

Aus der Hals-, Nasen-, Ohren-Klinik und Poliklinik – Plastische Operationen
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die Rolle des Survivin-NO-Signalwegs im
Rahmen der Cochleaimplantation

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

Vorgelegt von

Mathias Fries
aus Merzig

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 26.06.2025

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	I
2	Abkürzungsverzeichnis	V
3	Abbildungsverzeichnis	VIII
4	Tabellenverzeichnis	IX
5	Einleitung / Ziel der Dissertation	1
6	Literaturdiskussion	3
6.1	Anatomische Grundlagen des menschlichen Ohres	3
6.1.1	Ohrmuschel und äußerer Gehörgang	3
6.1.2	Mittelohr	3
6.1.3	Aufbau des Innenohrs	4
6.1.3.1	Vestibularorgan	4
6.1.3.2	Cochlea	5
6.1.3.2.1	Cochleäre Lateralwand	7
6.1.3.2.2	Corti-Organ und Limbus	9
6.1.3.2.3	Spiralganglienzellen	13
6.2	Physiologie der Cochlea	14
6.3	Pathophysiologie der Cochlea	16
6.3.1	Mikrozirkulationsstörungen der Cochlea	16
6.3.2	Lärmexposition	17
6.4	Cochleaimplantation	18
6.4.1	Indikation	19
6.4.2	Schädigung der Cochlea nach Implantation	20
6.4.3	Restgehörerhalt im Rahmen der Cochleaimplantation	21
6.4.4	Pathophysiologie des Restgehörverlustes	23
6.5	Physiologie von Stickstoffmonoxid	24

6.6	Synthese durch Stickstoffmonoxid-Synthasen	25
6.6.1	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS).....	26
6.6.2	Konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthasen	27
6.6.2.1	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS).....	28
6.6.2.2	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).....	29
6.7	Wirkung von Stickstoffmonoxid in der Cochlea	30
6.7.1	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies.....	33
6.7.1.1	Oxidativer Stress in der Cochlea durch ROS und RNS	34
6.7.2	Lärmbelastung und NO	35
6.7.3	Ototoxische Medikamente und NO	36
6.8	Survivin.....	36
6.8.1	Apoptose	38
6.8.2	Survivin-Expression und Rolle in der Onkologie	39
6.8.3	Survivin in der Cochlea	39
6.8.4	Survivin und NO	40
7	Material und Methoden	41
7.1	Material.....	41
7.1.1	Versuchstiere	41
7.1.2	Chemikalien, Geräte und Einmalmaterial.....	41
7.1.3	Zusammensetzung der Pufferlösungen	44
7.2	Methoden.....	44
7.2.1	Sicherstellung der Normalhörigkeit durch ABR.....	44
7.2.2	Tierexperimentelle Cochleaimplantation	45
7.2.3	Herstellung der Paraffinschnitte	45
7.2.4	Immunhistochemische Anfärbung der Paraffinschnitte	46
7.2.5	Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung.....	48
7.2.6	Statistische Auswertung	50
8	Ergebnisse.....	52

8.1	iNOS-Immunreaktion in der Cochlea	52
8.1.1	Lokalisation von iNOS in der Lateralwand	52
8.1.2	Quantifizierung von iNOS in der Lateralwand	52
8.1.3	Lokalisation von iNOS im Corti-Organ	53
8.1.4	Quantifizierung von iNOS im Corti-Organ	54
8.1.5	Lokalisation im Limbus, Nervenfasern und Ganglienzellen.....	55
8.1.6	Quantifizierung von iNOS in Nervenfasern und Ganglienzellen.....	56
8.1.7	Quantifizierung von iNOS im <i>Limbus spiralis</i>	57
8.2	Survivin-Immunreaktion in der Cochlea.....	59
8.2.1	Lokalisation von Survivin in der Lateralwand	59
8.2.2	Quantifizierung von Survivin in der Lateralwand	59
8.2.3	Lokalisation von Survivin im Corti-Organ	60
8.2.4	Quantifizierung von Survivin im Corti-Organ.....	61
8.2.5	Lokalisation im Limbus, Nervenfasern und Ganglienzellen.....	62
8.2.6	Quantifizierung von Survivin in NF und SGZ.....	63
8.2.7	Quantifizierung von Survivin im <i>Limbus spiralis</i>	64
8.3	p-eNOS-Immunreaktion in der Cochlea	66
8.3.1	Lokalisation in der Lateralwand und im Corti-Organ	66
8.3.2	Quantifizierung von p-eNOS in der <i>Stria vascularis</i>	67
8.3.3	Quantifizierung von p-eNOS im Corti-Organ.....	68
8.3.4	Lokalisation im Limbus, Nervenfasern und Ganglienzellen.....	68
8.3.5	Quantifizierung von p-eNOS in NF und SGZ	69
9	Diskussion	71
9.1	Diskussion möglicher Limitationen der angewandten Methodik.....	71
9.1.1	Versuchsdurchführung und Cochlea-Präparation	71
9.1.2	Anfertigung der immunhistochemischen Präparate	71
9.1.3	Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen.....	72
9.2	iNOS-Expression in der Cochlea.....	72

9.2.1	Funktion von iNOS nach Cochleaimplantation.....	73
9.2.2	iNOS-Inhibition nach Cochleaimplantation.....	74
9.2.2.1	Makrophagen-assoziierte Regulation von iNOS	75
9.2.2.2	NO-iNOS-Feedbackmechanismus.....	76
9.3	Survivin-Expression in der Cochlea.....	77
9.3.1	Funktion von Survivin nach Cochlea-Implantation	77
9.3.2	Sättigungseffekt der Survivin-Expression.....	78
9.3.3	Minderexpression von Survivin nach Elektrodenimplantation	79
9.3.4	Survivin-Modulation nach Cochlea-Implantation	79
9.3.5	Mögliche Signalwege der Survivin-Modulation.....	80
9.3.5.1	HIF-1 und Survivin	81
9.3.5.2	NF- κ B und Survivin	81
9.4	Expression der phosphorylierten eNOS in der Cochlea	82
9.4.1	Funktion von p-eNOS nach Cochlea-Implantation	82
9.4.1.1	p-eNOS in der Lateralwand.....	83
9.4.1.2	p-eNOS in Nervenfasern und Spiralganglienzellen.....	84
9.5	Zusammenspiel von Survivin und Stickstoffmonoxid	84
9.5.1	iNOS und Survivin im Rahmen der Cochleaimplantation.....	85
9.5.2	eNOS und Survivin im Rahmen der Cochleaimplantation.....	86
10	Zusammenfassung	88
11	Literaturverzeichnis.....	90
12	Danksagung.....	X
13	Tabellarischer Lebenslauf.....	XI

2 Abkürzungsverzeichnis

AICA	Arteria cerebelli anterior inferior
ABR	automatisierte Hirnstammaudiometrie
Akt1	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
äHZ	äußere Haarzellen
bcl2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CaMKII	Calmodulin-abhängige Kinase II
CAP	Summenaktionspotential (<i>compound action potential</i>)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	Cochleaimplantat
EAS	elektrisch-akustische Stimulation
eNOS	endotheliale NO-Synthase
DAB	Diaminobenzidin
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
iHZ	innere Haarzellen
iNOS	induzierbare NO-Synthase

LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
O ²⁻	Superoxid-Anion
OH·	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
p-eNOS	phosphorylierte endotheliale NO-Synthase
PBS	phosphatgepufferter Salzlösung
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Sham	scheinoperierte Tiere
SNAP	N-Acetyl-Pencillamin
SNP	Natriumnitroprussid
SGZ	Spiralganglienzellen
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	vaskular endothelial growth factor

XIAP

X-linked IAP

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Querschnitt einer Cochlea-Windung	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der <i>Stria vascularis</i>	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Corti-Organ	10
Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Meerschweinchen-Cochlea	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung	47
Abbildung 6: iNOS in der Lateralwand	52
Abbildung 7: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion in der Lateralwand	53
Abbildung 8: iNOS im Corti-Organ	54
Abbildung 9: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion im Corti-Organ	55
Abbildung 10: iNOS im <i>Limbus spiralis</i> und in Spiralganglienzellen	56
Abbildung 11: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion in NF und SGZ	57
Abbildung 12: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion im <i>Limbus spiralis</i>	58
Abbildung 13: Survivin in der Lateralwand	59
Abbildung 14: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion in der Lateralwand	60
Abbildung 15: Survivin im Corti-Organ	61
Abbildung 16: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion im Corti-Organ	62
Abbildung 17: Survivin im <i>Limbus spiralis</i> und in Spiralganglienzellen	63
Abbildung 18: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion in NF und SGZ	64
Abbildung 19: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion im <i>Limbus spiralis</i>	65
Abbildung 20: p-eNOS in der Lateralwand und im Corti-Organ	66
Abbildung 21: Quantifizierung der p-eNOS-Immunreaktion in der SV	67
Abbildung 22: Quantifizierung der p-eNOS-Immunreaktion im Corti-Organ	68
Abbildung 23: p-eNOS im <i>Limbus spiralis</i> und in Spiralganglienzellen	69
Abbildung 24: Quantifizierung der p-eNOS-Immunreaktion in NF und GC	70

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	41
Tabelle 2: Geräte	42
Tabelle 3: Einmalmaterial	43
Tabelle 4: Pufferzusammensetzung	44
Tabelle 5: Schritte der immunhistochemischen Färbung	48

5 Einleitung / Ziel der Dissertation

Die Cochleaimplantation stellt heutzutage einen weitverbreiteten chirurgischen Eingriff zur Wiederherstellung eines tiefgreifenden Hörverlustes dar. Der funktionelle Ersatz des Corti-Organ durch ein Cochleaimplantat (CI) verbessert nicht nur die Hörfunktion, sondern auch die soziale Situation der Patienten (Singh et al., 2015, Davis et al., 2016). Trotz Verwendung spezieller Elektrodendesigns, geringerer Insertionstiefe der Elektrodenträger, schonender Operationstechniken und intraoperativer Glukokortikoidapplikation kann es durch Cochleaimplantation, sofern vorhanden, zur Beeinträchtigung oder Verlust des Restgehörs kommen (Balkany et al., 2006, Gstoettner et al., 2006, Ludwig et al., 2022, Miranda et al., 2014, Tarabichi et al., 2021, Kuthubutheen et al., 2015, Braun et al., 2011). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zur Entwicklung otoprotektiver Ansätze sind bislang im Detail noch unverstanden.

In umfangreichen Vorarbeiten wurde erstmalig gezeigt, dass neben eines direkten strukturellen Schadens durch die Implantation und der Beeinträchtigung der Mikrozirkulation, die durch nitrosativen Stress induzierte Hemmung zytoprotektiver Mechanismen bei Schädigungen des Innenohrs von Bedeutung ist (Dinh et al., 2011, Li et al., 2007, Weiss et al., 2017, Arpornchayanon et al., 2011).

Stickstoffmonoxid (NO) hat innerhalb der Cochlea eine ambivalente Funktion, da es je nach Konzentration unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Prozesse moduliert (Heinrich und Helling, 2012). Das Molekül ist unter anderem für die cochleäre Mikrozirkulation und die interzelluläre Signalkommunikation mittels *gap junctions* von Relevanz und trägt so entscheidend zur Aufrechterhaltung des endocochleären Potenzials bei (Heinrich und Helling, 2012, Zhao et al., 2006). In großen Mengen besitzt Stickstoffmonoxid jedoch ebenfalls zytotoxische Eigenschaften und kann über die Bildung reaktiver Stickstoffspezies zu direkten Zellschäden und indirekt zur Einleitung des programmierten Zelltodes führen (Yamashita et al., 2004, Kurabi et al., 2017).

Survivin (BIRC5) ist ein Protein, welches die Caspase-vermittelte Apoptose hemmt und konnte im Rahmen von Lärmtraumata und Gentamicin-induzierter Ototoxizität innerhalb cochleärer Strukturen nachgewiesen werden (Knauer et al., 2010, Habtemichael et al., 2010a). Survivin als solches wird eine potenzielle otoprotektive Funktion zugesagt (Knauer et al., 2010).

Nachweislich ist Stickstoffmonoxid in der Lage, die Expression des zytoprotektiven Apoptoseinhibitorproteins Survivin in der Cochlea, einschließlich deren lateraler Wand, dem Ort der funktionellen Mikrozirkulation des Corti-Organs, zu modulieren (Engels et al., 2008, Fetz et al., 2009, Habtemichael et al., 2010a, Knauer et al., 2010). Auf welche Weise diese Regelkreise bei einem Implantationstrauma Mikrozirkulation und Hörerhalt beeinflussen und über welche Signalwege sie otoprotektiv oder ototoxisch wirken, ist unbekannt.

Basierend auf den Vorarbeiten wird postuliert, dass es bei Resthörigkeit nach Cochleaimplantation durch direkte und indirekte Traumata der cochleären Strukturen zur eNOS/iNOS-induzierten NO-Bildung und so zu einer Modulation der Survivin-Expression kommt. Diese Stressbedingungen können einen Hörverlust oder auch einen intrinsischen Schutzmechanismus auslösen. Es soll daher erstmalig die Bedeutung des Survivin-NO-Signalweges bei Resthörigkeit im Meerschweinchenmodell untersucht werden. Dabei wird zum einen die Frage beantwortet, inwiefern eine Cochleaimplantation die Survivin-Expression sowie die iNOS-Expression innerhalb der Cochlea reguliert. Zudem richtet sich die Fragestellung dieser Arbeit nach einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase im Sinne einer Phosphorylierung nach Cochlea-Implantation. Die Ergebnisse werden im Kontext der gegenwertigen Literatur gesetzt und die Rolle eines Survivin-NO-Signalweges im Rahmen der Cochlea-Implantation diskutiert.

6 Literaturdiskussion

6.1 Anatomische Grundlagen des menschlichen Ohres

Das menschliche Ohr ist ein paarig angelegtes Sinnesorgan und dient zum einen der akustischen Wahrnehmung und spielt zum anderen eine wichtige Rolle für den Gleichgewichtssinn. Anatomisch lässt sich das Ohr in die drei Bereiche äußeres Ohr, Mittelohr und Innenohr unterteilen.

6.1.1 Ohrmuschel und äußerer Gehörgang

Der äußere Teil des Ohres wird durch die *Auricula auris* (Ohrmuschel) und den *Meatus acusticus externus* (äußerer Gehörgang) gebildet. Letzterer ist etwa drei Zentimeter lang und endet in einem s-förmigen Verlauf am Trommelfell. Er besteht in seinem Verlauf zu zwei Drittel aus Knorpel und zu einem Drittel aus Knochen. Das Gerüst der Ohrmuschel besteht aus elastischem Knorpel, der durch seine Faltung die klassische Form des Ohres erzeugt. Dieses besteht aus verschiedenen Erhebungen, Einsenkungen und Falten. *Auricula* und *Meatus acusticus externus* haben die Funktion, die Schallwellen zum Trommelfell weiterzuleiten. (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010)

6.1.2 Mittelohr

Das Mittelohr besteht aus einem pneumatisiertem Raum im Felsenbein (*Pars petrosa ossis temporalis*), der sogenannten Paukenhöhle (*Cavum tympani*), welche über die eustachische Röhre (*Tuba auditiva*) eine direkte Verbindung zum *Pharynx* aufweist. Zudem gehört der Warzenfortsatz (*Processus mastoideus*), ein mit Schleimhaut ausgekleideter pneumatisierter Hohlraum im *Os temporale*, ebenfalls per definition zum Mittelohr. Die *Tuba auditiva* dient zum Druckausgleich im Mittelohr. Den Übergang von äußerem Ohr zu Mittelohr stellt das Trommelfell (*Membrana tympani*), eine schwingungsfähige Membran, dar. Über die sogenannten Gehörknöchelchen Hammer (*Malleus*), Amboss (*Incus*) und Steigbügel (*Stapes*) erfolgt die Schallleitung von der *Membrana tympani* zum ovalen Fenster (*Fenestra ovalis*) und damit zum Innenohr. Dort wird eine Flüssigkeit (Perilymphe) in Bewegung versetzt. Das Trommelfell wird durch die Schallwellen in der Luft in Schwingung versetzt und leitet die Energie über die Gehörknöchelchen in das Innenohr weiter. Mittels dieses

Schalleitungsapparates findet eine Impedanzanpassung statt. Ohne diese würde ein Großteil der Schallwellen beim Mediumwechsel von Luft zu Perilymphe reflektiert werden. Es muss folglich ein höherer Druck am ovalen Fenster wirken als am Trommelfell, um die Perilymphe im Innenohr in Schwingung zu versetzen. Diese Impedanzwandlung wird über zwei Mechanismen erreicht. Zum einen sind die Gehörknöchelchen über Gelenke miteinander verbunden und führen über eine Hebelwirkung zu einer Kraftverstärkung. Zum anderen sorgt das Verhältnis der Grundfläche zwischen Trommelfell und Steigbügel für eine Druckerhöhung. Diese beiden Mechanismen sorgen dafür, dass der Druck auf dem ovalen Fenster ungefähr 20-mal höher ist als der Druck auf dem Trommelfell und die Reflexionsverluste, durch die sich ändernden Widerstände verringert werden (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

6.1.3 Aufbau des Innenohrs

Eingebettet in das Felsenbein besteht das Innenohr aus einem knöchernen Gangsystem, in welchem sich ein membranöses (häutiges) Labyrinth befindet. Zwischen dem knöchernen und dem häutigen Labyrinth befindet sich der Perilymphraum, in welchem sich die Perilymphe befindet. Diese hat eine ähnliche Elektrolytzusammensetzung wie der *Liquor cerebrospinalis* (Hirnwasser). Über den *Ductus perilymphaticus* steht der Perilymphraum mit dem Subarachnoidalraum in Verbindung. Innerhalb des häutigen Labyrinthes befindet sich der sogenannte Endolympdraum, welcher mit einer kaliumreichen und natriumarmen Endolymphe gefüllt ist. Im *Saccus endolymphticus* erfolgt die Rückresorption der Endolymphe. Zum Innenohr gehören die Gehörschnecke (*Cochlea*) und das Gleichgewichtsorgan (Vestibularorgan) (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

6.1.3.1 Vestibularorgan

Anatomisch besteht das Gleichgewichtsorgan aus den beiden Makulaorganen *Sacculus* und *Utriculus* sowie drei Bogengängen. Das Vestibulum dient der Detektion von Dreh- und Linearbeschleunigungen und ist damit essentiell für den Gleichgewichtssinn und die räumliche Orientierung (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

Auf einer knöchernen Erhebung (*Crista ampullaris*) im Endolymphraum sitzt das Sinnesepithel bestehend aus Sinneszellen (Haarzellen) und Stützzellen. Die Haarzellen ragen mit ihren Stereovilli in eine Gallertmasse, welche aus Mukopolysacchariden besteht (*Cupula ampullaris*). In den Makularorganen beinhaltet die *Cupula* zusätzlich Calciumkarbonat-Kristalle, die sogenannten Otolithen. Dadurch besitzt die *Cupula* in den Makulaorganen eine höhere Dichte als die sie umgebene Endolymphe. Durch Trägkeitsphänomene kommt es bei Bewegungen zum Abknicken der Stereovilli. Dadurch werden Kaliumkanäle geöffnet und Kalium strömt entlang des Konzentrationsgradienten von der Endolymphe in die Zelle hinein und löst eine Depolarisation aus. Dieser Impuls wird über die bipolaren Zellen des *Ganglion vestibulare* zum Stammhirn weitergeleitet und dort verarbeitet (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

Die makulären Organe *Sacculus* und *Utriculus* dienen der Detektion von Linearbeschleunigungen. Sie sind senkrecht zueinander orientiert wobei der *Sacculus* für die vertikale und der *Utriculus* für die horizontale Linearbeschleunigung verantwortlich ist (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

Die drei Bogengänge (*Canales semicirculares anterior, posterior und lateralis*) stehen ebenfalls senkrecht zueinander und dienen der Detektion von Drehbeschleunigungen. In den Ampullen befindet sich das dafür notwendige Sinnesepithel (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

6.1.3.2 Cochlea

Die Hörschnecke befindet sich ebenfalls als knöcherner Hohlraum im Felsenbein und ist in drei Gänge gegliedert, welche sich schneckenförmig um eine knöchernen Achse (*Modiolus*) winden. Die Spitze der Cochlea (*Cupula cochleae*) zeigt dabei nach vorne unten und die Cochlea-Basis (*Basis cochleae*) zeigt in Richtung *Meatus acusticus internus*. Beim Menschen besitzt die Cochlea zweieinhalb Windungen. Vom *Modiolus* zieht eine dünne Knochenleiste (*Lamina spiralis ossea*) nach lateral. An ihr setzen die Reißner- und Basilarmembran an und unterteilen die Hörschnecke in drei Kompartimente. Die drei Gänge lassen sich in die mit Perilymphe gefüllte *Scala vestibuli* und *Scala tympani* sowie die mit Endolymphe gefüllte *Scala media (Ductus cochlearis)* unterteilen. Die *Scala vestibuli* beginnt am ovalen Fenster und geht am

Helicotrema in die *Scala tympani* über. Diese schließt mit dem runden Fenster (*Fenestra cochleae*), welches zur Paukenhöhle hin ragt, ab. Die *Scala media* gehört zum endolymphatischen System und ist nach oben hin durch die Reisner-Membran und nach unten hin durch die *Lamina spiralis ossea* und die Basilarmembran vom Perilymphraum abgegrenzt (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010). Die Reisner-Membran besteht aus zwei Zellschichten, einer Epithelschicht und einer Fibroblastenschicht (Duvall und Rhodes, 1967). Sie enthält verschiedene Ionen-Kanäle. (Yeh et al., 1997). Mit dem Corti-Organ sitzt innerhalb des *Ductus cochlearis* das eigentliche Sinnesorgan der Cochlea, welches für die Hörwahrnehmung verantwortlich ist. Die *Scala media* ist über den *Ductus reuniens* mit dem Endolymphraum des Vestibularorgans verbunden (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

Die Perilymphe ähnelt in ihrer Zusammensetzung dem *Liquor cerebrospinalis*. Sie ist natriumreich und kaliumarm. Sie wird als eine Art Ultrafiltrat des *Liquor cerebrospinalis* angesehen. Die Endolymphe ähnelt einer intrazellulären Elektrolytzusammensetzung. Sie ist natriumarm und kaliumreich (Raphael und Altschuler, 2003). Die Perilymphe wird von den Marginalzellen der *Stria vascularis* in der Lateralwand produziert und im *Sacculus endolymphaticus* resorbiert. Die Epithelzellen des membranösen Labyrinthes sind mit *tight junctions* ausgestattet, die dafür sorgen, dass die Endolymphe nicht in den Interzellularräum abfließen kann (Raphael und Altschuler, 2003). Die unterschiedlichen Konzentrationen an Ionen in den jeweiligen Kompartimenten der Hörschnecke sind essentiell für den physiologischen Ablauf der Hörwahrnehmung.

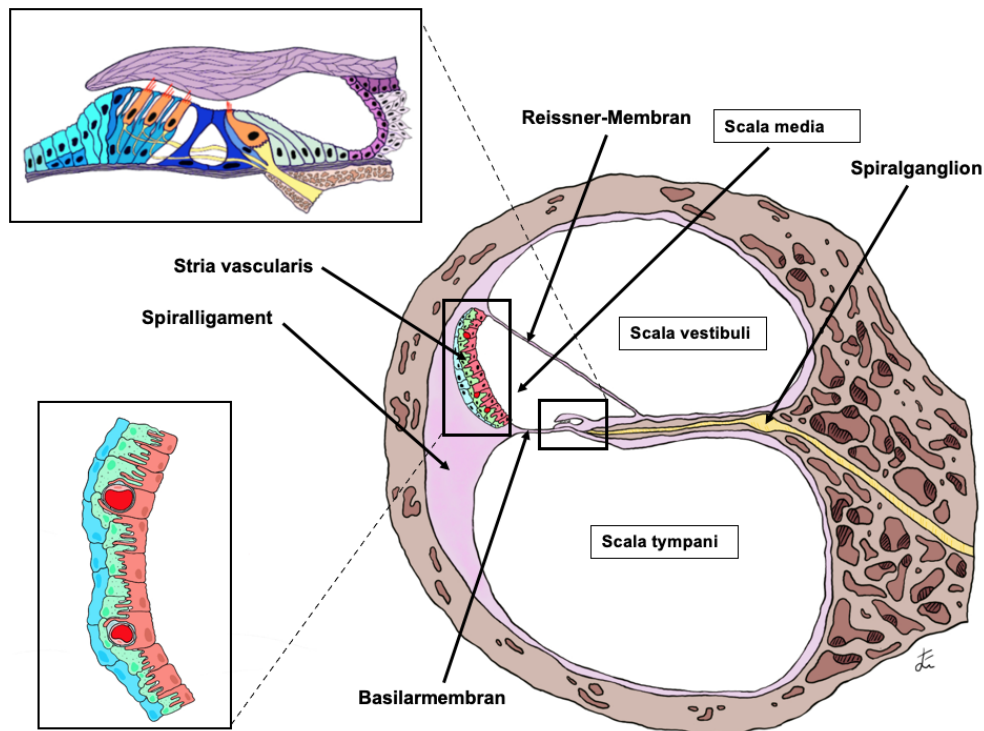


Abbildung 1: Schematischer Querschnitt einer Cochlea-Windung modifiziert nach Habtemichael et al. (2010) und Samaha et al. (2021)

6.1.3.2.1 Cochleäre Lateralwand

Die Lateralwand besteht aus der *Stria vascularis* sowie dem spiralen Ligament und bildet die laterale Begrenzung der Scala media. Die *Stria vascularis* besteht aus einem dreischichtigen prismatischen Epithel, welches sich von medial nach lateral in Marginal-, Intermediär- und Basalzellen unterteilen lässt (Raphael und Altschuler, 2003).

Die Marginalzellen zeichnen sich durch eine hexagonale und polarisierte Form aus. Sie sind mit Mikrovilli besetzt und untereinander mittels *tight junctions* verbunden (Anniko, 1976). Durch die enge Verbindung der Zellen untereinander wird die Endolymphe vom restlichen Gewebe der Lateralwand abgegrenzt. Die Marginalzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des endolympathischen Potenzials. Wichtig dabei ist auch eine enge Vernetzung der Zellen untereinander mittels *gap junctions* (Wu et al., 2019). Die Zellen sorgen mittels Na^+ -Kanäle, einem Na^+ - K^+ -2 Cl^- -Cotransporter sowie einer Na^+ - K^+ -ATPase für eine hohe Kaliumkonzentration und eine niedrige Natriumkonzentration in der Endolymphe

(Mizuta et al., 1997, Iwasa et al., 1994, Wangemann et al., 1995, Erichsen et al., 1996, Raphael und Altschuler, 2003).

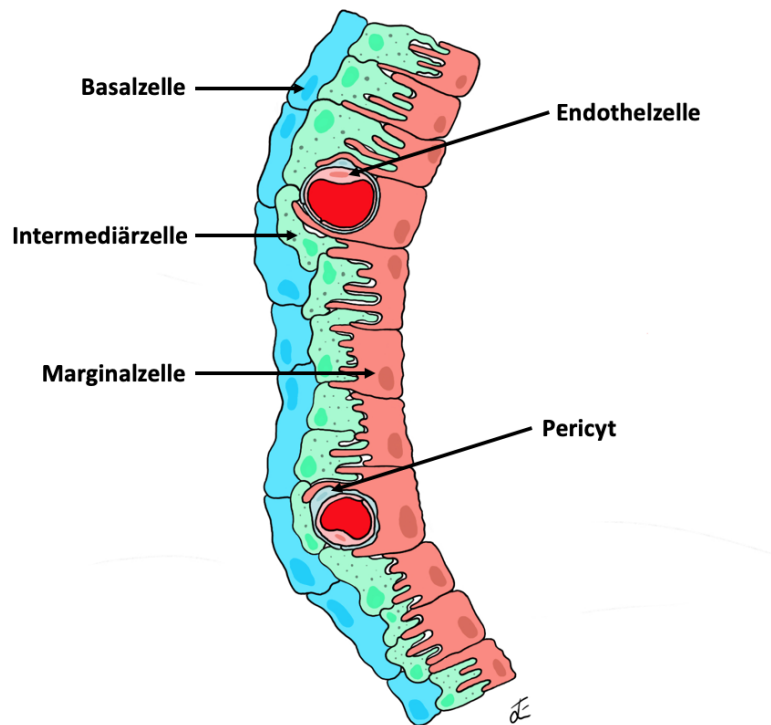


Abbildung 2: Schematische Darstellung der *Stria vascularis* modifiziert nach Samaha et al (2021)

Die Intermediärzellen der *Stria vascularis* enthalten Melanin und werden im weiteren Sinne als Melanozyten angesehen (Hilding und Ginzberg, 1977). Sie stammen embryologisch aus der Neuralleiste (Renauld et al., 2022). Sie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials, wobei die genauen physiologischen Mechanismen noch Grundlage aktueller Forschungen sind. (Hibino et al., 2010, Takeuchi et al., 2000, Ando und Takeuchi, 1999, Steel und Barkway, 1989). Eine Interaktion mit den Marginalzellen wird angenommen (Locher et al., 2015).

Die Basalzellen bilden die Grenzschicht zwischen *Stria vascularis* und spiralem Ligament. Da sie ebenfalls *tight junctions* und keine $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ besitzen, wird davon ausgegangen, dass sie eine Barrierefunktion inne haben (Forge, 1984, Kitajiri et al., 2004).

Die *Stria vascularis* enthält zudem ein Kapillarbett, welches essentiell für die Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase ist. Die Kapillaren bilden eine Blut-

Labyrinth-Schranke, welche ebenfalls den Einstrom von toxischen Substanzen in die Cochlea verhindert (Shi, 2011). Diese Barriere besteht aus Endothelzellen, welche untereinander mittels *tight junctions* verbunden sind, einer basalen Membran, Perizyten und perivaskulären Makrophagen (Sakagami et al., 1982, Shi, 2009, Shi, 2010, Shi et al., 2008).

Das spirale Ligament besteht zum größten Teil aus Fibrozyten, extrazellulärem Bindegewebe und Kapillaren (Henson et al., 1984). Das spirale Ligament hat unterschiedliche Funktionen. Es dient zur Verankerung der *Stria vascularis* und über das Kapillarnetz der metabolischen Versorgung der Marginal-, Intermediär- und Basalzellen (Henson et al., 1984, Raphael und Altschuler, 2003). Zudem steht das spirale Ligament mit der Basilarmembran in Verbindung. Es wird davon ausgegangen, dass die Fibrozyten im spiralen Ligament mit ihren kontraktile Elementen die Spannung der Basilarmembran beeinflussen (Henson und Henson, 1988, Sim, 1990). Ebenfalls sind die Fibrozyten des spiralen Ligaments an der Kaliumhomöostase beteiligt (Spicer und Schulte, 1991, Wangemann, 2006, Weber et al., 2001). Es steht in Kontakt mit den perilymphatischen Räumen der *Scala vestibuli* und *Scala tympani* und mittels Na^+ - K^+ -ATPasen und *gap junctions* soll es den Transport von K^+ - Ionen aus der Perilymphe in die Endolymphe unterstützen (Spicer und Schulte, 1991).

6.1.3.2.2 Corti-Organ und Limbus

Das Corti-Organ ist das eigentliche Sinnesorgan, welches für die Wahrnehmung von akustischen Reizen verantwortlich ist und befindet sich in der *Scala media*. Es sitzt der Basilarmembran sowie der *Lamina spiralis ossea* auf und besteht aus Stütz- und Sinneszellen, der Tektorialmembran und den Nervenenden der bipolaren Spiralganglienzellen.

Das Sinnesepithel sitzt mit seinen Stütz- und Haarzellen einer schwingungsfähigen Membran, der sogenannten Basilarmembran auf. Diese begrenzt die *Scala media* von der *Scala tympani* nach unten hin ab und setzt sich aus Mesothelzellen und Extrazellulärmatrix zusammen (Cabezudo, 1978, Raphael und Altschuler, 2003). Die Membran lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen. Die *Pars tecta* liegt medial, schließt an die *Lamina spiralis ossea* an und wird durch diese verstärkt. Aufgrund dessen ist dieser Teil der Membran in seiner Schwingungsfähigkeit eingeschränkt (Raphael und

Altschuler, 2003). Die *Pars pectinata* liegt lateral und grenzt an das spirale Ligament und ist schwingungsfähiger. Die Dicke der Basilarmembran nimmt zur Spitze der Cochlea hin zu. Umgekehrt verhält es sich mit der Spannung der Basilarmembran, diese nimmt zum Apex hin ab (Nadol, 1988, Roth und Bruns, 1992). Jeder Bereich der Membran, von Basis bis Apex, hat dadurch eine eigene Elastizität und wird von bestimmten Frequenzen unterschiedlich stark zu schwingen angeregt. Dieses Phänomen nennt sich Tonotopie (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010)

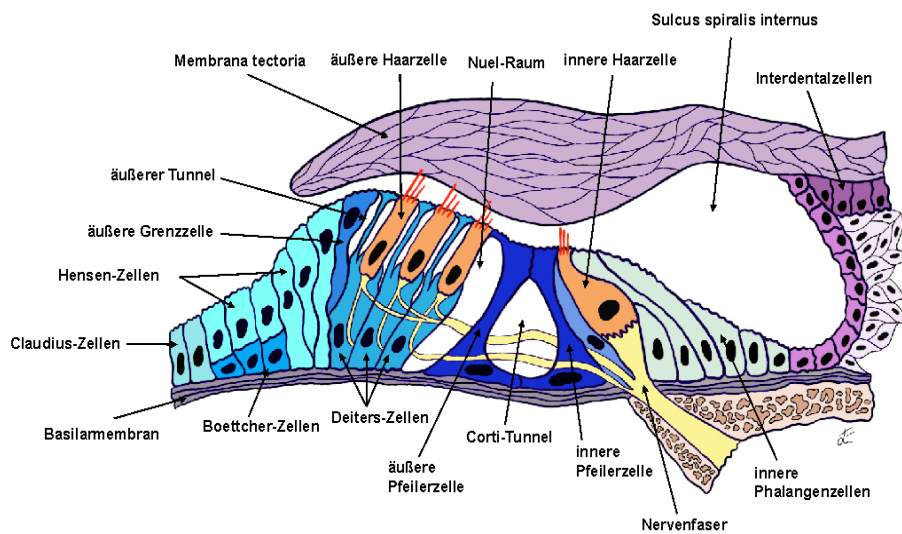


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Corti-Organ modifiziert nach Habtemichael et al. (2010)

Medial auf der *Lamina spiralis ossea* aufsitzend befindet sich der Limbus (*Limbus spiralis*). Dieser besteht aus Fibrozyten und Interdentalzellen und grenzt nach lateral an den inneren Sulcus. Studien zeigen, dass die medialen Interdentalzellen eine Rolle im Kalium-Recyclingmechanismus von Peri- zu Endolymphe spielen (Spicer et al., 2000). Die Interdentalzellen befinden sich oberhalb der Fibrozyten und produzieren ebenfalls eine extrazelluläre Matrix, welche die sogenannte Tektorialmembran (*Membrana tectoria*) bildet. Diese liegt dem Corti-Organ von oben auf und steht in Verbindung mit den Stereozilien der äußeren Haarzellen (äHZ) (Kimura, 1966). Ein Kontakt zu den inneren Haarzellen (iHZ) konnte bisher nicht beschrieben werden

(Matsumura, 2001). Hauptsächlich aus Kollagenen und Glykopeptiden bestehend, ist die *Membrana tectoria* zellfrei (Goodyear und Richardson, 2018). Namensgebend ist das für das Innenohr spezifische alpha-Tectorin (Goodyear et al., 2017). Sie spielt eine Rolle in der cochleären Signalverarbeitung (Lukashkin et al., 2010).

Die eigentlichen Sinneszellen des Corti-Organ stellen die Haarzellen dar (Raphael und Altschuler, 2003). Es lassen sich die inneren (iHZ) von den äußeren (äHZ) Haarzellen abgrenzen (Raphael und Altschuler, 2003). Die iHZ haben eine rein sensorische Funktion, sie nehmen über Stereozilien im apikalen Bereich mechanische Reize wahr und leiten dieses Signal in Form einer Neurotransmitterausschüttung in den basalen Zellabschnitten an die bipolaren Nervenzellen des N. vestibulocochlearis weiter (Raphael und Altschuler, 2003). Die äHZ wirken als qualitativer und quantitativer frequenzspezifischer Signalverstärker und modulieren das Hörsignal (Ashmore, 2008, Patuzzi, 2011, Raphael und Altschuler, 2003).

Die iHZ befinden sich medial des Corti-Tunnels. Lateral grenzen sie an die inneren Pfeilerzellen und zu den anderen drei Seiten an die Phalangenzellen. Der apikale Zellabschnitt ragt mit seinen Stereozilien in die Endolymphe der *Scala media* (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010). Sie sind auf der *Pars tecta* der Basilarmembran lokalisiert aufgrund dessen ihre Zellkörper bei akustischen Reizen nicht vibrieren (Raphael und Altschuler, 2003). Apikal besitzen die iHZ etwa 20-50 aktinhaltige Stereozilien, die in ihrer Anzahl zum Apex hin abnehmen und untereinander durch dünne proteinhaltige Fäden, den sogenannten *tip links*, miteinander verbunden sind. (Raphael und Altschuler, 2003, Flock und Cheung, 1977, Kachar et al., 2000). Zudem variieren sie in ihrer Länge, wobei sich das längste Stereozilium lateral befindet und die Länge nach medial hin abnimmt (Ashmore, 2008). Durch eine Schwingung der Endolymphe kommt es an den Stereozilien zu einer Abscherbewegung. Verläuft diese in Richtung des längsten Stereoziliums, öffnen sich Kaliumkanäle und die iHC wird depolarisiert (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010). Über eine Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen kommt es letzten Endes zu einer Transmitterausschüttung und Signalweiterleitung (Raphael und Altschuler, 2003).

Die äHZ besitzen einen ähnlichen Aufbau wie die iHZ, sind in drei Reihen angeordnet und sitzen speziellen Stützzellen, den Deiters-Zellen, auf (Raphael und Altschuler, 2003). Medial schließen die äHZ mit den Hensen-Zellen ab, während sie lateral an die

Corti-Lymphe des Nuel-Raums grenzen (Raphael und Altschuler, 2003). Diese hat eine ähnliche Elektrolytzusammensetzung wie die Perilymphe. Wie die iHZ besitzen auch die äHZ Stereozilien (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010). Das Größte findet sich dabei wiederum lateral und ragt mit seiner Spitze in die *Membrana tectoria* und ist in dieser verankert (Raphael und Altschuler, 2003). Im Zytoskelett der Zellen befinden sich Aktin und Mikrotubuli mit ihren assoziierten Proteinen (Flock et al., 1982). Wie die iHZ besitzen sie Kationenkanäle, welche bei Scherbewegungen der Stereozilien öffnen und zur Depolarisation der Zelle führen (Raphael und Altschuler, 2003). Es kommt nun jedoch nur bedingt zu einer basalen Transmitterausschüttung. Vielmehr besitzen die äHZ ein lateral angelegtes Zisternensystem sowie ein spezielles Motorprotein, Prestin, welches bei Depolarisation zu einer Verkürzung und bei Repolarisation zu einer Elongation der gesamten Zelle führt und das Corti-Organ zusätzlich in Schwingung versetzt. (Zheng et al., 2000, Ashmore, 2008, Triffo et al., 2019). Basal besitzen die Haarzellen sowohl Afferenzen als auch Efferenzen. Die Efferenzen aus dem *Nucleus olivaris superior* und dem *Corpus trapezoideum* sind dabei jedoch überwiegend (Raphael und Altschuler, 2003). Durch die Längenänderung der Zelle und der dadurch bedingten Schwingungsverstärkung dienen die äHZ der Amplifikation von Hörsignalen und der gezielten Verstärkung von bestimmten Frequenzen (Triffo et al., 2019, Ashmore, 2008).

