_	Genta 3d	Kontrolle	3546.03	533.75	6.64	<.0001	<.0001

Anhang 3: Gesamt- und Einzelwindungen Spirales Ligament

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>Adjp</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 2d	98.9572	514.52	0.19	0.8480	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 3d	-511.31	534.71	-0.96	0.3420	0.9982
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Kontrolle	2299.62	642.71	3.58	0.0006	0.0279
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 2d	136.69	514.52	0.27	0.7912	1.0000
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 3d	-539.44	534.71	-1.01	0.3162	0.9971
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Kontrolle	2081.82	614.89	3.39	0.0011	0.0482
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 2d	446.27	514.52	0.87	0.3885	0.9992
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 3d	-287.32	543.43	-0.53	0.5985	1.0000
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Kontrolle	1982.20	614.89	3.22	0.0019	0.0742

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Genta 3d	-610.27	482.66	-1.26	0.2100	0.9811
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Kontrolle	2200.67	600.10	3.67	0.0005	0.0214
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Genta 3d	-676.13	482.66	-1.40	0.1653	0.9599
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Kontrolle	1945.13	570.21	3.41	0.0010	0.0449
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Genta 3d	-733.60	492.31	-1.49	0.1403	0.9388
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Kontrolle	1535.93	570.21	2.69	0.0087	0.2497
Behandlung*Windung	1	Genta 3d	Kontrolle	2810.93	617.50	4.55	<.0001	0.0011
Behandlung*Windung	2	Genta 3d	Kontrolle	2621.26	588.49	4.45	<.0001	0.0016
Behandlung*Windung	3	Genta 3d	Kontrolle	2269.52	596.43	3.81	0.0003	0.0140
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 2d	227.31	398.42	0.57	0.5700	0.9406
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 3d	-446.02	415.31	-1.07	0.2862	0.7064
Behandlung	_	Genta 1d	Kontrolle	2121.22	463.91	4.57	<.0001	0.0001
Behandlung	_	Genta 2d	Genta 3d	-673.33	375.15	-1.79	0.0767	0.2838
Behandlung	_	Genta 2d	Kontrolle	1893.91	428.33	4.42	<.0001	0.0002
Behandlung	_	Genta 3d	Kontrolle	2567.24	444.09	5.78	<.0001	<.0001

Anhang 4: Gesamt- und Einzelwindungen Cortisches Organ

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 2d	-140.36	410.66	-0.34	0.7337	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 3d	-405.64	423.74	-0.96	0.3421	0.9981
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Kontrolle	1448.04	470.99	3.07	0.0031	0.1122
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 2d	102.54	450.13	0.23	0.8205	1.0000
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 3d	-676.33	457.34	-1.48	0.1442	0.9408
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Kontrolle	1393.94	497.89	2.80	0.0068	0.2058
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 2d	418.81	418.03	1.00	0.3203	0.9971
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 3d	-397.81	432.69	-0.92	0.3615	0.9987
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Kontrolle	1653.82	567.27	2.92	0.0049	0.1611
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Genta 3d	-265.28	385.60	-0.69	0.4940	0.9999
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Kontrolle	1588.40	437.00	3.63	0.0006	0.0258
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Genta 3d	-778.87	400.16	-1.95	0.0561	0.7260
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Kontrolle	1291.40	445.95	2.90	0.0052	0.1681
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Genta 3d	-816.62	403.06	-2.03	0.0471	0.6744
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Kontrolle	1235.01	545.01	2.27	0.0270	0.5106
Behandlung*Windung	1	Genta 3d	Kontrolle	1853.68	449.31	4.13	0.0001	0.0058
Behandlung*Windung	2	Genta 3d	Kontrolle	2070.27	453.23	4.57	<.0001	0.0013
Behandlung*Windung	3	Genta 3d	Kontrolle	2051.63	556.34	3.69	0.0005	0.0222
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 2d	127.00	365.84	0.35	0.7297	0.9855
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 3d	-493.26	378.14	-1.30	0.1969	0.5636
Behandlung	_	Genta 1d	Kontrolle	1498.60	417.88	3.59	0.0007	0.0036
Behandlung	_	Genta 2d	Genta 3d	-620.26	341.85	-1.81	0.0745	0.2764
Behandlung	_	Genta 2d	Kontrolle	1371.60	385.34	3.56	0.0007	0.0039
Behandlung	_	Genta 3d	Kontrolle	1991.86	397.04	5.02	<.0001	<.0001

