

## Einleitung

Hypoxie und Ischämie sind wichtige pathogenetische Faktoren für die Entstehung von Innenohrerkrankungen. Es wird angenommen, dass z. B. Hörsturz, Lärmschwerhörigkeit und Presbyakusis mit Hypoxie/Ischämie verbunden sind (Riva et al., 2006). Diese kann zum Abfall der Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration, zu einer verminderten Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase und zu einer veränderten Permeabilität von Ionenkanälen führen. In deren Folge kommt es zur Störung des Ionen-Gleichgewichtes, z. B. zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration, die eine Zellschädigung bis hin zum Zelltod auslösen kann (Lipton, 1999; Martinez-Dunst et al., 1997).

Die aktiven Funktionen im Innenohr werden durch zwei unterschiedliche Flüssigkeiten, Perilymphe (PL) und Endolymphe (EL), gewährleistet. Die PL ist ähnlich wie eine extrazelluläre Flüssigkeit zusammengesetzt und enthält 5 mM  $\text{K}^+$  und 150 mM  $\text{Na}^+$ . Die EL ist charakterisiert durch eine hohe Kalium ( $\text{K}^+$ )-Konzentration (ca. 150 mM) und eine niedrige Natrium ( $\text{Na}^+$ )-Konzentration (ca. 5 mM). Diese Ionen-Zusammensetzung ist die Grundlage für das positive endocochleäre Potenzial (ca. 80 mV). Dies ist ein wichtiger Faktor für den Eintritt von  $\text{K}^+$  in die Haarzelle und die sensorische Transduktion. Der Eintritt von  $\text{K}^+$  in die Haarzelle erfolgt über  $\text{K}^+$ -permeable Transduktionskanäle an den Stereozilien der apikalen Haarzellmembran, und der Rücktransport von  $\text{K}^+$  in die PL erfolgt über basolaterale Kanäle (Jentsch, 2000; Wangemann, 2002). Die  $\text{K}^+$ -bedingte Depolarisation führt zur Öffnung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. Dadurch werden Neurotransmitter am basalen Pol der Haarzelle ausgeschüttet (Geisler, 1998). Die pathologische Erhöhung der  $\text{K}^+$ -Konzentration soll bei der Entstehung des Morbus Menière eine Rolle spielen. Eine hohe extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration kann toxisch auf die Haarzellen wirken (Dulon et al., 1988).

$\text{Ca}^{2+}$  spielt eine bedeutende Rolle bei verschiedenen Funktionen der neuro-sensorischen Zellen der Cochlea, z. B. bei der Neurotransmitter-Ausschüttung und der Haarzellmotilität (Geisler, 1998; Kennedy et al., 2003). Eine pathologisch erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann über Apoptose und Nekrose zum Zelltod führen (Orrenius et al., 2003). Daher kommt der Aufrechterhaltung einer normalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine große Bedeutung zu. Über zwei Hauptmechanismen wird die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufrechterhalten: 1. Aufnahme des  $\text{Ca}^{2+}$  in intrazelluläre Speicher im endoplasmatischen Retikulum über die „smooth endoplasmatic reticulum calcium“-ATPase (SERCA) und 2. Auswärtstransport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle über die „plasma membran calcium“-ATPase (PMCA). Die Energie für diese Wege liefert der  $\text{Na}^+$ -Gradient. Mehrere Studien zeigten, dass die PMCA an den Stereozilien der

Säugetier-Cochlea nachweisbar ist. Die PMCA ist in beiden Haarzelltypen an den apikalen Bereichen der Stereozilien und an der Membran unterhalb der Kutikularplatte besonders dicht lokalisiert (Dumont et al., 2001).

Haarzellen sind die empfindlichsten Strukturen des Cortischen Organs. Wenn Sie geschädigt sind, können sie absterben und werden beim Menschen dann nicht mehr neu gebildet. Daher kommt dem Schutz der Haarzellen gegenüber Hypoxie/Ischämie eine große klinische Bedeutung zu. Zielstellung dieser Arbeit ist, 1. den Mechanismus der Haarzellschädigung durch Hypoxie/Ischämie besser zu verstehen und 2. neue Protektionsmöglichkeiten auszutesten. Dazu wurden der Einfluss der  $K^+$ -Konzentration auf die Haarzell-Vulnerabilität unter Hypoxie/Ischämie und die beiden Hauptmechanismen (SERCA oder PMCA), die eine kritische Rolle für das Überleben von Haarzellen unter Ischämie spielten, untersucht. Hierzu wurden die Effekte von Thapsigargin und Cyclopiazonsäure („cyclopiazonic acid“, CPA) als Inhibitoren der SERCA sowie Eosin und Orthovanadat (o-Vanadat) als Inhibitoren der PMCA getestet. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Wirkung von „recombinant human erythropoetin“ (rhEPO) im Vergleich zu „recombinant human insulin-like growth factor-1“ (rhIGF-1) und „recombinant human epithelial growth factor“ (rhEGF) auf die Ischämievulnerabilität der Haarzellen. Auf Anregung unseres Moskauer Kooperationspartners untersuchten wir ferner den Einfluss des Edelgases Argon auf die Hypoxie induzierte Haarzellschädigung in der organotypischen Kultur der Cochlea. Die Anregung zu diesen Untersuchungen ergab sich daraus, dass Kosmonauten häufig an Lärmschwerhörigkeit leiden.