Im Corti-Organ befinden sich verschiedene Stützzellen. Diese haben zum einen eine strukturgebende Funktion, zum anderen spielen sie aber auch eine Rolle in der Elektrolythomöostase, indem sie K^+ -Ionen recyceln und über Fibrozyten an die *Stria vascularis* zurückführen (Kikuchi et al., 2000a, Wangemann, 2002b). Sie kommunizieren dabei mittels *gap junctions*, was deren wichtige Bedeutung für die Hörwahrnehmung untermauert (Forge et al., 1999, Jagger und Forge, 2015). Es ist ebenfalls beschrieben, dass die Stützzellen eine efferente Innervation erfahren und so über ihre *gap junctions* einen Einfluss auf das Hörempfinden haben (Zhao et al., 2022). Die Struktur des Corti-Organ beinhaltet drei Tunnelsysteme, welche mit Corti-Lymphe gefüllt ist und miteinander kommunizieren. Die Corti-Lymphe ähnelt in ihrer Zusammensetzung der Perilymphe. Die inneren und äußeren Pfeilerzellen begrenzen den Corti-Tunnel. Die äHZ sind vom Nuel-Raum umgeben und sitzen den Deiters-Zellen auf. Nach Lateral befindet sich der äußere Tunnel, welcher durch Deiters-Zellen und eine äußere Grenzzelle begrenzt wird. Über Hensen-, Boettcher- und Claudius-Zellen kommt lateral der Übergang zum Epithel der Lateralwand (Raphael und

Altschuler, 2003, Merchant und Joseph B. Nadol, 2010). Die apikalen Anteile der Stütz- und Sinneszellen sind mittels *tight junctions* verbunden und bilden die Retikularlamina. Diese bildet zum einen eine Barriere zwischen Endolymphe und Corti-Lymphe und zum anderen sorgt sie für die mechanische Stabilität und Integrität der iHZ und äHZ (Leonova und Raphael, 1997, Raphael und Altschuler, 2003).

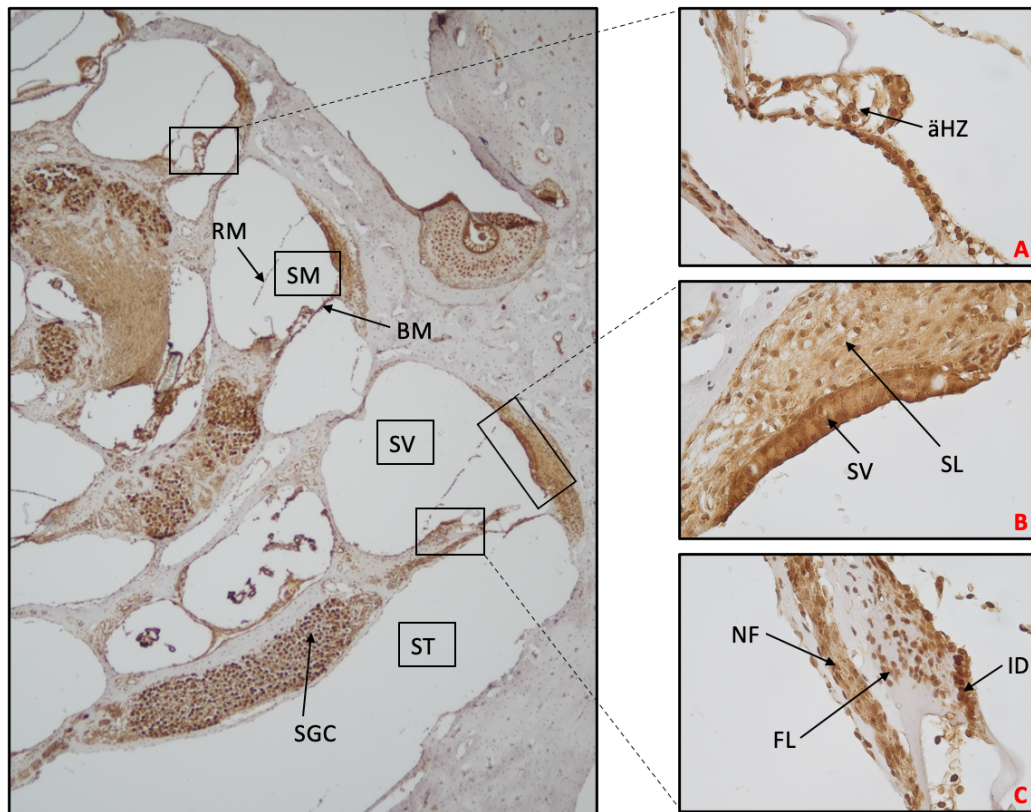


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahme einer Meerschweinchen-Cochlea
A: Corti-Organ mit exemplarisch markierten äußeren Haarzellen (äHZ); **B:** Lateralwand mit Stria vascularis (SV) und Spiralligament (SL); **C:** Limbus mit Nervenfasern (NF), Fibrozyten (FL) und Interdentalzellen (ID); **RM:** Reisner-Membran; **BM:** Basilarmembran; **SGC:** Spiralganglienzellen; **SV:** Scala vestibuli; **SM:** Scala media; **ST:** Scala tympani. Anfärbung mittels Survivin-Antikörper.

6.1.3.2.3 Spiralganglienzellen

Die Zellkörper der Spiralganglienzellen (SGZ) liegen im Rosenthal-Kanal. Dieser windet sich spiralförmig um die zentrale knöcherne Achse der Cochlea. Die Dendriten ziehen durch die *Lamina spiralis ossea* zu den jeweiligen Haarzellen. Den größten Teil bilden dabei die Afferenzen von den Synapsen der iHZ. Ebenfalls ziehen Efferenzen zu den äHZ. Es lassen sich zwei Typen von SGZ unterscheiden. Die bipolaren Typ I SGZ machen 90-95% aus und bilden eine Synapse mit den inneren Haarzellen. Die

kleineren pseudounipolaren Typ II SGZ stehen mit den äHZ in Kontakt und machen nur etwa 5% der SGZ aus (Raphael und Altschuler, 2003). Über den *N. vestibulocochlearis* ziehen die Axone der SGZ zum Hirnstamm (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

6.2 Physiologie der Cochlea

Die Schallwellen gelangen durch den *Meatus acusticus externus* zum Trommelfell und versetzen dieses in Schwingung. Über die Gehörknöchelchen Hammer, Amboss und Steigbügel wird die Energie auf das ovale Fenster und somit auf die Cochlea übertragen. Dort wird das ovale Fenster nach innen ausgelenkt und versetzt dadurch die *Scala vestibuli* und deren Perilymphe in Schwingung. Der Mechanismus der Impedanzanpassung ist detailliert Kapitel 6.1.2 zu entnehmen. Es entsteht eine Welle, die innerhalb der Perilymphe durch die *Scala vestibuli* über das Helicotrema in die *Scala tympani* wandert. Das *Fenestra cochleae* (runde Fenster) wird durch die Welle in Richtung Mittelohr ausgelenkt und die Welle dadurch abgedämpft (sog. Wechseldruckphänomen). Im Verlauf wandert die Welle in die gegenläufige Richtung und führt zur Auslenkung des ovalen Fensters Richtung Mittelohr. So entsteht ein Auf- und Abwärtsschwingung der Reissner- und Basilarmembran sowie der Endolymphe in der *Scala media*, welche letztendlich zu einer Auslenkung der Haarzellen und einem elektrischen Signal führt. Die Welle wandert von Schneckenbasis zur Schneckenspitze und führt dabei zu unterschiedlich starken Schwingungen. Dies ist abhängig von der jeweiligen Frequenz, welche an bestimmten Orten der Cochlea zu einer maximalen Auslenkung und Schwingung der Endolymphe führt. In Richtung Basis haben hohe Frequenzen ihr Amplitudenmaximum. Tiefe Frequenzen lenken die Bereiche nahe der Schneckenspitze maximal aus. Dieser Mechanismus wird Tonotopie genannt und sorgt dafür das ein akustischer Reiz innerhalb der Cochlea in seine verschiedenen Frequenzen aufgeteilt wird und die korrespondierenden Cochlea-Abschnitte maximal in Schwingung versetzt werden. Das menschliche Ohr ist in der Lage Frequenzen zwischen 20 Hz und 20 kHz wahrzunehmen (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

Kommt es durch die Wanderwelle am jeweiligen Amplitudenmaximum zu einer Schwingung der Basilarmembran und Endolymphe, so wird die *Membrana tectoria* ebenfalls in Bewegung gesetzt und verschiebt sich im Verhältnis zu den äHZ. Werden dabei die Stereozilien zum längsten Stereozilium hin ausgelenkt, öffnen sich

mechanosensible Kationenkanäle. Durch einen Einstrom von Kalium-Ionen wird die Zelle depolarisiert (Merchant und Joseph B. Nadol, 2010). In unmittelbarer Nähe zur Lateralwand der äHZ befindet sich das Motorprotein Prestin, welches bei Zelldepolarisation Chlorid-Ionen abgibt und dadurch zu einer Verkürzung der gesamten Zelle führt (Ashmore, 2019). Die darauffolgende Hyperpolarisation durch einen Ausstrom von Kalium-Ionen führt zu einer Aufnahme von Chlorid-Ionen in das Prestin-Molekül und somit zu einer Verlängerung der äHZ (Frolenkov et al., 1998, Ge et al., 2021). Durch diese Auf- und Abbewegung der äHZ wird die Endolymphe unterhalb der Membrana tectoria vermehrt in Bewegung versetzt und sorgt für eine Erregung der iHZ. Dieser Verstärkungsmechanismus findet vor allem in den Regionen der frequenzspezifischen Amplitudenmaxima statt und verstärkt dort die Signalwahrnehmung (Triffo et al., 2019, Ashmore, 2008, Ashmore et al., 2000).

Die Motilität der äHZ kann zudem durch efferente Bahnen aus dem *Nucleus olivaris superior* und dem *Corpus trapezoidem* beeinflusst werden. Mittels des Neurotransmitters Acetylcholin wird die Zelle hyperpolarisiert und der cochleäre Verstärkermechanismus der Haarzelle moduliert (Raphael und Altschuler, 2003).

Durch den vermehrten Endolymphstrom werden die Stereozilien der iHZ ausgelenkt und es kommt auch hier, bei Auslenkung zum längsten Stereozilium hin, zu einer Öffnung von Kationen-Kanälen mit anschließender Depolarisation der Sinneszelle durch Einstrom von Kalium- und Calcium-Ionen (Raphael und Altschuler, 2003). Dieser Einstrom erfolgt aufgrund der elektrischen Potenzialdifferenz über der Zellmembran. Daraufhin öffnen sich an der lateralen Zellwand und basal spannungsabhängige Calcium-Kanäle, was wiederum zu einer präsynaptischen Glutamat-Ausschüttung führt. Werden die Stereozilien in die gegengesetzte Richtung ausgelenkt, schließen die mechanosensiblen Kationen-Kanäle und die Neurotransmitterausschüttung sistiert. Die Kationen-Kanäle sind in vertikaler Ruheposition der Stereozilien teilweise geöffnet und sorgen für eine geringe Ausschüttung von Glutamat. Dies wiederum führt zu einer gewissen Spontanaktivität innerhalb des auditorischen Systems in Abwesenheit von akustischen Reizen. Die Frequenz der Stereozilienbewegung stimmt mit der Frequenz des akustischen Reizes überein, was wiederum zu einer ständigen Signalübertragung an der Synapse führt. Die iHZ interagieren mit bipolaren Typ I SGZ. Durch Bindung von Glutamat an ionotrope Rezeptoren wird das Signal letzten Endes weitergeleitet (Raphael und Altschuler, 2003, Merchant und Joseph B. Nadol, 2010).

6.3 Pathophysiologie der Cochlea

Eine Schädigung der Cochlea kann durch verschiedene Prozesse entstehen und führt dabei zur Innenohrschwerhörigkeit bis hin zum kompletten Hörverlust. Dabei spielen metabolische beziehungsweise mechanische Schädigungen sowie Durchblutungsstörungen des Innenohrs eine besondere Rolle. Diese mechanischen und metabolischen Störungen spielen beispielsweise bei verstärkter Lärmexposition, wie sie auch im Rahmen einer Cochleaimplantation vorkommen kann, eine Rolle (Pau et al., 2007). Ebenso kann es durch die Implantation zu direkten Schädigungen einzelner Innenohrstrukturen kommen (von Ilberg et al., 2011, Roland und Wright, 2006). Genauer dazu wird in Kapitel 6.4.2 ausführlicher erläutert Weiterhin besitzen eine Vielzahl an Medikamenten, wie beispielsweise Aminoglykoside, Zytostatika und Schleifendiuretika ototoxische Eigenschaften (Yu et al., 2021). Erkrankungen wie der Morbus Menière, der idiopathische Hörsturz, endolymphatischer Hydrops, die Presbyakusis (Altersschwerhörigkeit) und genetische Erkrankungen wie beispielsweise das Alport-Syndrom führen letzten Endes ebenfalls zu einer Innenohrschwerhörigkeit (Yu et al., 2021, Young, 2020).

6.3.1 Mikrozirkulationsstörungen der Cochlea

Die Cochlea mit ihren Strukturen wird durch die *Arteria cerebelli anterior inferior* (AICA), einem Ast der A. basilaris, mit Blut versorgt (Shi, 2011). Eine gute Durchblutung des Innenohrs spielt eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials und eine normale Produktion der Endolymphe (Shi, 2011). Störungen der cochleären Mikrozirkulation werden bereits seit langem als mögliche Ursachen für Lärmschwerhörigkeit, Altersschwerhörigkeit, den idiopathischen Hörsturz und Morbus Menière angesehen, da die sensorischen Haarzellen besonders empfindlich auf eine Ischämie reagieren (Shi, 2011, Wangemann, 2002a, Nuttall, 1999). Die Blutversorgung des Innenohrs wird durch einen Autoregulationsmechanismus sichergestellt, der auch bei schwankenden Blutdruckverhältnissen, eine ausreichende Durchblutung gewährleistet (Nakashima, 1999). Für diese Autoregulation spielen sowohl zelluläre Strukturen wie glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibrozyten, als auch lokale Metaboliten, wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine, Adenosintriphosphat (ATP), Laktat und Kalium eine Rolle und werden aktuell in der Wissenschaft diskutiert (Shi, 2011).

6.3.2 Lärmexposition

Das Innenohr kann durch eine erhöhte Lärmbelastung auf verschiedene Art und Weise geschädigt werden, was letzten Endes zu einem zeitlich begrenzten bis hin zu einem permanenten Hörverlust führen kann. Dabei sind vor allem die Haarzellen Ausgangspunkt für mechanische und metabolische pathophysiologische Veränderungen. (Kurabi et al., 2017).

Eine temporäre Veränderung der Hörschwelle (*temporary threshold shift*, TTS) nach Lärmbelastung kann durch unterschiedliche pathophysiologische Prozesse entstehen. Eine Rolle bei der TTS spielt die Entkopplung äHZ-Stereozilien von der Tektorialmembran (Nordmann et al., 2000). Ebenfalls können die *tip links* zwischen den Stereozilien reversibel brechen und diese zwischenzeitlich in ihrer Funktion einschränken, was wiederum zu einer reduzierten mechanoelektrischen Transduktion führt (Zhao et al., 1996, Kurian et al., 2003). Des Weiteren kommt es bei Überstimulation der iHZ zu einer gesteigerten Glutamat-Ausschüttung an den Synapsen, welche wiederum zu einer Exzitotoxizität der SGZ führt (Puel et al., 1998). Es konnte zudem gezeigt werden, dass durch die Gabe des Antioxidans D-Methionin ein TTS verhindert werden konnte, welches die Rolle von oxidativen und nitrosativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies hervorhebt (Cheng et al., 2008). Darüber hinaus konnte in diversen Versuchen gezeigt werden, dass eine Lärmbelastung mit Veränderungen des cochleären Blutflusses einhergeht (Thorne und Nuttall, 1987, Kimura, 1986, Shin et al., 2019).

Eine permanente Veränderung der Hörschwelle (*permanent threshold shift*, PTS) kommt durch eine irreversible Schädigung der Haarzellen zustande (Kurabi et al., 2017). Schädigungen der Lateralwand und der Neurone spielen jedoch ebenfalls eine Rolle (Kurabi et al., 2017). Eine massive Lärmbelastung kann zu direkten Schäden an den Stereozilien der Haarzellen führen und deren Funktion erheblich einschränken und sogar irreversibel aufheben (Liberman, 1987, Liberman und Beil, 1979). Eine starke akustische Überstimulation kann darüber hinaus die komplette Integrität des Corti-Organ zerstören, dabei die *tight junctions* zwischen Haarzellen und Stützzellen aufheben und folglich die Barrierefunktion der Retikularlamina aufheben (Kurabi et al., 2017). Dies führt zum Einstrom von Endolymph in die Cortilymphe und schlussendlich zum Zelluntergang der Haarzellen (Kurabi et al., 2017, Ahmad et al., 2003). Es konnte

zudem gezeigt werden, dass durch akustische Überstimulation Typ II- und Typ IV-Fibrozyten im spiralen Ligament untergehen (Wang et al., 2002). Diese am K⁺-Recyclingmechanismus beteiligten Zellen sind bei der Aufrechterhaltung des endocochleären Potenzials beteiligt (Wang et al., 2002). Letzten Endes spielt auch eine Apoptose und Nekrose von Haarzellen durch oxidativen und nitrosativen Stress eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Cochlea (Kurabi et al., 2017). Diese Thematik wird in Kapitel 6.7.1 weiter ausgeführt.

6.4 Cochleaimplantation

Die Cochleaimplantation stellt einen bisher einzigartigen Ansatz zum Erhalt einer Sinnesmodalität dar. Die Geschichte einer elektrischen Stimulation des Ohres geht dabei bis ins 18. Jahrhundert zurück (Mudry und Mills, 2013). Die erste Implantation einer Elektrode durch das runde Fenster in die Cochlea fand 1961 durch William House und John Doyle statt (Mudry und Mills, 2013). Im Laufe der Jahre wurden die CIs in ihrer Technologie zunehmend verbessert und die Operationstechniken angepasst.

Das CI setzt sich aus einem externen und einem internen, implantierbaren, Teil zusammen. Der interne Teil besteht aus einer Spule mitsamt Magnet, einem Signalprozessor sowie einer Elektrode, welche über einen Stimulator elektrisch stimuliert wird. Der äußere Teil des CI setzt sich aus einem Mikrofon, Sprachprozessor, Akku und ebenfalls einer Spule mit Magnet zusammen. Die Elektrode wird nahe dem runden Fenster in die *Scala tympani* implantiert. Der Rest des implantierbaren Teils liegt außen auf dem Schädelknochen in einer chirurgisch geschaffenen Vertiefung auf. Über das Mikrofon werden akustische Signale im Sprachprozessor verarbeitet und über die äußere Spule durch die Haut auf die innere Spule übertragen. Diese stehen über die Magnete miteinander in Kontakt. Über den Signalprozessor werden elektrische Signale generiert, welche über die Elektroden die Nervenfasern stimulieren. Die Stromversorgung des Implantates erfolgt dabei von außen mittels Induktion (Wang und Puel, 2018).

Eine Weiterentwicklung des klassischen CIs, über das vollelektrisch gehört wird, stellt die sogenannte elektrisch-akustische Stimulation (EAS) dar. Sie stellt eine Art Hybrid-System aus CI und klassischem Hörgerät dar, wodurch sowohl tiefe Frequenzen akustisch mittels Hörgeräts, als auch höhere Frequenzen elektrisch mittels CI

wahrgenommen werden können (von Ilberg et al., 1999, von Ilberg et al., 2011). Dabei werden kürzere Elektrodenträger implantiert. Diese erreichen aufgrund ihrer verkürzten Länge erst gar nicht den tonotopen Bereich des Tieftonrestgehörs. Durch die Methode der EAS können auch Patienten behandelt werden, die im Tieftonbereich ein gutes Residualgehör vorweisen, aufgrund ihrer ausgeprägten Innenohrschwerhörigkeit im Mittel- und Hochfrequenzbereich jedoch kein konventionell ausreichend verstärkbares Sprachverstehen mehr besitzen (Gifford et al., 2010). Daher ist es für den Erfolg der EAS von essentieller Bedeutung Strategien für den Restgehörerhalt zu entwickeln (Mamelle et al., 2019). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit EAS ein signifikant besseres Sprachverständnis, gerade in Situationen mit Störgeräuschen, aufweisen, als Patienten mit rein elektrischer oder akustischer auditorischer Stimulation (Weissgerber et al., 2019, Baumann und Helbig, 2009, Rader, 2015, Rader et al., 2013).

6.4.1 Indikation

Grundsätzlich gilt, dass für Cochleaimplantate Patient*innen in Frage kommen, welche durch ein Implantat ein besseres Sprachverstehen und eine bessere Sprachentwicklung erreichen als durch ein herkömmliches Hörgerät. Die Cochleaimplantation erfährt eine Vielzahl möglicher Indikationen, von denen sowohl Kleinkinder, Jugendliche und Erwachsene profitieren (Szyfter et al., 2019). Generell gilt, dass zur Indikationsstellung sowohl die audiologischen Untersuchungsbefunde, die zu erwartende verbesserte Sprachentwicklung sowie soziale Aspekte eine Rolle spielen (Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, 2020). Die möglichen OP-Indikationen befinden sich in einem konstanten Anpassungsprozess und werden von der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V. aktualisiert. Um die hohen Qualitätsstandards dieses Eingriffs sicherzustellen, werden CI-implantierende Zentren von der oben genannten Fachgesellschaft zertifiziert. Grundsätzlich lassen sich die Indikationen in zwei Gruppen unterteilen: Prä- und postlingual, also vor und nach Spracherwerb. Für prälingual ertaubte Kinder ist eine frühzeitige CI-Versorgung essentiell, um eine ausreichende Kommunikationsfähigkeit zu gewährleisten (Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, 2020). Auch prälingual ertaubte Erwachsene können von einer CI-Versorgung profitieren (Eisenberg, 1982, Lammers et al., 2018).

Postlingual besteht ebenfalls bei Kindern und Erwachsenen die Indikation zur ein- oder beidseitigen Versorgung mittels CI (Hoppe et al., 2015, Hoppe et al., 2017, Leigh et al., 2016). Weitere Indikationen bestehen bei einer einseitigen Taubheit, bei asymmetrischen Hörverlust und bei auditorischen Synapto-/Neuropathien (Van de Heyning et al., 2016, Döge et al., 2017, Benchetrit et al., 2021, Arndt et al., 2011, Walger et al., 2011). Die dringliche Versorgung mittels Implantat ist bei ossifizierenden Meningitiden und Labyrinthitiden mit Hörverlust gegeben (Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, 2020). Besteht eine Indikation für beide Ohren sollte die Implantat-Versorgung beidseits erfolgen und kann sowohl ein- als auch zweizeitig erfolgen (Laszig et al., 2004).

6.4.2 Schädigung der Cochlea nach Implantation

Cochleäre Strukturen können nach einer Elektrodeninsertion auf vielfältige Art und Weise geschädigt werden. Eine unsanfte Operationstechnik und unterschiedliche anatomische Gegebenheiten können bei Implantation zu direkten strukturellen Schäden des Hörorgans führen und dessen Integrität zerstören (von Ilberg et al., 2011). Diese sind beispielsweise eine Ruptur der Basilarmembran, Fraktur der *Lamina spiralis ossea* oder Verletzung von Blutgefäßen (von Ilberg et al., 2011, Roland und Wright, 2006, Wright und Roland, 2013, Tanaka et al., 2014). Dies kann bei Unterbrechung der Barriere zwischen Peri- und Endolymphraum zu einem Zusammenbruch des endocochleären Potenzials und Verlust von Perilymphe führen (von Ilberg et al., 2011). Unmittelbar nach dem Einführen der Elektrode legt diese sich in den meisten Fällen an die Lateralwand an. Dabei können Druckschäden, Ablösung und Risse im spiralen Ligament und Rupturen in der Basilarmembran entstehen (Addams-Williams et al., 2011, Adunka et al., 2004, von Ilberg et al., 2011). Darüber hinaus steigt durch das Einbringen der Elektrode in den Perilymphraum der intracochleäre Druck, welches Schäden ähnlich einer hohen Lärmbelastung verursachen kann (Greene et al., 2016, Todt et al., 2014). Die Bohrung im Rahmen der Cochleostomie kann durch Vibration und erhöhte Lärmbelastung ebenfalls zu einer Schädigung des Organs und zum Funktionsverlust der Haarzellen führen (Pau et al., 2007, Dalchow et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Cochleostomie Schalldruckpegel von über 130 dB entstehen (Yu et al., 2014). Die Elektrodeninsertion kann eine direkte und indirekte Immunreaktion auslösen und so zu

Entzündungsreaktionen und oxidativem Stress führen, welche ebenfalls einen Haarzellverlust durch Apoptose begünstigen können (Astolfi et al., 2016, Dinh et al., 2011, Simoni et al., 2020). Hierbei scheint TNF-alpha als proinflammatorisches Zytokin eine Rolle zu spielen (Ren und Stankovic, 2018, Scherer et al., 2010, Arpornchayanon et al., 2013, Eisenhut, 2019). Histopathologisch wurde letztlich nachgewiesen, dass das Einbringen einer Elektrode zu intracochleärer Fibrose und Sklerose führt (O'Leary et al., 2013, Seyyedi und Nadol, 2014, Foggia et al., 2019, Reiss et al., 2015, Li et al., 2007, Somdas et al., 2007, Fayad et al., 2009).

6.4.3 Restgehörerhalt im Rahmen der Cochleaimplantation

Der Erhalt des Restgehörs im Rahmen der EAS spielt eine entscheidende Rolle für das Hörrehabilitationsresultat und in Sonderheit das Sprachverstehen des Patienten (von Ilberg et al., 2011, Lin et al., 2021). Aufgrund der tonotopen Eigenschaften der Cochlea befindet sich der Frequenzbereich des Restgehörs in den medialen und apikalen Abschnitten der Cochlea und somit hauptsächlich im Tieftonbereich (Gao und Yi, 2022). Der Versuch, das Restgehör zu erhalten, baut dabei auf mehreren Säulen auf (Lin et al., 2021).

Zum einen wird im Rahmen der Implantation eine sanfte Operationstechnik verwendet. Dabei hat sich in Studien gezeigt, dass der Zugang über das runde Fenster atraumatischer ist als eine direkte Cochleostomie (Hoskison et al., 2017, Lin et al., 2021, Adunka et al., 2004). Eshraghi et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass letztere zu einer signifikant höheren Rate an Restgehörverlust führt als der Zugang durch das runde Fenster (Eshraghi et al., 2017). Die Frage nach dem Zugangsweg zur Cochlea bleibt jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert, da es ebenfalls Studien gibt, die keinen Unterschied bezüglich des Restgehörerhalts zwischen den beiden Zugangsmöglichkeiten sehen (Sun et al., 2015). Neueste Reviews sehen jedoch das runde Fenster als vorteilhafter (Avasarala et al., 2022).

Des Weiteren scheint die Geschwindigkeit, mit der die Elektrode implantiert wird, eine Rolle zu spielen und wird in der Literatur diskutiert (Lin et al., 2021). Ein gleichmäßiges und langsames Einführen der Elektrode vermindert Volumenverschiebungen in der *Scala tympani* und somit auch Kräfte, die auf die Strukturen der Cochlea wirken und diese schädigen können (Todd et al., 2007, Kontorinis et al., 2011). Die Frage nach

der idealen Insertionsgeschwindigkeit bleibt jedoch weiterhin offen und wird Gegenstand weiterer Forschungen bleiben (Lin et al., 2021). Neueste Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass eine während der Elektrodeninsertion, intraoperativ, durchgeführte Elektrocochleographie mit direktem Feedback für den Operateur mit einer längeren mittleren Insertionszeit und positiven Effekt für den Erhalt des Residualgehörs assoziiert sind (Höing et al., 2024).

Das Einfügen eines Implantats in die Cochlea kann zu einer Fremdkörperreaktion mit Inflammation und Fibrose führen, was wiederum zu Haarzelluntergang und Verlust des Residualgehörs führen kann. (Simoni et al., 2020, Astolfi et al., 2016). Anti-inflammatorische Substanzen sind daher notwendig, um den Entzündungsprozess und den strukturellen Umbauprozess innerhalb der Cochlea zu reduzieren (Khater und El-Anwar, 2017). In Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl lokal als auch systemisch applizierte Glukokortikoide einen positiven Einfluss auf den Erhalt des Restgehörs haben (Skarżyńska et al., 2018, Wang et al., 2018, Braun et al., 2011).

Die optimale Elektrodenauswahl ist ebenfalls essentiell. Die Elektrode sollte den anatomischen Gegebenheiten und der Ätiologie des Hörverlustes des Patienten angepasst sein, um eine atraumatische Insertion und ein optimales Ergebnis zu erreichen (Lin et al., 2021, von Ilberg et al., 2011, Adunka und Kiefer, 2006). Das Einführen der Elektrode um 18-20mm in die basale Windung der Cochlea deckt zum einen den hohen Frequenzbereich durch elektrische Stimulation ab und schützt zum anderen die mittleren und oberen cochleären Strukturen, welche die tonotopischen Frequenzbereiche des Residualhörens darstellen (von Ilberg et al., 2011, Adunka und Kiefer, 2006)

Der Hörerhalt stellt ein wichtiges chirurgisches Qualitätsmerkmal dar. Bei erfahrenen Chirurg*innen liegt der Erhalt des Restgehörs heutzutage zwischen 95-98% (Mamelle et al., 2019, Moteki et al., 2018, Santa Maria et al., 2013). Dennoch kann es durch bisher nicht eindeutig erklärbare Ursachen bei einigen Patienten direkt oder mit zeitlicher Verzögerung nach der Cochleaimplantation zu einem Verlust des Residualgehörs kommen (Woodson et al., 2010, Yao et al., 2006, Gstoettner et al., 2009, Gstoettner et al., 2006, Santa Maria et al., 2013).

6.4.4 Pathophysiologie des Restgehörverlustes

Die Implantation kann zu strukturellen Schäden der Cochlea-Strukturen führen und somit direkt die Haarzelle schädigen oder die elektro-mechanische Transduktion durch Veränderung oder Verlust des endocochleären Potentials beeinflussen (Roland und Wright, 2006, Wright und Roland, 2013, Tanaka et al., 2014, von Ilberg et al., 2011). Eine Lärmbelastung durch das chirurgische Vorgehen kann pathophysiologisch ebenfalls eine Rolle spielen (Pau et al., 2007).

Ein direkter Kontakt der Elektrode zur Lateralwand kann diese schädigen. Die *Stria vascularis* enthält Zellen, welche für die Aufrechterhaltung des endocochleären Potentials wichtig sind (Shi, 2011). Zudem enthält sie ein Kapillarnetz, welches die Blut-Labyrinth-Schranke bildet und toxische Substanzen daran hindert, in die Cochlea zu gelangen (Shi, 2011, Shi, 2016, Zhang et al., 2012). Durch die Elektrodeninsertion kann die Lateralwand geschädigt werden und durch einen Entzündungsprozess in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Wright und Roland, 2013). Tanaka et al. konnten zeigen, dass ein Verlust des Residualgehörs nach Cochleaimplantation mit einer verminderten Dichte der *Stria vascularis* einhergeht (Tanaka et al., 2014).

Eine Fremdkörperreaktion führt zu einer chronischen Inflammation innerhalb der Cochlea und konsekutiv durch Zunahme an Fibrozyten und Extrazellulärmatrix zu Fibrosierung und Sklerosierung (O'Leary et al., 2013, Seyyedi und Nadol, 2014, Gao und Yi, 2022). Die inflammatorische Antwort beinhaltet mehrere Signalwege, an denen unter anderem TNF-alpha, IL-1-beta und andere proinflammatorische Zytokine beteiligt sind (Jia et al., 2013). Diese Zytokine können letzten Endes zu einer Apoptose von Haarzellen und anderen wichtigen Zellen der Cochlea führen (Bas et al., 2012). Auch die Lateralwand kann durch Inflammation beeinträchtigt werden (Wright und Roland, 2013). Die *Stria vascularis* sowie die Blut-Labyrinth-Schranke werden in ihrer Struktur geschädigt, sodass die Elektrolythomöostase nicht weiter aufrechterhalten werden kann (Gao und Yi, 2022). Ebenfalls wird in der Literatur eine mögliche Schädigung und Funktionseinschränkung von Synapsen zwischen Haarzellen und SGZ durch chronische Inflammation diskutiert (Gao und Yi, 2022, Liberman und Kujawa, 2017)

6.5 Physiologie von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) besitzt eine Vielzahl biologischer Aktivitäten und trägt in der Cochlea einen wichtigen Teil zu einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen bei (Pacher et al., 2007, Takumida und Anniko, 2002, Thomas et al., 2008). Das Molekül besteht aus einem Stickstoff- und Sauerstoffatom, ist ungeladen und besitzt ein geringes Molekulargewicht (Thomas et al., 2008). Aufgrund seiner elektrischen Neutralität und der Eigenschaft, sowohl in hydrophiler als auch hydrophober Umgebung löslich zu sein, kann es frei zwischen Zellmembranen und Membranen von Zellorganellen, wie Mitochondrien, diffundieren (Thomas et al., 2008, Heinrich und Helling, 2012). Das Molekül an sich ist sehr flüchtig und besitzt nur eine kurze Halbwertszeit im Sekundenbereich (Heinrich und Helling, 2012).

NO hat eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen im menschlichen Körper. Durch eine Relaxation von glatten Muskelzellen ist es an der Tonusregulation von Blutgefäßen beteiligt (Robbins und Grisham, 1997). Zudem trägt NO eine entscheidende Rolle bei der Regulation und Pathophysiologie des kardiovaskulären Systems, da es ebenfalls an der Thrombozytenaggregation und Chemotaxis von Leukozyten beteiligt ist (Förstermann und Sessa, 2012, Napoli et al., 2006). Das Molekül stammt hierbei aus den Endothelzellen der Gefäße (Moncada, 1994, Robbins und Grisham, 1997). Die Wirkung wird dabei durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), einem Signalmolekül, vermittelt und spielt bei vielen unterschiedlichen Krankheitsbildern, wie beispielsweise der Entstehung von Atherosklerose, eine Rolle (Mónica et al., 2016, Napoli et al., 2006).

Darüber hinaus dient NO als Botenstoff im zentralen und peripheren Nervensystem, in dem es unter anderem mit N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA) interagiert (Zhang und Snyder, 1995). Ferner spielt es eine modulierende Rolle bei chronischer und akuter Inflammation und greift dort in unterschiedliche Mechanismen ein (Guzik et al., 2003). Ebenso kann NO die Transkription von Genen, die mRNA-Translation und die post-translationale Modifikationen von Proteinen modulieren (Förstermann und Sessa, 2012).

Letztlich wird das Molekül in wenigen Sekunden inaktiviert, da es mit Sauerstoffmolekülen reagiert und oxidiert (Robbins und Grisham, 1997). Dadurch entstehen neben Nitrit und Nitrat auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive

Stickstoffspezies (RNS), welche zu oxidativen Stress und Zelluntergang führen (Robbins und Grisham, 1997, Förstermann und Sessa, 2012). Die Rolle von ROS und RNS wird in Kapitel 6.7.1 weiter ausgeführt.

6.6 Synthese durch Stickstoffmonoxid-Synthasen

Die Synthese von NO im menschlichen Organismus kann grundsätzlich durch zwei Mechanismen erfolgen. Zum einen durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), welche in drei Isoformen vorliegt (Heinrich und Helling, 2012, Förstermann und Sessa, 2012). Zum anderen ist eine enzymunabhängige Synthese durch direkte Reduktion von Nitrit zu NO möglich. Dies geschieht häufig in saurem und ischämischen Milieu (Weitzberg und Lundberg, 1998, Zweier et al., 1999).

Die konstitutiv exprimierten Formen neuronale NOS (nNOS, NOS I) und endotheliale NOS (eNOS, NOS III) sind abhängig von Calcium und Calmodulin, wohingegen die induzierbare NOS (iNOS, NOS II) Calcium-unabhängig agiert (Heinrich und Helling, 2012, Förstermann und Sessa, 2012). Für die Synthese von NO benötigen alle drei Isoformen L-Arginin als Substrat, Sauerstoff sowie reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Co-Substrat und Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD) und Tetrahydrobiopterin als Co-Faktoren (Heinrich und Helling, 2012, Förstermann und Sessa, 2012).

Während der Enzymreaktion werden mittels Redoxreaktionen Elektronen von NADPH über FAD und FMN auf eine Haem-Gruppe übertragen (Förstermann und Sessa, 2012). Dabei werden die Substrate Sauerstoff reduziert und L-Arginin oxidiert, sodass als Produkt der enzymatischen Reaktion NO und L-Citrullin entstehen (Stuehr et al., 2001, Förstermann und Sessa, 2012). Calmodulin spielt dabei eine wichtige Rolle für den Elektronentransfer auf die Haem-Gruppe (Abu-Soud und Stuehr, 1993). Je nach Isoform ist die Bindung von Calmodulin an die jeweilige NO-Synthase abhängig oder unabhängig von der intrazellulären Calcium-Konzentration (Förstermann und Sessa, 2012, Hemmens und Mayer, 1998).

Die Produktion von NO kann entweder durch eine Hochregulation der Anzahl an Synthasen oder eine gesteigerte Aktivität der Enzyme erreicht werden (Heinrich und Helling, 2012).

6.6.1 Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Die iNOS liegt nicht permanent im Gewebe vor. Vielmehr wird ihre Expression durch bestimmte Stoffe, wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha) und andere proinflammatorische Zytokine auf transkriptioneller Ebene induziert (Robbins und Grisham, 1997). Sie stimmt in ihrer Proteinsequenz zu etwa 50% mit der von eNOS und nNOS überein, kann jedoch, wenn exprimiert, unterschiedliche Mengen an NO bilden (Heinrich und Helling, 2012, Knowles und Moncada, 1994). iNOS ist in der Lage NO-Konzentrationen im mikromolaren Bereich zu produzieren, wohingegen bei eNOS und nNOS lediglich nanomolare Mengen erreicht werden (Heinrich und Helling, 2012). Folglich führt eine Aktivierung der iNOS zu einem starken Anstieg der NO-Konzentration (Robbins und Grisham, 1997). Ferner besteht ebenfalls ein Unterschied im Bezug zu ihrer Abhängigkeit zu Calcium und Calmodulin. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten Isoformen bindet Calmodulin bereits bei sehr niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen an iNOS aufgrund dessen es als eine Art Untereinheit betrachtet wird (Cho et al., 1992). Die iNOS wird unabhängig von Calcium aktiviert (Förstermann und Sessa, 2012).

Physiologisch und pathophysiologisch nimmt das Enzym im menschlichen Organismus verschiedene Rollen ein. iNOS wurde anfänglich in Makrophagen entdeckt und es wurde postuliert, dass NO in höheren Konzentrationen bei der unspezifischen Immunabwehr eine Rolle spielt (Förstermann und Sessa, 2012, Wei et al., 1995). Dabei entsteht aus NO und O_2^- Peroxynitrit ($ONOO^-$), welches als ROS und RNS zu bakteriellen DNA-Schäden führt (Valko et al., 2007). Auch außerhalb des Immunsystems scheint NO eine tragende Rolle zu spielen. In hohen Konzentrationen besitzt das Molekül zytotoxische Eigenschaften, da es direkt mit DNA interagiert und zu Strangbrüchen führt (Fehsel et al., 1993). Li et al. konnten nachweisen, dass sich einige Zelltypen diese Eigenschaften zur Abwehr von Tumorzellen zunutze machen (Li et al., 1991). Allerdings führt dies auch zu zytotoxischen Effekten an gesunden Zellen (Fehsel et al., 1993). Einerseits durch direkte Interaktion von NO mit der DNA, andererseits durch ROS und RNS (Förstermann und Sessa, 2012). Weiterhin ist das Enzym ein Mediator bei inflammatorischen Erkrankungen und eine erhöhte Expression mit hoher NO-Produktion spielt pathophysiologisch eine tragende Rolle bei der Entstehung eines septischen Schocks und Multiorganversagens (Förstermann und Sessa, 2012).