Anhang 5: Gesamt- und Einzelwindungen Nervenfasern

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 2d	333.93	442.53	0.75	0.4538	0.9998
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 3d	-217.06	457.69	-0.47	0.6372	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Kontrolle	1780.77	500.27	3.56	0.0008	0.0340
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 2d	248.74	497.68	0.50	0.6192	1.0000
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 3d	-318.80	503.84	-0.63	0.5296	1.0000
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Kontrolle	1615.28	556.33	2.90	0.0053	0.1689
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 2d	459.86	456.22	1.01	0.3180	0.9969
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 3d	-53.4864	473.20	-0.11	0.9104	1.0000
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Kontrolle	1758.87	580.98	3.03	0.0038	0.1287
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Genta 3d	-550.99	415.40	-1.33	0.1903	0.9718
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Kontrolle	1446.83	461.89	3.13	0.0028	0.1010
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Genta 3d	-567.54	438.22	-1.30	0.2008	0.9763
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Kontrolle	1366.54	497.68	2.75	0.0082	0.2329
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Genta 3d	-513.35	436.03	-1.18	0.2442	0.9886
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Kontrolle	1299.00	551.13	2.36	0.0221	0.4514
Behandlung*Windung	1	Genta 3d	Kontrolle	1997.82	476.44	4.19	0.0001	0.0053
Behandlung*Windung	2	Genta 3d	Kontrolle	1934.08	503.84	3.84	0.0003	0.0155
Behandlung*Windung	3	Genta 3d	Kontrolle	1812.36	565.27	3.21	0.0023	0.0847
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 2d	347.51	416.26	0.83	0.4075	0.8376
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 3d	-196.45	430.44	-0.46	0.6499	0.9681
Behandlung	_	Genta 1d	Kontrolle	1718.30	471.48	3.64	0.0006	0.0033
Behandlung	_	Genta 2d	Genta 3d	-543.96	387.48	-1.40	0.1661	0.5025
Behandlung	_	Genta 2d	Kontrolle	1370.79	432.62	3.17	0.0025	0.0131
Behandlung	_	Genta 3d	Kontrolle	1914.75	446.28	4.29	<.0001	0.0004

Anhang 6: Gesamt- und Einzelwindungen Fibrozyten im Limbus

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 2d	55.2340	513.18	0.11	0.9147	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 3d	-378.45	512.01	-0.74	0.4633	0.9998
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Kontrolle	1224.62	577.64	2.12	0.0391	0.6116
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 2d	406.86	636.45	0.64	0.5256	1.0000
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 3d	-258.55	605.04	-0.43	0.6710	1.0000
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Kontrolle	1217.02	682.21	1.78	0.0806	0.8185
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 2d	247.51	534.85	0.46	0.6456	1.0000
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 3d	-306.10	545.17	-0.56	0.5770	1.0000
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Kontrolle	1191.91	730.38	1.63	0.1091	0.8886
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Genta 3d	-433.69	483.96	-0.90	0.3746	0.9989
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Kontrolle	1169.39	552.93	2.11	0.0395	0.6151
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Genta 3d	-665.41	548.79	-1.21	0.2311	0.9854
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Kontrolle	810.17	632.86	1.28	0.2065	0.9779
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Genta 3d	-553.61	519.74	-1.07	0.2920	0.9949
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Kontrolle	944.40	711.60	1.33	0.1906	0.9712

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 3d	Kontrolle	1603.07	551.85	2.90	0.0055	0.1712
Behandlung*Windung	2	Genta 3d	Kontrolle	1475.57	601.26	2.45	0.0177	0.3916
Behandlung*Windung	3	Genta 3d	Kontrolle	1498.01	719.39	2.08	0.0426	0.6369
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 2d	236.53	443.03	0.53	0.5958	0.9504
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 3d	-314.37	448.27	-0.70	0.4864	0.8961
Behandlung	_	Genta 1d	Kontrolle	1211.18	508.72	2.38	0.0212	0.0943
Behandlung	_	Genta 2d	Genta 3d	-550.90	410.29	-1.34	0.1856	0.5408
Behandlung	_	Genta 2d	Kontrolle	974.65	475.59	2.05	0.0458	0.1844
Behandlung	_	Genta 3d	Kontrolle	1525.55	480.48	3.18	0.0026	0.0134

