

Aus dem Molekularbiologischen Forschungslabor und Tinnituszentrum der HNO-Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Einflussfaktoren auf die Hypoxie/Ischämie induzierte Schädigung von
Haarzellen der Cochlea**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nyamaa Amarjargal

aus Ulaanbaatar, Mongolei

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. B. Mazurek
2. Prof. Dr. med. D. Groneberg
3. Prof. Dr. M. Knipper

Datum der Promotion: 22. Februar 2008

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	4
Einleitung	5
Material und Methodik	6
<i>Präparation des Cortischen Organs</i>	6
<i>Kultivierung</i>	7
<i>Hypoxie/Ischämie</i>	7
<i>Bestimmung des Haarzellschadens</i>	7
<i>K⁺-Konzentration, PMCA- und SERCA-Blocker</i>	8
<i>Wachstumsfaktoren</i>	8
<i>Argon</i>	8
Ergebnisse	9
<i>Haarzellverlust durch Ischämie</i>	9
<i>Einfluss der K⁺-Konzentration auf die Haarzellen</i>	9
<i>Einfluss von Blockern des Ca²⁺-Transportes auf die Haarzellen</i>	9
<i>Einfluss von rhEPO auf die Ischämievulnerabilität der Haarzellen</i>	10
<i>Wirkung von Argon auf die Hypoxievulnerabilität von Haarzellen</i>	10
Diskussion	10
<i>In-vitro-Modell des Cortischen Organs</i>	10
<i>Einfluss der K⁺-Konzentration auf die Haarzellen in Normoxie und Ischämie</i>	10
<i>Einfluss des Ca²⁺-Transportes auf den Ischämie bedingten Haarzellverlust</i>	11
<i>Protektive Wirkung von rhEPO</i>	12
<i>Protektive Wirkung von Argon</i>	12
<i>Bedeutung der Untersuchungen</i>	12
Literatur	14
Abkürzungsverzeichnis	17
Relevante Publikationen	18
Erklärung über den Anteil an den Publikationen	
Publikationsliste	
Lebenslauf	
Erklärung	
Danksagung	

Abstrakt

Hypoxie und Ischämie sind wichtige pathogenetische Faktoren für die Entstehung von Innenohrerkrankungen wie Hörsturz, Lärmschwerhörigkeit, Presbyakusis und Tinnitus. Zielstellung dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zum besseren Verständnis des Mechanismus der Haarzellschädigung durch Hypoxie/Ischämie zu leisten und neue Protektionsmöglichkeiten für Haarzellen gegenüber Hypoxie/Ischämie zu testen. Die Untersuchungen erfolgten am Modell der organotypischen Kultur des Cortischen Organs von neugeborenen Ratten (3.-5. postnataler Tag).

Auf Grund der Bedeutung von Elektrolyten für die Haarzelle prüften wir den Einfluss der Kalium (K^+)-Konzentration auf den Haarzellverlust. Ischämie von 3 bis 4 h resultierte bei 5 mM K^+ in einem signifikanten Verlust von inneren (IHZ) und äußeren (ÄHZ) Haarzellen. Der Verlust betrug im apikalen, medialen und basalen Segment 15-25 % ÄHZ und 35-51 % IHZ, wobei das apikale Segment eine geringere Schädigung aufwies als das basale. Bei 30 und 50 mM K^+ erfolgte keine Erhöhung, sondern eine Verringerung des ÄHZ-Verlustes im basalen Segment. Bei 70 mM K^+ konnte eine signifikante Verringerung des Verlustes an IHZ und ÄHZ im medialen und basalen Bereich der Cochlea nachgewiesen werden.

Der Einfluss des Kalzium (Ca^{2+})-Transportes auf die Haarzellen wurde mit Blockern der „smooth endoplasmatic reticulum calcium“-ATPase (SERCA), Thapsigargin und Cyclopiazonsäure („cyclopiazonic acid“, CPA), sowie Blockern der Plasmamembran-Calcium-ATPase (PMCA), Eosin und Orthovanadat (o-Vanadat), untersucht. Thapsigargin und CPA zeigten unter Normoxie und Ischämie bei den verwendeten Konzentrationen keine Wirkung. Im Gegensatz dazu hatten Eosin und o-Vanadat dosisabhängig sowohl unter Normoxie als auch unter Ischämie einen schädigenden Einfluss. Die verstärkende Wirkung der PMCA-Blocker auf den Haarzelltod unterstützt die Vermutung, dass die PMCA-Aktivität ein Schlüsselfaktor für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und das Überleben der Haarzellen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von „recombinant human erythropoetin“ (rhEPO) und dem Edelgas Argon auf den Haarzellverlust untersucht. Sowohl rhEPO als auch Argon erwiesen sich als protektiv gegenüber Ischämie bzw. Hypoxie.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die organotypische Kultur des Cortischen Organs für die Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Haarzell-Vitalität gut geeignet ist. Eine direkte Übertragung der Resultate auf den adulten Organismus bzw. den Menschen ist nicht oder nur begrenzt möglich.

Abkürzungsverzeichnis

ÄHZ	Äußere Haarzelle
Ar-Hypoxie	Argon-Hypoxie
BSG	Buffered saline glucose
Ca ²⁺	Kalzium
CPA	Cyclopiazonsäure
EL	Endolymph
IHZ	Innere Haarzelle
K ⁺	Kalium
N ₂ -Hypoxie	Stickstoff-Hypoxie
Na ⁺	Natrium
o-Vanadat	Orthovanadat
PL	Perilymphe
PMCA	Plasmamembran-Kalzium-ATPase
rhEGF	Recombinant human epithelial growth factor
rhEPO	Recombinant human erythropoetin
rhIGF-1	Recombinant human insulin-like growth factor-1
SERCA	Smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Amarjargal, Nyamaa erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Einflussfaktoren auf die Hypoxie/Ischämie induzierte Schädigung von Haarzellen der Cochlea selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Frau Priv. Doz. Dr. B. Mazurek möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und ihre freundliche Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. J. Gross möchte ich ganz besonders herzlich für seine kontinuierliche und konsequente Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit danken.

Frau Dipl. Ing. (FH) H. Haupt gilt mein ganz herzlicher Dank für ihre wertvollen inhaltlichen Hinweise und Anmerkungen.

Meinen Kollegen und Mitarbeitern des Labors, Frau M. Descher, Frau J. Fuchs, Frau A. Machulik und Frau R. Moller, möchte ich sehr herzlich für das freundliche Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danken.

Familie Zöllner danke ich besonders für den wertvollen Erfahrungs- und Meinungs-austausch.

Zum Schluss sei meiner Familie und besonders meinem Sohn Bilguun für die Unterstützung, die Liebe und das Verständnis, die sie mir in den letzten Jahren entgegengebracht haben, gedankt.