Nach Watanabe und Hess et al. kann iNOS nicht in der unstimulierten Cochlea nachgewiesen werden (Watanabe et al., 2000b, Hess et al., 1999). Shi und Popa et al. konnten in ihren Untersuchungen jedoch vereinzelt eine Basalexpression in bestimmten cochleären Zellstrukturen nachweisen (Popa et al., 2001, Shi et al., 2003). Eine erhöhte iNOS-Expression ließ sich in der Cochlea nach Stimulation mit bakteriellen Endotoxinen detektieren (Takumida et al., 2000, Shi et al., 2003, Hess et al., 1999, Watanabe et al., 2000b, Watanabe et al., 2000a). Dies impliziert, dass iNOS eine pathophysiologische Rolle im Rahmen einer intracochleären Inflammation spielt (Watanabe et al., 2000b). Eine Behandlung mit ototoxischen Substanzen, wie Aminoglykosiden und Cisplatin, führte ebenfalls zu einer Expressionssteigerung des Enzyms (Watanabe et al., 2002, Li et al., 2006, Liu et al., 2008). Auch eine akustische Überstimulation durch Beschallung mit hohen Schalldruckpegeln induziert eine Hochregulierung der Synthese sowie einen intracochleären Anstieg der NO-Konzentration (Shi et al., 2003, Shi und Nuttall, 2003, Shi et al., 2002). Unter ischämischen Bedingungen und in Meerschweinchen mit endolymphatischen Hydrops konnte eine erhöhte iNOS-Expression ebenfalls detektiert werden (Michel et al., 2000, Morizane et al., 2005).

Eine basale Expression von iNOS wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Unter pathologischen Bedingungen konnte eine Expressionssteigerung des Enzyms nachgewiesen werden (Shi et al., 2003).

6.6.2 Konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthasen

Zu den konstitutiven Stickstoffmonoxid-Synthasen gehören die nNOS und eNOS, (Förstermann und Sessa, 2012, Heinrich und Helling, 2012). Diese beiden Enzyme lassen sich permanent in einer Vielzahl von Geweben nachweisen und auch in der Cochlea werden sie dauerhaft exprimiert (Förstermann und Sessa, 2012, Heinrich und Helling, 2012, Heinrich et al., 1997, Heinrich et al., 1998).

Durch eine intrazelluläre Calcium-Erhöhung bindet Calmodulin an das Enzym und ermöglicht einen Elektronentransfer, was letzten Endes durch zahlreiche Redoxreaktionen zur Produktion von NO führt (Hemmens und Mayer, 1998).

6.6.2.1 Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS)

Die nNOS konnte in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden (Förstermann et al., 1994). Darunter zählen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, Ganglien des vegetativen Nervensystems und neben Epithelzellen verschiedenster Organsysteme auch glatte Muskelzellen von Gefäßen (Förstermann et al., 1994, Förstermann und Sessa, 2012).

In der Cochlea konnte nNOS im Corti-Organ und in der Lateralwand nachgewiesen werden (Takumida und Anniko, 2002, Heinrich et al., 1997). Heinrich et al. konnte die beiden konstitutiv exprimierten NO-Synthasen in ähnlichen zellulären als auch subzellulären Regionen innerhalb der Cochlea feststellen (Heinrich et al., 2004). Es besteht die Möglichkeit eines Kompensationsmechanismus zwischen eNOS und nNOS unter pathophysiologischen Bedingungen (Heinrich et al., 2004).

NO, produziert von der nNOS, hat unterschiedliche physiologische Funktionen nicht nur im Nervensystem, sondern auch in der Peripherie (Förstermann und Sessa, 2012). Es ist bei der neuronalen und synaptischen Plastizität insbesondere bei der Langzeitpotenzierung im Rahmen von Lernprozessen von großer Bedeutung (Blackshaw et al., 2003, Bon und Garthwaite, 2003). Darüber hinaus scheint die Isoform ein wichtiger Faktor bei der Neurogenese zu sein (Zhou und Zhu, 2009). Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass nNOS an der zentralen Regulation des systemischen Blutdrucks beteiligt ist (Toda et al., 2009, Togashi et al., 1992). In der Peripherie konnte nNOS in Nervenzellen nachgewiesen werden, welche die glatten Muskelzellen von Gefäßen innervieren (Förstermann und Sessa, 2012). Die neuronale Isoform scheint neben der eNOS auch für die Tonusregulation von Gefäßen relevant zu sein (Förstermann und Sessa, 2012). Zudem ist sie für die Aufrechterhaltung einer penilen Erektion bedeutsam (Rajfer et al., 1992).

Pathophysiologisch ist von der nNOS produziertes NO bei einer Vielzahl an neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, von Relevanz (Zhou und Zhu, 2009). Ein starker Anstieg der NO-Konzentration kann zu Exzitotoxizität und Nervenzelluntergang führen (Brown, 2010).

6.6.2.2 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

Die eNOS findet sich vornehmlich in Endothelzellen von Gefäßen, lässt sich jedoch auch in einer Vielzahl anderer Gewebe inklusive der Cochlea nachweisen (Förstermann et al., 1994, Heinrich et al., 1998, Li et al., 2002).

Die Produktion von NO durch eNOS wird zum einen durch die Expression des Enzyms und zum anderen durch Modulation der Enzymaktivität beeinflusst (Li et al., 2002). Die Expression kann dabei durch physikalische Stimuli, Wachstumsfaktoren, Hormone und andere Mediatoren, wie TNF-alpha und bakterielle Endotoxine, gesteuert werden (Li et al., 2002). Für die Regulation der Enzymaktivität spielen sowohl der intrazelluläre Calciumspiegel (siehe dazu Kapitel 6.6) als auch eine Phosphorylierung und Dephosphorylierung von bestimmten Aminosäuren des Enzyms eine Rolle (Fleming und Busse, 2003).

Die Phosphorylierung kann an verschiedenen Tyrosin-, Threonin- und Serinresten stattfinden (Fleming, 2010). Unterschiedliche Stimuli initiieren über Kinasen die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinbestandteilen des Enzyms und führen somit zu einer Aktivitätssteigerung oder -minderung der Synthase (Fleming, 2010). Wichtige Phosphorylierungsorte sind dabei Serin 1177 (Ser1177) und Threonin 495 (Thr495) (Dimmeler et al., 1999, Fleming und Busse, 2003). Zu den wichtigsten Stimuli zählen der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), Bradykinin, Insulin, Östrogen und erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel (Fleming, 2010). Auf das Endothel wirkende Scherkräfte stellen ebenfalls einen wichtigen Stimulus dar (Fleming, 2010).

Serin 1177 liegt in unstimulierten Endothelzellen dephosphoryliert vor und wird durch die oben genannten Stimuli mittels spezieller Proteinkinasen phosphoryliert (Förstermann und Sessa, 2012). Wichtig sind dabei die Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase B (Akt1), Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) und die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) (Fleming, 2010). Eine Phosphorylierung von Ser1177 ermöglicht einen besseren Elektronentransfer durch die Redoxkaskade des Enzyms und steigert somit die NO-Produktion (Förstermann und Sessa, 2012). Laut Fleming et al. ist Threonin 495 in unstimulierten Zellen durchgehend phosphoryliert, stört die Bindung von Calmodulin an das Enzym und mindert letzten Endes dessen Aktivität (Fleming et al., 2001). Man geht davon aus, dass dabei die Proteinkinase C (PKC) eine tragende Rolle spielt (Michell et al., 2001). Eine Dephosphorylierung von Thr495 führt zu einer Aktivitätssteigerung von eNOS (Förstermann und Sessa, 2012). Es

existieren zahlreiche weitere Phosphorylierungsorte, die bei der Aktivitätsregulation von eNOS eine Rolle spielen (Fleming, 2010). Einfachheitshalber wird sich in diesem Kapitel auf Ser1177 und Thr495 beschränkt.

Die NO-Produktion durch eNOS hat große Relevanz für das kardiovaskuläre System und ist dabei an einer Vielzahl von physiologischen Abläufen beteiligt (Förstermann und Sessa, 2012). Neben Vasodilatation und Blutdruckkontrolle besitzt eNOS anti-inflammatorische und anti-atherosklerotische Eigenschaften, aufgrund dessen ihr eine vasoprotektive Rolle zukommt (Förstermann und Sessa, 2012). Eine Endotheldysfunktion mit reduzierter eNOS-Aktivität kann letzten Endes zu multiplen Pathologien des kardiovaskulären Systems führen (Förstermann, 2010, Förstermann und Sessa, 2012).

In der Cochlea konnte eNOS im Corti-Organ, den SGZ und in der Lateralwand nachgewiesen werden (Heinrich et al., 1998, Heinrich et al., 2004, Heinrich et al., 2019). Ebenfalls gelang der Nachweis in den Endothelzellen kapillärer Gefäße von *Stria vascularis* und Spiralligament (Yamane et al., 1997). Die höchsten Konzentrationen fanden sich in Zellen, welche die Retikularlamina und somit die Barriere zwischen Endo- und Perilymphe bilden: den inneren und äußeren Pfeiler- und Haarzellen sowie den Deiters-Zellen (Heinrich et al., 1998). Heinrich et al. konnten zudem zeigen, dass eine intratympanale Injektion von ototoxischen Substanzen sowie eine akute Lärmbelastung des Innenohrs zu einer Steigerung der eNOS-Expression führt (Heinrich et al., 2005, Heinrich et al., 2006, Heinrich et al., 2019). Ob es sich bei der nachgewiesenen Hochregulierung von eNOS um einen otoprotektiven oder otodestruktiven Mechanismus handelt, bleibt weiterhin offen und Gegenstand weiterer Forschungen (Heinrich et al., 2006). Es gibt jedoch Anzeichen, die durchaus nahelegen, dass eNOS eine otoprotektive Rolle spielen könnte (Heinrich et al., 2019, Heinrich et al., 2021).

6.7 Wirkung von Stickstoffmonoxid in der Cochlea

NO ist physiologisch und pathophysiologisch in der Cochlea auf vielfältige Art und Weise von Relevanz (Heinrich und Helling, 2012). Niedrige NO-Konzentrationen sollen eine zytoprotektive Rolle spielen wohingegen ein massiver Anstieg der NO-Produktion, beispielsweise durch erhöhte iNOS-Expression, zu zytotoxischen und

pathophysiologischen Veränderungen in der Cochlea führt (Shi et al., 2003, Shi und Nuttall, 2003, Ruan, 2002, Fessenden und Schacht, 1998, Heinrich und Helling, 2012). Heinrich und Helling (2012) beschrieben die Auswirkungen von NO auf die cochleäre Mikrozirkulation, die interzelluläre Signalkommunikation mittels *gap junctions* sowie den synaptischen Signaltransfer (Heinrich und Helling, 2012).

Im Allgemeinen ist bekannt, dass NO eine große Bedeutung für die Tonusregulierung von Blutgefäßen hat (Förstermann, 2010, Förstermann und Sessa, 2012). Brechtelsbacher et al. (1994) und Jiang et al. (2004) gelang der Nachweis einer basalen NO-Produktion innerhalb der versorgenden Gefäße der Cochlea und damit auch eine, den Vasotonus regulierende Funktion, des Moleküls (Brechtelsbauer et al., 1994, Jiang et al., 2004). Eine Inhibition der NO-Synthasen durch Applikation von N^G-nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) führte zu einer Verringerung des Gefäßdurchmessers und einer daraus resultierenden Reduzierung des cochleären Blutflusses (Jiang et al., 2004, Brechtelsbauer et al., 1994). Dieser Effekt konnte durch die Gabe des Substrates L-Arginin rückgängig gemacht werden (Brechtelsbauer et al., 1994). Die eNOS konnte in Endothelzellen der *Stria vascularis* und des Spiralligaments nachgewiesen werden (Heinrich et al., 1998, Yamane et al., 1997). Zudem geht man davon aus, dass neben eNOS auch nNOS aus Typ V-Fibrozyten an der NO-Produktion in der Lateralwand beteiligt ist (Dai et al., 2011). Shi et al. (2003) postulierten, dass ein Anstieg von iNOS unter pathologischen Bedingungen und damit eine stark erhöhte NO-Konzentration in der Cochlea zu Untergang von Marginalzellen der *Stria vascularis* und Einschränkungen der cochleären Mikrozirkulation führt (Shi und Nuttall, 2003). Ebenfalls scheinen die Perizyten die Mikrozirkulation in der Cochlea zu beeinflussen (Heinrich und Helling, 2012). Sie besitzen kontraktile Elemente und alle drei Isoformen der NOS konnten nachgewiesen werden (Dai et al., 2009, Shi et al., 2008, Shi et al., 2001). Darüber hinaus inhibiert NO auf direktem Weg spannungsabhängige Calcium-Kanäle in Perizyten und führt so zu einer Relaxation (Sakagami et al., 2001). NO ist somit durch verschiedenste Mechanismen an der Regulation des cochleären Blutflusses beteiligt und trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung der Hörfunktion bei.

Neben der Mikrozirkulation hat NO auch eine große Relevanz für die interzelluläre Kommunikation mittels *gap junctions* (Heinrich und Helling, 2012). Dabei ist vor allem das Kalium-Recycling von zentraler Rolle und gewährleistet eine Aufrechterhaltung der Elektrolythomöostase sowie des endocochleären Potenzials (Zhao et al., 2006). *Gap*

junctions stellen Zell-Zell-Verbindungen dar, welche das Zytoplasma zweier benachbarter Zellen miteinander verbinden und so für eine Kommunikation dieser Zellen untereinander sorgen (Goodenough und Paul, 2009). Die Kanäle setzen sich aus zwei Proteinkomplexen, den sogenannten Connexonen, zusammen, welche jeweils wiederum aus sechs Transmembranproteinen, den Connexinen, bestehen (Goodenough und Paul, 2009). Kleine Moleküle und Ionen können diese Kanäle durch Diffusion passieren (Goodenough und Paul, 2009). Eine Verbindung zwischen Mutationen in Connexin-Genen und genetisch bedingter Innenohrschwerhörigkeit verdeutlichen die Wichtigkeit der *gap junctions* für die cochleäre Funktion (Zhao et al., 2006, Kikuchi et al., 2000b). Es existieren zwei funktionelle interzelluläre Systeme aus *gap junctions* innerhalb der Cochlea (Heinrich und Helling, 2012). Ein epitheliales System verbindet zum einen die inneren Haarzellen über Sulcus- und Interdentalzellen mit der Limbus-Region und zum anderen die äHZ über weitere Stützzellen zur Lateralwand (Heinrich und Helling, 2012). Ein zweites mesenchymales System befindet sich in der Lateralwand und verbindet Intermediär- sowie Basalzellen der *Stria vascularis* und Fibrozyten im spiralen Ligament miteinander (Heinrich und Helling, 2012, Kikuchi et al., 2000b, Zhao et al., 2006). Die interzellulären Verbindungen sind für das Recycling sowie die Bereitstellung von Kalium und somit für die Aufrechterhaltung des endocochleären Potenzials von großer Relevanz (Zhao et al., 2006, Kikuchi et al., 2000a). Blasits et al. (2000) konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass ein Anstieg der NO-Konzentration zu einer Trennung der *gap junctions* in Deiters-Zellen führt (Blasits et al., 2000). Dies könnte zu einem reduzierten Kalium-Recycling führen und pathophysiologische Konsequenzen für die Hörfunktion haben (Heinrich und Helling, 2012). Ein Zusammenhang zwischen NO und der Entkopplung von *gap junctions* konnte bereits in anderen Organsystemen nachgewiesen werden (Rörig und Sutor, 1996, Patel et al., 2006).

Ebenfalls ist in der Literatur beschrieben, dass der synaptische Signaltransfer durch NO beeinflusst werden kann (Heinrich und Helling, 2012). Der Neurotransmitter der afferenten cochleären Synapsen ist vornehmlich Glutamat, welcher an der Postsynapse mit ionotropen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagiert (Raphael und Altschuler, 2003, Heinrich und Helling, 2012). Es ist bekannt, dass Lärmexposition zu Nervenzelluntergang und Hörverlust führt (Puel et al., 1998). Laut Shi et al. (2015) kommt es dabei zu einer Verminderung der Synapsen, welche sich erst nach Wochen normalisiert (Shi et al., 2015). Eine starke Überstimulation führt

jedoch zu permanenten Hörverlust (Spoendlin, 1985). Der Mechanismus der Exzitotoxizität durch Glutamat ist dabei von besonderer Relevanz (Puel et al., 1998). Eine massive Glutamatfreisetzung führt zu einer übermäßigen Stimulation der ionotropen Glutamatrezeptoren mit konsekutivem Einstrom von Kationen (Zhang et al., 2021). Anionen und Wasser folgen entlang des Konzentrationsgefälles und sorgen für eine Zellschwellung bis hin zum Zelluntergang (Zhang et al., 2021, Wang et al., 2002, Pujol und Puel, 1999). Puel et al. (1998) konnten durch die Gabe von Glutamat-Antagonisten diese Zellschwellung verhindern (Puel et al., 1998). Die nNOS kann durch eine proteinbindende Region an NMDA-Rezeptoren binden und durch deren Aktivierung stimuliert werden (Sattler et al., 1999, Zhang et al., 2010). Dawson et al. (1996) konnten mittels Zellkulturen von nNOS-Knockout-Mäusen nachweisen, dass NO in Glutamat-bedingter Neurotoxizität von Relevanz ist (Dawson et al., 1996). Folglich kann eine NO bedingte Neurotoxizität aufgrund einer Überstimulation cochleärer postsynaptischer NMDA-Rezeptoren eine pathophysiologische Rolle im Innenohr spielen (Heinrich und Helling, 2012).

6.7.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

ROS und RNS werden auch als freie Radikale bezeichnet und sind Moleküle, welche durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen eine erhöhte Reaktionsfreudigkeit aufweisen (Halliwell und Gutteridge, 2015). Die bekanntesten ROS sind das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Valko et al., 2007). $O_2^{\cdot-}$ wird dabei als primäres Radikal bezeichnet, da es durch Interaktion mit anderen Molekülen sekundäre ROS wie OH^{\cdot} generieren kann (Valko et al., 2007). Zu den RNS zählen NO, Stickstoffdioxid (NO_2), Distickstofftrioxid (N_2O_3) sowie Peroxynitrit ($ONOO^-$), welches durch Reaktion von NO mit $O_2^{\cdot-}$ entsteht (Kurabi et al., 2017, Valko et al., 2007). $ONOO^-$ ist sehr potent und ist zu Einzelstrangbrüchen der DNA und Peroxidation von Lipiden in der Lage (Förstermann und Sessa, 2012, Shahab und Jamesdaniel, 2022). NO_2 und N_2O_3 können die Apoptose einleiten (Shahab und Jamesdaniel, 2022). $O_2^{\cdot-}$ entsteht zum einen durch die Atmungskette in Mitochondrien und zum anderen durch die NADPH-Oxidase (Dröge, 2002). Auch NOS können in ihrem enzymatischen Prozess ROS und RNS generieren (Wang und Puel, 2018). ROS und RNS führen in hohen Konzentrationen zu oxidativen Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen wohingegen beide in niedrigen Konzentrationen auch eine

regulatorische Funktion auf unterschiedlichste Signalkaskaden sowie eine bakterielle Abwehrfunktion besitzen (Valko et al., 2007, Evans und Halliwell, 1999, Poirrier et al., 2010). Darüber hinaus können ROS die Apoptose, also den programmierten Zelltod, initiieren (Valko et al., 2007). Unter physiologischen Bedingungen werden hohe ROS- und RNS-Konzentrationen durch antioxidative Abwehrmechanismen kontrolliert (Evans und Halliwell, 1999). Zu diesen Mechanismen gehören Enzyme wie die Glutathion-Peroxidase und die Superoxid-Dismutase sowie Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbinsäure (Vitamin C) (Evans und Halliwell, 1999). Ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Elimination freier Radikale führt letzten Endes zu oxidativem Stress (Evans und Halliwell, 1999).

6.7.1.1 Oxidativer Stress in der Cochlea durch ROS und RNS

ROS und RNS konnten in der Cochlea nach Beschallung sowie Applikation von ototoxischen Substanzen nachgewiesen werden (Shi und Nuttall, 2003, Henderson et al., 2006, Kim et al., 2010, Vlajkovic et al., 2010). ONOO⁻ als äußerst reaktionsfreudiges freies Radikal konnte ebenfalls in der Cochlea nach Lärmbelastung gefunden werden (Yamashita et al., 2004). Neben direkten Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen können die Radikale durch eine Peroxidation von Lipiden auch hochtoxische Moleküle bilden (Yamashita et al., 2004). Diese sind in der Lage, die Apoptose einzuleiten (Kurabi et al., 2017). Yamashita et al. (2004) zeigten, dass ein Anstieg von ROS und RNS in der Cochlea mit einem progressiven Haarzelluntergang korreliert (Yamashita et al., 2004).

Pathophysiologisch ist der Calcium-Haushalt einer Zelle ebenfalls von Relevanz für die Entstehung von ROS und RNS (Kurabi et al., 2017). ROS entstehen zu einem großen Teil in Mitochondrien und eine erhöhte Calcium-Konzentration in der Zelle erhöht die Permeabilität der Mitochondrienmembran und damit die Durchlässigkeit für ROS (Valko et al., 2007, Kurabi et al., 2017). Sowohl exzessive Beschallung als auch ototoxische Medikamente können in Haarzellen die intrazelluläre Calcium-Homöostase modulieren (Fridberger et al., 1998, Esterberg et al., 2014, Esterberg et al., 2013).

Laut Kurabi et al. (2017) können ROS die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen stimulieren (Kurabi et al., 2017). Die iNOS kann durch proinflammatorische

Zytokine in ihrer Expression gesteigert werden und so große Mengen NO synthetisieren (Robbins und Grisham, 1997). Dieses NO kann wiederum mit O²⁻ zu Peroxynitrat umgewandelt werden und weiteren oxidativen Schaden verursachen (Valko et al., 2007).

Darüber hinaus führen Mikrozirkulationsstörungen mit Ischämie und anschließender Reperfusion zu massiver ROS-Produktion (Valko et al., 2007). Durchblutungsstörungen der Cochlea werden seit langem als möglicher Mechanismus für eine Vielzahl an Innenohrpathologien angesehen (Shi, 2011). Es gibt diverse Hinweise dafür, dass eine erhöhte Lärmbelastung mit einem reduzierten cochleären Blutfluss einhergeht (Arpornchayanon et al., 2011, Scheibe et al., 1993, Thorne und Nuttall, 1987). Laut Kurabi et al. (2017) könnte durch Lipidperoxidation Produkte entstehen, welche selbst vasoaktive Eigenschaften besitzen und so einen Teufelskreis aus Ischämie und ROS-Bildung entstehen lassen (Kurabi et al., 2017).

6.7.2 Lärmbelastung und NO

Einige Experimente konnten in der Vergangenheit nachweisen, dass eine erhöhte Lärmbelastung zu einer gesteigerten NO-Produktion innerhalb verschiedenster cochleärer Zellstrukturen führt (Shi et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass NO nach Beschallung sowohl durch eine Hochregulierung der eNOS- als auch iNOS-Aktivität produziert wird (Heinrich et al., 2005, Inai et al., 2012, Shi und Nuttall, 2003). Chen et al. (2008) zeigten in ihren Untersuchungen eine Korrelation zwischen NO und permanenten Hörschwellenanstieg nach Lärmbelastung (Chen et al., 2008). Nach Shi und Nuttall (2003) führt eine akustische Überstimulation der Cochlea zu einer Induktion von iNOS mit gesteigerter NO- und ROS-Produktion. Sie postulierten, dass dies zu Schäden innerhalb der *Stria vascularis* und somit zu cochleären Mikrozirkulationsstörungen führen kann (Shi und Nuttall, 2003). Es gibt zahlreiche wissenschaftliche Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen Lärmschwerhörigkeit und nitrosativem beziehungsweise oxidativem Stress nahelegen (Ohinata et al., 2003, Yamashita et al., 2005, Han et al., 2013, Honkura et al., 2016). Die massive Produktion von NO im Zusammenspiel mit ROS und RNS nach massiver Beschallung kann die Apoptose einleiten, zum Untergang cochleärer Zellen führen und somit die Hörfähigkeit nachhaltig schädigen (Shahab und Jamesdaniel, 2022, Nagashima et al., 2010).

6.7.3 Ototoxische Medikamente und NO

Erhöhte NO-Konzentrationen konnten innerhalb der Cochlea nach Behandlung mit nachweislich ototoxischen Medikamenten nachgewiesen werden (Heinrich und Helling, 2012). Dabei sind vor allem Aminoglykoside und Zytostatika von besonderer Relevanz (Jamesdaniel et al., 2016, Jamesdaniel et al., 2012, Heinrich et al., 2008). Cisplatin führt durch Generierung von oxidativem und nitrosativem Stress zu Zelluntergang und Apoptose, was letzten Endes in einem Hörverlust mündet (Shahab und Jamesdaniel, 2022). Watanabe et al. (2002) zeigten, dass eine Behandlung von Mäusen mit Cisplatin zu einer gesteigerten iNOS Expression führt. Sie postulierten, dass eine erhöhte NO-Produktion durch das Enzym bei Cisplatin-induzierter Ototoxizität von besonderer Relevanz ist (Watanabe et al., 2002). Aminoglykoside sind ebenfalls ototoxisch und diese Eigenschaft wird therapeutisch bei der Behandlung des Morbus Menière genutzt (Blakley, 2000). Nach Heinrich et al. (2008) trägt NO zum Hörverlust durch Gentamicin bei. In ihren Versuchen konnten sie eine Korrelation zwischen erhöhter NO-Produktion und einem Hörschwellenanstieg nach intratympanaler Gentamicin-Injektion identifizieren (Heinrich et al., 2008). Darüber hinaus konnte eine erhöhte Expression von iNOS und eNOS in der Cochlea nach Gentamicin-Behandlung festgestellt werden (Heinrich et al., 2008, Heinrich et al., 2006, Liu et al., 2008). Als pathophysiologische Ursache für den Hörverlust nach Gentamicin-Behandlung wird unter anderem oxidativer und nitrosativer Stress sowie eine NO-vermittelte Apoptose gesehen (Yang et al., 2011).

6.8 Survivin

Survivin (BIRC5) wurde zum ersten Mal durch Ambrosini et al. (1997) beschrieben. Sie konnten das Protein in unterschiedlichsten humanen Krebsarten nachweisen und sprachen ihm eine Apoptose-inhibierende Rolle zu (Ambrosini et al., 1997). Survivin ist mit 142 Aminosäuren und einer atomaren Masseneinheit von etwa 16,5 kDa ein kleines Protein (Ambrosini et al., 1997). Das Survivin-codierende Gen BIRC5 befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 17 (Ambrosini et al., 1997).

Survivin ist das kleinste Mitglied einer Gruppe von Proteinen, welche als *Inhibitor of apoptosis protein* (IAP) bezeichnet werden (Altieri, 2008a). Zum jetzigen Stand sind

acht verschiedene IAPs bekannt, deren gemeinsames Merkmal eine sogenannte *Baculoviral IAP Repeat*-Domäne (BIR-Domäne) ist (Srinivasula und Ashwell, 2008, Wheatley und Altieri, 2019). Mittels dieser Domäne sind die Proteine in der Lage, sich an Caspasen zu binden (Eckelman et al., 2006). Neben einer solchen strukturellen Gemeinsamkeit besitzen die IAPs weitere, für die Inhibition der Apoptose wichtige Proteindomänen (Eckelman et al., 2006). Eine davon ist die sogenannte *Really interesting new gene* – Domäne (RING-Domäne), welche eine Ubiquitinligase darstellt und so Proteine durch Ubiquitinierung dem Proteasom zum Abbau zuführen können (Eckelman et al., 2006). Laut Eckelman et al. (2006) gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten die Apoptose durch direkte Inaktivierung von Caspasen zu inhibieren. Zum einen durch Inhibierung ihrer enzymatischen Aktivität und zum anderen durch Abbau der Caspasen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Eckelman et al., 2006). *X-linked IAP* (XIAP) scheint nach aktuellem Stand das einzige IAP zu sein, welches Caspasen direkt inhibieren kann (Eckelman et al., 2006, Wheatley und Altieri, 2019, Eckelman und Salvesen, 2006). Darüber hinaus können IAPs auch indirekt über *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und andere Signalkaskaden ihre Funktion ausüben und sind neben der Inhibierung der Apoptose an weiteren zellulären Abläufen beteiligt (Cetraro et al., 2022). Dazu zählen unter anderem die Zellteilung und -migration (Srinivasula und Ashwell, 2008).

Survivin besitzt selbst keine enzymatische Funktion sondern dient vielmehr als eine Art Adapterprotein im Zusammenspiel mit anderen Proteinen (Wheatley und Altieri, 2019). Das Protein ist funktionell für die Inhibition der Apoptose und eine regelrechte Zellteilung während der Mitose von besonderer Relevanz (Wheatley und Altieri, 2019, Altieri, 2006). Laut Wheatley und Altieri (2019) interagiert Survivin mit XIAP, *Hepatitis B virus X-interacting protein* (HBXIP) und *XIAP-associated factor 1* (XAF1). Dieser Komplex soll die Wirkung von XIAP auf Caspasen sowie die Aktivität anderer IAPs modulieren (Wheatley und Altieri, 2019, Marusawa et al., 2003). Ferner beschreiben Song et al. (2003) eine Interaktion zwischen *Second mitochondrial-derived activator of caspases* (Smac), einem IAP-Inhibitor, und Survivin. In ihren Versuchen konnten sie nachweisen, dass Survivin den pro-apoptotischen Effekt von Smac antagonisiert (Song et al., 2003). Smac oder auch *Direct IAP binding protein with low PI* (DIABLO) genannt, ist ein proapoptotisches Protein und inhibiert die Wirkung von IAPs (Verhagen und Vaux, 2002). Survivin besitzt eine Halbwertszeit von etwa 30 Minuten und wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Zhao et al., 2000).

6.8.1 Apoptose

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Es ist allgemein bekannt, dass die Apoptose über einen extrinsischen und einen intrinsischen Aktivierungsweg eingeleitet werden kann. Dabei spielt die kaskadenartige Aktivierung von bestimmten Cysteinproteasen, den Caspasen, eine bedeutende Rolle (Elmore, 2007).

Extrinsisch kann die Apoptose über einen sogenannten „Todesrezeptor“ (*death receptor*) eingeleitet werden (Elmore, 2007). Dieser gehört zur Gruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (Ashkenazi und Dixit, 1998). Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, welche zur Rekrutierung von verschiedenen Proteinen, Komplexbildung und letzten Endes zur Aktivierung der Caspase 8 führt (Elmore, 2007). Diese dient als Initiatorcaspase und aktiviert die Effektorcaspasen 7, 6 und 3, welche letzten Endes den Zelltod herbeiführen (Elmore, 2007). Am Ende dieser Kaskade steht die Caspase 3, welche durch Aktivierung von weiteren Proteasen und Endonukleasen zu DNA-Fragmentierung, Abbau von Zytoskelett- und Kernbestandteilen, Formung der Apoptosomen mit Expression von Rezeptoren für phagozytierende Zellen und letzten Endes der Phagozytose führt (Elmore, 2007).

Die intrinsische Apoptose geht von den Mitochondrien der Zelle aus. Dabei können verschiedene unterschiedliche Stimuli innerhalb der Zelle zur Initiation des programmierten Zelltods führen (Elmore, 2007). Ein Beispiel wäre dabei DNA-Schäden durch oxidativen Stress oder ein Entzug von Wachstumsfaktoren (Elmore, 2007). Der Stimulus führt unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, welcher wiederum eine Signalkaskade über proapoptische Proteine der *B-cell-lymphoma*-Familie (*bcl2*) in Gang setzt (Chen, 2016, Riley et al., 2008). Proteine der *bcl2*-Familie können sowohl pro- als auch antiapoptisch wirken und dienen im Allgemeinen als Modulatoren der Apoptose (Elmore, 2007). Eine Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran wird induziert, woraufhin Cytochrom c, aber auch Smac/DIABLO, das Mitochondrium ins Zytosol verlässt (Elmore, 2007). Innerhalb des Zytosols bildet sich aus Cytochrom c, der Pro-Caspase 9 und weiteren Adapterproteinen das sogenannte Apoptosom (Chinnaiyan, 1999). Dieses aktiviert die Caspase 9, welche wiederum die Effektorcaspasen stimuliert (Elmore, 2007).

6.8.2 Survivin-Expression und Rolle in der Onkologie

Survivin wurde als Apoptose-Inhibitor und Regulator der Mitose in einer Vielzahl von Tumorgeweben entdeckt und ist in der Lage Tumorzellen vor Apoptose zu schützen (Altieri, 2008a, Wheatley und Altieri, 2019, Fukuda und Pelus, 2006, Altieri, 2003). Darüber hinaus ist es auch während der Embryogenese exprimiert und in der Entwicklungsphase von besonderer Relevanz (Uren et al., 2000). Neben Tumorzellen und Embryogenese konnte BIRC5 auch in nichtmalignem adultem differenziertem Gewebe nachgewiesen werden und könnte dort eine zytoprotektive oder -destruktive Funktion haben (Lechler et al., 2007). Zudem wurde das Protein in primitiven hämatopoetischen Zellen, T-Lymphozyten, Neutrophilen und vaskulären Endothelzellen nachgewiesen (Fukuda und Pelus, 2006). Eine basale Expression konnte darüber hinaus in humanen Thymuszellen und Inselzellen des Pankreas gefunden werden (Kobayashi et al., 2002, Liggins et al., 2003).

Survivin kann als prognostischer Marker in der Therapie maligner Erkrankungen herangezogen werden, da es in den meisten Krebsformen stark exprimiert wird und mit einer erhöhten Rückfallrate, Chemotherapie- und Strahlenresistenz sowie einem schlechten Outcome assoziiert ist (Altieri, 2003, Altieri, 2008b, Wheatley und Altieri, 2019, Fukuda und Pelus, 2006). Aufgrund der Überexpression in Tumorzellen und seiner antiapoptotischen Eigenschaften, stellt Survivin einen wichtigen und vielversprechenden Ansatzpunkt onkologischer Forschung dar (Wheatley und Altieri, 2019).

6.8.3 Survivin in der Cochlea

Habtemichael et al. (2010) gelangt erstmals der Nachweis von Survivin in ausdifferenziertem cochleären Gewebe anhand eines Meerschweinchenmodells und ließ die Idee einer möglichen physiologischen oder pathophysiologischen Rolle des Proteins im Rahmen von Innenohrdysfunktionen zu (Habtemichael et al., 2010a, Habtemichael et al., 2010b). In weiteren Experimenten konnten sie zeigen, dass eine moderate Lärmbelastung zu einem Hörverlust von 33 dB und einem Anstieg der Survivin-Expression im Spiralligament, dem Corti-Organ und den Nervenfasern führte (Habtemichael et al., 2010a, Knauer et al., 2010). Nach intratympanaler Injektion des ototoxischen Aminoglykosids Gentamicin hingegen konnte eine signifikante Expressionsminderung, korrelierend mit einem mittleren Hörverlust von 24 dB

nachgewiesen werden (Habtemichael et al., 2010a, Knauer et al., 2010). Habtemichael et al. und Knauer et al. (2010) postulierten nach ihren Versuchen eine mögliche otoprotektive Rolle des Antiapoptoseproteins Survivin (Knauer et al., 2010, Habtemichael et al., 2010a).

6.8.4 Survivin und NO

In diversen Publikationen konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von Survivin und der Konzentration an NO hergestellt werden (Chao et al., 2004, Fetz et al., 2009). Chao et al. (2004) fanden heraus, dass die Gabe von NO-spendenden Substanzen, wie N-Acetyl-Pencillamin (SNAP) und Natriumnitroprussid (SNP), mit einer Expressionsminderung von Survivin in humanen Lungenkarzinomzellen korreliert (Chao et al., 2004). Sie postulieren ebenfalls, dass der p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg für die NO-abhängige Inhibition von Survivin verantwortlich ist (Chao et al., 2004). Dies konnten Engels et al. (2008) in ihren Untersuchungen am Ovarialkarzinom bestätigen (Engels et al., 2008). Der p38-MAPK-Signaleweg ist bei hohen NO-Konzentrationen von Relevanz und vermittelt eine Expressionsminderung von Survivin und den Zelluntergang durch Apoptose (Fetz et al., 2009). Darüber hinaus scheint auch der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt (PI3K/Akt)-Signalweg im Zusammenhang mit niedrigen Konzentrationen und Expressionssteigerung von Survivin von Relevanz zu sein (Fetz et al., 2009). Die Tatsache, dass niedrige NO-Konzentrationen zur Expressionssteigerung von Survivin und hohe Konzentrationen zur Herunterregulierung der Expression führt konnte in verschiedenen malignen Zelltypen nachgewiesen werden (Chao et al., 2004, Engels et al., 2008, Fetz et al., 2009). Zusätzlich konnten Fetz et al. (2009) und Engels et al. (2008) eine Korrelation zwischen iNOS- und Survivin-Expression feststellen (Fetz et al., 2009, Engels et al., 2008).

Nach Lärmtrauma und Verabreichung ototoxischer Medikamente konnte in der Cochlea eine gesteigerte NO-Produktion durch eNOS und iNOS nachgewiesen werden (Heinrich et al., 2006, Heinrich et al., 2005, Shi et al., 2001, Watanabe et al., 2002). Ebenfalls konnten beide Stimuli die Survivin-Expression in der Cochlea beeinflussen (Habtemichael et al., 2010a). Laut Knauer et al. (2010) spielen eNOS und niedrige NO-Konzentrationen sowie deren regulatorischer Einfluss auf Survivin mittels

des PI3K/Akt-Signalwegs eine mögliche otoprotektive Rolle nach cochleärem Trauma (Knauer et al., 2010).

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Versuchstiere

Es wurden gesunde, weibliche *Dunkin Hartley* - Albinomeerschweinchen (200-250g, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) als Versuchstiere verwendet. Insgesamt wurden 24 Tiere eingesetzt, von denen jeweils eine Hälfte ein Cochlea-Implantat erhielt und die andere Hälfte als Sham-Kontrolle (reine Cochleostomie ohne Cochlea-Implantation) diente. Bei allen Tieren lagen präoperativ regelrechte Preyer-Reflexe vor. Eine Mittelohrerkrankung konnte ebenfalls otoskopisch ausgeschlossen werden. Die Tiere wurden in einem 12h-12h Tag-Nacht-Rhythmus in den Räumlichkeiten der *Translational Animal Research Center* (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten (Universitätsmedizin Mainz, Gebäude 901, 5. OG). Die tierexperimentellen Versuche, Tötung und Organentnahme der Versuchstiere erfolgten im Labor der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz (Gebäude 102, 2. OG). Eine ausreichende Versorgung mit Nahrung und Wasser wurde *ad libitum* gewährleistet. Ein konstantes Klima von 22°C, eine relative Luftfeuchte von 55% und ein Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden wurde bei der Haltung der Versuchstiere eingehalten. Sowohl Haltung im TARC, als auch experimentelle Versuche im Labor fanden übereinstimmend mit gesetzlichen Vorgaben statt und wurden entsprechend von der verantwortlichen Aufsichtsbehörde (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Mainzer Straße 112, 56068 Koblenz) kontrolliert. Eine entsprechende Genehmigung der Tierversuche lag vor (23 177-07 / G 14-1-062).