Anhang 7: Gesamt- und Einzelwindungen Interdentalzellen

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 2d	183.79	596.69	0.31	0.7593	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 3d	-511.40	615.14	-0.83	0.4094	0.9995
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Kontrolle	1108.14	688.26	1.61	0.1132	0.8978
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 2d	512.91	714.34	0.72	0.4758	0.9999
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 3d	-614.21	714.39	-0.86	0.3937	0.9992
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Kontrolle	1201.03	801.97	1.50	0.1401	0.9349
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 2d	525.79	627.32	0.84	0.4056	0.9994
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 3d	-624.04	649.95	-0.96	0.3413	0.9980
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Kontrolle	1176.36	853.41	1.38	0.1738	0.9628
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Genta 3d	-695.19	560.36	-1.24	0.2201	0.9829
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Kontrolle	924.35	639.76	1.44	0.1543	0.9486
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Genta 3d	-1127.12	610.64	-1.85	0.0704	0.7856
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Kontrolle	688.12	711.12	0.97	0.3375	0.9978
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Genta 3d	-1149.83	606.56	-1.90	0.0634	0.7565
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Kontrolle	650.57	820.85	0.79	0.4315	0.9997
Behandlung*Windung	1	Genta 3d	Kontrolle	1619.54	657.00	2.47	0.0169	0.3830
Behandlung*Windung	2	Genta 3d	Kontrolle	1815.24	711.17	2.55	0.0136	0.3316
Behandlung*Windung	3	Genta 3d	Kontrolle	1800.41	838.27	2.15	0.0362	0.5924
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 2d	407.50	534.03	0.76	0.4487	0.8706
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 3d	-583.22	549.96	-1.06	0.2937	0.7148
Behandlung	_	Genta 1d	Kontrolle	1161.84	618.03	1.88	0.0655	0.2487
Behandlung	_	Genta 2d	Genta 3d	-990.71	494.30	-2.00	0.0501	0.1991
Behandlung	_	Genta 2d	Kontrolle	754.35	569.06	1.33	0.1906	0.5510
Behandlung	_	Genta 3d	Kontrolle	1745.06	584.04	2.99	0.0042	0.0213

Anhang 8: Gesamt- und Einzelwindungen Spiralganglionzellen

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 2d	1317.02	1038.02	1.27	0.2158	0.9663
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Genta 3d	351.96	1020.45	0.34	0.7329	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 1d	Kontrolle	2353.43	1029.12	2.29	0.0306	0.4703
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 2d	1189.27	1032.12	1.15	0.2597	0.9825

<i>Effect</i>	<i>Windung</i>	<i>Behandlung</i>	<i>_Behandlung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Genta 3d	220.30	1006.43	0.22	0.8284	1.0000
Behandlung*Windung	2	Genta 1d	Kontrolle	2198.41	1071.50	2.05	0.0504	0.6179
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 2d	1370.91	1032.12	1.33	0.1956	0.9548
Behandlung*Windung	3	Genta 1d	Genta 3d	-156.04	1006.66	-0.16	0.8780	1.0000
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Genta 3d	-965.07	855.32	-1.13	0.2695	0.9849
Behandlung*Windung	1	Genta 2d	Kontrolle	1036.40	865.65	1.20	0.2420	0.9772
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Genta 3d	-968.97	882.45	-1.10	0.2823	0.9876
Behandlung*Windung	2	Genta 2d	Kontrolle	1009.14	956.00	1.06	0.3009	0.9907
Behandlung*Windung	3	Genta 2d	Genta 3d	-1526.94	882.72	-1.73	0.0955	0.8074
Behandlung*Windung	1	Genta 3d	Kontrolle	2001.47	844.50	2.37	0.0255	0.4208
Behandlung*Windung	2	Genta 3d	Kontrolle	1978.11	928.21	2.13	0.0427	0.5675
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 2d	1292.40	946.15	1.37	0.1837	0.3729
Behandlung	_	Genta 1d	Genta 3d	138.74	934.00	0.15	0.8831	0.9879
Behandlung	_	Genta 1d	Kontrolle
Behandlung	_	Genta 2d	Genta 3d	-1153.66	784.66	-1.47	0.1535	0.3213
Behandlung	_	Genta 2d	Kontrolle
Behandlung	_	Genta 3d	Kontrolle