7.1.2 Chemikalien, Geräte und Einmalmaterial

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Citronensäure Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dako Stift „Dako Pen“	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark

Diaminobenzidin (DAB)	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
DAB Pufferlösung	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
eNOS monoclonal rabbit IgG antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
<i>Eukitt</i> [®] Quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehyd 4%	VWR Chemicals, Radnor, PA, USA
<i>Goat-anti-rabbit antibody</i> (polyclonaler biotynlierter Sekundärantikörper)	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Hämalaunlösung (sauer) nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
iNOS polyclonal rabbit IgG antibody	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Isopropanol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland
Methanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Normalserum (Goat-serum)	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Paraffin <i>Roti</i> [®] - <i>Plast</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
p-eNOS monoclonal rabbit IgG antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sterilium [®] classic pure	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Streptavidin/HRP	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
<i>Survivin</i> polyclonal rabbit IgG antibody	Novus Biologicals, Centennial, CO, USA
<i>Terralin</i> [®] <i>liquid</i>	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Tris(hydroxymethylmethan)-aminomethan <i>PUFFERAN</i> [®]	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol/ Xylene	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Dampfgarer	SilverCrest, Soest, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C) <i>Herafreeze</i> [™]	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Kamera Nikon TE-DIH-F	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Kühlplatte EG 1140C	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Mikroskop h500	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop Nikon Eclipse E200	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikrotom RM 2165	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Paraffingießstation EG1140H	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
pH-Meter <i>FiveEasy</i> TM	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Pipette (100µl-1000 µl) <i>Transferpette</i> [®] S	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipette (50µl-200 µl) <i>Reference</i> [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (10µl-100µl) <i>Reference</i> [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (2µl-20µl) <i>Reference</i> [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (0,5µl-10µl) <i>Reference</i> [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette (0,1µl-2,5 µl) <i>Reference</i> [®]	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterile Werkbank <i>MC6</i>	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen im Allgäu, Deutschland
Präzisionswaage <i>Kern PCB</i>	As-Wägetechnik GmbH, Garching bei München, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vortexmischer	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Wasserbad	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim am Main, Deutschland

Tabelle 3: Einmalmaterial

Material	Hersteller
Deckglas 24 x 50 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger <i>Superfrost Plus</i> TM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pasteurpipetten 3ml	Alpha Laboratories Limited, Hampshire, United Kingdom
Pipettenspitzen (bis 1000µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (bis 200µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (bis 10µl)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
<i>Safe-Lock Tubes Eppendorf Quality</i> TM (1,5ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Einmalskalpell (<i>disposable scalpel</i>) No.11/No.21	Feather safety razor Co. LTD., Osaka, Japan
Einmalhandschuhe Nitrile Powder-free Größe M	Abena A/S, Aabenraa, Dänemark

7.1.3 Zusammensetzung der Pufferlösungen

Für die immunhistochemische Färbung der *Cochleae* wurden entsprechend den jeweiligen Antikörpern zwei verschiedene Puffer verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 4 beschrieben ist.

Tabelle 4: Pufferzusammensetzung

Citratpuffer (pH 6,0)	TRIS/EDTA-Puffer (pH 9,0)
18 ml 0,1mol/L Zitronensäure	10 mmol/L TRIS (1,21g)
82 ml 0,1mol/L Natriumcitrat	1 mmol/L EDTA (0,29g)
900 ml Aqua dest.	1000ml Aqua dest.

7.2 Methoden

7.2.1 Sicherstellung der Normalhörigkeit durch ABR

Die Versuchstiere wurden mittels Isofluran (Fa. AbbVie, Ludwigshafen, Deutschland) 1,15 Vol% inhalativ bei einer Sauerstoffflussrate von 2l/min sediert. Anschließend erfolgte die Einleitung einer intraperitonealen Narkose mit Ketamin (Ketavet, Bayer, Leverkusen, Deutschland) 85 mg/kg + Xylazin (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland) 8,5 mg/kg. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte alle 30 Minuten durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketamin 42,5 mg/kg + Xylazin 4,25 mg/kg. Die Tiere wurden während der gesamten Versuche auf einer Heizplatte gelagert (38°C) und die Körpertemperatur rektal kontrolliert. Eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr wurde durch eine intravenöse Dauerinfusion von NaCl 0,9% mit einer Flussgeschwindigkeit von 80µl/kg KG/min gewährleistet. Bepanthensalbe (Fa. Roche) schützte die Augen der Tiere vor dem Austrocknen.

Zusätzlich zur intraperitonealen Narkose erfolgte eine Lokalanästhesie mit Articain (Ultracain 1%, 0,5ml) (Sanofi, Paris, Frankreich) im Bereich der Lendenwirbelsäule, des Vertex und des Mastoids. Nach durchgeführter Hautrasur wurden die automatisierten Hirnstammpotentiale (*Automated auditory brainstem responses*, ABR) mittels Silberdrahts in den oben genannten drei Regionen abgeleitet. Dabei wurde das jeweilige Ohr durch einen externen Lautsprecher mit sich wiederholenden akustischen

Signalen beschallt und gleichzeitig über die Silberelektroden die akustisch evozierten Potentiale abgeleitet. So konnte die Normalhörigkeit der Tiere sichergestellt, sowie deren minimale Hörschwelle abgeleitet werden.

7.2.2 Tierexperimentelle Cochleaimplantation

Im weiteren Verlauf des Experimentes fanden weitere audiometrische und mikrozirkulatorische Analysen statt. Dabei handelt es sich um Ableitungen von Summenaktionspotentialen (*Compound Action Potentials, CAP*) am runden Fenster und Intravitalmikroskopie der Blutgefäße in der cochleären Lateralwand durch spezifische Fluoreszenzmarker. Da diese Versuche nicht Teil dieser Dissertationsarbeit sind, wird auf diese nicht weiter eingegangen. Die Methodik der Cochleaimplantation wird jedoch für die weitere Interpretation als wichtig angesehen und im Folgenden beschrieben. Zunächst wurde nach retroaurikulärer Hautinzision das Subkutangewebe durchtrennt, die Muskulatur verlagert und die *Bulla auditiva* dargestellt. Anschließend wurde die *Bulla auditiva* perforiert, ihr lateraler Aspekt abgestanzt und die Cochlea exponiert. Mit einem Diamant-Cochleostomiebohrer (0,6 mm Durchmesser) wurde die Cochlea in ihrer basalen Windung unmittelbar caudal des runden Fensters in der Scala tympani eröffnet (sog. Cochleostomie). Anschließend wurde eine speziell angefertigte Silikonelektrode (4-Kanal *Guinea pig electrode*, Fa. MED-EL, Innsbruck, Österreich) ca. 5 mm tief vollinsertiert und mit Histoacryl (B. Braun, Melsungen, Deutschland) am Rand der Bulla fixiert und die Cochleostomie mit Muskelgewebe aus dem *Musculus temporalis* abgedeckt. Die Elektrode verblieb für die weiteren oben genannten Versuche für etwa zwei Stunden in der Cochlea.

7.2.3 Herstellung der Paraffinschnitte

Die Versuchstiere wurden nach Sicherstellung einer maximal tiefen Narkose mittels Injektion von 1 ml Kaliumchlorid (14,9%) getötet. Im Anschluss wurde das jeweils linke und rechte Felsenbein als Ganzes entnommen und in einer Formaldehydlösung fixiert. Im nächsten Schritt wurde die Cochlea aus dem Felsenbein freipräpariert. Dabei war es von zentraler Bedeutung, so viel Felsenbeinknochen wie möglich von der Cochlea zu entfernen, da dies die anschließende Entkalkung des Präparates erleichtert. Die Cochleae wurden nach Freipräparierung zur Entkalkung für drei Wochen in einer

EDTA-Lösung bei 4°C eingelegt, mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol entwässert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet.

Im weiteren Verlauf wurden aus den Blöcken mittels Microtom (Typ RM 2165, Fa. Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) 3 µm dicke Schnitte angefertigt und nach einem Glättevorgang in warmen Wasser (37°C) auf Superfrost Objektträger (Fa. ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA,) aufgezogen. Es wurde dabei auf die optimale Schnittrichtung der Cochlea geachtet. Anschließend wurden die Schnitte für 24 Stunden bei 35° Celsius in einem Trockenschrank gelagert, um das Anhaften des Schnittes auf dem Objektträger zu gewährleisten.

7.2.4 Immunhistochemische Anfärbung der Paraffinschnitte

Durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70% Isopropanol für je 5 Minuten) wurden die Schnitte für die weiteren Versuchsschritte entparaffiniert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte anschließend für 30 Minuten in einem, dem Antikörper entsprechenden, Puffer (Citrat, pH 6,0 oder TRIS/EDTA, pH 9,0) mittels Dampfgeräts auf etwa 90°C erhitzt. Dabei wurde für eNOS und phospho-eNOS (p-eNOS) TRIS/EDTA und für Survivin und iNOS Citrat als Puffer verwendet. Die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgte durch eine Behandlung mit einer Lösung aus 3% H₂O₂ und Methanol für 19 Minuten. Nach einer Präinkubation für 45 Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 1% Rinderserumalbumin und 10% Ziegenserum (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark, Nr. X0907), erfolgte für einen Teil der Schnitte die Inkubation mit dem polyklonalen anti-Survivin Hasen-IgG-Antikörper (1:1000, Novus Biologicals, Centennial, CO, USA, Nr. NB500-201) über Nacht bei 4° Celsius. Für den Rest der Schnitte erfolgte eine analoge Behandlung mit einem monoklonalen anti-eNOS Hasen-IgG-Antikörper (1:100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, Nr. D8A6N), einem monoklonalen anti-Phospho-eNOS Hasen-IgG-Antikörper (1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, Nr. C9C3) und einem polyklonalen anti-iNOS Hasen-IgG-Antikörper (1:2000, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA, Nr. BML-SA200). Die jeweiligen Verdünnungen erfolgten mit 1% Rinderserumalbumin in PBS. Am folgenden Tag wurde zunächst 30 Minuten mit einem biotyniliertem polyklonalen Sekundärantikörper in 1% Rinderserumalbumin in PBS (*Goat anti-rabbit*, 1:250, Dako Denmark, Glostrup, Dänemark, Nr. E0432) und anschließend 30 Minuten mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase in PBS (1:200, Dako

Denmark, Glostrup, Dänemark, Nr. P0397) inkubiert. Um eine Farbreaktion herbeizuführen, wurde im letzten Schritt für eine Minute mit dem Substrat Diaminobenzidin (DAB, Dako Denmark, Glostrup, Dänemark, Nr. K3468) in dazugehöriger Pufferlösung (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark, Nr. K3468) inkubiert. Das DAB wurde von der Peroxidase umgewandelt und ein braunes Präzipitat entstand. Alle Waschschrte zwischen den Färbeschritten wurden in TBS/Tween (pH 7,6) durchgeführt. Das TBS/Tween setzte sich aus einer 10-fach konzentrierten TBS-Stocklösung (302,85g Tris(hydroxymethylmethan)-aminomethan und 430,50 g Natriumchlorid auf 5 L destilliertes Wasser, pH 7,6) und einer Tween-20-Stocklösung (5%, 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt) zusammen.

Mittels zweiminütiger Gegenfärbung in Hämalaun (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden die restlichen Strukturen der Cochlea besser dargestellt. Zum Schluss erfolgte eine Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol, gefolgt vom Eindecken der Objektträger mit Eukitt® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Nr. BCCB0745) und Deckglas (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nr. 1871).

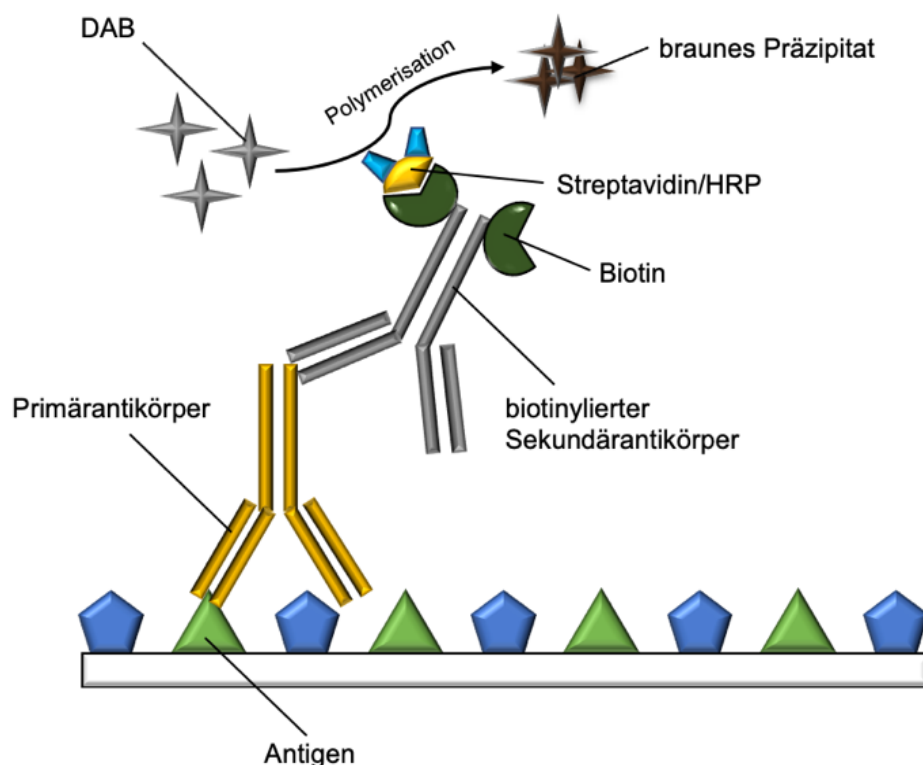


Abbildung 5: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden vier Antikörper verwendet: Anti-Survivin, Anti-eNOS, Anti-p-eNOS und Anti-iNOS. Auf jedem Objektträger befanden sich jeweils zwei Schnitte, die beide die auszuwertenden cochleären Regionen beinhalteten. Es wurden sowohl die CI-Gruppe, als auch die Sham-Gruppe (reine Cochleostomie ohne Cochleaimplantation) angefärbt.

Tabelle 5: Schritte der immunhistochemischen Färbung

2x 5 min	Xylol
5 min	100% Isopropanol
5 min	90% Isopropanol
5 min	80% Isopropanol
5 min	70% Isopropanol
5 min	Agua dest.
5 min	Citratpuffer (pH 6,0) oder TRIS/EDTA (pH 9,0)
30min	Im Dampfgarer erhitztes Citrat bzw. TRIS/EDTA
10 min	Frisches Citrat oder TRIS/EDTA
18 min	Methanol/H ₂ O ₂ -Gemisch
5 min	TBS/Tween
45 min	Normalserum (<i>goat serum</i>) 1:10 verdünnt mit PBS/1% BSA
über Nacht	Primärantikörper je nach Zielprotein und entsprechender Verdünnung
2x 5min	Waschvorgang in TBS/Tween
30 min	Biotinylierter Sekundärantikörper (<i>goat-anti-rabbit</i>) 1:250 verdünnt mit PBS/1% BSA
2x 5min	Waschvorgang mit TBS/Tween
30 min	Streptavidin/HRP 1:200 verdünnt mit PBS
2x 5min	Waschvorgang in TBS/Tween
1 min	Diaminobenzidin in Pufferlösung
5 min	TBS/Tween
2 min	Hämalaun
5 min	Leitungswasser
5 min	70% Isopropanol
5 min	80% Isopropanol
5 min	90% Isopropanol
5 min	100% Isopropanol
2x 5 min	Xylol

7.2.5 Quantifizierung der immunhistochemischen Färbung

Zur quantitativen Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Präparate wurden zunächst Bilder der jeweiligen cochleären Regionen im JPEG-Format gespeichert. Die

Bilder wurden mit einer Nikon TE-DIH-F Kamera (Fa. Nikon, Stadt, Land), welches an ein Nikon Eclipse TE2000-U Mikroskop (Fa. Nikon, Stadt, Land) gekoppelt war, aufgenommen. Für die optimale Darstellung der Regionen wurde eine 400-fache Vergrößerung, gewährleistet durch ein 40x Objektiv, gewählt. Zudem wurde eine konstante Belichtung mit 8.0V (Halogenbelichtung) und eine konstante Belichtungszeit von 20 ms eingestellt.

Für jede Windung der Cochlea wurden Bilder der lateralen Wand einschließlich Spiralligament und *Stria vascularis*, dem cortischen Organ, dem Limbus, bestehend aus Interdentalzellen, Fibrozyten und Nervenfasern sowie den SGZ angefertigt. Bedingt durch die Schnittebene (Medianschnitt) wurden die jeweiligen Regionen für jede Windung zweimal erfasst (links und rechts des Modiolus), sodass insgesamt, unter Berücksichtigung der cochleären Anatomie des Meerschweinchens mit 3,5 Windungen, 40 Bilder pro Cochlea angefertigt wurden. Diese wurden als JPEG-Format mit genauer Bezeichnung von Versuchstier, Seite des Ohres, Antikörper und Region der Cochlea abgespeichert.

Die weitere Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit Adobe Photoshop® (Photoshop Version 5.1, Windows, Adobe System, San Jose, CA, USA). Zunächst wurde für alle Bilder eine Helligkeits- und Kontraststufe eingestellt, da somit gleiche Voraussetzungen für die Analyse geschaffen werden konnte.

Im nächsten Schritt wurden für den jeweiligen Antikörper (Survivin, eNOS, p-eNOS und iNOS), die Versuchstiergruppe (Sham, CI) die jeweiligen Regionen (Lateralwand, Corti-Organ, Limbus und Spiralganglienzellen) ausgeschnitten und in einem Megafile gespeichert. Innerhalb einer Region wurden Pixel mit deutlich sichtbarer Braunfärbung (entspricht dem Präzipitat der immunhistochemischen Reaktion) markiert. Zusätzlich wurde eine Toleranz von 15 Farbstufen vom ursprünglichen Braunwert eingestellt. Innerhalb des Megafiles wurden nun alle Pixel markiert, die diesen Braunwert vorweisen oder in der Toleranz liegen. Alle nicht markierten Regionen der Cochlea wurden mittels „Auswahl umkehren“-Funktion markiert und aus der Datei entfernt. Hierdurch konnten alle Pixelbereiche mit Braunfärbung, welche der Immunreaktion entsprechen, markiert, ausgeschnitten und in einem neuen Megafile gespeichert werden. Zehn dieser einzelnen Pixelbereiche wurden in die nächsten Megafiles, mit den anderen Regionen, als Referenzfärbung übertragen. Dadurch konnte erreicht werden, dass durch Markierung der Referenz, alle Pixel mit entsprechender Intensität

erfasst werden. Somit galten für die Erfassung relevanter Farbbereiche in allen Megafilen die gleichen Einstellungen.

Mithilfe der „Histogramm“-Funktion konnte die Braunfärbung der nun erhaltenen Bereiche quantifiziert werden. Dabei wurde für jede einzelne Region innerhalb eines Megafilens die Färbeintensität sowie die Größe des ausgewählten Bereiches in Pixel bestimmt. Für jede Einzelregion wurde zudem der Grauwert des Hintergrundes bestimmt, da mittels Differenz aus diesem und der durchschnittlichen Farbintensität des einzelnen Bereiches eventuelle Schwankungen in Kontrast und Helligkeit, die bei der Aufnahme der Bilder mittels Mikroskops oder bei der Herstellung der Präparate entstanden sein könnten, berechnet wurden (A). Des Weiteren wurde der braungefärbte, ausgeschnittene Bereich einer Cochlea mit der gesamten Fläche in Bezug gesetzt. Dieser Wert wurde in Prozent angegeben und veranschaulicht die Ausprägung der Immunreaktion (B). Die Intensität der immunhistochemischen Färbung ergibt sich aus der Multiplikation der beiden oben erläuterten Werte (A und B) und wurde in willkürlichen Einheiten (engl.: *arbitrary units* [AU]) angegeben und in einer Tabelle für jede Cochlea, Region und Windung gespeichert. Es wurden je vier Cochleae aus der CI- und Sham-Gruppe für iNOS, p-eNOS und Survivin und je vier Cochleae aus CI- und Sham-Gruppe für eNOS ausgewertet.

Das Verfahren zu Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen wurde in der Literatur von Lehr et al. (1997) beschrieben und ist im Labor der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz etabliert (Heinrich et al., 2010, Lehr et al., 1997).

7.2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurde das Programm Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Als primärer Endpunkt wurde die ermittelte Färbeintensität des jeweils verwendeten Antikörpers festgelegt. Die Ergebnisse der Färbeintensität wurden zwei Gruppen zugeteilt, der Sham- und der CI-Gruppe. Zunächst wurde getestet, ob die ausgewerteten Daten einer Normalverteilung unterlagen. Dies wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests durchgeführt. Je nach Verteilungsmuster der entsprechenden Datensätze wurde ein ungekoppelter t-Test für normalverteilte und ein Mann-Whitney-Test für nicht-normalverteilte Daten durchgeführt. Entsprechend

des jeweiligen Verteilungsmusters und Testverfahren werden die Daten in dieser Arbeit als Mittelwert mit Standardabweichung oder Median mit 95%-Konfidenzintervall angegeben. Eine statistische Signifikanz wurde mit einem p-Wert < 0.05 definiert.

8 Ergebnisse

8.1 iNOS-Immunreaktion in der Cochlea

8.1.1 Lokalisation von iNOS in der Lateralwand

Eine iNOS-Immunreaktion kann sowohl in Präparaten der Sham- als auch der CI-Gruppe in der *Stria vascularis* und dem Spiralligament nachgewiesen werden (Abbildung 6, A-D). In der *Stria vascularis* sind Marginal-, Intermediär- und Basalzellen in beiden Gruppen durch Antikörper angefärbt. Im Vergleich zur CI-Gruppe (C, D) zeigt sich in der Sham-Gruppe (A, B) optisch eine stärkere Expression in der *Stria vascularis* und dem Spiralligament. Insbesondere in den Marginalzellen zeigt sich in der Sham-Gruppe ein deutlich erhöhtes Expressionsmuster (vgl. Abbildung 6, A-D).

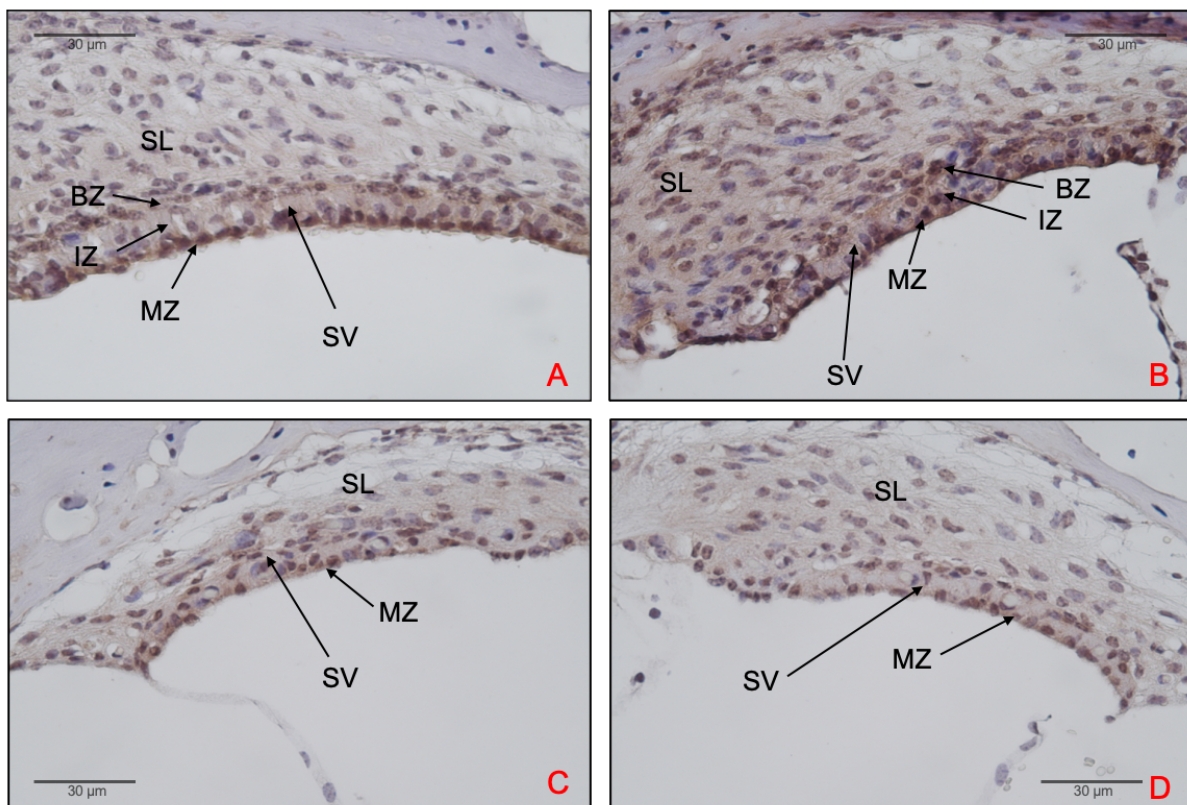


Abbildung 6: iNOS in der Lateralwand

Lichtmikroskopische Aufnahme der Lateralwand in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. **A, B:** Sham; **C, D:** CI; **SV:** *Stria vascularis*; **SL:** Spiralligament; **MZ:** Marginalzellen; **IZ:** Intermediärzellen; **BZ:** Basalzellen

8.1.2 Quantifizierung von iNOS in der Lateralwand

Sowohl nach Sham- als auch nach CI-Operation zeigte sich in der Lateralwand eine iNOS-Immunreaktion. In der *Stria vascularis* ließen sich höhere Mediane als im

Spiralligament detektieren. Die Immunreaktion war nach Elektrodeninsertion in der CI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe in beiden Regionen der Lateralwand im Median erniedrigt. In der *Stria vascularis* (48.51 vs. 596.7 AU, $p < 0.0001$) war die Farbintensität im Median in der CI-Gruppe signifikant geringer ausgeprägt (Abbildung 7). Im spiralen Ligament zeigten sich niedrigere Werte in der CI-Gruppe ohne statistisches Signifikanzniveau zu erreichen (26.42 vs. 180.6 AU, $p = 0.0571$). Dies deutet auf eine reduzierte iNOS-Expression nach Elektrodeninsertion hin wohingegen die Expression des Enzyms innerhalb der Sham-Gruppe auf hohem Niveau bleibt.

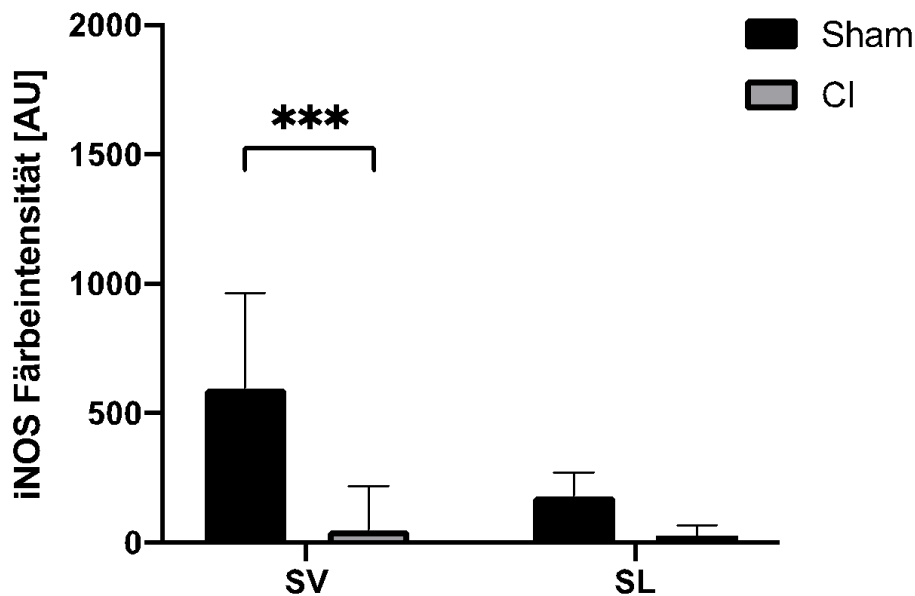


Abbildung 7: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion in der Lateralwand
 Vergleich der iNOS-Färbeintensität in [AU] in der *Stria vascularis* (SV) und dem Spiralligament (SL) nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median mit 95%-Konfidenzintervall. *** $p < 0.0005$.

8.1.3 Lokalisation von iNOS im Corti-Organ

Eine iNOS-Expression kann in der Sham- und der CI-Gruppe im Corti-Organ nachgewiesen werden (Abbildung 8, A-D). Dabei zeigt sich eine iNOS-Immunreaktion sowohl in den iHZ und äHZ als auch in den Stützzellen, insbesondere den Hensen-Zellen. In den Sham-Präparaten (A, B) zeigt sich im Vergleich zu den CI-Präparaten (C, D) in iHZ und äHZ sowie in Stützzellen eine optisch deutlich erhöhte immunhistochemische Färbung.

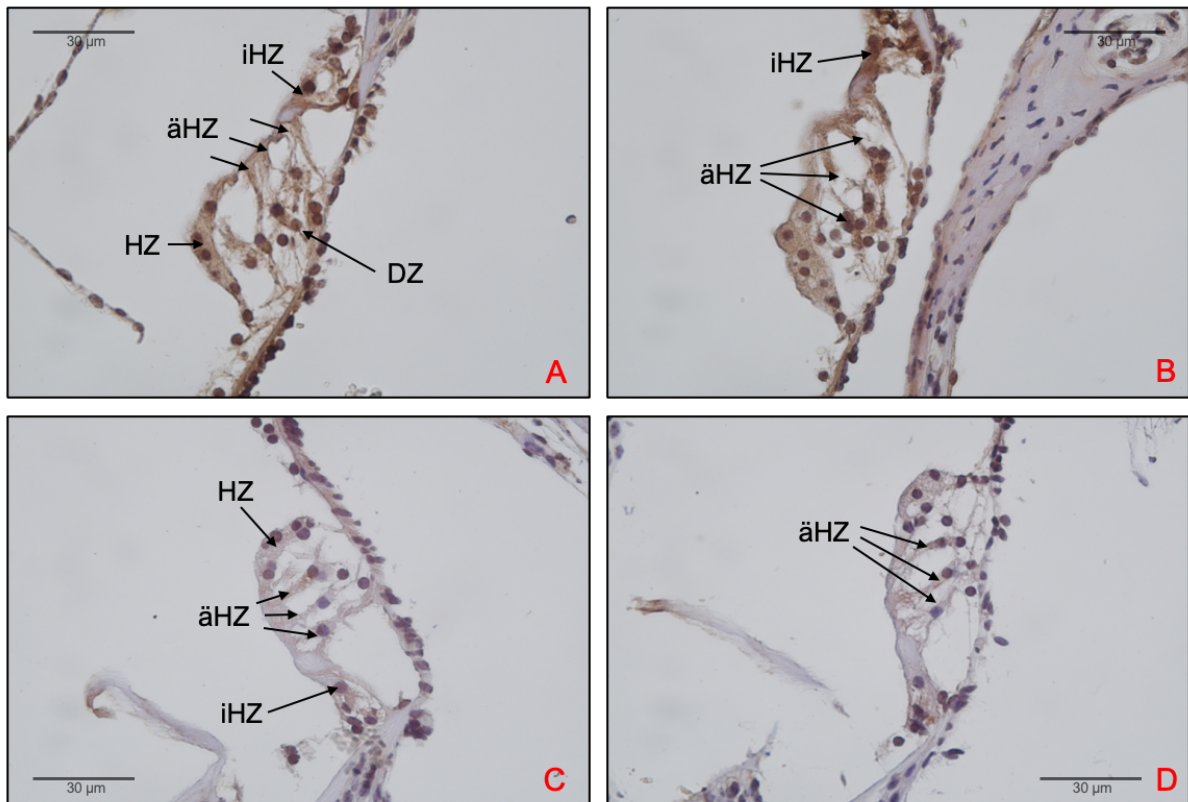


Abbildung 8: iNOS im Corti-Organ

Lichtmikroskopische Aufnahme des Corti-Organs in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. **A, B:** Sham; **C, D:** CI; **HZ:** Hensen-Zellen; **DZ:** Deiters-Zellen; **iHZ:** innere Haarzellen; **äHZ:** äußere Haarzellen

8.1.4 Quantifizierung von iNOS im Corti-Organ

Im Corti-Organ zeigte sich eine iNOS-Immunreaktion nach Sham- und CI-Operation. In der Sham-Gruppe war die Färbeintensität im Median quantitativ stärker ausgeprägt als in der CI-Gruppe (329.5 vs. 54.33 AU) (Abbildung 9). Dieser Unterschied erreichte Signifikanzniveau ($p=0.0003$). Dies spricht für eine Runterregulierung der iNOS-Expression innerhalb des Corti-Organs nach Elektrodeninsertion.

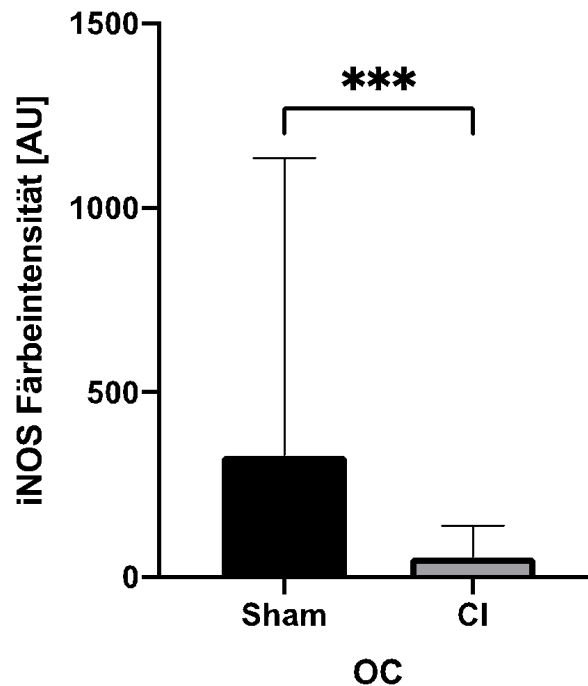


Abbildung 9: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion im Corti-Organ

Vergleich der iNOS-Färbeintensität in [AU] im Corti-Organ nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Mittelwerte mit Standardabweichung. *** $p < 0.0005$.

8.1.5 Lokalisation im Limbus, Nervenfasern und Ganglienzellen

Innerhalb des *Limbus spiralis* (Abbildung 10, A, C) konnte sowohl in der Sham-Gruppe (A) als auch in der CI-Gruppe (C) in Fibrozyten und Interdentalzellen eine immunhistochemische Färbereaktion durch den iNOS-Antikörper nachgewiesen werden. Diese Färbereaktion zeigt sich in Fibrozyten und Interdentalzellen in Präparaten der CI-Gruppe (C) gegenüber Präparaten der Sham-Gruppe (A) optisch deutlich abgeschwächt.

Ein starker iNOS-Nachweis lässt sich in Nervenfasern der Sham-operierten Tiere finden (Abbildung 10, A). Im Gegensatz dazu färben sich die Nervenfasern innerhalb der CI-Gruppe (C) optisch nur sehr leicht bis gar nicht mit dem iNOS-Antikörper an.

In beiden Gruppen zeigt sich eine deutliche iNOS-Expression innerhalb der SGZ (Abbildung 10, C, D). Rein optisch lässt sich dabei kein Unterschied zwischen Sham-Gruppe (B) und CI-Gruppe (D) feststellen.

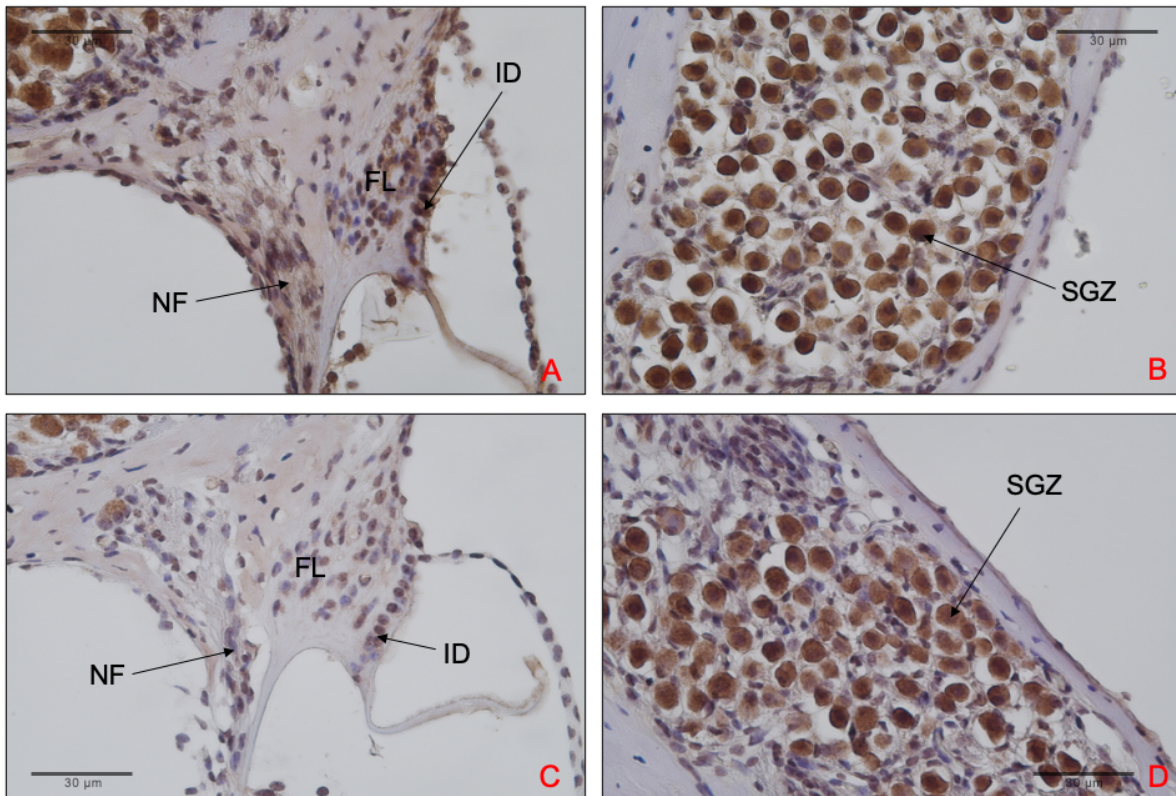


Abbildung 10: iNOS im *Limbus spiralis* und in Spiralganglienzellen

Lichtmikroskopische Aufnahme des Limbus (A, C) und der Spiralganglienzellen (B; D) in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. A, B: Sham; C, D: CI; NF: Nervenfasern; FL: Fibrozyten; ID: Interdentalzellen; SGZ: Spiralganglienzellen

8.1.6 Quantifizierung von iNOS in Nervenfasern und Ganglienzellen

Ein immunhistochemischer iNOS-Nachweis sowie dessen Quantifizierung gelang in Nervenfasern und SGZ sowohl in Sham- als auch in CI-Präparaten und konnte für beide Gruppe quantifiziert werden (Abbildung 11)

In den Nervenfasern (NF) war die quantitative iNOS-Färbintensität im Median in der Sham-Gruppe stärker ausgeprägt als in der Implantat-Gruppe (48.27 vs. 34.05 AU). Dies stellt eine Tendenz ohne statistische Signifikanz dar ($p=0.1049$) deutet jedoch eine Expressionsminderung des Enzyms nach Implantation eines Cochleaimplantates an.

In den SGZ war der Median der gemessenen Farbintensitäten zwischen Sham- und CI-Gruppe annähernd gleich mit Tendenz zu einer stärkeren Färbintensität in der CI-Gruppe (7957 vs. 9350 AU). Dieser war im Vergleich zu den anderen Zellregionen der Cochlea deutlich erhöht. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz ($p=0.6206$). Im

Vergleich zu den anderen Cochlea-Regionen zeigte sich keine Expressionsminderung von iNOS nach Elektrodeninsertion.

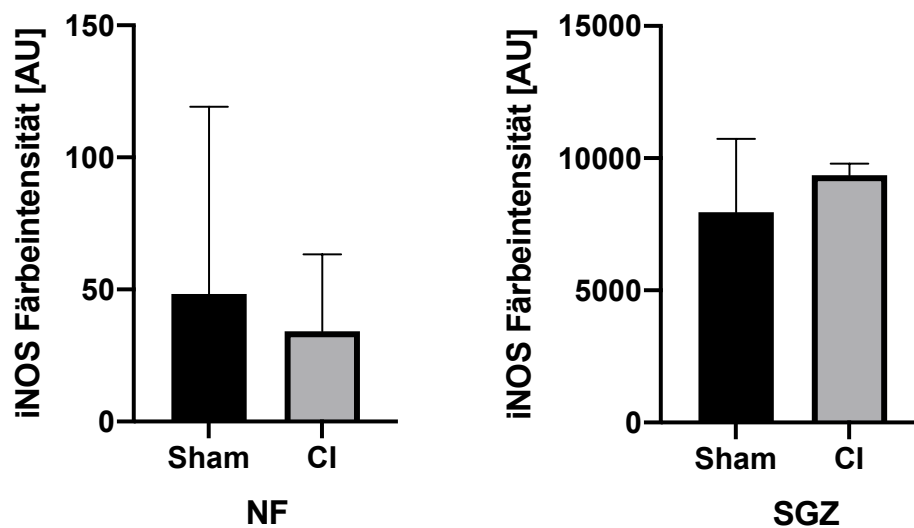


Abbildung 11: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion in NF und SGZ

Vergleich der iNOS-Färbeintensität in [AU] in Nervenfasern (NF) und Spiralganglienzellen (SGZ) nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median und 95%-Konfidenzintervall. Beide Regionen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

8.1.7 Quantifizierung von iNOS im *Limbus spiralis*

Ein iNOS-Immunreaktion und deren Quantifizierung gelang in Fibrozyten und Interdentalzellen des *Limbus spiralis*.

Innerhalb der Fibrozyten zeigte sich ein deutlicher Unterschied des Medians der iNOS-Färbeintensität zwischen Sham- und CI-Gruppe. Diese waren im Median in der Sham-Gruppe signifikant stärker ausgeprägt als in der CI-Gruppe (119.4 vs. 18.69 AU, $p=0.0286$).

Ebenso zeigte sich ein ausgeprägter quantitativer Unterschied in den Interdentalzellen des *Limbus spiralis*. Auch hier war die iNOS-Färbeintensität im Median in der Sham-Gruppe signifikant stärker ausgeprägt als in der CI-Gruppe (564.0 vs. 109.1 AU, $p=0.0003$).

Die quantitative Auswertung der iNOS-Färbeintensität im *Limbus spiralis* zeigte auch hier eine Expressionsminderung von iNOS nach Einbringen eines Cochleaimplantates.

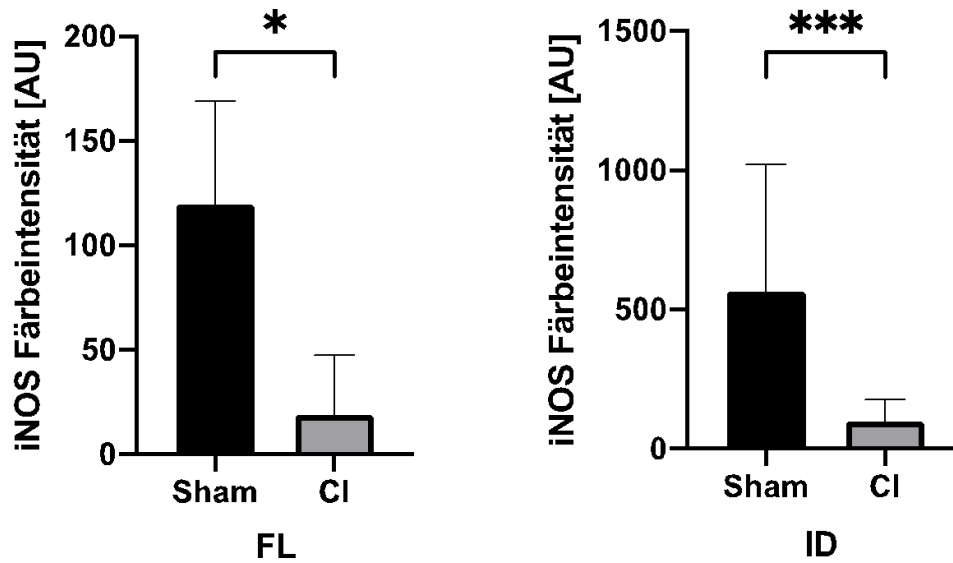


Abbildung 12: Quantifizierung der iNOS-Immunreaktion im *Limbus spiralis*
 Vergleich der iNOS-Färbeintensität in [AU] in Fibrozyten (FL) und Interdentalzellen (ID) des *Limbus spiralis* nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median mit 95%-Konfidenzintervall. *** p<0.0005, * p<0.05.

8.2 Survivin-Immunreaktion in der Cochlea

8.2.1 Lokalisation von Survivin in der Lateralwand

Eine deutliche Survivin-Expression ließ sich in der *Stria vascularis* und im Spiralligament sowohl in der Sham- (Abbildung 13, A, B) als auch in der CI-Gruppe (Abbildung 13, C, D) nachweisen. Innerhalb der *Stria vascularis* zeigten bei beiden Gruppen die Marginal- und Basalzellen eine stärker ausgeprägte immunhistochemische Färbung als die Intermediärzellen. Hinsichtlich der Expression lassen sich die beiden Gruppen optisch nicht voneinander unterscheiden.

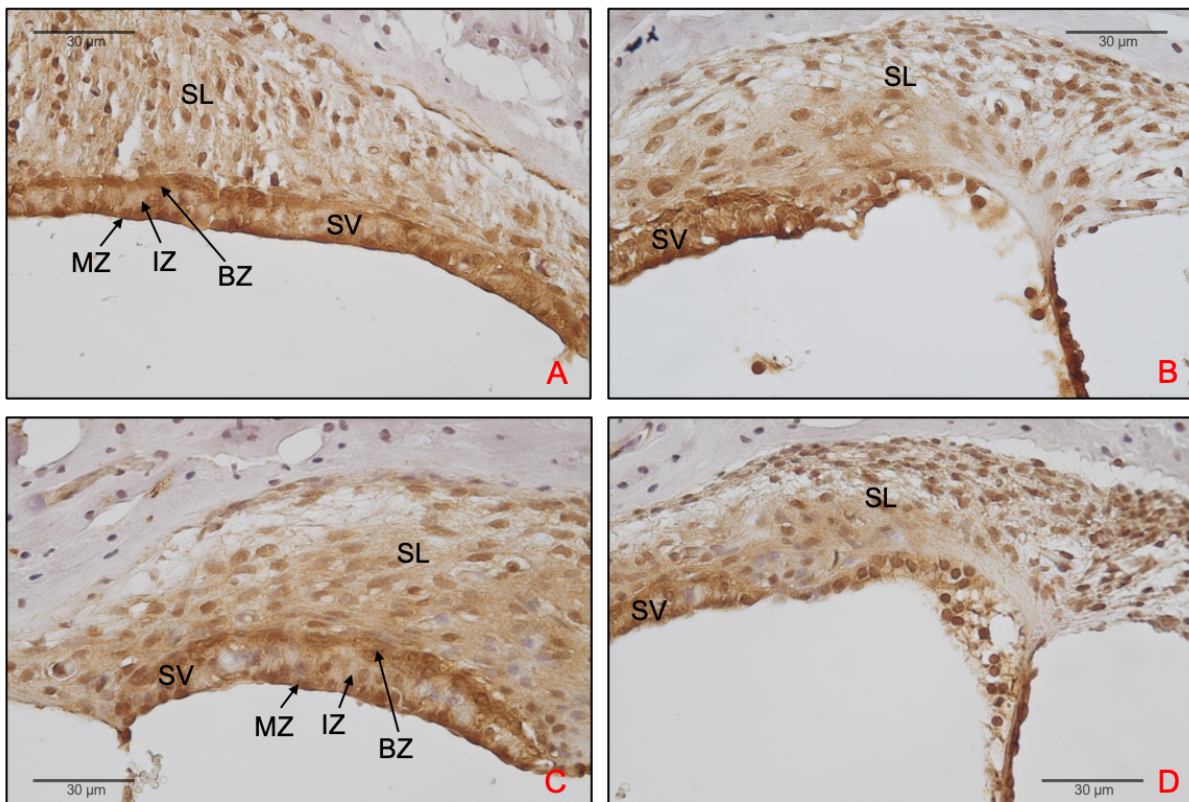


Abbildung 13: Survivin in der Lateralwand

Lichtmikroskopische Aufnahme der Lateralwand in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. **A, B:** Sham; **C, D:** CI; **SV:** *Stria vascularis*; **SL:** Spiralligament; **MZ:** Marginalzellen; **IZ:** Intermediärzellen; **BZ:** Basalzellen

8.2.2 Quantifizierung von Survivin in der Lateralwand

In der Lateralwand zeigte sich sowohl in der Sham- und CI-Gruppe eine ausgeprägte Immunreaktion sowohl in *Stria vascularis* als auch im Spiralligament. Quantitativ zeigt sich in der *Stria vascularis* für beide Gruppen eine höhere Survivin-Immunreaktion. Im Vergleich zur CI-Gruppe ist die Färbeintensität in der Sham-Gruppe im Mittel

signifikant höher (9242 vs. 8225 AU, $p=0.0109$). Im spiralen Ligament ist der Median in der Sham-Gruppe ebenfalls höher als in der CI-Gruppe (3633 vs. 2842 AU). Dieser Unterschied zeigt jedoch nur eine Tendenz in Richtung Sham-Gruppe und ist nicht statistisch signifikant ($p=0.2256$). Sowohl in *Stria vascularis* als auch im Spiralligament sind die Werte der Survivin-Färbereaktion im Mittel (SV) und Median (SL) in der Sham-Gruppe höher als in der CI-Gruppe, was wiederum eine Expressionsminderung von Survivin nach Elektrodenimplantation nahelegt.

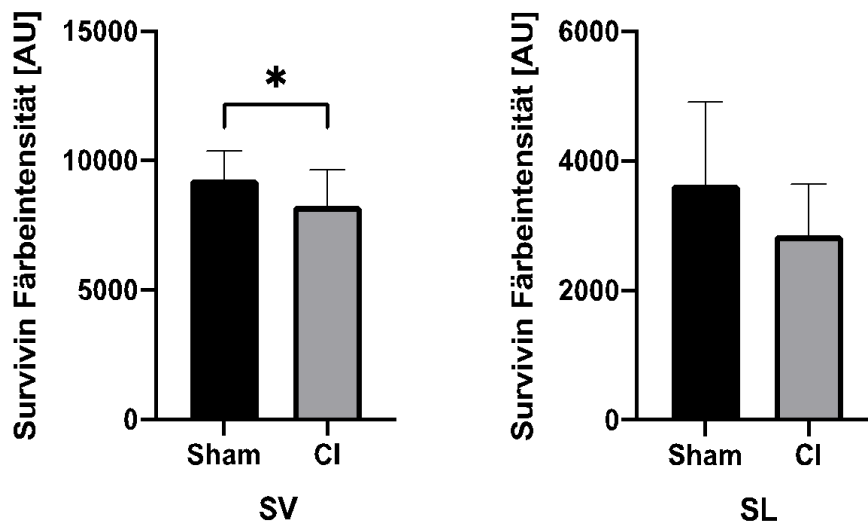


Abbildung 14: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion in der Lateralwand
 Vergleich der Survivin-Färbereaktion in [AU] in der *Stria vascularis* (SV) und dem Spiralligament (SL) nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Mittelwerte mit Standardabweichung (SV) und Median mit 95%-Konfidenzintervall (SL). * $p < 0.05$.

8.2.3 Lokalisation von Survivin im Corti-Organ

Im Corti-Organ konnte eine Survivin-Expression in der Sham-Gruppe (Abbildung 15, A, B) und ebenfalls in der CI-Gruppe (Abbildung 15, C, D) nachgewiesen werden. Dabei wurden sowohl innere und äußere Haarzellen als auch Stützzellen, mit Ausnahme der basalen Deiters-Zellen in beiden Gruppen stark immunhistochemisch angefärbt. Rein optisch ist kein Unterschied in der Färbereaktion zwischen Sham- und CI-Gruppe erkennbar.

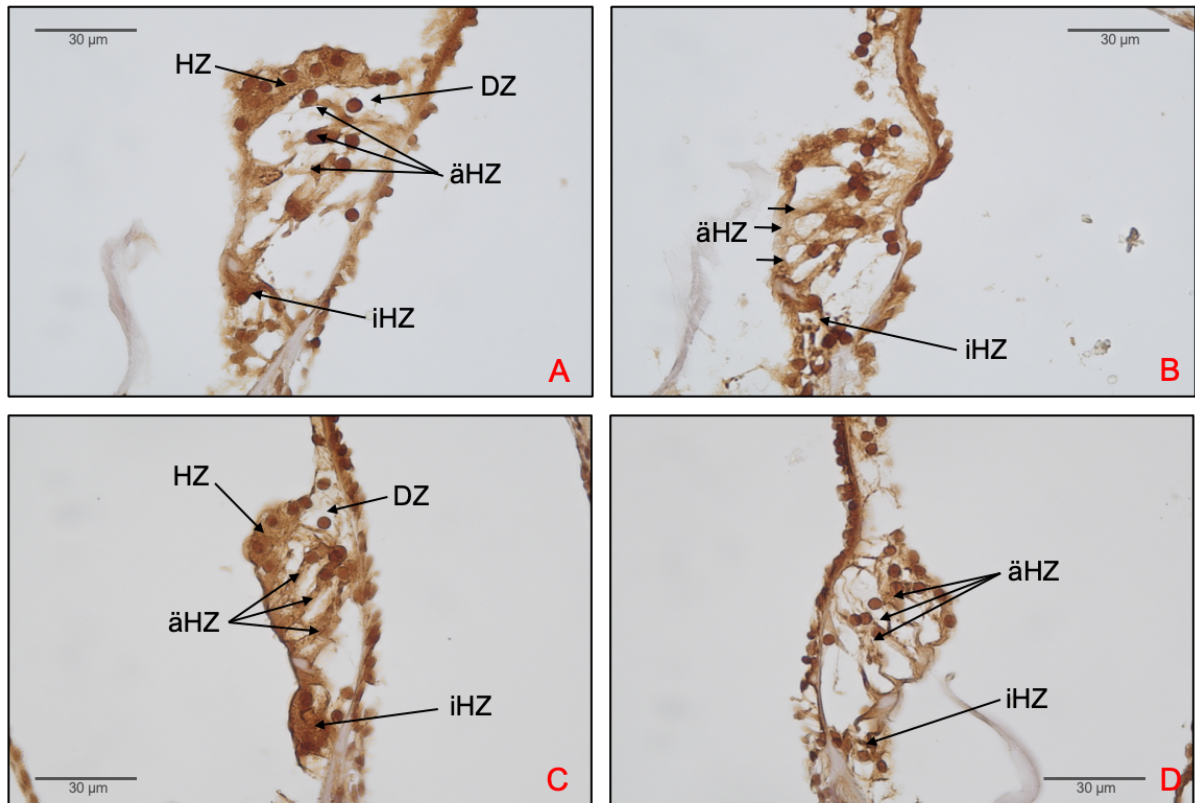


Abbildung 15: Survivin im Corti-Organ

Lichtmikroskopische Aufnahme des Corti-Organs in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. **A, B:** Sham; **C, D:** CI; **HZ:** Hensen-Zellen; **DZ:** Deiters-Zellen; **iHZ:** innere Haarzellen; **äHZ:** äußere Haarzellen

8.2.4 Quantifizierung von Survivin im Corti-Organ

Der Median der Survivin-Färbereaktion im Corti-Organ ist in der Sham-Gruppe etwas höher als in der CI-Gruppe (5653 vs. 4597 AU). Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant ($p=0.5648$). Dies bedeutet, dass es keinen eindeutig signifikanten Unterschied in der Survivin-Expression nach Cochleaimplantation im Vergleich zur Sham-Operation gibt. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz zu Gunsten der Sham-Gruppe.

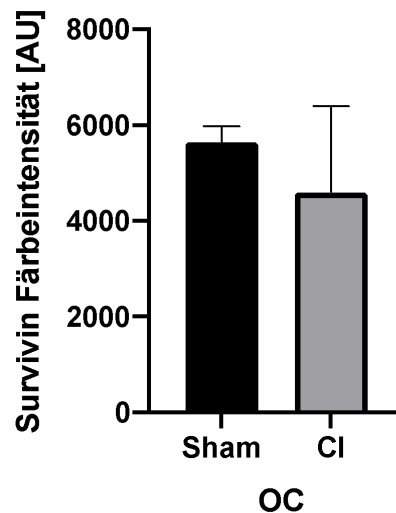


Abbildung 16: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion im Corti-Organ

Vergleich der Survivin-Färbeintensität in [AU] im Corti-Organ nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median mit 95%-Konfidenzintervall. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

8.2.5 Lokalisation im Limbus, Nervenfasern und Ganglienzellen

Im Bereich des *Limbus spiralis* zeigt sich eine deutliche Survivin-Immunreaktion in den Zellkernen der Fibrozyten sowie den Interdentalzellen. Die Intensität der Färbung ist optisch in Sham- (Abbildung 17, A) und CI-Gruppe (Abbildung 17, C) gleichermaßen ausgeprägt.

Innerhalb der Nervenfasern lässt sich ebenfalls eine immunhistochemische Färbereaktion nachweisen. Ein Intensitätsunterschied zwischen beiden Gruppen ist auch hier optisch nicht nachweisbar.

Die SGZ weisen sowohl in den Sham-Präparaten (Abbildung 17, B) als auch in den CI-Präparaten (Abbildung 17, D) eine stark ausgeprägte Färbereaktion auf. Optisch ist die Expression in der CI-Gruppe etwas stärker ausgeprägt als in der Sham-Gruppe.

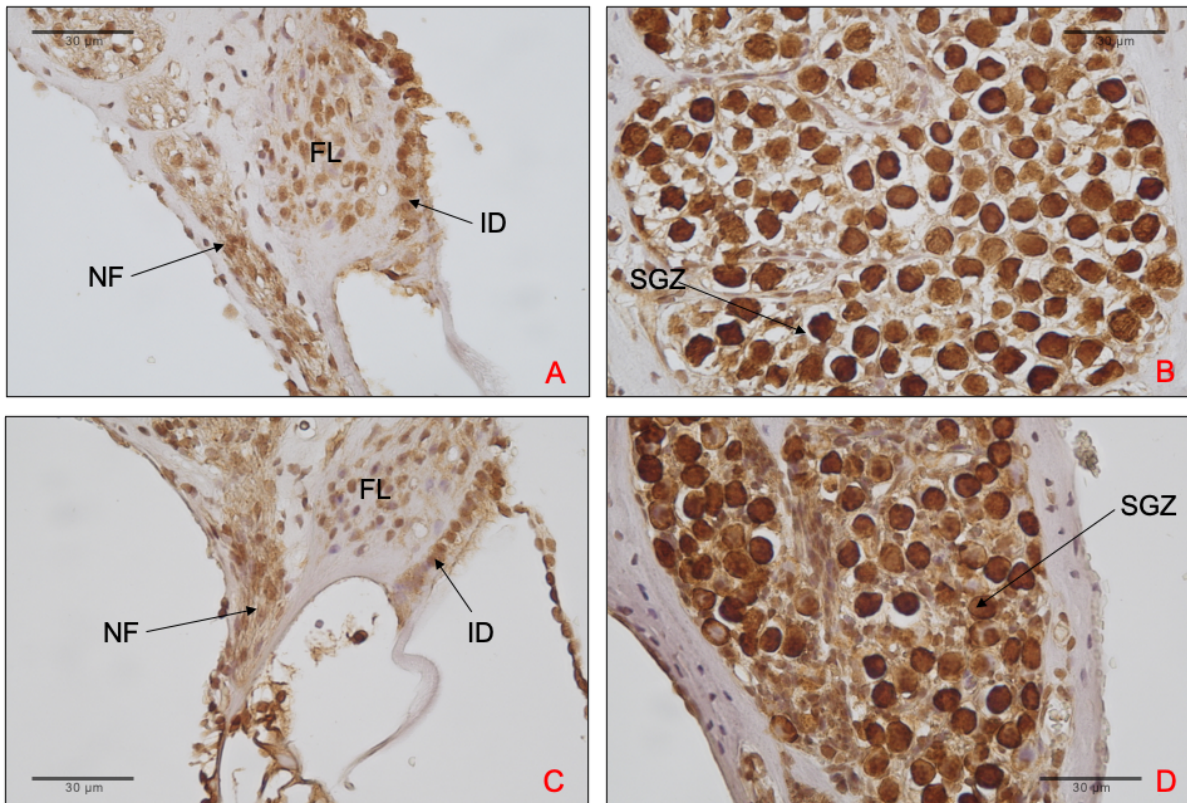


Abbildung 17: Survivin im Limbus spiralis und in Spiralganglienzellen

Lichtmikroskopische Aufnahme des Limbus (A, C) und der Spiralganglienzellen (B; D) in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. A, B: Sham; C, D: CI; NF: Nervenfasern; FL: Fibrozyten; ID: Interdentalzellen; SGZ: Spiralganglienzellen

8.2.6 Quantifizierung von Survivin in NF und SGZ

Im Median zeigt sich in den Nervenfasern eine etwa gleich stark ausgeprägte Survivin-Färbereaktion in beiden Gruppen mit Tendenz zur Sham-Gruppe (6649 vs. 5834 AU). Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant ($p=0.2658$).

In den SGZ sind die Mittelwerte in der CI-Gruppe signifikant höher als in der Sham-Gruppe (11222 vs. 9891 AU, $p=0.0015$) ausgeprägt. Dies zeigt eine Expressionssteigerung von Survivin in den SGZ nach Elektrodenimplantation im Vergleich zu Sham-Operation.

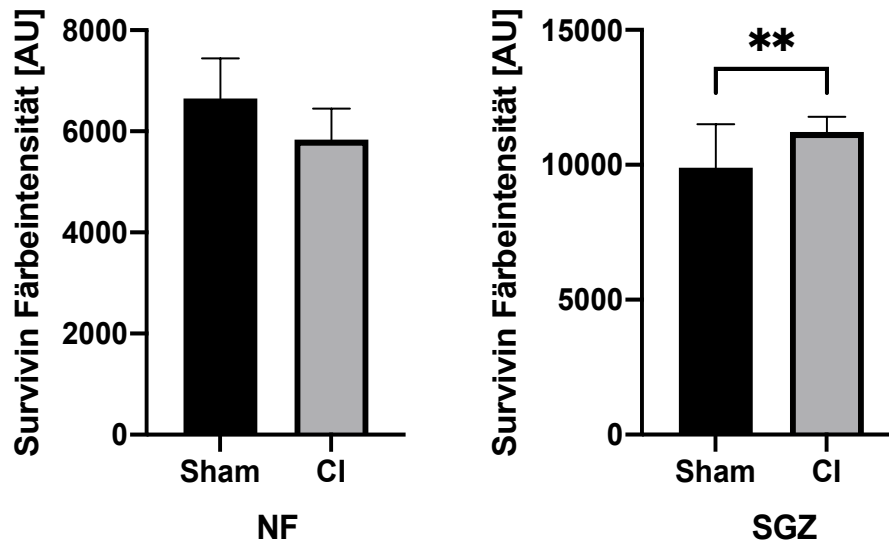


Abbildung 18: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion in NF und SGZ

Vergleich der Survivin-Färbeintensität in [AU] in Nervenfasern (**NF**) und Spiralganglienzellen (**SGZ**) nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median mit 95%-Konfidenzintervall (**NF**) und Mittelwerte mit Standardabweichung (**SGZ**). ** $p < 0.005$.

8.2.7 Quantifizierung von Survivin im *Limbus spiralis*

In den Interdentalzellen des *Limbus spiralis* zeigen sich im Mittel keine signifikanten Unterschiede der Survivin-Immunreaktion zwischen Sham- und CI-Gruppe (7025 vs. 6762 AU, $p = 0.5947$). Eine Elektrodeninsertion führt nicht zur Expressionssteigerung oder -minderung von Survivin in den Interdentalzellen.

In den Fibrozyten des *Limbus spiralis* ist die Survivin-Färbeintensität im Mittel in der Sham-Gruppe signifikant höher als in der CI-Gruppe (2575 vs. 1817 AU, $p = 0.0226$). Dies entspricht einer Minderung der Survivin-Expression nach CI-Implantation in den Fibrozyten.

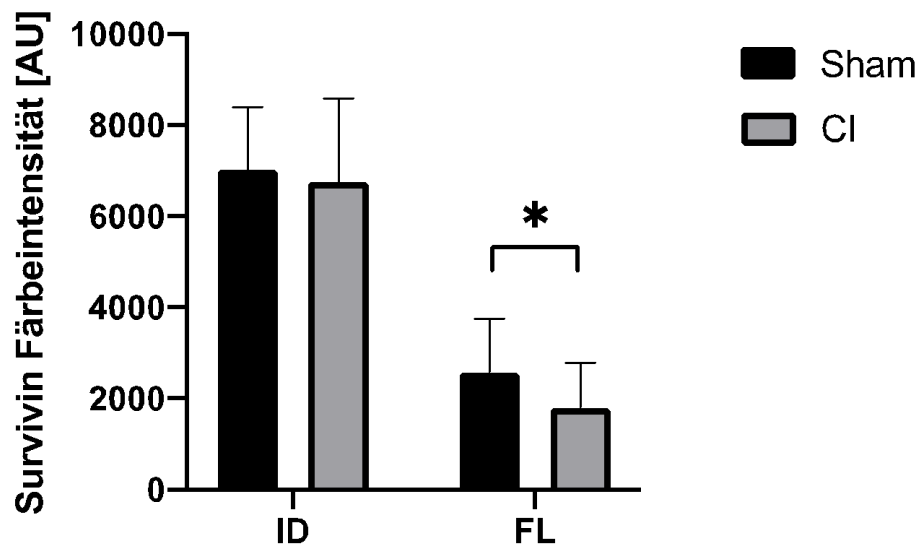


Abbildung 19: Quantifizierung der Survivin-Immunreaktion im *Limbus spiralis*
 Vergleich der Survivin-Färbeintensität in [AU] in Fibrozyten (FL) und Interdentalzellen (ID) des *Limbus spiralis* nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p < 0.05$.

8.3 p-eNOS-Immunreaktion in der Cochlea

8.3.1 Lokalisation in der Lateralwand und im Corti-Organ

Immunhistochemisch kann p-eNOS in der Lateralwand (Abbildung 20, A, C) sowohl in Sham-Präparaten (A) als auch in den CI-Präparaten (C) nachgewiesen werden. Eine Anfärbung zeigt dabei in der *Stria vascularis* und dem Spiralligament. In der Sham-Gruppe (A) ist die Farbintensität optisch stärker ausgeprägt als in der CI-Gruppe (C). Der Expressionsunterschied zeigt sich deutlich in den Basalzellen der *Stria vascularis* (A).

Im Corti-Organ (Abbildung 20, B, D) zeigt sich in beiden Gruppen nur eine leichte immunhistochemische Farbreaktion. Optisch auffällig ist eine verstärkte Anfärbung innerhalb der äHZ und iHZ in der CI-Gruppe (D) im Vergleich zur Sham-Gruppe (B). Die Stützzellen zeigen in beiden Gruppen keinen Unterschied in der Farbreaktion. Diese ist bei beiden schwach ausgeprägt.

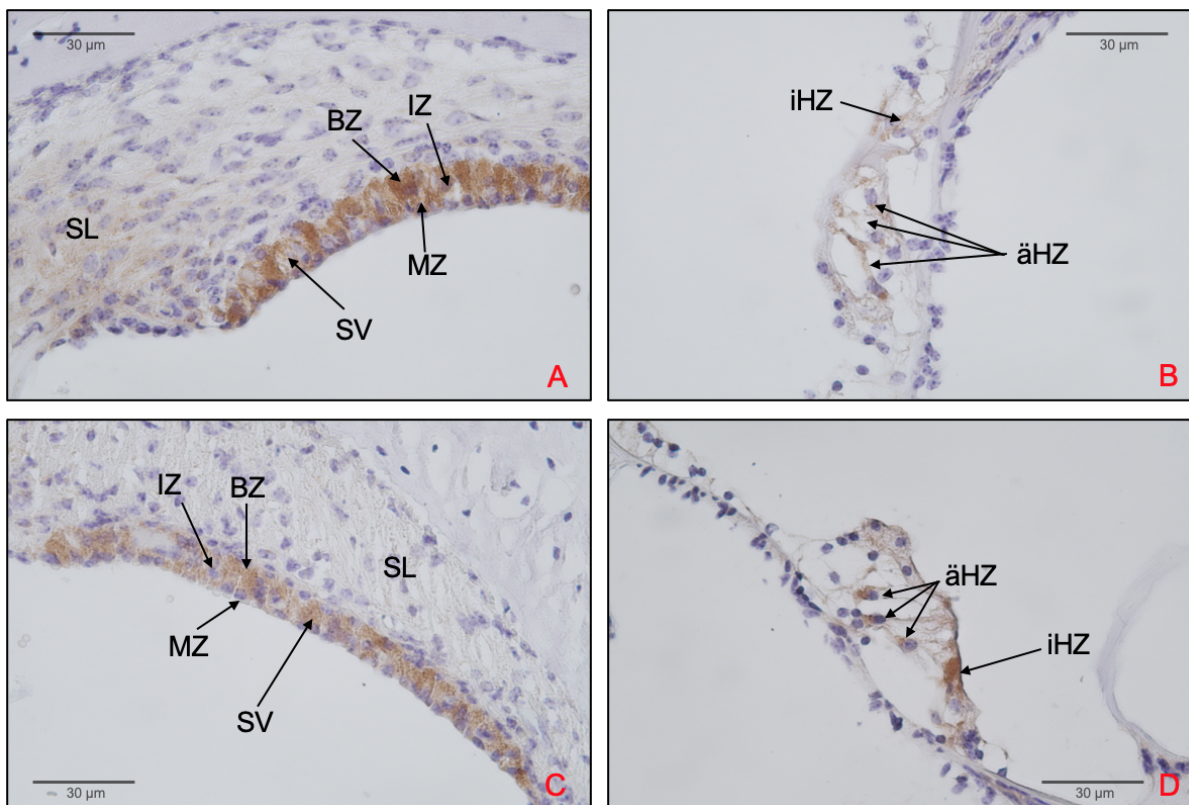


Abbildung 20: p-eNOS in der Lateralwand und im Corti-Organ

Lichtmikroskopische Aufnahme der Lateralwand (A, C) und des Corti-Organs (B, D) in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. A, B: Sham; C, D: CI; SV: *Stria vascularis*; SL: Spiralligament; MZ: Marginalzellen; IZ: Intermediärzellen; BZ: Basalzellen; iHZ: innere Haarzellen; äHZ: äußere Haarzellen

8.3.2 Quantifizierung von p-eNOS in der *Stria vascularis*

In der *Stria vascularis* zeigt sich im Median eine stärkere Farbintensität in der Sham-Gruppe als in der CI-Gruppe (1873 vs. 1218 AU). Der Unterschied beider Gruppen ist statistisch signifikant ($p=0.0018$) und zeigt eine Expressionsminderung von p-eNOS nach Elektrodenimplantation im Vergleich zur Sham-Operation ohne Implantation.

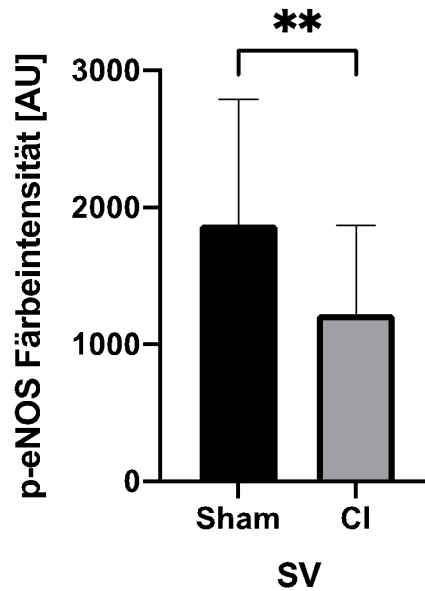


Abbildung 21: Quantifizierung der p-eNOS-Immunreaktion in der SV

Vergleich der Survivin-Färbeintensität in [AU] in der *Stria vascularis* nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median mit 95%-Konfidenzintervall. ** $p < 0.005$.

8.3.3 Quantifizierung von p-eNOS im Corti-Organ

Im Corti-Organ ist der Median der gemessenen p-eNOS-Färbintensität in der CI-Gruppe höher als in der Sham-Gruppe (278.3 vs. 125.5 AU) ohne statistisch signifikant zu sein ($p=0.2019$).

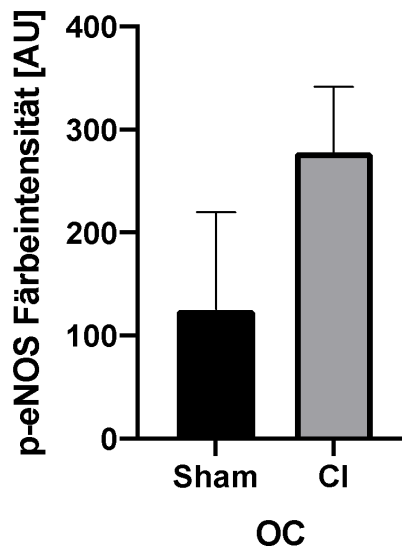


Abbildung 22: Quantifizierung der p-eNOS-Immunreaktion im Corti-Organ

Vergleich der p-eNOS-Färbintensität in [AU] im Corti-Organ nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median mit 95%-Konfidenzintervall. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

8.3.4 Lokalisation im Limbus, Nervenfasern und Ganglienzellen

Im Limbus (Abbildung 23, A, C) zeigt sich optisch in beiden Gruppen eine sehr gering ausgeprägte Farbreaktion in Fibrozyten und Interdentalzellen. Dabei unterscheiden sich Sham- (A) und CI-Gruppe (C) nicht voneinander.

Die Nervenfasern (A,C) weisen ebenfalls nur eine schwache Anfärbung auf. Hier ist optisch eine leicht stärkere immunhistochemische Farbreaktion in der Sham-Gruppe (A) sichtbar.

Sowohl in der Sham- als auch in der CI-Gruppe weisen die SGZ eine p-eNOS-Immunreaktion auf (Abbildung 23, B, D). Eine erhöhte Expression ist dabei vor allem im Zytosol und vereinzelt in den Zellkernen nachweisbar. Optisch zeigt sich in den Sham-Präparaten (B) eine verstärkte Farbintensität.

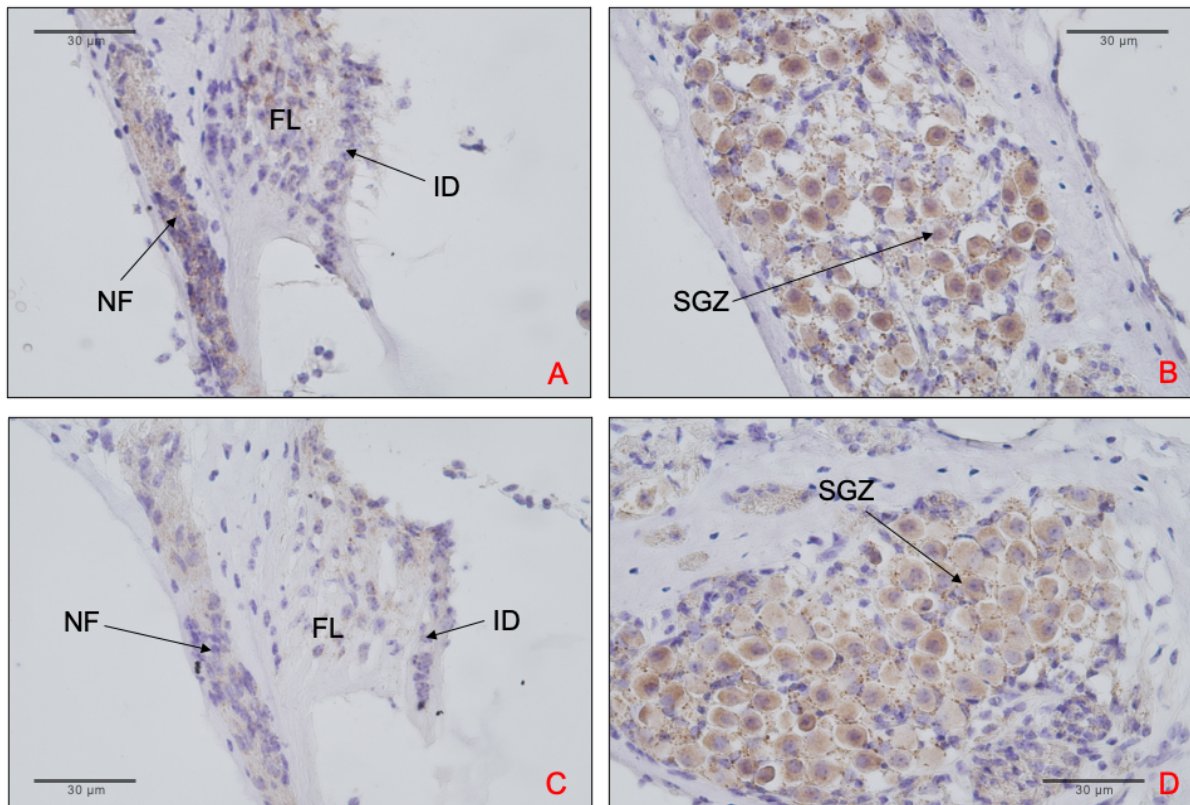


Abbildung 23: p-eNOS im Limbus spiralis und in Spiralganglienzellen

Lichtmikroskopische Aufnahme des Limbus (A, C) und der Spiralganglienzellen (B; D) in 400-facher Vergrößerung. Maßstab 30 µm. A, B: Sham; C, D: CI; NF: Nervenfasern; FL: Fibrozyten; ID: Interdentalzellen; SGZ: Spiralganglienzellen

8.3.5 Quantifizierung von p-eNOS in NF und SGZ

In Nervenfasern ist der Median der p-eNOS-Färbintensität in der CI-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe erniedrigt (11.8 vs. 1.54 AU). Der Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0.0282$).

In den SGZ zeigen sich im Median niedrigere Messwerte für die p-eNOS-Färbintensität in der Sham-Gruppe im Vergleich zur CI-Gruppe (172.3 vs. 478.5). Auch dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p=0.0078$).

In Nervenfasern als auch in den SGZ zeigen sich unterschiedliche Verhältnisse der eNOS-Färbintensitäten zwischen Sham- und CI-Gruppe. Eine klare Tendenz in Richtung erhöhter Werte innerhalb der Sham-Gruppe lässt sich in den Nervenfasern erkennen. Innerhalb der SGZ ist die Expression in der Sham-Gruppe jedoch deutlich geringer als in der CI-Gruppe.