8.1.3. Vergleich der Gesamtgruppen und der Windungen untereinander

Tabellarische Übersicht der Gesamtgruppen und der Windungen untereinander in der Reihenfolge Stria vascularis, Spirales Ligament, Cortisches Organ, Nervenfasern, Fibrozyten im Limbus, Interdentalzellen und Spiralganglionzellen.

Anhang 9: Gesamtgruppen und Windungen untereinander Stria vascularis

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	2	-259.34	421.43	-0.62	0.5401	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	3	-909.47	421.43	-2.16	0.0340	0.5840
Behandlung*Windung	Genta 1d	2	3	-650.13	421.43	-1.54	0.1270	0.9234
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	2	20.8137	344.10	0.06	0.9519	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	3	-560.37	344.10	-1.63	0.1075	0.8930
Behandlung*Windung	Genta 2d	2	3	-581.18	344.10	-1.69	0.0953	0.8677
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	2	-318.46	376.94	-0.84	0.4008	0.9994
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	3	-956.92	388.63	-2.46	0.0160	0.3789
Behandlung*Windung	Genta 3d	2	3	-638.46	388.63	-1.64	0.1045	0.8873
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	2	-20.6832	533.07	-0.04	0.9692	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	3	-128.90	533.07	-0.24	0.8096	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	2	3	-108.22	533.07	-0.20	0.8397	1.0000
Windung	_	1	2	-144.42	212.46	-0.68	0.4987	0.7760
Windung	_	1	3	-638.91	213.78	-2.99	0.0038	0.0104
Windung	_	2	3	-494.50	213.78	-2.31	0.0234	0.0599

Anhang 10: Gesamtgruppen und Windungen untereinander Spirales Ligament

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	2	268.15	436.79	0.61	0.5411	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	3	269.90	436.79	0.62	0.5385	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	2	3	1.7499	436.79	0.00	0.9968	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	2	305.89	356.64	0.86	0.3938	0.9993
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	3	617.22	356.64	1.73	0.0876	0.8483
Behandlung*Windung	Genta 2d	2	3	311.33	356.64	0.87	0.3854	0.9992
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	2	240.02	390.68	0.61	0.5408	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	3	493.89	402.54	1.23	0.2236	0.9850
Behandlung*Windung	Genta 3d	2	3	253.87	402.54	0.63	0.5302	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	2	50.3532	588.72	0.09	0.9321	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	3	-47.5243	588.72	-0.08	0.9359	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	2	3	-97.8776	552.50	-0.18	0.8599	1.0000
Windung	_	1	2	216.10	226.00	0.96	0.3420	0.6066
Windung	_	1	3	333.37	227.30	1.47	0.1466	0.3126
Windung	_	2	3	117.27	221.54	0.53	0.5981	0.8572

Anhang 11: Gesamtgruppen und Windungen untereinander Cortisches Organ

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	2	96.5510	306.70	0.31	0.7540	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	3	-375.17	260.77	-1.44	0.1553	0.9508
Behandlung*Windung	Genta 1d	2	3	-471.72	306.70	-1.54	0.1291	0.9237
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	2	339.45	242.25	1.40	0.1661	0.9590
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	3	184.00	238.29	0.77	0.4429	0.9997
Behandlung*Windung	Genta 2d	2	3	-155.45	248.78	-0.62	0.5344	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	2	-174.15	240.69	-0.72	0.4721	0.9999
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	3	-367.34	249.12	-1.47	0.1454	0.9419
Behandlung*Windung	Genta 3d	2	3	-193.20	254.46	-0.76	0.4506	0.9998
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	2	42.4459	329.84	0.13	0.8980	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	3	-169.39	468.02	-0.36	0.7186	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	2	3	-211.83	468.02	-0.45	0.6524	1.0000
Windung	_	1	2	76.0747	141.31	0.54	0.5923	0.8528
Windung	_	1	3	-181.98	159.27	-1.14	0.2576	0.4919
Windung	_	2	3	-258.05	165.78	-1.56	0.1247	0.2721