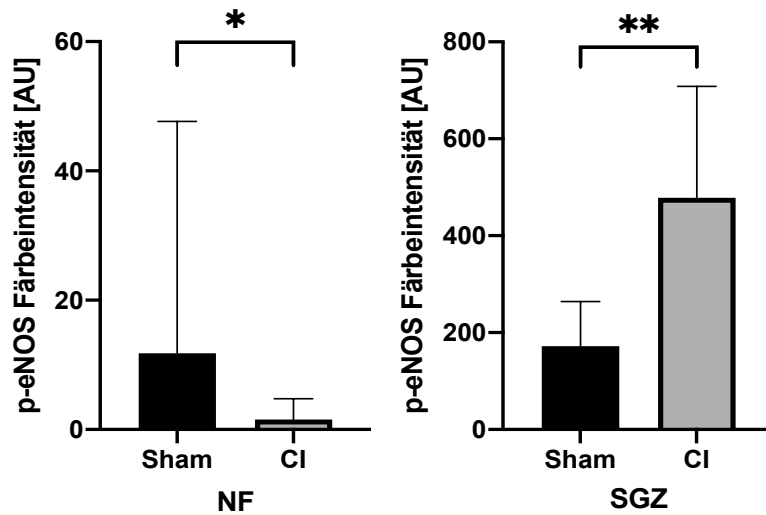


Abbildung 24: Quantifizierung der p-eNOS-Immunreaktion in NF und GC

Vergleich der p-eNOS-Färbeintensität in [AU] in Nervenfasern (**NF**) und Spiralganglienzellen (**SGZ**) nach Sham- und CI-Operation. Darstellung als Median mit 95%-Konfidenzintervall. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$

9 Diskussion

9.1 Diskussion möglicher Limitationen der angewandten Methodik

9.1.1 Versuchsdurchführung und Cochlea-Präparation

Die Versuchstiere wurden alle unter gleichen Bedingungen in den Räumlichkeiten der *Translational Animal Research Center* (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten. Bei den 24 Versuchstieren handelte es sich allesamt um gesunde, weibliche *Dunkin Hartley* - Albinomeerschweinchen ähnlicher Konstitution (200-250g, Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Etwaige Fehlerquellen durch unterschiedliche Versorgung der Versuchstiere, Herkunftsunterschiede oder Geschlechtsunterschiede konnten somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Versuchsdurchführung mit Sham-Operation und CI-Implantation sowie die Tötung der Tiere und Cochlea-Entnahme wurde durch ein und dieselbe Person durchgeführt. Dadurch konnten Unterschiede sowohl in der Operationstechnik als auch bei der Präparationstechnik der Cochlea-Entnahme minimiert werden. Alle Tiere erhielten gleiche Narkotika und supportive Maßnahmen in gewichtsadaptierter Dosis, sodass auch hier Fehlerquellen aufgrund unterschiedlicher Medikation auf ein Minimum reduziert werden konnten.

9.1.2 Anfertigung der immunhistochemischen Präparate

Die Anfertigung der immunhistochemischen Schnitte wurde von einer Person, dem Promovierenden Mathias Fries, für alle Antikörper in den Räumlichkeiten der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz nach dem im Labor etablierten Protokoll durchgeführt (Heinrich et al., 2006, Heinrich et al., 2005). Aufgrund der Vielzahl an Präparaten war es einer Person allein nicht möglich, alle Präparate für den jeweiligen Antikörper an einem Tag zu bearbeiten. Hierdurch könnten sich tagesabhängige Unterschiede in den jeweiligen Färbeprozessen zeigen und letzten Endes zu Veränderungen der Messwerte führen. Um dies zu verhindern, wurden Präparate beider Gruppen an einem Tag gefärbt, um so die möglichen tagesabhängigen Schwankungen auf beide Gruppen gleichmäßig zu verteilen und den Effekt auf die quantitative Auswertung so gering wie möglich zu halten.

9.1.3 Auswertung der lichtmikroskopischen Aufnahmen

Um bei der Anfertigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen Fehlerquellen auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die Aufnahmen durch eine Einzelperson, dem Promovierenden Mathias Fries, für alle Präparate durchgeführt. Dabei wurde dasselbe Mikroskop und derselbe Computer für alle Aufnahmen verwendet und stets auf eine identische Einstellung der Belichtung und Belichtungszeit geachtet.

Die Erkennung der einzelnen cochleären Strukturen und Zellen sowie die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mittels Adobe Photoshop® fand durch den Promovierenden Mathias Fries in Unterstützung mit PD Dr. rer. nat. Ulf-Rüdiger Heinrich und dessen außerordentliche Expertise auf diesem Gebiet für die gesamte Versuchsreihe statt. Dieses Verfahren ist im Labor etabliert und reduziert durch einen standardisierten Ablauf mögliche Fehler in der Auswertung (Heinrich et al., 2010, Lehr et al., 1997). Mögliche Fehlerquellen bei der Erkennung von Zellen und der Interpretation der Braunfärbung sind somit personengebunden und auf ein Minimum reduziert. Es handelt sich bei den ermittelten Messwerten um semiquantitative Werte, da die Auswertung letzten Endes dem persönlichen subjektiven Empfinden unterliegt. Somit kann ein Fehler durch die interpretierende und auswertende Person nicht gänzlich ausgeschlossen, durch das standardisierte Verfahren und eine Toleranz von 15 Braunstufen, jedoch auf ein Minimum reduziert werden.

9.2 iNOS-Expression in der Cochlea

Wir unterteilen die Cochlea in sieben Regionen: die Lateralwand mit *Stria vascularis* und Spiralligament, das Corti-Organ, den Limbus mit Interdentalzellen und Fibrozyten sowie Nervenfasern und SGZ. In jeder dieser sieben untersuchten Regionen ließ sich in unseren Experimenten eine iNOS-Expression nachweisen (Ernst et al., 2023). Dies gilt für die Sham- als auch die CI-Gruppe. In der unstimulierten Cochlea ist iNOS in der Regel nicht nachzuweisen (Gosepath et al., 1997). Unsere Ergebnisse lassen sich in Einklang mit früheren Publikationen bringen, in denen man eine Expression von iNOS in der Cochlea nach akustischer oder chemisch-toxischer Stimulation nachweisen konnte (Shi et al., 2003, Watanabe et al., 2000b, Watanabe et al., 2000a, Inai et al., 2012). Ebenfalls konnte in der Vergangenheit demonstriert werden, dass eine Expressionssteigerung der induzierbaren NO-Synthase mit einer gesteigerten

NO-Produktion innerhalb der Cochlea einhergeht und so verschiedene cochleäre Prozesse moduliert (Heinrich und Helling, 2012). Die im Rahmen der Cochleostomie erzeugten Lärmpegel durch das Bohren des Knochens sind mit einer akuten Lärmbelastung der Cochlea gleichzusetzen, welche in älteren Veröffentlichungen mit einer gesteigerten iNOS-Expression und einer cochleären Schädigung in Verbindung gebracht werden konnten (Inai et al., 2012). Anhand dieser Vorarbeiten ist anzunehmen, dass der Prozess der Elektroden-Implantation sowohl ein akustisches als auch ein mechanisches Trauma darstellt, welches bereits als potenziell pathologisch für die Haarzellfunktion identifiziert wurde (Pau et al., 2007, Addams-Williams et al., 2011). In unseren beiden Untersuchungsgruppen weist die CI-Gruppe, welche sowohl eine Cochleostomie als auch eine Elektrodeninsertion durchläuft, ein kumulativ höheres traumatisches Potenzial für die cochleären Strukturen auf. Vor diesem Hintergrund ist zunächst davon auszugehen, dass sich nach Cochleaimplantation eine stärkere Expressionssteigerung des Enzyms im Vergleich zur reinen Cochleostomie zeigt (Ernst et al., 2023).

9.2.1 Funktion von iNOS nach Cochleaimplantation

In diversen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass iNOS als möglicher pathophysiologischer Mediator nach unterschiedlichsten Stimuli in Frage kommt. Dabei ist iNOS im Rahmen inflammatorischer Prozesse sowie nach chemischem und akustischem Trauma von Relevanz (Watanabe et al., 2002, Watanabe et al., 2000b, Watanabe et al., 2000a, Inai et al., 2012, Shi und Nuttall, 2003). Eine basale iNOS-Expression in der Cochlea ist in der Literatur beschrieben und wird kontrovers diskutiert (Watanabe et al., 2000b, Watanabe et al., 2000a, Shi und Nuttall, 2003). In unseren Versuchen konnte in allen untersuchten cochleären Regionen sowohl nach reiner Cochleostomie als auch nach anschließender Elektrodenimplantation eine deutliche Färbereaktion nachgewiesen werden. Der Bohrvorgang im Zuge der Cochleostomie ist analog einer Exposition mit verschiedenen Schalldruckpegeln, als akustisches Trauma zu werten (Pau et al., 2007). Die iNOS produziert bekanntermaßen große Mengen an NO (Robbins und Grisham, 1997). Dies kann durch Bildung von ROS zur Aktivierung pro-inflammatorischer Signalkaskaden und letzten Endes zum programmierten Zelltod führen (Kurabi et al., 2017). Eine

Korrelation zwischen einer gesteigerten NO-Produktion und einer PTS ist vorbeschrieben (Chen et al., 2008).

Im Rahmen der Cochleaimplantation könnte die iNOS eine entscheidende pathophysiologische Rolle einnehmen und Gegenstand therapeutischer Ziele werden. Trotz der im Kapitel 9.2.1 beschriebenen Expressionsminderung des Enzyms nach Elektrodenimplantation ist die mögliche ototoxische Wirkung großer Mengen NO nicht außer Acht zu lassen und sollte nähergehend untersucht werden. Bereits die Cochleostomie führt zu einem Expressionsanstieg und kann über die Produktion großer Mengen NO zur Bildung freier Radikale führen. Diese wiederum könnten maßgeblich an einem möglichen Resthörverlust nach Cochleaimplantation beteiligt sein.

9.2.2 iNOS-Inhibition nach Cochleaimplantation

Anders als zunächst angenommen zeigte sich in unseren Experimenten eine signifikant höhere iNOS-Expression in der Sham-Gruppe nach alleiniger Cochleostomie im Vergleich zur CI-Gruppe. Dieser Unterschied erreichte in der *Stria vascularis*, dem spiralen Ligament, dem Corti-Organ sowie den Interdentalzellen und Fibrozyten des Limbus Signifikanzniveau. Einzig in den SGZ zeigte sich eine Tendenz zur erhöhten iNOS-Expression nach Cochleaimplantation (Ernst et al., 2023).

Die induzierbare Isoform der NOS produziert physiologischerweise bis zu ihrer Inaktivierung hohe Konzentrationen an NO (Robbins und Grisham, 1997). Es ist inzwischen allgemein bekannt, dass iNOS unter anderem mittels Ubiquitinierung abgebaut wird (Kolodziejcki et al., 2002). Diverse andere die Aktivität des Enzyms modulierende Faktoren wurden ebenfalls beschrieben (Cinelli et al., 2020).

Als mögliche Mechanismen der iNOS-Inhibition im Rahmen der Elektrodenimplantation kommen ein vorzeitiger und frühzeitig initiiertes Abbau des Enzyms, sowie eine beeinträchtigte Aktivierung in Frage (Ernst et al., 2023). Die physiologische Funktion von iNOS kann durch verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Neben dem oben genannten Abbau des Enzyms durch Ubiquitinierung spielt auch die Stabilität der mRNA eine Rolle. So konnten Korhonen et al. zeigen, dass eine verringerte mRNA-Stabilität zu einem erhöhten Enzymabbau führt (Korhonen et al., 2002). Sowohl die Modulation der mRNA-Stabilität als auch ein Ubiquitin-abhängiger

Abbau des Isoenzym kommen durch die kurze Nachbeobachtungsphase von etwa zwei Stunden nach Elektrodenimplantation als mögliche Ursachen nicht in Betracht (Ernst et al., 2023). Vielmehr stehen kurzfristige Regulationsmechanismen im Mittelpunkt, welche innerhalb kürzester Zeit zu einer Inaktivierung und einem Abbau von iNOS führen (Ernst et al., 2023).

9.2.2.1 Makrophagen-assoziierte Regulation von iNOS

Makrophagen spielen innerhalb der Cochlea eine wichtige Rolle und konnten im unstimulierten Zustand in verschiedenen Subkompartimenten wie der Lateralwand und den SGZ nachgewiesen werden (Hirose et al., 2005, Shi, 2010, Ernst et al., 2023). Insbesondere im Rahmen eines akustischen cochleären Traumas konnte den Makrophagen eine übergeordnete Rolle nachgewiesen werden (He et al., 2020, Ernst et al., 2023). Makrophagen können dabei zum einen mittels erhöhter NO-Produktion cochleoprotektiv agieren (Aktan, 2004, Laskin et al., 2011, Ernst et al., 2023). Zum anderen können nach Wang et al. Makrophagen mittels p62-Rezeptor-Interaktion zur Autophagie der iNOS führen und so die intrazellulären NO-Konzentrationen senken (Wang et al., 2019, Ernst et al., 2023).

Als Autophagie wird ein intrazellulärer Abbauprozess bezeichnet, über welchen zelleigene Bestandteile einem Lysosomen-vermittelten Recyclingmechanismus zugeführt und somit abgebaut werden (Parzych und Klionsky, 2014). Dies stellt neben dem Ubiquitin-Proteasom-System einen weiteren Weg zum intrazellulären Proteinabbau dar (Shaid et al., 2013). Mittels verschiedener Rezeptorvermittelter Signalwege kann dieser Prozess eingeleitet werden. Dabei spielen unter anderem p62 und NBR1 sowie diverse weitere Rezeptormoleküle eine tragende Rolle (Shaid et al., 2013, Wang et al., 2019) Insbesondere p62 ist dabei für die Autophagie von iNOS von Relevanz (Wang et al., 2019).

Okayasu et al. konnten zeigen, dass es im Rahmen der Cochleaimplantation zu einem Anstieg der intracochleären Makrophagenanzahl kommt (Okayasu et al., 2020). In unseren Experimenten kann somit eine Makrophagen-vermittelte Autophagie als möglicher kausaler Zusammenhang zwischen einer erniedrigten iNOS-Konzentration, in nahezu allen untersuchten Subkompartimenten der Cochlea, nach Cochleaimplantation gesehen werden (Ernst et al., 2023).

9.2.2.2 NO-iNOS-Feedbackmechanismus

Neben einem Ubiquitin-abhängigen Abbau sowie Autophagie durch Makrophagen lassen sich in der Literatur weitere Regulationsmechanismen der iNOS-Aktivität finden (Cinelli et al., 2020). Cinelli et al. (2020) diskutieren in ihrer Veröffentlichung neben einer direkten Proteininteraktion auch einen negativen Feedbackmechanismus durch NO (Cinelli et al., 2020). Assreuy et al. (1993) beschrieben eine irreversible Hemmung der iNOS durch NO. Dies gelangt durch die Hinzugabe von NO-Donoren wie S-nitroso-acetyl-penicillamine (SNAP) und S-nitroso-glutathione (GSNO) (Assreuy et al., 1993). Derselbe Effekt konnte auch für die eNOS nachgewiesen werden (Ravichandran et al., 1995). Ebenfalls diskutiert wurde eine Inhibition post-translationaler Prozesse, welche letzten Endes zu einer verminderten iNOS-Genexpression führen (Chang et al., 2004)

Im Vergleich zur reinen Cochleostomie kann es im Rahmen der Elektrodenimplantation zu mechanischer Kompression der vorwiegend venösen Abflussgefäße im Bereich der Lateralwand und des Modiolus kommen (Wright und Roland, 2013). Diesem mechanischen Einfluss folgt im vorgeschalteten Kapillarnetz eine venöse Stase mit Änderung des postkapillären Druckes (Wright und Roland, 2013). In der Literatur wurde bereits ein Autoregulationsmechanismus des cochleären Blutflusses beschrieben (Nakashima, 1999, Brown und Nuttall, 1994). NO konnte dabei als wichtiger Mediator identifiziert werden (Brechtelsbauer et al., 1994, Fessenden und Schacht, 1998). Hämodynamische und mechanische Veränderungen innerhalb des Blutgefäßes können im Rahmen einer venösen Stase durch Elektrodenimplantation zu einer erhöhten NO-Ausschüttung führen (Kuebler et al., 2003, Ernst et al., 2023)

Eine erniedrigte iNOS-Konzentration in der implantierten Untersuchungsgruppe kann sich durch einen NO-induzierten negativen Feedbackmechanismus erklären lassen. Mechanische Einflüsse auf das Blutgefäßsystem, vorwiegend der Lateralwand und des Modiolus, führen im Rahmen der Implantation zu einem reduzierten cochleären Blutfluss (Ernst et al., 2023). Dieser wiederum kann zu einer erhöhten NO-Ausschüttung durch die konstitutiven NOS führen, was wiederum in einer Autoinhibition von iNOS mündet (Ernst et al., 2023).

9.3 Survivin-Expression in der Cochlea

Die in den nun folgenden Kapiteln dargelegte Diskussion zu Survivin im Rahmen der Cochlea-implantation ist Teil dieser Arbeit. Ein entsprechendes Manuskript zur Veröffentlichung befindet sich derzeit in Ausarbeitung.

In unseren Versuchen konnten wir Survivin zwei Stunden nach Intervention in der Lateralwand mit *Stria vascularis* und spiralem Ligament, dem Limbus mit Interdentalzellen und Fibrozyten, den Nervenfasern, dem Corti-Organ sowie den SGZ nachweisen. Bis auf die SGZ zeigte sich leicht höhere Survivinexpressionen in den Sham-operierten Tieren im Vergleich zur CI-Gruppe. Dieser Unterschied erreichte in der *Stria vascularis* und in den Fibrozyten des Limbus Signifikanzniveau. In den SGZ zeigte sich das Expressionsmuster zugunsten der CI-Gruppe. Zusammenfassend zeigen sich in beiden Untersuchungsgruppen hohe Survivin-Expressionen, welche sich in den einzelnen cochleären Regionen etwas, zum Teil auch Signifikanzniveau erreichend, unterscheiden. Diese Erkenntnisse decken sich mit bisherigen Publikationen, welche eine erhöhte Survivin-Expression in der Cochlea nach akustisch-mechanischem sowie chemisch-toxischem Trauma nachweisen konnten (Knauer et al., 2010, Habtemichael et al., 2010a).

9.3.1 Funktion von Survivin nach Cochlea-Implantation

Knauer et al. (2010) schreiben Survivin eine potenziell otoprotektive Rolle zu. Ihnen gelang der Nachweis einer signifikant gesteigerten Survivin-Expression nach Lärmtrauma (Knauer et al., 2010). In ihren Experimenten verglichen Sie Cochleae von unstimulierten Meerschweinchen mit Innenohren von Tieren, welche mit 70dB und 90dB beschallt wurden. Es ist bekannt, dass es durch das Bohren im Rahmen der Cochleostomie zu einer signifikanten Lärmbelastung des Innenohrs kommen kann (Yu et al., 2014). Anhand *post mortem* an menschlichen Körpern durchgeführter Untersuchungen konnten während der Cochleostomie Schalldrücke von über 130dB nachgewiesen werden (Yu et al., 2014). Im Rahmen einer solchen Lärmbelastung kann es zu TTS und PTS kommen (Lynch und Kil, 2005, Kurabi et al., 2017). Neben einer akuten Lärmbelastung durch das Bohren spielen auch direkte mechanische Traumata durch das Einbringen der Elektrode eine pathophysiologische Rolle. So kann es im Zuge der Elektrodenimplantation zu Schäden der Lateralwand, der *Lamina spiralis* und der Basilarmembran kommen (Roland und Wright, 2006). Ebenso haben

intracochleäre Druckveränderungen durch das Einbringen der Elektrode einen entscheidenden Einfluss (Todt et al., 2014, Mittmann et al., 2017). So stellt die Cochleostomie als solches bereits ein traumatisches Potenzial für die verbleibende Innenohrfunktion dar, welches durch das Implantieren einer Elektrode nur verstärkt wird. Dies kann maßgeblichen Einfluss auf das Restgehör haben (Kurabi et al., 2017).

Somit ist eine Expressionssteigerung sowohl in Sham- als auch in CI-Gruppe durch die mechanische und akustische Reizung im Rahmen der Cochleostomie und Elektrodenimplantation zu erklären und könnte als möglicher otoprotektiver Gegenregulationsmechanismus nach Cochleamplantation von Relevanz sein (Habtemichael et al., 2010a, Knauer et al., 2010).

9.3.2 Sättigungseffekt der Survivin-Expression

Das Antiapoptoseprotein Survivin wurde in unstimulierten Cochleae in verschiedenen zellulären Regionen auf einem niedrigen Expressionsniveau identifiziert (Knauer et al., 2010). Bereits kurze Zeit nach hoher Lärmbelastung konnte eine hohe Survivin-Expression in fast allen cochleären Windungen und Zelltypen festgestellt werden (Knauer et al., 2010). Eine Lärmbelastung von 70 dB führte zu einer geringeren Färbintensität im Vergleich zu einer Lärmbelastung von 90 dB (Knauer et al., 2010). Dies könnte auf ein orts- und dosisabhängiges Reaktionsmuster hinweisen. Knauer et al. verwendeten denselben Survivin-Antikörper sowie dieselbe immunhistochemische Färbemethode wie wir in unserer Versuchsreihe (Knauer et al., 2010).

Anhand bisher nicht veröffentlichter Daten unserer Arbeitsgruppe konnten wir in unstimulierten Meerschweinchen-Cochleae sowie in beschallten Innenohren denselben Effekt wie bereits durch Knauer et al. beschrieben nachweisen. Im Vergleich dazu kam es in unseren Experimenten ebenfalls innerhalb kürzester Zeit nach Cochleostomie und Elektrodenimplantation zu einer verstärkten Survivin-Expression in allen untersuchten Subkompartimenten der Cochlea. Ähnlich zeigten sich die Expressionsmuster in den mit 70dB- und 90dB-beschallten Tieren. Sowohl die reine Cochleostomie sowie das Eröffnen der Cochlea und anschließendes Implantieren einer Elektrode führten zu einem vergleichbaren Survivin-Anstieg.

Diese Ergebnisse könnten als möglicher Sättigungseffekt des Survivin-Anstiegs nach cochleären Trauma interpretiert werden. Innerhalb kürzester Zeit nach akustischem

oder mechanischem Trauma im Rahmen des Bohrvorgangs kommt es intrazellulär zu einem starken Expressionsanstieg des Antiapoptoseproteins. Ein zusätzliches mechanisches Trauma im Rahmen der Elektrodeninsertion scheint zu keinem weiteren Expressionsanstieg zu führen. Die Möglichkeit eines Sättigungseffektes wurde bereits in der Literatur beschrieben (Scheer et al., 2017). Unsere Versuchsreihe sah eine Tötung der Tiere zwei Stunden nach Intervention vor. Diesbezüglich muss Bedacht werden, dass für den Expressionsanstieg nur kurzfristig einsetzende Regulationsmechanismen in Betracht kommen.

9.3.3 Minderexpression von Survivin nach Elektrodenimplantation

Trotz einer vergleichbar hohen Färbeintensität in beiden Untersuchungsgruppen zeigte sich vor allem in den Fibrozyten des *Limbus spiralis* und in der *Stria vascularis* eine leichte Expressionsminderung nach Cochlea-implantation im Vergleich zur reinen Cochleostomie. Dies könnte auf zusätzliche direkte und indirekte Traumata durch das Einführen der Elektrode bedingt sein (Wright und Roland, 2013, Roland und Wright, 2006). Auf individueller zellulärer Ebene könnte es durch direkte strukturelle Schädigungen zum Verlust der zellulären Integrität und Zusammenbruch des Zellstoffwechsels kommen, wodurch sich eine Minderexpression des Enzyms erklären ließe. Mikrozirkulationsstörungen mit ischämisch bedingtem Zelluntergang sowie Verlust des endocochleären Potenzials sind als mögliche Ursachen nicht auszuschließen und kommen ebenfalls in Betracht (Oshima et al., 2014, Ernst et al., 2023). Eine erhöhte Survivin-Expression innerhalb der SGZ nach Implantation lässt sich möglicherweise durch deren anatomische Lage erklären. Die SGZ liegen im Rosenthal-Kanal des Modiolus und könnte durch mögliche direkte Traumata mit Verlust der zellulären Integrität geschützt sein (Raphael und Altschuler, 2003).

9.3.4 Survivin-Modulation nach Cochlea-Implantation

In Kapitel 9.3.1 und 9.3.2 wurde insbesondere die Expressionssteigerung von Survivin nach akustischem und mechanischem Trauma diskutiert. Generell gilt, dass Dauer und Intensität des akustischen Traumas das Ausmaß einer potenziellen Hörbeeinträchtigung beeinflussen und so entweder zu einer TTS oder PTS führen können (Nordmann et al., 2000, Kurabi et al., 2017). Pathophysiologisch spielen dabei

neben einer temporären Entkopplung der Stereozilien der äHZ eine Vielzahl weiterer möglicher Pathomechanismen eine mögliche Rolle (Nordmann et al., 2000, Kurabi et al., 2017). Im Rahmen einer TTS nach akustischer Stimulation konnten sowohl eine vermehrte Ausschüttung von ATP mit konsekutiver Aktivierung von Purinrezeptorkanälen als auch die Bildung ROS als mögliche pathophysiologische Mechanismen identifiziert werden (Kurabi et al., 2017, Cheng et al., 2008). Eine Glutamat-vermittelte Überstimulation der äHZ wurde ebenfalls postuliert (Puel et al., 1998). Ebenso konnte zuletzt ein intracochleärer Makrophagenanstieg nach akustischem Trauma beschrieben werden (Frye et al., 2018). Insgesamt konnten auf subzellulärer Ebene nach Lärmbelastung über 25 verschiedene aktivierte Transkriptionsfaktoren festgestellt werden (Maeda et al., 2021).

Wie beschrieben konnten eine Vielzahl an möglichen Pathomechanismen nach Lärmbelastung identifiziert werden. Diese lassen sich mit unseren Ergebnissen einer frühzeitigen Expressionssteigerung von Survivin nach akustischem Bohrtrauma bzw. Elektrodenimplantation in Einklang bringen. Wie bereits durch Knauer et al. beschrieben, könnte die Modulation des Antiapoptoseproteins eine wichtige frühzeitige otoprotektive Rolle im Rahmen akuter Lärmtraumata, insbesondere im Rahmen der Cochleaimplantation, spielen. Wie in unseren Ergebnissen dargestellt scheint diese Survivin-Modulation bereits zwei Stunden nach Stimulus stattzufinden.

9.3.5 Mögliche Signalwege der Survivin-Modulation

Zahlreiche Signalwege und Signalmoleküle konnten bereits mit Survivin in Verbindung gebracht werden und könnten auch nach Cochleaimplantation von besonderer Relevanz sein und in Hinblick auf mögliche therapeutische Ansätze eine Rolle spielen. Eine verringerte cochleäre Durchblutung nach akustischer Stimulation ist in der Literatur beschrieben und korreliert mit einer Hörschwellenverschiebung (Shi, 2009). Dabei konnte Shi insbesondere eine Änderung des cochleären Blutflusses und eine erhöhte Kapillarpermeabilität in den Gefäßen der *Stria vascularis* nachweisen (Shi, 2009). Im Rahmen weiterer Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe konnte eine verringerter cochleärer Blutfluss in der Lateralwand nach Cochleaimplantation dargelegt werden (Ernst et al., 2023). Diese Verringerung des cochleären Blutflusses führt, wie durch Lamm und Arnold beschrieben, zu einer ischämischen Umgebung innerhalb der Cochlea (Lamm und Arnold, 1996). Intracochleäre hypoxische

Bedingungen begünstigen die Expression von Transkriptionsfaktoren, welche unter anderem mit einem anaeroben Zellstoffwechsel assoziiert sind (Shi, 2009, Lambert et al., 2018). Darunter zählen unter anderem *Nuclear factor, kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB) und Hypoxie-induzierter Faktor 1 (HIF-1) (Lambert et al., 2018, Xia et al., 2016, Shi, 2009).

9.3.5.1 HIF-1 und Survivin

HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher im Rahmen einer ischämisch bedingten Zellantwort von entscheidender Relevanz ist (Haddad und Harb, 2005). Er ist unter ischämischen Bedingungen an der Genexpression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), Erythropoietin und des Glukosetransporters 1 beteiligt (Semenza et al., 1999). HIF-1 ist für das zelluläre Überleben in hypoxischen Konditionen von entscheidender Relevanz (Semenza, 2001, Chung et al., 2011). Ein Hochregulierung von HIF-1 konnte im Tiermodell nach akustischem Trauma einen Hörverlust verhindern und deutet so auf eine entscheidende Rolle des Proteins im Rahmen ischämischer cochleärer Bedingungen hin (Chung et al., 2011). Eine HIF-1-Depletion mittels miRNA konnte nachweislich zu einer verringerten Survivin-Expression in Tumorzelllinien führen (Li et al., 2013).

Ein cochleäres Trauma, wie es im Rahmen der Cochleaimplantation zu erwarten ist, könnte zu hypoxischen Bedingungen innerhalb der verschiedenen cochleären Kompartimente führen. Eine HIF-1-induzierte Expressionssteigerung von Survivin stellt in diesem Zusammenhang einen möglichen otoprotektiven Gegenregulationsmechanismus dar.

9.3.5.2 NF-κB und Survivin

NF-κB ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, welcher nach unterschiedlichen Stimuli das zelluläre Wachstum, die Zelldifferenzierung, inflammatorische Prozesse und die Regulation der Apoptose modulieren kann (Pahl, 1999). Zudem konnte NF-κB unter ischämischen Bedingungen sowie im Rahmen inflammatorischer Prozesse vermehrt nachgewiesen werden (Oliver et al., 2009). Innerhalb der Cochlea konnte NF-κB detektiert werden (Nagashima et al., 2005). Dem Protein wird eine wichtige Rolle im Rahmen der Haarzellfunktion sowie dem Schutz

der primären auditorischen Neurone vor Exzitotoxizität zugesprochen (Nagy et al., 2005, Lang et al., 2006). NF- κ B ist ein relevanter regulatorischer Mediator im Rahmen cochleärer Traumata (Haake et al., 2009). Zudem konnte ein Anstieg der DNA des Transkriptionsfaktors unmittelbar nach akustischen Stimulus innerhalb der Cochlea nachgewiesen werden (Nagashima et al., 2007). Dies untermauert die potenzielle Rolle einer kurzfristig einsetzenden regulatorischen Funktion des Proteins im Rahmen cochleärer Traumata. Wang et al. (2010) gelang der Nachweis einer Korrelation zwischen NF- κ B und Survivin in Hepatozyten (Wang et al., 2010).

Im Rahmen der Cochlea-implantation kommt es zu akuten mechanischen und akustischen Traumata der Cochlea. Eine stressbedingte Hochregulierung von Survivin über den NF- κ B-Signalweg könnte einen möglichen Gegenregulationsmechanismus darstellen.

9.4 Expression der phosphorylierten eNOS in der Cochlea

Die phosphorylierte Form der eNOS konnte in unserer Versuchsreihe in der *Stria vascularis*, dem Corti-Organ, den Nervenfasern und den SGZ nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich insbesondere in der *Stria vascularis* hohe Farbintensitäten mit signifikantem Unterschied zu Gunsten der Sham-Gruppe. Ebenso zeigten sich die Werte in den Nervenfasern signifikant in der Sham-Gruppe erhöht. In den SGZ zeigte sich mit statistischer Signifikanz erhöhte Werte in der CI-Gruppe. In ihrer phosphorylierten Form befindet sich das Enzym im aktiven Zustand und liefert so genauere Erkenntnisse über die Enzymaktivität und somit die NO-Produktion unmittelbar nach Cochleostomie und Elektrodenimplantation (Li et al., 2002).

9.4.1 Funktion von p-eNOS nach Cochlea-Implantation

Der eNOS wird im Allgemeinen eine anti-inflammatorische und vasoprotektive Rolle zugeschrieben und ist vor allem im kardiozirkulatorischen System von besonderer Relevanz (Förstermann und Sessa, 2012). Neben seiner physiologischen Funktion in Blutgefäßen konnten das Enzym unter normalen Bedingungen in der Cochlea nachgewiesen werden (Förstermann et al., 1994, Heinrich et al., 1998). Yamane et al. (1997) gelang dabei insbesondere der Nachweis in den Blutgefäßen der *Stria vascularis* und des spiralen Ligaments (Yamane et al., 1997). Unter verschiedenen

pathologischen Bedingungen konnte bereits eine Expressionssteigerung des Enzyms innerhalb der verschiedenen cochleären Regionen dargestellt werden (Heinrich et al., 2006, Heinrich et al., 2005). Dabei gelang Heinrich et al. vor allem der Nachweis einer gesteigerten Expression des Enzyms nach akuter Lärmbelastung und Injektion ototoxischer Substanzen (Heinrich et al., 2005, Heinrich et al., 2006). Es wird postuliert, dass eNOS, welches als konstitutiv exprimiertes Enzym mit geringeren NO-Produktion einhergeht, innerhalb der Cochlea im Rahmen eines akuten traumatischen Ereignisses eine potenziell otoprotektive Rolle einnimmt (Heinrich et al., 2019, Heinrich et al., 2021).

Wie auch in den Versuchen von Heinrich et al. (2019) stellt die Cochleostomie ein akustisches Trauma dar (Pau et al., 2007). Eine gesteigerte Enzymaktivität im Sinne einer Phosphorylierung in beiden Untersuchungsgruppen lässt sich mit den von Heinrich et al. (2019) erhobenen Erkenntnissen einer gesteigerten Enzymexpression nach Lärmbelastung in Einklang bringen (Heinrich et al., 2019).

9.4.1.1 p-eNOS in der Lateralwand

Unsere Ergebnisse zeigen eine verringerte immunhistochemische Färbereaktion der phosphorylierten und somit aktivierten eNOS in der *Stria vascularis* nach Elektrodeninsertion im Vergleich zur reinen Cochleostomie. In weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnten Ernst et al. (2023) einen verminderten cochleären Blutfluss und eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität innerhalb der Lateralwand nach Elektrodeninsertion nachweisen (Ernst et al., 2023). Die eNOS hat eine wichtige anti-inflammatorische und anti-arteriosklerotische Funktion innerhalb des Gefäßsystems und ist zudem für die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutflusses von Relevanz (Förstermann und Sessa, 2012). Physiologisch konnte eNOS in den Endothelzellen der Kapillargefäße der *Stria vascularis* und des spiralen Ligaments nachgewiesen werden (Yamane et al., 1997). Es konnte zudem gezeigt werden, dass eNOS für die Aufrechterhaltung der cochleären Mikrozirkulation eine Rolle spielt (Yamane et al., 1997, Heinrich und Helling, 2012).

Die Erkenntnis einer Minderexpression der phosphorylierten eNOS nach Elektrodeninsertion lässt sich somit mit den Ergebnissen von Ernst et al. (2023) decken. eNOS ist von besonderer Relevanz für die Aufrechterhaltung der cochleären

Mikrozirkulation (Yamane et al., 1997). Sowohl der cochleäre Blutfluss als auch die phosphorylierte und aktivierte Form von eNOS zeigen sich nach Cochleaimplantation im Vergleich zur reinen Cochleostomie reduziert (Ernst et al., 2023). Dies verdeutlicht, dass eNOS im Rahmen eines verringerten cochleären Blutflusses nach Elektrodenimplantation eine besondere Relevanz hat. Mögliche pathophysiologische Zusammenhänge gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären.

9.4.1.2 p-eNOS in Nervenfasern und Spiralganglienzellen

Sowohl in den Nervenfasern als auch in den Spiralganglienzellen lässt sich die phosphorylierte eNOS (p-eNOS) immunhistochemisch nachweisen und quantifizieren. In der Literatur ist beschrieben, dass eNOS im zentralen Nervensystem neben der neuronalen NOS eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion einnimmt (Paakkari und Lindsberg, 1995). Es ist bekannt, dass NO im Rahmen des synaptischen Signaltransfers innerhalb der Cochlea von Relevanz ist (Heinrich und Helling, 2012). In unseren Versuchen zeigten sich in den Nervenfasern eine ausgeprägtere Farbreaktion in der Sham-Gruppe und in den Ganglienzellen in der CI-Gruppe. Die eNOS scheint im Rahmen der cochleären Nervenfunktion nach Cochleaimplantation eine Rolle zu spielen, welche es in weiteren Untersuchungen zu klären gilt.

9.5 Zusammenspiel von Survivin und Stickstoffmonoxid

In zahlreichen Veröffentlichungen wurde bereits eine Korrelation zwischen Survivin und NO dargestellt (Knauer et al., 2010). Wie bereits in Kapitel 6.8.4 beschrieben wurden dabei vor allem der p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg und der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt (PI3K/Akt)-Signalweg als mögliche Schlüsselwege identifiziert (Engels et al., 2008, Fetz et al., 2009, Knauer et al., 2010). Darüber hinaus könnten auch weitere Signalwege im Rahmen des Zusammenspiels zwischen NO und Survivin von besonderer Relevanz sein. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3 (Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3) gelegt werden.

9.5.1 iNOS und Survivin im Rahmen der Cochleaimplantation

Sowohl für Survivin als auch iNOS konnten gesteigerte Expression in der Vergangenheit im Rahmen eines cochleären Traumas nachgewiesen werden (Shi und Nuttall, 2003, Habtemichael et al., 2010a). Zudem konnte gezeigt werden, dass hohe NO-Konzentrationen, unter anderem durch eine erhöhte Expression und Aktivität der induzierbaren NO-Synthase vermittelt, zu einer Herunterregulierung von Survivin in Kopf-Hals-Tumoren führt (Fetz et al., 2009). Dabei konnte der p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg als relevant identifiziert werden (Fetz et al., 2009, Chao et al., 2004). In Hepatozyten gelangen Wang et al. (2011) der Nachweis einer potenziellen Apoptose-modulierenden Funktion des iNOS-NO-Survivin-Signalwegs (Wang et al., 2011)

Neben bereits genannten MAPK-Signalweg könnte auch STAT3 als ein mögliches Verbindungsprotein zwischen iNOS und Survivin angesehen werden (Ernst et al., 2023). STAT-Proteine sind Moleküle, welche Rezeptorsignale, von der Zellmembran kommend, in den Zellkern weiterleiten und so die Proteintranskription bestimmter Proteine modulieren (Pellegrini und Dusanter-Fourt, 1997). Gritsko et al. (2006) konnten zeigen, dass das Survivin-Gen ein direktes Bindungsziel für STAT3 darstellt und somit eine Aktivierung von STAT3 mit einer Expressionssteigerung von Survivin einhergeht (Gritsko et al., 2006). Zudem bindet STAT3 an den iNOS-Promoter und stimuliert die iNOS-Transkription (Puram et al., 2012). Im Rahmen eines Maus-Modells konnte gezeigt werden, dass nach Lärmtrauma eine Inhibition des Januskinase-2-STAT3-Signalswegs zu einer otoprotektiven Wirkung führt (Wilson et al., 2014).

Zuletzt könnte auch NF- κ B eine wichtige Rolle als Modulator zwischen iNOS und Survivin einnehmen. Wie bereits in Kapitel 9.3.5.2 beschrieben stellt NF- κ B einen ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor dar, welcher vor allem im Rahmen akuter inflammatorische Prozesse eine Rolle spielt (Pahl, 1999). Eine Korrelation zwischen NF- κ B und Survivin lässt sich in der Literatur finden (Wang et al., 2010). Zudem stellt der iNOS-Promoter eine wichtige Zielstruktur von NF- κ B dar (Hughes et al., 2008, Morris et al., 2003).

Nach Cochleaimplantation zeigte sich in allen untersuchten Subregionen der Cochlea eine ausgeprägte Survivin- als auch eine iNOS-Expression. Somit könnte der iNOS-Survivin-Signalweg eine wichtige regulatorische Funktion in den pathophysiologischen Abläufen nach Cochleaimplantation einnehmen und für den Resthörerhalt nach

Implantation von Relevanz sein. Die iNOS produziert bekanntermaßen im aktivierten Zustand hohe Konzentrationen an NO (Robbins und Grisham, 1997). Eine klare Korrelation zwischen einer p38-MAPK-modulierten Runterregulierung von Survivin aufgrund einer hohen NO-Konzentration lässt sich in unseren Versuchen somit zunächst nicht bestätigen. Das chirurgische Vorgehen im Rahmen der Cochleaimplantation stellt neben einem bohrungsbedingten akustischen Trauma, ein direktes mechanisches Trauma im Rahmen der Elektrodeninsertion dar (Roland und Wright, 2006, Pau et al., 2007). Aufgrund dessen könnten neben dem p38-MAPK-Signalweg auch weitere Signalwege entscheidend sein. Dabei könnten die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NF- κ B eine wichtige regulierende Funktion im Survivin-NO-Signalweg einnehmen und sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

9.5.2 eNOS und Survivin im Rahmen der Cochleaimplantation

Durch Knauer et al. (2010) wird postuliert, dass eine niedrige Konzentration von NO, welche durch eine basale eNOS-Expression oder eNOS-Aktivierung mittels Phosphorylierung entsteht, mittels des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt (PI3K/Akt)-Signalwegs zu einer Expressionssteigerung von Survivin führt und somit einen otoprotektiven Mechanismus im Rahmen eines cochleären Traumas darstellt (Knauer et al., 2010). Dabei unterstützen sie ihre These durch Erkenntnisse, welche unter anderem im Ovarial-Karzinom und in Kopf-Hals-Tumoren gewonnen wurden (Engels et al., 2008, Fetz et al., 2009). Innerhalb der Endothelzellen konnte jedoch auch eine negative Korrelation zwischen der eNOS und des Thrombozytenwachstumsfaktors (PDGF)-Survivin-Signalwegs nachgewiesen werden (Yu et al., 2012). Zwar konnten Knauer et al. (2010) im Rahmen ihrer Untersuchungen eine erhöhte Konzentration von Komponenten des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt (PI3K/Akt)-Signalwegs innerhalb der Cochlea nachweisen, verweisen jedoch darauf, dass diese Erkenntnisse aufgrund der Fixierungsmethoden der Cochlea nur unter Vorbehalt zu interpretieren sind (Knauer et al., 2010).

In unserer Versuchsreihe konnte eine Aktivierung von eNOS, im Sinne einer Phosphorylierung des Enzyms, in der *Stria vascularis*, dem Corti-Organ, den Nervenzellen und den SGZ der Cochlea nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich in diesen Subregionen ebenfalls eine starke Expression von Survivin. Die

Cochleaimplantation stellt ein mechanisches und akustisches Trauma dar (Pau et al., 2007, Roland und Wright, 2006). Diese Ergebnisse lassen die Erkenntnis zu, dass der eNOS-Survivin-Signalweg, wie bereits durch Knauer et al. (2010) postuliert, im Rahmen cochleärer Traumata, einen möglicher otoprotektiven Gegenregulationsmechanismus darstellt. Inwieweit der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt (PI3K/Akt)-Signalweg dabei eine Rolle spielt, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

10 Zusammenfassung

Die Cochleaimplantation stellt heutzutage einen einzigartigen Ersatz eines Sinnesorgans dar. Ein Verlust der Resthörigkeit ist nach wie vor eine bis heute wenig erforschte Komplikation im Rahmen dieses Eingriffes. Trotz Optimierung der Operationstechnik, Verwendung spezieller Elektroden und postoperativer Glukokortikoidtherapie bleibt der Restgehörverlust eine ernstzunehmende Komplikation dieses chirurgischen Eingriffes.

In diversen Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Antiapoptoseprotein Survivin im Rahmen unterschiedlicher cochleärer Traumata eine möglicherweise otoprotektive Rolle einnimmt. Des Weiteren ist die Bedeutung von iNOS und eNOS sowie die Bedeutung von NO im Rahmen einer akuten Lärmbelastung und eines chemisch-toxischen Traumas der Cochlea bekannt.

In dieser Arbeit konnte die Rolle eines Survivin-NO-Signalwegs im Rahmen der Cochleaimplantation demonstriert werden. Mittels immunhistochemischer Färbung wurde die Expression von iNOS, eNOS und Survivin in Meerschweinchencochleae nach alleiniger Cochleostomie, als auch nach zusätzlicher Elektroden-Insertion quantifiziert und miteinander verglichen. Wir konnten zeigen, dass sowohl iNOS, eNOS als auch Survivin nach Cochleaimplantation in nahezu allen cochleären Regionen exprimiert werden und damit eine Relevanz eines Survivin-NO-Signalwegs nach Cochleaimplantation demonstrieren.

Entgegen unseren Erwartungen zeigte sich eine Minderexpression des Enzyms iNOS nach Implantation. Dies könnte zum einen auf einen negativen Feedbackmechanismus durch NO zurückzuführen sein. Ein solcher Prozess ist in der Literatur bereits beschrieben worden. Zudem besteht die Möglichkeit eines Makrophagen-assoziierten Abbaus des Enzyms nach Elektrodenimplantation. Ebenso ist eine Makrophagen-assoziierte Autophagie von iNOS möglich.

Zusammenfassend könnten iNOS und größere Mengen NO eine mögliche otoprotektive Rolle im Rahmen der Cochleaimplantation einnehmen. Perioperative Therapiekonzepte, die auf eine stabile intracochleäre NO-Konzentration abzielen sowie die pharmakologische Induktion von iNOS sollten in Zukunft als mögliche Therapie zum Erhalt des Resthörvermögens im Rahmen der Cochleaimplantation in Betracht gezogen werden.

Darüber hinaus konnten wir in unserer Versuchsreihe die aktivierte Form der eNOS nach Cochleostomie und Elektrodenimplantation nachweisen. In der Lateralwand zeigte sich eine verminderte Expression nach Implantation. eNOS könnte relevant für die Aufrechterhaltung des cochleären Blutflusses und den Hörschwellenerhalt nach Cochlea-implantation sein.

Sowohl nach alleiniger Cochleostomie als auch nach zusätzlicher Elektroden-Insertion zeigte sich ubiquitär innerhalb der Cochlea eine deutlich ausgeprägte Survivin-Expression. Ein ausbleibender Expressionsanstieg nach Elektroden-Insertion könnte einem möglichen Sättigungsmechanismus innerhalb der Cochlea zu Grunde liegen. Eine mögliche otoprotektive Rolle wurde Survivin bereits in der Literatur zugeschrieben. Survivin als solches stellt einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige otoprotektive und restgehörerhaltende Therapiekonzepte im Rahmen der Cochlea-implantation dar und sollte weiterhin nähergehend untersucht werden.

Unsere Ergebnisse erhärten die Vermutung, dass der Survivin-NO-Signalweg im Rahmen cochleärer Traumata eine mögliche otoprotektive Rolle einnimmt. Die Beeinflussung der Survivin-NO-Achse beispielsweise im Rahmen einer zielgerichteten Innenohrtherapie stellt einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige otoprotektive und restgehörerhaltende Therapiekonzepte im Rahmen der Cochlea-implantation dar. Eine Korrelation zwischen iNOS, dem cochleären Blutfluss der Lateralwand und einer Hörschwellenverschiebung nach Cochlea-implantation konnten Ernst et al. (2023), für dessen Veröffentlichung Teile dieser Arbeit ausgearbeitet und verwendet wurden, bereits nachweisen. Mögliche Schnittstellen zwischen NO und Survivin gilt es dabei in Zukunft genauer zu untersuchen. Insbesondere NF- κ B und STAT3 stellen in diesem Zusammenhang wichtige Ziele dar, die es nach Cochlea-implantation im Rahmen des Survivin-NO-Signalwegs genauer zu untersuchen gilt.

11 Literaturverzeichnis

- ABU-SOUD, H. M. & STUEHR, D. J. 1993. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10769-72.
- ADDAMS-WILLIAMS, J., MUNAWEERA, L., COLEMAN, B., SHEPHERD, R. & BACKHOUSE, S. 2011. Cochlear implant electrode insertion: in defence of cochleostomy and factors against the round window membrane approach. *Cochlear Implants Int*, 12 Suppl 2, S36-9.
- ADUNKA, O. & KIEFER, J. 2006. Impact of electrode insertion depth on intracochlear trauma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 135, 374-82.
- ADUNKA, O., UNKELBACH, M. H., MACK, M., HAMBEK, M., GSTOETTNER, W. & KIEFER, J. 2004. Cochlear implantation via the round window membrane minimizes trauma to cochlear structures: a histologically controlled insertion study. *Acta Otolaryngol*, 124, 807-12.
- AHMAD, M., BOHNE, B. A. & HARDING, G. W. 2003. An in vivo tracer study of noise-induced damage to the reticular lamina. *Hear Res*, 175, 82-100.
- AKTAN, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci*, 75, 639-53.
- ALTIERI, D. C. 2003. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, 3, 46-54.
- ALTIERI, D. C. 2006. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 609-15.
- ALTIERI, D. C. 2008a. New wirings in the survivin networks. *Oncogene*, 27, 6276-84.
- ALTIERI, D. C. 2008b. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*, 8, 61-70.
- AMBROSINI, G., ADIDA, C. & ALTIERI, D. C. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, 3, 917-21.
- ANDO, M. & TAKEUCHI, S. 1999. Immunological identification of an inward rectifier K⁺ channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res*, 298, 179-83.
- ANNIKO, M. 1976. Surface structure of stria vascularis in the guinea pig cochlea. Normal morphology and atoxyl-induced pathologic changes. *Acta Otolaryngol*, 82, 343-53.
- ARNDT, S., LASZIG, R., ASCHENDORFF, A., BECK, R., SCHILD, C., HASSEPASS, F., IHORST, G., KROEGER, S., KIRCHEM, P. & WESARG, T. 2011. [Unilateral deafness and cochlear implantation: audiological diagnostic evaluation and outcomes]. *Hno*, 59, 437-46.
- ARPORNCHAYANON, W., CANIS, M., IHLER, F., SETTEVENDEMIE, C. & STRIETH, S. 2013. TNF- α inhibition using etanercept prevents noise-induced hearing loss by improvement of cochlear blood flow in vivo. *Int J Audiol*, 52, 545-52.
- ARPORNCHAYANON, W., CANIS, M., SUCKFUELL, M., IHLER, F., OLZOWY, B. & STRIETH, S. 2011. Modeling the measurements of cochlear microcirculation and hearing function after loud noise. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 145, 463-9.
- ASHKENAZI, A. & DIXIT, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-8.
- ASHMORE, J. 2008. Cochlear outer hair cell motility. *Physiol Rev*, 88, 173-210.
- ASHMORE, J. 2019. Outer Hair Cells and Electromotility. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 9.

- ASHMORE, J. F., GÉLÉOC, G. S. & HARBOTT, L. 2000. Molecular mechanisms of sound amplification in the mammalian cochlea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11759-64.
- ASSREUY, J., CUNHA, F. Q., LIEW, F. Y. & MONCADA, S. 1993. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 108, 833-7.
- ASTOLFI, L., SIMONI, E., GIARBINI, N., GIORDANO, P., PANNELLA, M., HATZOPOULOS, S. & MARTINI, A. 2016. Cochlear implant and inflammation reaction: Safety study of a new steroid-eluting electrode. *Hear Res*, 336, 44-52.
- AVASARALA, V. S., JINKA, S. K. & JEYAKUMAR, A. 2022. Complications of Cochleostomy Versus Round Window Surgical Approaches: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cureus*, 14, e25451.
- BALKANY, T. J., CONNELL, S. S., HODGES, A. V., PAYNE, S. L., TELISCHI, F. F., ESHRAGHI, A. A., ANGELI, S. I., GERMANI, R., MESSIAH, S. & ARHEART, K. L. 2006. Conservation of residual acoustic hearing after cochlear implantation. *Otol Neurotol*, 27, 1083-8.
- BAS, E., DINH, C. T., GARNHAM, C., POLAK, M. & VAN DE WATER, T. R. 2012. Conservation of hearing and protection of hair cells in cochlear implant patients' with residual hearing. *Anat Rec (Hoboken)*, 295, 1909-27.
- BAUMANN, U. & HELBIG, S. 2009. [Hearing with combined electric acoustic stimulation]. *HNO*, 57, 542-50.
- BENCHETRIT, L., RONNER, E. A., ANNE, S. & COHEN, M. S. 2021. Cochlear Implantation in Children With Single-Sided Deafness: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 147, 58-69.
- BLACKSHAW, S., ELIASSON, M. J., SAWA, A., WATKINS, C. C., KRUG, D., GUPTA, A., ARAI, T., FERRANTE, R. J. & SNYDER, S. H. 2003. Species, strain and developmental variations in hippocampal neuronal and endothelial nitric oxide synthase clarify discrepancies in nitric oxide-dependent synaptic plasticity. *Neuroscience*, 119, 979-90.
- BLAKLEY, B. W. 2000. Update on intratympanic gentamicin for Meniere's disease. *Laryngoscope*, 110, 236-40.
- BLASITS, S., MAUNE, S. & SANTOS-SACCHI, J. 2000. Nitric oxide uncouples gap junctions of supporting Deiters cells from Corti's organ. *Pflugers Arch*, 440, 710-2.
- BON, C. L. & GARTHWAITE, J. 2003. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 23, 1941-8.
- BRAUN, S., YE, Q., RADELOFF, A., KIEFER, J., GSTOETTNER, W. & TILLEIN, J. 2011. Protection of inner ear function after cochlear implantation: compound action potential measurements after local application of glucocorticoids in the guinea pig cochlea. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 73, 219-28.
- BRECHTELSBAUER, P. B., NUTTALL, A. L. & MILLER, J. M. 1994. Basal nitric oxide production in regulation of cochlear blood flow. *Hear Res*, 77, 38-42.
- BROWN, G. C. 2010. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*, 23, 153-65.
- BROWN, J. N. & NUTTALL, A. L. 1994. Autoregulation of cochlear blood flow in guinea pigs. *Am J Physiol*, 266, H458-67.
- CABEZUDO, L. M. 1978. The ultrastructure of the basilar membrane in the cat. *Otolaryngology*, 86, Or1433.
- CETRARO, P., PLAZA-DIAZ, J., MACKENZIE, A. & ABADÍA-MOLINA, F. 2022. A Review of the Current Impact of Inhibitors of Apoptosis Proteins and Their Repression in Cancer. *Cancers (Basel)*, 14.
- CHANG, K., LEE, S. J., CHEONG, I., BILLIAR, T. R., CHUNG, H. T., HAN, J. A., KWON, Y. G., HA, K. S. & KIM, Y. M. 2004. Nitric oxide suppresses inducible

- nitric oxide synthase expression by inhibiting post-translational modification of I κ B. *Exp Mol Med*, 36, 311-24.
- CHAO, J. I., KUO, P. C. & HSU, T. S. 2004. Down-regulation of survivin in nitric oxide-induced cell growth inhibition and apoptosis of the human lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, 279, 20267-76.
- CHEN, J. 2016. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6, a026104.
- CHEN, Y. S., TSENG, F. Y., LIN, K. N., YANG, T. H., LIN-SHIAU, S. Y. & HSU, C. J. 2008. Chronologic changes of nitric oxide concentration in the cochlear lateral wall and its role in noise-induced permanent threshold shift. *Laryngoscope*, 118, 832-6.
- CHENG, P. W., LIU, S. H., YOUNG, Y. H., HSU, C. J. & LIN-SHIAU, S. Y. 2008. Protection from noise-induced temporary threshold shift by D-methionine is associated with preservation of ATPase activities. *Ear Hear*, 29, 65-75.
- CHINNAIYAN, A. M. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1, 5-15.
- CHO, H. J., XIE, Q. W., CALAYCAY, J., MUMFORD, R. A., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D. & NATHAN, C. 1992. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med*, 176, 599-604.
- CHUNG, J. W., SHIN, J. E., HAN, K. W., AHN, J. H., KIM, Y. J., PARK, J. W. & SO, H. S. 2011. Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha by cobalt chloride prevents hearing loss in noise-exposed mice. *Environ Toxicol Pharmacol*, 31, 153-9.
- CINELLI, M. A., DO, H. T., MILEY, G. P. & SILVERMAN, R. B. 2020. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*, 40, 158-189.
- DAI, M., NUTTALL, A., YANG, Y. & SHI, X. 2009. Visualization and contractile activity of cochlear pericytes in the capillaries of the spiral ligament. *Hear Res*, 254, 100-7.
- DAI, M., YANG, Y. & SHI, X. 2011. Lactate dilates cochlear capillaries via type V fibrocyte-vessel coupling signaled by nNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301, H1248-54.
- DALCHOW, C. V., HAGEMEIERS, K. C., MUENSCHER, A., KNECHT, R. & KAMEIERS, F. 2013. Investigation of noise levels generated by otologic drills. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 270, 505-10.
- DAVIS, A., MCMAHON, C. M., PICHORA-FULLER, K. M., RUSS, S., LIN, F., OLUSANYA, B. O., CHADHA, S. & TREMBLAY, K. L. 2016. Aging and Hearing Health: The Life-course Approach. *Gerontologist*, 56 Suppl 2, S256-67.
- DAWSON, V. L., KIZUSHI, V. M., HUANG, P. L., SNYDER, S. H. & DAWSON, T. M. 1996. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci*, 16, 2479-87.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HALS-NASEN-OHRENHEILKUNDE, K.-U. H.-C. E. V. 2020. *Cochlea-Implantat-Versorgung* [Online]. Available: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/017-071I_S2k_Cochlea-Implantat-Versorgung-zentral-auditorische-Implantate_2020-12.pdf [Accessed].
- DIMMELER, S., FLEMING, I., FISSLTHALER, B., HERMANN, C., BUSSE, R. & ZEIHNER, A. M. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399, 601-5.
- DINH, C. T., BAS, E., CHAN, S. S., DINH, J. N., VU, L. & VAN DE WATER, T. R. 2011. Dexamethasone treatment of tumor necrosis factor-alpha challenged organ of

- Corti explants activates nuclear factor kappa B signaling that induces changes in gene expression that favor hair cell survival. *Neuroscience*, 188, 157-67.
- DÖGE, J., BAUMANN, U., WEISSGERBER, T. & RADER, T. 2017. Single-Sided Deafness: Impact of Cochlear Implantation on Speech Perception in Complex Noise and on Auditory Localization Accuracy. *Otol Neurotol*, 38, e563-e569.
- DRÖGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82, 47-95.
- DUVALL, A. J., 3RD & RHODES, V. T. 1967. Reissner's membrane. An ultrastructural study. *Arch Otolaryngol*, 86, 143-51.
- ECKELMAN, B. P. & SALVESEN, G. S. 2006. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem*, 281, 3254-60.
- ECKELMAN, B. P., SALVESEN, G. S. & SCOTT, F. L. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*, 7, 988-94.
- EISENBERG, L. S. 1982. Use of the cochlear implant by the prelingually deaf. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl*, 91, 62-6.
- EISENHUT, M. 2019. Evidence Supporting the Hypothesis That Inflammation-Induced Vasospasm Is Involved in the Pathogenesis of Acquired Sensorineural Hearing Loss. *Int J Otolaryngol*, 2019, 4367240.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ENGELS, K., KNAUER, S. K., LOIBL, S., FETZ, V., HARTER, P., SCHWEITZER, A., FISSELER-ECKHOFF, A., KOMMOSS, F., HANKER, L., NEKLJUDOVA, V., HERMANN, I., KLEINERT, H., MANN, W., DU BOIS, A. & STAUBER, R. H. 2008. NO signaling confers cytoprotectivity through the survivin network in ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 68, 5159-66.
- ERICHSEN, S., ZUO, J., CURTIS, L., RAREY, K. & HULTCRANTZ, M. 1996. Na,K-ATPase alpha- and beta-isoforms in the developing cochlea of the mouse. *Hear Res*, 100, 143-9.
- ERNST, B. P., HEINRICH, U. R., FRIES, M., MEUSER, R., RADER, T., ECKRICH, J., STAUBER, R. H. & STRIETH, S. 2023. Cochlear implantation impairs intracochlear microcirculation and counteracts iNOS induction in guinea pigs. *Front Cell Neurosci*, 17, 1189980.
- ESHRAHGI, A. A., AHMED, J., KRYSIAK, E., ILA, K., ASHMAN, P., TELISCHI, F. F., ANGELI, S., PRENTISS, S., MARTINEZ, D. & VALENDIA, S. 2017. Clinical, surgical, and electrical factors impacting residual hearing in cochlear implant surgery. *Acta Otolaryngol*, 137, 384-388.
- ESTERBERG, R., HAILEY, D. W., COFFIN, A. B., RAIBLE, D. W. & RUBEL, E. W. 2013. Disruption of intracellular calcium regulation is integral to aminoglycoside-induced hair cell death. *J Neurosci*, 33, 7513-25.
- ESTERBERG, R., HAILEY, D. W., RUBEL, E. W. & RAIBLE, D. W. 2014. ER-mitochondrial calcium flow underlies vulnerability of mechanosensory hair cells to damage. *J Neurosci*, 34, 9703-19.
- EVANS, P. & HALLIWELL, B. 1999. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci*, 884, 19-40.
- FAYAD, J. N., MAKAREM, A. O. & LINTHICUM, F. H., JR. 2009. Histopathologic assessment of fibrosis and new bone formation in implanted human temporal bones using 3D reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 141, 247-52.
- FEHSEL, K., JALOWY, A., QI, S., BURKART, V., HARTMANN, B. & KOLB, H. 1993. Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes*, 42, 496-500.

- FESSENDEN, J. D. & SCHACHT, J. 1998. The nitric oxide/cyclic GMP pathway: a potential major regulator of cochlear physiology. *Hear Res*, 118, 168-76.
- FETZ, V., BIER, C., HABTEMICHAEL, N., SCHUON, R., SCHWEITZER, A., KUNKEL, M., ENGELS, K., KOVÁCS, A. F., SCHNEIDER, S., MANN, W., STAUBER, R. H. & KNAUER, S. K. 2009. Inducible NO synthase confers chemoresistance in head and neck cancer by modulating survivin. *Int J Cancer*, 124, 2033-41.
- FLEMING, I. 2010. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch*, 459, 793-806.
- FLEMING, I. & BUSSE, R. 2003. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R1-12.
- FLEMING, I., FISSLTHALER, B., DIMMELER, S., KEMP, B. E. & BUSSE, R. 2001. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*, 88, E68-75.
- FLOCK, A., BRETSCHER, A. & WEBER, K. 1982. Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells. *Hear Res*, 7, 75-89.
- FLOCK, A. & CHEUNG, H. C. 1977. Actin filaments in sensory hairs of inner ear receptor cells. *J Cell Biol*, 75, 339-43.
- FOGGIA, M. J., QUEVEDO, R. V. & HANSEN, M. R. 2019. Intracochlear fibrosis and the foreign body response to cochlear implant biomaterials. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*, 4, 678-683.
- FORGE, A. 1984. Gap junctions in the stria vascularis and effects of ethacrynic acid. *Hear Res*, 13, 189-200.
- FORGE, A., BECKER, D., CASALOTTI, S., EDWARDS, J., EVANS, W. H., LENCH, N. & SOUTER, M. 1999. Gap junctions and connexin expression in the inner ear. *Novartis Found Symp*, 219, 134-50; discussion 151-6.
- FÖRSTERMANN, U. 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*, 459, 923-39.
- FÖRSTERMANN, U., CLOSS, E. I., POLLOCK, J. S., NAKANE, M., SCHWARZ, P., GATH, I. & KLEINERT, H. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23, 1121-31.
- FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33, 829-37, 837a-837d.
- FRIDBERGER, A., FLOCK, A., ULFENDAHL, M. & FLOCK, B. 1998. Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca²⁺ concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 7127-32.
- FROLENKOV, G. I., ATZORI, M., KALINEC, F., MAMMANO, F. & KACHAR, B. 1998. The membrane-based mechanism of cell motility in cochlear outer hair cells. *Mol Biol Cell*, 9, 1961-8.
- FRYE, M. D., ZHANG, C. & HU, B. H. 2018. Lower level noise exposure that produces only TTS modulates the immune homeostasis of cochlear macrophages. *J Neuroimmunol*, 323, 152-166.
- FUKUDA, S. & PELUS, L. M. 2006. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther*, 5, 1087-98.
- GAO, J. & YI, H. 2022. Molecular mechanisms and roles of inflammatory responses on low-frequency residual hearing after cochlear implantation. *J Otol*, 17, 54-58.
- GE, J., ELFERICH, J., DEGHANI-GHAHNAVIYEH, S., ZHAO, Z., MEADOWS, M., VON GERSDORFF, H., TAJKHORSHID, E. & GOUAUX, E. 2021. Molecular

- mechanism of prestin electromotive signal amplification. *Cell*, 184, 4669-4679.e13.
- GIFFORD, R. H., DORMAN, M. F., SHALLOP, J. K. & SYDLOWSKI, S. A. 2010. Evidence for the expansion of adult cochlear implant candidacy. *Ear Hear*, 31, 186-94.
- GOODENOUGH, D. A. & PAUL, D. L. 2009. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002576.
- GOODYEAR, R. J., LU, X., DEANS, M. R. & RICHARDSON, G. P. 2017. A tectorin-based matrix and planar cell polarity genes are required for normal collagen-fibril orientation in the developing tectorial membrane. *Development*, 144, 3978-3989.
- GOODYEAR, R. J. & RICHARDSON, G. P. 2018. Structure, Function, and Development of the Tectorial Membrane: An Extracellular Matrix Essential for Hearing. *Curr Top Dev Biol*, 130, 217-244.
- GOSEPATH, K., GATH, I., MAURER, J., POLLOCK, J. S., AMEDEE, R., FÖRSTERMANN, U. & MANN, W. 1997. Characterization of nitric oxide synthase isoforms expressed in different structures of the guinea pig cochlea. *Brain Res*, 747, 26-33.
- GREENE, N. T., MATTINGLY, J. K., BANAKIS HARTL, R. M., TOLLIN, D. J. & CASS, S. P. 2016. Intracochlear Pressure Transients During Cochlear Implant Electrode Insertion. *Otol Neurotol*, 37, 1541-1548.
- GRITSKO, T., WILLIAMS, A., TURKSON, J., KANEKO, S., BOWMAN, T., HUANG, M., NAM, S., EWEIS, I., DIAZ, N., SULLIVAN, D., YODER, S., ENKEMANN, S., ESCHRICH, S., LEE, J. H., BEAM, C. A., CHENG, J., MINTON, S., MURO-CACHO, C. A. & JOVE, R. 2006. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*, 12, 11-9.
- GSTOETTNER, W., HELBIG, S., SETTEVENDEMIE, C., BAUMANN, U., WAGENBLAST, J. & ARNOLDNER, C. 2009. A new electrode for residual hearing preservation in cochlear implantation: first clinical results. *Acta Otolaryngol*, 129, 372-9.
- GSTOETTNER, W. K., HELBIG, S., MAIER, N., KIEFER, J., RADELOFF, A. & ADUNKA, O. F. 2006. Ipsilateral electric acoustic stimulation of the auditory system: results of long-term hearing preservation. *Audiol Neurootol*, 11 Suppl 1, 49-56.
- GUZIK, T. J., KORBUT, R. & ADAMEK-GUZIK, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54, 469-87.
- HAAKE, S. M., DINH, C. T., CHEN, S., ESHRAGHI, A. A. & VAN DE WATER, T. R. 2009. Dexamethasone protects auditory hair cells against TNFalpha-initiated apoptosis via activation of PI3K/Akt and NFkappaB signaling. *Hear Res*, 255, 22-32.
- HABTEMICHAEL, N., HEINRICH, U. R., KNAUER, S. K., SCHMIDTMANN, I., BIER, C., DOCTER, D., BROCHHAUSEN, C., HELLING, K., BRIEGER, J., STAUBER, R. H. & MANN, W. J. 2010a. Expression analysis suggests a potential cytoprotective role of Birc5 in the inner ear. *Mol Cell Neurosci*, 45, 297-305.
- HABTEMICHAEL, N., WÜNSCH, D., BIER, C., TILLMANN, S., UNRUHE, B., FRAUENKNECHT, K., HEINRICH, U. R., MANN, W. J., STAUBER, R. H. & KNAUER, S. K. 2010b. Cloning and functional characterization of the guinea pig apoptosis inhibitor protein Survivin. *Gene*, 469, 9-17.

- HADDAD, J. J. & HARB, H. L. 2005. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Int Immunopharmacol*, 5, 461-83.
- HALLIWELL, B. & GUTTERRIDGE, J. M. C. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford Oxford University Press.
- HAN, W. J., SHI, X. R. & NUTTALL, A. 2013. Noise-induced nitrotyrosine increase and outer hair cell death in guinea pig cochlea. *Chin Med J (Engl)*, 126, 2923-7.
- HE, W., YU, J., SUN, Y. & KONG, W. 2020. Macrophages in Noise-Exposed Cochlea: Changes, Regulation and the Potential Role. *Aging Dis*, 11, 191-199.
- HEINRICH, U. R. & HELLING, K. 2012. Nitric oxide--a versatile key player in cochlear function and hearing disorders. *Nitric Oxide*, 27, 106-16.
- HEINRICH, U. R., HELLING, K., SIFFERATH, M., BRIEGER, J., LI, H., SCHMIDTMANN, I. & MANN, W. J. 2008. Gentamicin increases nitric oxide production and induces hearing loss in guinea pigs. *Laryngoscope*, 118, 1438-42.
- HEINRICH, U. R., MAURER, J., GOSEPATH, K. & MANN, W. 1997. Electron microscopic localization of nitric oxide I synthase in the organ of Corti of the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 254, 396-400.
- HEINRICH, U. R., MAURER, J., GOSEPATH, K. & MANN, W. 1998. Immunoelectron microscopic localization of nitric oxide synthase III in the guinea pig organ of Corti. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 255, 483-90.
- HEINRICH, U. R., MAURER, J. & MANN, W. 2004. Evidence for a possible NOS back-up system in the organ of Corti of the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 261, 121-8.
- HEINRICH, U. R., MEUSER, R., ERNST, B. P., SCHMIDTMANN, I., DIETRICH, D., STAUBER, R. H. & STRIETH, S. 2021. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Reticular Lamina of the Organ of Corti by a Nitric Oxide Donor. *J Histochem Cytochem*, 69, 731-739.
- HEINRICH, U. R., SCHMIDTMANN, I., MEUSER, R., ERNST, B. P., WUNSCH, D., SIEMER, S., GRIBKO, A., STAUBER, R. H. & STRIETH, S. 2019. Early Alterations of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Patterns in the Guinea Pig Cochlea After Noise Exposure. *J Histochem Cytochem*, 67, 845-855.
- HEINRICH, U. R., SELIVANOVA, O., BRIEGER, J. & MANN, W. J. 2006. Endothelial nitric oxide synthase upregulation in the cochlea of the guinea pig after intratympanic gentamicin injection. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 263, 62-8.
- HEINRICH, U. R., SELIVANOVA, O., FELTENS, R., BRIEGER, J. & MANN, W. 2005. Endothelial nitric oxide synthase upregulation in the guinea pig organ of Corti after acute noise trauma. *Brain Res*, 1047, 85-96.
- HEINRICH, U. R., SELIVANOVA, O., SCHMIDTMANN, I., FELTENS, R., BRIEGER, J. & MANN, W. J. 2010. Noise exposure alters cyclooxygenase 1 (COX-1) and 5-lipoxygenase (5-LO) expression in the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol*, 130, 358-65.
- HEMMENS, B. & MAYER, B. 1998. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods Mol Biol*, 100, 1-32.
- HENDERSON, D., BIELEFELD, E. C., HARRIS, K. C. & HU, B. H. 2006. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear*, 27, 1-19.
- HENSON, M. M. & HENSON, O. W., JR. 1988. Tension fibroblasts and the connective tissue matrix of the spiral ligament. *Hear Res*, 35, 237-58.
- HENSON, M. M., HENSON, O. W., JR. & JENKINS, D. B. 1984. The attachment of the spiral ligament to the cochlear wall: anchoring cells and the creation of tension. *Hear Res*, 16, 231-42.

- HESS, A., BLOCH, W., HUVERSTUHL, J., SU, J., STENNERT, E., ADDICKS, K. & MICHEL, O. 1999. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanic endotoxin-treatment. *Brain Res*, 830, 113-22.
- HIBINO, H., NIN, F., TSUZUKI, C. & KURACHI, Y. 2010. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch*, 459, 521-33.
- HILDING, D. A. & GINZBERG, R. D. 1977. Pigmentation of the stria vascularis. The contribution of neural crest melanocytes. *Acta Otolaryngol*, 84, 24-37.
- HIROSE, K., DISCOLO, C. M., KEASLER, J. R. & RANSOHOFF, R. 2005. Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma. *J Comp Neurol*, 489, 180-94.
- HONKURA, Y., MATSUO, H., MURAKAMI, S., SAKIYAMA, M., MIZUTARI, K., SHIOTANI, A., YAMAMOTO, M., MORITA, I., SHINOMIYA, N., KAWASE, T., KATORI, Y. & MOTOHASHI, H. 2016. NRF2 Is a Key Target for Prevention of Noise-Induced Hearing Loss by Reducing Oxidative Damage of Cochlea. *Sci Rep*, 6, 19329.
- HOPPE, U., HAST, A. & HOCKE, T. 2015. Audiometry-Based Screening Procedure for Cochlear Implant Candidacy. *Otol Neurotol*, 36, 1001-5.
- HOPPE, U., HOCKE, T., HAST, A. & HORNUNG, J. 2017. [Longterm Results of a Screening Procedure for Adult Cochlear Implant Candidates]. *Laryngorhinootologie*, 96, 234-238.
- HOSKISON, E., MITCHELL, S. & COULSON, C. 2017. Systematic review: Radiological and histological evidence of cochlear implant insertion trauma in adult patients. *Cochlear Implants Int*, 18, 192-197.
- HÖING, B., EICHLER, T., JUELLY, V., MEYER, M., JUNG, L., WASCHKIES, L., LANG, S. & ARWEILER-HARBECK, D. 2024. Digital live imaging of intraoperative electrocochleography during cochlear implantation: the first 50 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 281, 1175-1183.
- HUGHES, J. E., SRINIVASAN, S., LYNCH, K. R., PROIA, R. L., FERDEK, P. & HEDRICK, C. C. 2008. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res*, 102, 950-8.
- INAI, S., WATANABE, K. & OKUBO, K. 2012. Inducible nitric oxide synthase participates in cochlear damage after acoustic stimulation in Guinea pigs. *J Nippon Med Sch*, 79, 121-8.
- IWASA, K. H., MIZUTA, K., LIM, D. J., BENOS, D. J. & TACHIBANA, M. 1994. Amiloride-sensitive channels in marginal cells in the stria vascularis of the guinea pig cochlea. *Neurosci Lett*, 172, 163-6.
- JAGGER, D. J. & FORGE, A. 2015. Connexins and gap junctions in the inner ear--it's not just about K⁺ recycling. *Cell Tissue Res*, 360, 633-44.
- JAMESDANIEL, S., COLING, D., HINDUJA, S., DING, D., LI, J., CASSIDY, L., SEIGEL, G. M., QU, J. & SALVI, R. 2012. Cisplatin-induced ototoxicity is mediated by nitroxidative modification of cochlear proteins characterized by nitration of Lmo4. *J Biol Chem*, 287, 18674-86.
- JAMESDANIEL, S., RATHINAM, R. & NEUMANN, W. L. 2016. Targeting nitrative stress for attenuating cisplatin-induced downregulation of cochlear LIM domain only 4 and ototoxicity. *Redox Biol*, 10, 257-265.
- JIA, H., WANG, J., FRANÇOIS, F., UZIEL, A., PUEL, J. L. & VENAIL, F. 2013. Molecular and cellular mechanisms of loss of residual hearing after cochlear implantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 122, 33-9.

- JIANG, Z. G., SHI, X., ZHAO, H., SI, J. Q. & NUTTALL, A. L. 2004. Basal nitric oxide production contributes to membrane potential and vasotone regulation of guinea pig in vitro spiral modiolar artery. *Hear Res*, 189, 92-100.
- KACHAR, B., PARAKKAL, M., KURC, M., ZHAO, Y. & GILLESPIE, P. G. 2000. High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13336-41.
- KHATER, A. & EL-ANWAR, M. W. 2017. Methods of Hearing Preservation during Cochlear Implantation. *Int Arch Otorhinolaryngol*, 21, 297-301.
- KIKUCHI, T., ADAMS, J. C., MIYABE, Y., SO, E. & KOBAYASHI, T. 2000a. Potassium ion recycling pathway via gap junction systems in the mammalian cochlea and its interruption in hereditary nonsyndromic deafness. *Med Electron Microsc*, 33, 51-6.
- KIKUCHI, T., KIMURA, R. S., PAUL, D. L., TAKASAKA, T. & ADAMS, J. C. 2000b. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev*, 32, 163-6.
- KIM, H. J., LEE, J. H., KIM, S. J., OH, G. S., MOON, H. D., KWON, K. B., PARK, C., PARK, B. H., LEE, H. K., CHUNG, S. Y., PARK, R. & SO, H. S. 2010. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. *J Neurosci*, 30, 3933-46.
- KIMURA, R. S. 1966. Hairs of the cochlear sensory cells and their attachment to the tectorial membrane. *Acta Otolaryngol*, 61, 55-72.
- KIMURA, R. S. 1986. Animal models of inner ear vascular disturbances. *Am J Otolaryngol*, 7, 130-9.
- KITAJIRI, S., MIYAMOTO, T., MINEHARU, A., SONODA, N., FURUSE, K., HATA, M., SASAKI, H., MORI, Y., KUBOTA, T., ITO, J., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2004. Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci*, 117, 5087-96.
- KNAUER, S. K., HEINRICH, U. R., BIER, C., HABTEMICHAEL, N., DOCTER, D., HELLING, K., MANN, W. J. & STAUBER, R. H. 2010. An otoprotective role for the apoptosis inhibitor protein survivin. *Cell Death Dis*, 1, e51.
- KNOWLES, R. G. & MONCADA, S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 (Pt 2), 249-58.
- KOBAYASHI, Y., YUKIUE, H., SASAKI, H., FUKAI, I., YOKOYAMA, T., KIRIYAMA, M., YAMAKAWA, Y., MAEDA, M. & FUJII, Y. 2002. Developmentally regulated expression of survivin in the human thymus. *Hum Immunol*, 63, 101-7.
- KOŁODZIEJSKI, P. J., MUSIAL, A., KOO, J. S. & EIŠSA, N. T. 2002. Ubiquitination of inducible nitric oxide synthase is required for its degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12315-20.
- KONTORINIS, G., LENARZ, T., STÖVER, T. & PAASCHE, G. 2011. Impact of the insertion speed of cochlear implant electrodes on the insertion forces. *Otol Neurotol*, 32, 565-70.
- KORHONEN, R., LAHTI, A., HÄMÄLÄINEN, M., KANKAANRANTA, H. & MOILANEN, E. 2002. Dexamethasone inhibits inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production by destabilizing mRNA in lipopolysaccharide-treated macrophages. *Mol Pharmacol*, 62, 698-704.
- KUEBLER, W. M., UHLIG, U., GOLDMANN, T., SCHAEEL, G., KEREM, A., EXNER, K., MARTIN, C., VOLLMER, E. & UHLIG, S. 2003. Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med*, 168, 1391-8.