Anhang 12: Gesamtgruppen und Windungen untereinander Nervenfasern

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	2	215.96	300.94	0.72	0.4761	0.9999
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	3	-129.22	238.28	-0.54	0.5898	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	2	3	-345.18	301.90	-1.14	0.2579	0.9910
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	2	130.77	230.39	0.57	0.5727	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	3	-3.2903	216.66	-0.02	0.9879	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	2	3	-134.06	238.80	-0.56	0.5769	1.0000

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	2	114.22	218.53	0.52	0.6033	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	3	34.3513	227.17	0.15	0.8804	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	2	3	-79.8699	237.62	-0.34	0.7381	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	2	50.4737	317.38	0.16	0.8742	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	3	-151.12	416.78	-0.36	0.7183	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	2	3	-201.59	422.36	-0.48	0.6351	1.0000
Windung	–	1	2	127.86	135.12	0.95	0.3482	0.6137
Windung	–	1	3	-62.3195	143.40	-0.43	0.6656	0.9013
Windung	–	2	3	-190.17	154.72	-1.23	0.2243	0.4414

Anhang 13: Gesamtgruppen und Windungen untereinander Fibrozyten im Limbus

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	2	21.3825	467.95	0.05	0.9637	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	3	-3.8673	374.93	-0.01	0.9918	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	2	3	-25.2498	471.29	-0.05	0.9575	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	2	373.00	434.82	0.86	0.3952	0.9992
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	3	188.41	375.31	0.50	0.6179	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	2	3	-184.59	430.59	-0.43	0.6700	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	2	141.28	343.92	0.41	0.6830	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	3	68.4826	357.54	0.19	0.8489	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	2	3	-72.8000	374.22	-0.19	0.8466	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	2	13.7821	493.73	0.03	0.9778	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	3	-36.5806	641.95	-0.06	0.9548	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	2	3	-50.3626	656.48	-0.08	0.9392	1.0000
Windung	–	1	2	137.36	219.39	0.63	0.5341	0.8065
Windung	–	1	3	54.1111	226.57	0.24	0.8122	0.9691
Windung	–	2	3	-83.2517	247.30	-0.34	0.7378	0.9395

Anhang 14: Gesamtgruppen und Windungen untereinander Interdentalzellen

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>AdjP</i>
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	2	-16.6077	524.74	-0.03	0.9749	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	3	-197.82	418.93	-0.47	0.6387	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	2	3	-181.21	527.86	-0.34	0.7327	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	2	312.51	403.22	0.78	0.4417	0.9997
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	3	144.18	380.42	0.38	0.7062	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	2	3	-168.33	419.68	-0.40	0.6899	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	2	-119.42	384.27	-0.31	0.7572	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	3	-310.47	399.48	-0.78	0.4404	0.9997
Behandlung*Windung	Genta 3d	2	3	-191.05	418.04	-0.46	0.6495	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	2	76.2816	553.19	0.14	0.8908	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	3	-129.60	721.43	-0.18	0.8581	1.0000
Behandlung*Windung	Kontrolle	2	3	-205.88	736.15	-0.28	0.7808	1.0000

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>Adj</i>
Windung	–	1	2	63.1906	236.06	0.27	0.7900	0.9613
Windung	–	1	3	-123.43	250.03	-0.49	0.6236	0.8746
Windung	–	2	3	-186.62	270.58	-0.69	0.4933	0.7705