- KURABI, A., KEITHLEY, E. M., HOUSLEY, G. D., RYAN, A. F. & WONG, A. C. 2017. Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss. *Hear Res*, 349, 129-137.
- KURIAN, R., KRUPP, N. L. & SAUNDERS, J. C. 2003. Tip link loss and recovery on chick short hair cells following intense exposure to sound. *Hear Res*, 181, 40-50.
- KUTHUBUTHEEN, J., COATES, H., ROWSELL, C., NEDZELSKI, J., CHEN, J. M. & LIN, V. 2015. The role of extended preoperative steroids in hearing preservation cochlear implantation. *Hear Res*, 327, 257-64.
- LAMBERT, S. A., JOLMA, A., CAMPITELLI, L. F., DAS, P. K., YIN, Y., ALBU, M., CHEN, X., TAIPALE, J., HUGHES, T. R. & WEIRAUCH, M. T. 2018. The Human Transcription Factors. *Cell*, 172, 650-665.
- LAMM, K. & ARNOLD, W. 1996. Noise-induced cochlear hypoxia is intensity dependent, correlates with hearing loss and precedes reduction of cochlear blood flow. *Audiol Neurootol*, 1, 148-60.
- LAMMERS, M. J. W., VERSNEL, H., TOPSAKAL, V., VAN ZANTEN, G. A. & GROLMAN, W. 2018. Predicting Performance and Non-Use in Prelingually Deaf and Late-Implanted Cochlear Implant Users. *Otol Neurotol*, 39, e436-e442.
- LANG, H., SCHULTE, B. A., ZHOU, D., SMYTHE, N., SPICER, S. S. & SCHMIEDT, R. A. 2006. Nuclear factor kappaB deficiency is associated with auditory nerve degeneration and increased noise-induced hearing loss. *J Neurosci*, 26, 3541-50.
- LASKIN, D. L., SUNIL, V. R., GARDNER, C. R. & LASKIN, J. D. 2011. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 51, 267-88.
- LASZIG, R., ASCHENDORFF, A., STECKER, M., MÜLLER-DEILE, J., MAUNE, S., DILLIER, N., WEBER, B., HEY, M., BEGALL, K., LENARZ, T., BATTMER, R. D., BÖHM, M., STEFFENS, T., STRUTZ, J., LINDER, T., PROBST, R., ALLUM, J., WESTHOFEN, M. & DOERING, W. 2004. Benefits of bilateral electrical stimulation with the nucleus cochlear implant in adults: 6-month postoperative results. *Otol Neurotol*, 25, 958-68.
- LECHLER, P., WU, X., BERNHARDT, W., CAMPEAN, V., GASTIGER, S., HACKENBECK, T., KLANKE, B., WEIDEMANN, A., WARNECKE, C., AMANN, K., ENGEHAUSEN, D., WILLAM, C., ECKARDT, K. U., RÖDEL, F. & WIESENER, M. S. 2007. The tumor gene survivin is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney. *Am J Pathol*, 171, 1483-98.
- LEHR, H. A., MANKOFF, D. A., CORWIN, D., SANTEUSANIO, G. & GOWN, A. M. 1997. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem*, 45, 1559-65.
- LEIGH, J. R., DETTMAN, S. J. & DOWELL, R. C. 2016. Evidence-based guidelines for recommending cochlear implantation for young children: Audiological criteria and optimizing age at implantation. *Int J Audiol*, 55 Suppl 2, S9-s18.
- LEONOVA, E. V. & RAPHAEL, Y. 1997. Organization of cell junctions and cytoskeleton in the reticular lamina in normal and ototoxicity damaged organ of Corti. *Hear Res*, 113, 14-28.
- LI, G., LIU, W. & FRENZ, D. 2006. Cisplatin ototoxicity to the rat inner ear: a role for HMG1 and iNOS. *Neurotoxicology*, 27, 22-30.
- LI, H., WALLERATH, T. & FÖRSTERMANN, U. 2002. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*, 7, 132-47.

- LI, L. M., KILBOURN, R. G., ADAMS, J. & FIDLER, I. J. 1991. Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res*, 51, 2531-5.
- LI, P. M., SOMDAS, M. A., EDDINGTON, D. K. & NADOL, J. B., JR. 2007. Analysis of intracochlear new bone and fibrous tissue formation in human subjects with cochlear implants. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 116, 731-8.
- LI, W., CHEN, Y. Q., SHEN, Y. B., SHU, H. M., WANG, X. J., ZHAO, C. L. & CHEN, C. J. 2013. HIF-1 α knockdown by miRNA decreases survivin expression and inhibits A549 cell growth in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*, 32, 271-80.
- LIBERMAN, M. C. 1987. Chronic ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear Res*, 26, 65-88.
- LIBERMAN, M. C. & BEIL, D. G. 1979. Hair cell condition and auditory nerve response in normal and noise-damaged cochleas. *Acta Otolaryngol*, 88, 161-76.
- LIBERMAN, M. C. & KUJAWA, S. G. 2017. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear Res*, 349, 138-147.
- LIGGINS, C., ORLICKY, D. J., BLOOMQUIST, L. A. & GIANANI, R. 2003. Developmentally regulated expression of Survivin in human pancreatic islets. *Pediatr Dev Pathol*, 6, 392-7.
- LIN, C. C., CHIU, T., CHIOU, H. P., CHANG, C. M., HSU, C. J. & WU, H. P. 2021. Residual hearing preservation for cochlear implantation surgery. *Tzu Chi Med J*, 33, 359-364.
- LIU, H. Y., CHI, F. L. & GAO, W. Y. 2008. Taurine attenuates aminoglycoside ototoxicity by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression in the cochlea. *Neuroreport*, 19, 117-20.
- LOCHER, H., DE GROOT, J. C., VAN IPEREN, L., HUISMAN, M. A., FRIJNS, J. H. & CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M. 2015. Development of the stria vascularis and potassium regulation in the human fetal cochlea: Insights into hereditary sensorineural hearing loss. *Dev Neurobiol*, 75, 1219-40.
- LUDWIG, S., RIEMANN, N., HANS, S., CHRISTOV, F., LUDWIG, J. M., SAXE, J. & ARWEILER-HARBECK, D. 2022. Evaluation of hearing preservation in adults with a slim perimodiolar electrode. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 279, 1233-1242.
- LUKASHKIN, A. N., RICHARDSON, G. P. & RUSSELL, I. J. 2010. Multiple roles for the tectorial membrane in the active cochlea. *Hear Res*, 266, 26-35.
- LYNCH, E. D. & KIL, J. 2005. Compounds for the prevention and treatment of noise-induced hearing loss. *Drug Discov Today*, 10, 1291-8.
- MAEDA, Y., KARIYA, S., URAGUCHI, K., TAKAHARA, J., FUJIMOTO, S., SUGAYA, A. & NISHIZAKI, K. 2021. Immediate changes in transcription factors and synaptic transmission in the cochlea following acoustic trauma: A gene transcriptome study. *Neurosci Res*, 165, 6-13.
- MAMELLE, E., GRANGER, B., STERKERS, O., LAHLOU, G., FERRARY, E., NGUYEN, Y. & MOSNIER, I. 2019. Long-term residual hearing in cochlear implanted adult patients who were candidates for electro-acoustic stimulation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*.
- MARUSAWA, H., MATSUZAWA, S., WELSH, K., ZOU, H., ARMSTRONG, R., TAMM, I. & REED, J. C. 2003. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *Embo j*, 22, 2729-40.
- MATSUMURA, M. 2001. [A study on the contact between tectorial membrane and inner hair cell stereocilia in the cochlea]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 76, 151-4.
- MERCHANT, S. N. & JOSEPH B. NADOL, J. 2010. *Schuhknecht's Pathology of the Ear*, PMPH-USA.

- MICHEL, O., HESS, A., SU, J., BLOCH, W., STENNERT, E. & ADDICKS, K. 2000. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the hydropic cochlea of guinea pigs. *Hear Res*, 143, 23-8.
- MICHELL, B. J., CHEN, Z., TIGANIS, T., STAPLETON, D., KATSI, F., POWER, D. A., SIM, A. T. & KEMP, B. E. 2001. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 276, 17625-8.
- MIRANDA, P. C., SAMPAIO, A. L., LOPES, R. A., RAMOS VENOSA, A. & DE OLIVEIRA, C. A. 2014. Hearing preservation in cochlear implant surgery. *Int J Otolaryngol*, 2014, 468515.
- MITTMANN, P., MITTMANN, M., ERNST, A. & TODT, I. 2017. Intracochlear Pressure Changes due to 2 Electrode Types: An Artificial Model Experiment. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 156, 712-716.
- MIZUTA, K., ADACHI, M. & IWASA, K. H. 1997. Ultrastructural localization of the Na-K-Cl cotransporter in the lateral wall of the rabbit cochlear duct. *Hear Res*, 106, 154-62.
- MONCADA, S. 1994. Nitric oxide. *J Hypertens Suppl*, 12, S35-9.
- MÓNICA, F. Z., BIAN, K. & MURAD, F. 2016. The Endothelium-Dependent Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Adv Pharmacol*, 77, 1-27.
- MORIZANE, I., HAKUBA, N., HYODO, J., SHIMIZU, Y., FUJITA, K., YOSHIDA, T. & GYO, K. 2005. Ischemic damage increases nitric oxide production via inducible nitric oxide synthase in the cochlea. *Neurosci Lett*, 391, 62-7.
- MORRIS, K. R., LUTZ, R. D., CHOI, H. S., KAMITANI, T., CHMURA, K. & CHAN, E. D. 2003. Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide. *Infect Immun*, 71, 1442-52.
- MOTEKI, H., NISHIO, S. Y., MIYAGAWA, M., TSUKADA, K., NOGUCHI, Y. & USAMI, S. I. 2018. Feasibility of hearing preservation for residual hearing with longer cochlear implant electrodes. *Acta Otolaryngol*, 138, 1080-1085.
- MUDRY, A. & MILLS, M. 2013. The early history of the cochlear implant: a retrospective. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 139, 446-53.
- NADOL, J. B., JR. 1988. Comparative anatomy of the cochlea and auditory nerve in mammals. *Hear Res*, 34, 253-66.
- NAGASHIMA, R., SUGIYAMA, C., YONEYAMA, M., KURAMOTO, N., KAWADA, K. & OGITA, K. 2007. Acoustic overstimulation facilitates the expression of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit probably through enhanced DNA binding of activator protein-1 and/or NF-kappaB in the murine cochlea. *Neurochem Int*, 51, 209-15.
- NAGASHIMA, R., SUGIYAMA, C., YONEYAMA, M. & OGITA, K. 2005. Transcriptional factors in the cochlea within the inner ear. *J Pharmacol Sci*, 99, 301-6.
- NAGASHIMA, R., YAMAGUCHI, T., TANAKA, H. & OGITA, K. 2010. Mechanism underlying the protective effect of tempol and N ω -nitro-L-arginine methyl ester on acoustic injury: possible involvement of c-Jun N-terminal kinase pathway and connexin26 in the cochlear spiral ligament. *J Pharmacol Sci*, 114, 50-62.
- NAGY, I., MONGE, A., ALBINGER-HEGYI, A., SCHMID, S. & BODMER, D. 2005. NF-kappaB is required for survival of immature auditory hair cells in vitro. *J Assoc Res Otolaryngol*, 6, 260-8.
- NAKASHIMA, T. 1999. Autoregulation of cochlear blood flow. *Nagoya J Med Sci*, 62, 1-9.

- NAPOLI, C., DE NIGRIS, F., WILLIAMS-IGNARRO, S., PIGNALOSA, O., SICA, V. & IGNARRO, L. J. 2006. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*, 15, 265-79.
- NORDMANN, A. S., BOHNE, B. A. & HARDING, G. W. 2000. Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hear Res*, 139, 13-30.
- NUTTALL, A. L. 1999. Sound-Induced Cochlear Ischemia/Hypoxia as a Mechanism of Hearing Loss. *Noise Health*, 2, 17-32.
- O'LEARY, S. J., MONKSFIELD, P., KEL, G., CONNOLLY, T., SOUTER, M. A., CHANG, A., MAROVIC, P., O'LEARY, J. S., RICHARDSON, R. & EASTWOOD, H. 2013. Relations between cochlear histopathology and hearing loss in experimental cochlear implantation. *Hear Res*, 298, 27-35.
- OHINATA, Y., MILLER, J. M. & SCHACHT, J. 2003. Protection from noise-induced lipid peroxidation and hair cell loss in the cochlea. *Brain Res*, 966, 265-73.
- OKAYASU, T., QUESNEL, A. M., O'MALLEY, J. T., KAMAKURA, T. & NADOL, J. B., JR. 2020. The Distribution and Prevalence of Macrophages in the Cochlea Following Cochlear Implantation in the Human: An Immunohistochemical Study Using Anti-Iba1 Antibody. *Otol Neurotol*, 41, e304-e316.
- OLIVER, K. M., TAYLOR, C. T. & CUMMINS, E. P. 2009. Hypoxia. Regulation of NFkappaB signalling during inflammation: the role of hydroxylases. *Arthritis Res Ther*, 11, 215.
- OSHIMA, H., IKEDA, R., NOMURA, K., YAMAZAKI, M., HIDAKA, H., KATORI, Y., OSHIMA, T., KAWASE, T. & KOBAYASHI, T. 2014. Change in endocochlear potential during experimental insertion of a simulated cochlear implant electrode in the guinea pig. *Otol Neurotol*, 35, 234-40.
- PAKKARI, I. & LINDSBERG, P. 1995. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann Med*, 27, 369-77.
- PACHER, P., BECKMAN, J. S. & LIAUDET, L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87, 315-424.
- PAHL, H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853-66.
- PARZYCH, K. R. & KLIONSKY, D. J. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20, 460-73.
- PATEL, L. S., MITCHELL, C. K., DUBINSKY, W. P. & O'BRIEN, J. 2006. Regulation of gap junction coupling through the neuronal connexin Cx35 by nitric oxide and cGMP. *Cell Commun Adhes*, 13, 41-54.
- PATUZZI, R. 2011. Ion flow in cochlear hair cells and the regulation of hearing sensitivity. *Hear Res*, 280, 3-20.
- PAU, H. W., JUST, T., BORNITZ, M., LASURASHVILLI, N. & ZAHNERT, T. 2007. Noise exposure of the inner ear during drilling a cochleostomy for cochlear implantation. *Laryngoscope*, 117, 535-40.
- PELLEGRINI, S. & DUSANTER-FOURT, I. 1997. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*, 248, 615-33.
- POIRRIER, A. L., PINCEMAIL, J., VAN DEN ACKERVEKEN, P., LEFEBVRE, P. P. & MALGRANGE, B. 2010. Oxidative stress in the cochlea: an update. *Curr Med Chem*, 17, 3591-604.
- POPA, R., ANNIKO, M., TAKUMIDA, M. & ARNOLD, W. 2001. Localization of nitric oxide synthase isoforms in the human cochlea. *Acta Otolaryngol*, 121, 454-9.

- PUEL, J. L., RUEL, J., GERVAIS D'ALDIN, C. & PUJOL, R. 1998. Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport*, 9, 2109-14.
- PUJOL, R. & PUEL, J. L. 1999. Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci*, 884, 249-54.
- PURAM, S. V., YEUNG, C. M., JAHANI-ASL, A., LIN, C., DE LA IGLESIA, N., KONOPKA, G., JACKSON-GRUSBY, L. & BONNI, A. 2012. STAT3-iNOS Signaling Mediates EGFRvIII-Induced Glial Proliferation and Transformation. *J Neurosci*, 32, 7806-18.
- RADER, T. 2015. [Speech perception with electric-acoustic stimulation : Comparison with bilateral cochlear implant users in different noise conditions]. *HNO*, 63, 85-93.
- RADER, T., FASTL, H. & BAUMANN, U. 2013. Speech perception with combined electric-acoustic stimulation and bilateral cochlear implants in a multisource noise field. *Ear Hear*, 34, 324-32.
- RAJFER, J., ARONSON, W. J., BUSH, P. A., DOREY, F. J. & IGNARRO, L. J. 1992. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med*, 326, 90-4.
- RAPHAEL, Y. & ALTSCHULER, R. A. 2003. Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res Bull*, 60, 397-422.
- RAVICHANDRAN, L. V., JOHNS, R. A. & RENGASAMY, A. 1995. Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide. *Am J Physiol*, 268, H2216-23.
- REISS, L. A., STARK, G., NGUYEN-HUYNH, A. T., SPEAR, K. A., ZHANG, H., TANAKA, C. & LI, H. 2015. Morphological correlates of hearing loss after cochlear implantation and electro-acoustic stimulation in a hearing-impaired Guinea pig model. *Hear Res*, 327, 163-74.
- REN, Y. & STANKOVIC, K. M. 2018. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNFalpha) in Hearing Loss and Vestibular Schwannomas. *Curr Otorhinolaryngol Rep*, 6, 15-23.
- RENAULD, J. M., KHAN, V. & BASCH, M. L. 2022. Intermediate Cells of Dual Embryonic Origin Follow a Basal to Apical Gradient of Ingression Into the Lateral Wall of the Cochlea. *Front Cell Dev Biol*, 10, 867153.
- RILEY, T., SONTAG, E., CHEN, P. & LEVINE, A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 402-12.
- ROBBINS, R. A. & GRISHAM, M. B. 1997. Nitric oxide. *Int J Biochem Cell Biol*, 29, 857-60.
- ROLAND, P. S. & WRIGHT, C. G. 2006. Surgical aspects of cochlear implantation: mechanisms of insertional trauma. *Adv Otorhinolaryngol*, 64, 11-30.
- RÖRIG, B. & SUTOR, B. 1996. Nitric oxide-stimulated increase in intracellular cGMP modulates gap junction coupling in rat neocortex. *Neuroreport*, 7, 569-72.
- ROTH, B. & BRUNS, V. 1992. Postnatal development of the rat organ of Corti. I. General morphology, basilar membrane, tectorial membrane and border cells. *Anat Embryol (Berl)*, 185, 559-69.
- RUAN, R. S. 2002. Possible roles of nitric oxide in the physiology and pathophysiology of the mammalian cochlea. *Ann N Y Acad Sci*, 962, 260-74.
- SAKAGAMI, K., KAWAMURA, H., WU, D. M. & PURO, D. G. 2001. Nitric oxide/cGMP-induced inhibition of calcium and chloride currents in retinal pericytes. *Microvasc Res*, 62, 196-203.

- SAKAGAMI, M., MATSUNAGA, T. & HASHIMOTO, P. H. 1982. Fine structure and permeability of capillaries in the stria vascularis and spiral ligament of the inner ear of the guinea pig. *Cell Tissue Res*, 226, 511-22.
- SAMAHA, N. L., ALMASRI, M. M., JOHNS, J. D. & HOA, M. 2021. Hearing restoration and the stria vascularis: evidence for the role of the immune system in hearing restoration. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 29, 373-384.
- SANTA MARIA, P. L., DOMVILLE-LEWIS, C., SUCHER, C. M., CHESTER-BROWNE, R. & ATLAS, M. D. 2013. Hearing preservation surgery for cochlear implantation--hearing and quality of life after 2 years. *Otol Neurotol*, 34, 526-31.
- SATTLER, R., XIONG, Z., LU, W. Y., HAFNER, M., MACDONALD, J. F. & TYMIANSKI, M. 1999. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*, 284, 1845-8.
- SCHEER, A., KNAUER, S. K. & VERHAEGH, R. 2017. Survivin expression pattern in the intestine of normoxic and ischemic rats. *BMC Gastroenterol*, 17, 76.
- SCHEIBE, F., HAUPT, H. & LUDWIG, C. 1993. Intensity-related changes in cochlear blood flow in the guinea pig during and following acoustic exposure. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 250, 281-5.
- SCHERER, E. Q., YANG, J., CANIS, M., REIMANN, K., IVANOV, K., DIEHL, C. D., BACKX, P. H., WIER, W. G., STRIETH, S., WANGEMANN, P., VOIGTLAENDER-BOLZ, J., LIDINGTON, D. & BOLZ, S. S. 2010. Tumor necrosis factor-alpha enhances microvascular tone and reduces blood flow in the cochlea via enhanced sphingosine-1-phosphate signaling. *Stroke*, 41, 2618-24.
- SEMENZA, G. L. 2001. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 167-71.
- SEMENZA, G. L., AGANI, F., IYER, N., KOTCH, L., LAUGHNER, E., LEUNG, S. & YU, A. 1999. Regulation of cardiovascular development and physiology by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci*, 874, 262-8.
- SEYYEDI, M. & NADOL, J. B., JR. 2014. Intracochlear inflammatory response to cochlear implant electrodes in humans. *Otol Neurotol*, 35, 1545-51.
- SHAHAB, M. & JAMESDANIEL, S. 2022. Nitrate Stress and Auditory Dysfunction. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15.
- SHAID, S., BRANDTS, C. H., SERVE, H. & DIKIC, I. 2013. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ*, 20, 21-30.
- SHI, L., LIU, K., WANG, H., ZHANG, Y., HONG, Z., WANG, M., WANG, X., JIANG, X. & YANG, S. 2015. Noise induced reversible changes of cochlear ribbon synapses contribute to temporary hearing loss in mice. *Acta Otolaryngol*, 135, 1093-102.
- SHI, X. 2009. Cochlear pericyte responses to acoustic trauma and the involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol*, 174, 1692-704.
- SHI, X. 2010. Resident macrophages in the cochlear blood-labyrinth barrier and their renewal via migration of bone-marrow-derived cells. *Cell Tissue Res*, 342, 21-30.
- SHI, X. 2011. Physiopathology of the cochlear microcirculation. *Hear Res*, 282, 10-24.
- SHI, X. 2016. Pathophysiology of the cochlear intrastrial fluid-blood barrier (review). *Hear Res*, 338, 52-63.
- SHI, X., DAI, C. & NUTTALL, A. L. 2003. Altered expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the cochlea. *Hear Res*, 177, 43-52.

- SHI, X., HAN, W., YAMAMOTO, H., TANG, W., LIN, X., XIU, R., TRUNE, D. R. & NUTTALL, A. L. 2008. The cochlear pericytes. *Microcirculation*, 15, 515-29.
- SHI, X. & NUTTALL, A. L. 2003. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress. *Brain Res*, 967, 1-10.
- SHI, X., REN, T. & NUTTALL, A. L. 2001. Nitric oxide distribution and production in the guinea pig cochlea. *Hear Res*, 153, 23-31.
- SHI, X., REN, T. & NUTTALL, A. L. 2002. The electrochemical and fluorescence detection of nitric oxide in the cochlea and its increase following loud sound. *Hear Res*, 164, 49-58.
- SHIN, S. A., LYU, A. R., JEONG, S. H., KIM, T. H., PARK, M. J. & PARK, Y. H. 2019. Acoustic Trauma Modulates Cochlear Blood Flow and Vasoactive Factors in a Rodent Model of Noise-Induced Hearing Loss. *Int J Mol Sci*, 20.
- SIM, D. W. 1990. Spiral ligament tension fibroblasts and extracellular fibres in the guinea pig. *Acta Anat (Basel)*, 138, 195-9.
- SIMONI, E., GENTILIN, E., CANDITO, M., BORILE, G., ROMANATO, F., CHICCA, M., NORDIO, S., ASPIDISTRIA, M., MARTINI, A., CAZZADOR, D. & ASTOLFI, L. 2020. Immune Response After Cochlear Implantation. *Front Neurol*, 11, 341.
- SINGH, G., LAU, S. T. & PICHORA-FULLER, M. K. 2015. Social Support Predicts Hearing Aid Satisfaction. *Ear Hear*, 36, 664-76.
- SKARŻYŃSKA, M. B., SKARŻYŃSKI, P. H., KRÓL, B., KOZIEŁ, M., OSIŃSKA, K., GOS, E. & SKARŻYŃSKI, H. 2018. Preservation of Hearing Following Cochlear Implantation Using Different Steroid Therapy Regimens: A Prospective Clinical Study. *Med Sci Monit*, 24, 2437-2445.
- SOMDAS, M. A., LI, P. M., WHITEN, D. M., EDDINGTON, D. K. & NADOL, J. B., JR. 2007. Quantitative evaluation of new bone and fibrous tissue in the cochlea following cochlear implantation in the human. *Audiol Neurootol*, 12, 277-84.
- SONG, Z., YAO, X. & WU, M. 2003. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 278, 23130-40.
- SPICER, S. S. & SCHULTE, B. A. 1991. Differentiation of inner ear fibrocytes according to their ion transport related activity. *Hear Res*, 56, 53-64.
- SPICER, S. S., THOMOPOULOS, G. N. & SCHULTE, B. A. 2000. Structural evidence for ion transport and tectorial membrane maintenance in the gerbil limbus. *Hear Res*, 143, 147-61.
- SPOENDLIN, H. 1985. Histopathology of noise deafness. *J Otolaryngol*, 14, 282-6.
- SRINIVASULA, S. M. & ASHWELL, J. D. 2008. IAPs: what's in a name? *Mol Cell*, 30, 123-35.
- STEEL, K. P. & BARKWAY, C. 1989. Another role for melanocytes: their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development*, 107, 453-63.
- STUEHR, D., POU, S. & ROSEN, G. M. 2001. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*, 276, 14533-6.
- SUN, C. H., HSU, C. J., CHEN, P. R. & WU, H. P. 2015. Residual hearing preservation after cochlear implantation via round window or cochleostomy approach. *Laryngoscope*, 125, 1715-9.
- SZYFTER, W., KARLIK, M., SEKULA, A., HARRIS, S. & GAWEŃKI, W. 2019. Current indications for cochlear implantation in adults and children. *Otolaryngol Pol*, 73, 1-5.
- TAKEUCHI, S., ANDO, M. & KAKIGI, A. 2000. Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys J*, 79, 2572-82.

- TAKUMIDA, M. & ANNIKO, M. 2002. Nitric oxide in the inner ear. *Curr Opin Neurol*, 15, 11-5.
- TAKUMIDA, M., ANNIKO, M., POPA, R. & ZHANG, D. M. 2000. Lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in the guinea pig organ of Corti. *Hear Res*, 140, 91-8.
- TANAKA, C., NGUYEN-HUYNH, A., LOERA, K., STARK, G. & REISS, L. 2014. Factors associated with hearing loss in a normal-hearing guinea pig model of Hybrid cochlear implants. *Hear Res*, 316, 82-93.
- TARABICHI, O., JENSEN, M. & HANSEN, M. R. 2021. Advances in hearing preservation in cochlear implant surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 29, 385-390.
- THOMAS, D. D., RIDNOUR, L. A., ISENBERG, J. S., FLORES-SANTANA, W., SWITZER, C. H., DONZELLI, S., HUSSAIN, P., VECOLI, C., PAOLOCCI, N., AMBS, S., COLTON, C. A., HARRIS, C. C., ROBERTS, D. D. & WINK, D. A. 2008. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med*, 45, 18-31.
- THORNE, P. R. & NUTTALL, A. L. 1987. Laser Doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear Res*, 27, 1-10.
- TODA, N., AYAJIKI, K. & OKAMURA, T. 2009. Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. *J Hypertens*, 27, 1929-40.
- TODD, C. A., NAGHDY, F. & SVEHLA, M. J. 2007. Force application during cochlear implant insertion: an analysis for improvement of surgeon technique. *IEEE Trans Biomed Eng*, 54, 1247-55.
- TODT, I., MITTMANN, P. & ERNST, A. 2014. Intracochlear fluid pressure changes related to the insertional speed of a CI electrode. *Biomed Res Int*, 2014, 507241.
- TOGASHI, H., SAKUMA, I., YOSHIOKA, M., KOBAYASHI, T., YASUDA, H., KITABATAKE, A., SAITO, H., GROSS, S. S. & LEVI, R. 1992. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther*, 262, 343-7.
- TRIFFO, W. J., PALSDOTTIR, H., SONG, J., MORGAN, D. G., MCDONALD, K. L., AUER, M. & RAPHAEL, R. M. 2019. 3D Ultrastructure of the Cochlear Outer Hair Cell Lateral Wall Revealed By Electron Tomography. *Front Cell Neurosci*, 13, 560.
- UREN, A. G., WONG, L., PAKUSCH, M., FOWLER, K. J., BURROWS, F. J., VAUX, D. L. & CHOO, K. H. 2000. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol*, 10, 1319-28.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- VAN DE HEYNING, P., TÁVORA-VIEIRA, D., MERTENS, G., VAN ROMPAEY, V., RAJAN, G. P., MÜLLER, J., HEMPEL, J. M., LEANDER, D., POLTERAUER, D., MARX, M., USAMI, S. I., KITOH, R., MIYAGAWA, M., MOTEKI, H., SMILSKY, K., BAUMGARTNER, W. D., KEINTZEL, T. G., SPRINZL, G. M., WOLF-MAGELE, A., ARNDT, S., WESARG, T., ZIRN, S., BAUMANN, U., WEISSGERBER, T., RADER, T., HAGEN, R., KURZ, A., RAK, K., STOKROOS, R., GEORGE, E., POLO, R., MEDINA, M. D. M., HENKIN, Y., HILLY, O., ULANOVSKI, D., RAJESWARAN, R., KAMESWARAN, M., DI GREGORIO, M. F. & ZERNOTTI, M. E. 2016. Towards a Unified Testing Framework for Single-Sided Deafness Studies: A Consensus Paper. *Audiol Neurootol*, 21, 391-398.

- VERHAGEN, A. M. & VAUX, D. L. 2002. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis*, 7, 163-6.
- VLAJKOVIC, S. M., LEE, K. H., WONG, A. C., GUO, C. X., GUPTA, R., HOUSLEY, G. D. & THORNE, P. R. 2010. Adenosine amine congener mitigates noise-induced cochlear injury. *Purinergic Signal*, 6, 273-81.
- VON ILBERG, C., KIEFER, J., TILLEIN, J., PFENNINGDORFF, T., HARTMANN, R., STÜRZEBECKER, E. & KLINKE, R. 1999. Electric-acoustic stimulation of the auditory system. New technology for severe hearing loss. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 61, 334-40.
- VON ILBERG, C. A., BAUMANN, U., KIEFER, J., TILLEIN, J. & ADUNKA, O. F. 2011. Electric-acoustic stimulation of the auditory system: a review of the first decade. *Audiol Neurootol*, 16 Suppl 2, 1-30.
- WALGER, M., FOERST, A., BEUTNER, D., STREICHER, B., STÜRMER, K. & LANGROTH, R. 2011. [Auditory synaptopathy/neuropathy: clinical findings and diagnosis]. *Hno*, 59, 414-24.
- WANG, J. & PUEL, J. L. 2018. Toward Cochlear Therapies. *Physiol Rev*, 98, 2477-2522.
- WANG, J., WU, M. Y., SU, H., LU, J., CHEN, X., TAN, J. & LU, J. H. 2019. iNOS Interacts with Autophagy Receptor p62 and is Degraded by Autophagy in Macrophages. *Cells*, 8.
- WANG, K., BREMS, J. J., GAMELLI, R. L. & HOLTERMAN, A. X. 2010. Survivin signaling is regulated through nuclear factor-kappa B pathway during glycochenodeoxycholate-induced hepatocyte apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 1368-75.
- WANG, K., BREMS, J. J., GAMELLI, R. L. & HOLTERMAN, A. X. 2011. iNOS/NO signaling regulates apoptosis induced by glycochenodeoxycholate in hepatocytes. *Cell Signal*, 23, 1677-85.
- WANG, Y., HAN, L., DIAO, T., JING, Y., WANG, L., ZHENG, H., MA, X., QI, J. & YU, L. 2018. A comparison of systemic and local dexamethasone administration: From perilymph/cochlea concentration to cochlear distribution. *Hear Res*, 370, 1-10.
- WANG, Y., HIROSE, K. & LIBERMAN, M. C. 2002. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 3, 248-68.
- WANGEMANN, P. 2002a. Cochlear blood flow regulation. *Adv Otorhinolaryngol*, 59, 51-7.
- WANGEMANN, P. 2002b. K(+) cycling and its regulation in the cochlea and the vestibular labyrinth. *Audiol Neurootol*, 7, 199-205.
- WANGEMANN, P. 2006. Supporting sensory transduction: cochlear fluid homeostasis and the endocochlear potential. *J Physiol*, 576, 11-21.
- WANGEMANN, P., LIU, J. & MARCUS, D. C. 1995. Ion transport mechanisms responsible for K⁺ secretion and the transepithelial voltage across marginal cells of stria vascularis in vitro. *Hear Res*, 84, 19-29.
- WATANABE, K., HESS, A., BLOCH, W. & MICHEL, O. 2000a. Inhibition of inducible nitric oxide synthase lowers the cochlear damage by lipopolysaccharide in guinea pigs. *Free Radic Res*, 32, 363-70.
- WATANABE, K., HESS, A., ZUMEGER, C., STENNERT, E., BLOCH, W., ADDICKS, K. & MICHEL, O. 2000b. Changes of the compound action potential (CAP) and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea under the inflammatory condition(1). *Hear Res*, 145, 149-55.
- WATANABE, K., INAI, S., JINNOUCHI, K., BADA, S., HESS, A., MICHEL, O. & YAGI, T. 2002. Nuclear-factor kappa B (NF-kappa B)-inducible nitric oxide synthase

- (iNOS/NOS II) pathway damages the stria vascularis in cisplatin-treated mice. *Anticancer Res*, 22, 4081-5.
- WEBER, P. C., CUNNINGHAM, C. D., 3RD & SCHULTE, B. A. 2001. Potassium recycling pathways in the human cochlea. *Laryngoscope*, 111, 1156-65.
- WEI, X. Q., CHARLES, I. G., SMITH, A., URE, J., FENG, G. J., HUANG, F. P., XU, D., MULLER, W., MONCADA, S. & LIEW, F. Y. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375, 408-11.
- WEISS, B. G., BERTLICH, M., BETTAG, S. A., DESINGER, H., IHLER, F. & CANIS, M. 2017. Drug-induced Defibrinogenation as New Treatment Approach of Acute Hearing Loss in an Animal Model for Inner Ear Vascular Impairment. *Otol Neurotol*, 38, 648-654.
- WEISSGERBER, T., STOVER, T. & BAUMANN, U. 2019. Speech perception in noise: Impact of directional microphones in users of combined electric-acoustic stimulation. *PLoS One*, 14, e0213251.
- WEITZBERG, E. & LUNDBERG, J. O. 1998. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide*, 2, 1-7.
- WHEATLEY, S. P. & ALTIERI, D. C. 2019. Survivin at a glance. *J Cell Sci*, 132.
- WILSON, T., OMELCHENKO, I., FOSTER, S., ZHANG, Y., SHI, X. & NUTTALL, A. L. 2014. JAK2/STAT3 inhibition attenuates noise-induced hearing loss. *PLoS One*, 9, e108276.
- WOODSON, E. A., REISS, L. A. J., TURNER, C. W., GFELLER, K. & GANTZ, B. J. 2010. The Hybrid cochlear implant: a review. *Adv Otorhinolaryngol*, 67, 125-134.
- WRIGHT, C. G. & ROLAND, P. S. 2013. Vascular trauma during cochlear implantation: a contributor to residual hearing loss? *Otol Neurotol*, 34, 402-7.
- WU, X., ZHANG, W., LI, Y. & LIN, X. 2019. Structure and Function of Cochlear Gap Junctions and Implications for the Translation of Cochlear Gene Therapies. *Front Cell Neurosci*, 13, 529.
- XIA, J. B., LIU, G. H., CHEN, Z. Y., MAO, C. Z., ZHOU, D. C., WU, H. Y., PARK, K. S., ZHAO, H., KIM, S. K., CAI, D. Q. & QI, X. F. 2016. Hypoxia/ischemia promotes CXCL10 expression in cardiac microvascular endothelial cells by NFkB activation. *Cytokine*, 81, 63-70.
- YAMANE, H., TAKAYAMA, M., KONISHI, K., IGUCHI, H., SHIBATA, S., SUNAMI, K. & NAKAI, Y. 1997. Nitric oxide synthase and contractile protein in the rat cochlear lateral wall: possible role of nitric oxide in regulation of stria blood flow. *Hear Res*, 108, 65-73.
- YAMASHITA, D., JIANG, H. Y., LE PRELL, C. G., SCHACHT, J. & MILLER, J. M. 2005. Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience*, 134, 633-42.
- YAMASHITA, D., JIANG, H. Y., SCHACHT, J. & MILLER, J. M. 2004. Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res*, 1019, 201-9.
- YANG, T. H., YOUNG, Y. H. & LIU, S. H. 2011. EGb 761 (Ginkgo biloba) protects cochlear hair cells against ototoxicity induced by gentamicin via reducing reactive oxygen species and nitric oxide-related apoptosis. *J Nutr Biochem*, 22, 886-94.
- YAO, W. N., TURNER, C. W. & GANTZ, B. J. 2006. Stability of low-frequency residual hearing in patients who are candidates for combined acoustic plus electric hearing. *J Speech Lang Hear Res*, 49, 1085-90.
- YEH, T. H., TSAI, M. C., LEE, S. Y., HSU, M. M. & TRAN BA HUY, P. 1997. Stretch-activated nonselective cation, Cl⁻ and K⁺ channels in apical membrane of epithelial cells of Reissner's membrane. *Hear Res*, 109, 1-10.

- YOUNG, Y. H. 2020. Contemporary review of the causes and differential diagnosis of sudden sensorineural hearing loss. *Int J Audiol*, 59, 243-253.
- YU, H., TONG, B., ZHANG, Q., ZHU, W. & DUAN, M. 2014. Drill-induced noise level during cochleostomy. *Acta Otolaryngol*, 134, 943-6.
- YU, J., ZHANG, Y., ZHANG, X., RUDIC, R. D., BAUER, P. M., ALTIERI, D. C. & SESSA, W. C. 2012. Endothelium derived nitric oxide synthase negatively regulates the PDGF-survivin pathway during flow-dependent vascular remodeling. *PLoS One*, 7, e31495.
- YU, W., ZONG, S., DU, P., ZHOU, P., LI, H., WANG, E. & XIAO, H. 2021. Role of the Stria Vascularis in the Pathogenesis of Sensorineural Hearing Loss: A Narrative Review. *Front Neurosci*, 15, 774585.
- ZHANG, J. & SNYDER, S. H. 1995. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 213-33.
- ZHANG, L., CHEN, S. & SUN, Y. 2021. Mechanism and Prevention of Spiral Ganglion Neuron Degeneration in the Cochlea. *Front Cell Neurosci*, 15, 814891.
- ZHANG, M., XU, J. T., ZHU, X., WANG, Z., ZHAO, X., HUA, Z., TAO, Y. X. & XU, Y. 2010. Postsynaptic density-93 deficiency protects cultured cortical neurons from N-methyl-D-aspartate receptor-triggered neurotoxicity. *Neuroscience*, 166, 1083-90.
- ZHANG, W., DAI, M., FRIDBERGER, A., HASSAN, A., DEGAGNE, J., NENG, L., ZHANG, F., HE, W., REN, T., TRUNE, D., AUER, M. & SHI, X. 2012. Perivascular-resident macrophage-like melanocytes in the inner ear are essential for the integrity of the intrastrial fluid-blood barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 10388-93.
- ZHAO, H. B., KIKUCHI, T., NGEZAHAYO, A. & WHITE, T. W. 2006. Gap junctions and cochlear homeostasis. *J Membr Biol*, 209, 177-86.
- ZHAO, H. B., LIU, L. M., YU, N., ZHU, Y., MEI, L., CHEN, J. & LIANG, C. 2022. Efferent neurons control hearing sensitivity and protect hearing from noise through the regulation of gap junctions between cochlear supporting cells. *J Neurophysiol*, 127, 313-327.
- ZHAO, J., TENEV, T., MARTINS, L. M., DOWNWARD, J. & LEMOINE, N. R. 2000. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci*, 113 Pt 23, 4363-71.
- ZHAO, Y., YAMOAHA, E. N. & GILLESPIE, P. G. 1996. Regeneration of broken tip links and restoration of mechanical transduction in hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15469-74.
- ZHENG, J., SHEN, W., HE, D. Z., LONG, K. B., MADISON, L. D. & DALLOS, P. 2000. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405, 149-55.
- ZHOU, L. & ZHU, D. Y. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 20, 223-30.
- ZWEIER, J. L., SAMOUILOV, A. & KUPPUSAMY, P. 1999. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta*, 1411, 250-62.

12 Danksagung

13 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 04.07.1994
Geburtsort: Merzig
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Berufliche Tätigkeit

seit 10/2022
Arzt in Weiterbildung zum Facharzt an der Poliklinik für Hals, -Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Bonn der Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Akademische Ausbildung

05/2022
10/2015 – 05/2022
05/2022
10/2014 – 08/2015
06/2014
Approbation als Arzt
Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Drittes medizinisches Staatsexamens und Abschluss des Medizinstudiums
Maschinenbaustudium am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Promotionsprojekt

04/2020
Anmeldung des Promotionsprojektes:
„Die Rolle des Survivin-NO-Signalwegs im Rahmen der Cochleaimplantation“

Teilaspekte dieser Promotion wurden publiziert: Ernst et al. (2023)

Bonn, 07.11.2024

Mathias Fries