Anhang 15: Gesamtgruppen und Windungen untereinander Spiralganglionzellen

<i>Effect</i>	<i>Behandlung</i>	<i>Windung</i>	<i>_Windung</i>	<i>Estimate</i>	<i>StdErr</i>	<i>tValue</i>	<i>Probt</i>	<i>Adj</i>
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	2	216.80	529.08	0.41	0.6853	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	1	3	-74.7790	529.08	-0.14	0.8887	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 1d	2	3	-291.58	485.84	-0.60	0.5536	0.9999
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	2	89.0411	517.41	0.17	0.8647	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	1	3	-20.8983	517.41	-0.04	0.9681	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 2d	2	3	-109.94	485.84	-0.23	0.8227	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	2	85.1383	419.15	0.20	0.8406	1.0000
Behandlung*Windung	Genta 3d	1	3	-582.77	427.83	-1.36	0.1848	0.9471
Behandlung*Windung	Genta 3d	2	3	-667.91	443.83	-1.50	0.1444	0.9052
Behandlung*Windung	Kontrolle	1	2	61.7743	545.73	0.11	0.9107	1.0000
Windung	–	1	2	113.19	252.63	0.45	0.6578	0.6578
Windung	–	1	3
Windung	–	2	3

9. Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn ..., dem Ärztlichen Direktor der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik der Universitätsmedizin Mainz, einen großen Dank dafür aussprechen, dass ich diese Dissertation in seiner Abteilung ausarbeiten durfte.

Weiterhin danke ich Herrn ... für seine kompetente und nette Betreuung.

Ein großer Dank geht an ... und an alle Mitarbeiter des Labors der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik für die freundliche Aufnahme in ihr Team sowie der Bereitstellung der Räumlichkeiten und der Materialien.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an Herrn ... richten, der mir mit seiner Fachkunde und seinem außergewöhnlich zuvorkommenden Charakter während der gesamten Ausarbeitung dieser Dissertation eine unglaublich große Hilfe war. Ohne ihn wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit kaum denkbar gewesen.

Frau ... danke ich für die praktische Anleitung bei der immunhistochemischen Färbung der Präparate. Es war eine Freude mit ihr zusammenarbeiten zu dürfen.

Ein zusätzlicher Dank geht an Frau ... aus dem IMBEI der Universitätsmedizin Mainz für die große Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Des Weiteren danke ich Herrn ..., Leiter der Tierhaltungsanlage und seinen Mitarbeiter für die Betreuung der Meerschweinchen.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden einen riesengroßen Dank aussprechen. Meinen Eltern danke ich für ihre außergewöhnlich liebevolle Unterstützung und für die Ermöglichung meines Lebensweges. Ein großer Dank geht an meinen Bruder, der mir stets ein Vorbild ist. Meinen Freunden danke ich für ihre Inspiration meines Lebens und für ihren überragenden Rückhalt, auf den ich mich immer verlassen kann.

10. Lebenslauf

Tiemo Dustin Kern

Tel.:
Handy:
Email:

Familienstand: ledig
Vater:
Mutter:

Schulische Laufbahn:

1996-2002 Weingartenschule in Kriftel / Gymnasialzweig
2002-2005 Friedrich-Dessauer-Gymnasium in Frankfurt a.M.-Höchst

Studium:

04/2006-10/2012 Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Praktika:

08/2005-10/2005 Pflegepraktikum Kliniken des Main-Taunus-Kreises, Bad Soden

10/2005-11/2005 Pflegepraktikum Städt. Kliniken Frankfurt a.M.-Höchst

08/2008-09/2008 Famulatur HNO-Klinik der Städt. Kliniken Frankfurt a.M.-Höchst

02/2009-03/2009 Famulatur Orthopädie des Sportmedizinischen Instituts Frankfurt am Main

08/2009-09/2009 Famulatur Orthopädie, West Coast Center for Orthopedic Surgery and Sports Medicine, Kalifornien, USA

03/2010-04/2010 Famulatur Orthopädie der Arcus Sportklinik, Pforzheim

08/2010 Famulatur Orthopädie, West Coast Center for Orthopedic Surgery and Sports Medicine, Kalifornien, USA

Examina:

03/2008 Erstes Staatsexamen Medizin

11/2012 Zweites Staatsexamen Medizin

Praktisches Jahr:

08/2011-12/2011 Orthopädie am Kantonsspital Bruderholz, Basel, Schweiz

12/2011-04/2012 Innere Medizin am St. Elisabeth-Krankenhaus, Neuwied

04/2012-07/2012 Chirurgie am St. Elisabeth-Krankenhaus, Neuwied

Frankfurt am Main, November 2012