## **Material und Methodik**

### *Präparation des Cortischen Organs*

Die Cochlea wurde aus neonatalen Wistarratten (3.-5. postnataler Tag) in Anlehnung an Sobkowicz et al. (1993) und Lowenheim et al. (1999) präpariert. Das Tier wurde mit einer scharfen chirurgischen Schere (Fine Science Tool) auf einer sterilen Kompresse durch einen Schnitt dekapitiert. Ein grosser Teil des Blutes des Kopfes wurde durch Abtupfen entfernt. Dann folgte die Oberflächendesinfektion des Kopfes mit 70 %igem Alkohol. Das Felsenbein wurde präpariert und in eine Petrischale (Nunc, 60 mm) mit gekühlter Puffer-Lösung („buffered saline glucose“, BSG) überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter aseptischen Bedingungen in einer Arbeitsbank unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Jena) mit Feinpräparationsinstrumenten (Fine Science Tools). Die cochleäre Kapsel wurde zunächst entfernt und dann die häutige Cochlea in eine neue Petrischale (Nunc, 35 mm) mit BSG überführt. Dann wurden die Stria

vascularis und der Modiolus entfernt. Das Cortische Organ wurde entsprechend den Windungen in die Segmente apikal, medial und basal unterteilt.

### *Kultivierung*

Die Kultivierung erfolgte in 4-well-Platten (Nunc) in einem modifizierten Medium nach Lowenheim et al. (1999). Das Medium enthielt: Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 nutrient mixtures (DMEM/F12, Gibco, Karlsruhe, Germany, 1:1) mit 10 % fetalem Kalbsserum (FCS, Biochrom AG seromed, Berlin, Germany), 10 mM HEPES (Boehringer, Mannheim, Germany), 20 nM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM L-Glutamin (SERVA, Heidelberg, Germany), 50 U/ml Penicillin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 25 g/ml Insulin (Sigma), 100 µg/ml Transferrin (SERVA), 60 µg/ml Putrescin (SERVA) und 0,6 % Glukose. Für spezifische Fragestellungen wurde die Mediumzusammensetzung modifiziert. Die Kultivierung der Segmente erfolgte in 500 µl komplettem Medium in einem mit 5 % CO<sub>2</sub> begasten Inkubator (Revco Scientific, Inc. Asheville, NC, USA) bei 37°C (Standardbedingungen).

### *Hypoxie/Ischämie*

Bei diesen Experimenten wurden eine Cochlea des Tieres der normoxischen Kontrollgruppe und die andere der Hypoxie/Ischämie-Gruppe zugeordnet. In der Regel erfolgte die Hypoxieexposition in artifizieller Perilymphe (in mM: 125 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 1,99 EGTA, 20 HEPES, 24 NaHCO<sub>3</sub> und 10 Glukose) (Wanaverbecq et al. 2003; R.P.Bobbin 2003). Ischämie wurde erzeugt, indem die Cochleakultur in artifizieller PL ohne Glukose in einem Gasgemisch (5 % CO<sub>2</sub> und 95 % N<sub>2</sub>, 15 min, AGA Gas GmbH, Bottrop, Germany) in einer Billups-Rothenberg-Kammer (Billups, Rothenberg, Germany) inkubiert wurde. Dadurch hat man im Kulturmedium eine Hypoxie von 10-20 mm Hg (Gao et al. 1999). Für die Erzeugung einer Ischämie wurde das komplette Medium durch eine reine Elektrolytlösung ohne Glukose oder andere Zusätze ersetzt und die Hypoxie eingeleitet. Die Kontrollen wurden in artifizieller PL mit Glukosezusatz unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Nach Hypoxie/Ischämie-Ende werden die cochleären Segmente für 24 h im Medium inkubiert.

### *Bestimmung des Haarzellschadens*

Zur Fixierung wurde das Medium entfernt, das Segment einmal mit BSG gewaschen und mit 0,5 ml 4 %igem Paraformaldehyd 30 min inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde zur Permeabilisierung Triton (0,2 % in PBS) für 30 min appliziert und noch einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden ein Plastikring (5 mm) um das Segment platziert und 10 µl

Phalloidin (0,1 µg = 1 µM, Phalloidin-TRITC, Sigma, St. Louis, MO, USA) in den Ring gegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation im Dunkeln wurde das Segment mit PBS gewaschen und darin bis zur Zählung aufbewahrt. Phalloidin bindet sich an filamentäres Aktin (F-Aktin) und markiert die actinreichen Stereozilien und die Cuticularplatte der Haarzellen. Die Beurteilung und die Zählung der Haarzellen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop (Leica DMIL, Microsystem Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany, 400fache Vergrößerung).

#### *K<sup>+</sup>-Konzentration, PMCA- und SERCA-Blocker*

Es wurden folgende K<sup>+</sup>-Konzentrationen eingesetzt: 5,0; 30,0; 50,0; 70,0 mM in Normoxie und Ischämie. Die Lösungen wurden so hergestellt, dass Na<sup>+</sup> durch K<sup>+</sup> ersetzt wurde. Die PMCA-Blocker hatten folgende Konzentrationen in Normoxie und Ischämie: 1,5; 5,0; 10,0 µM Eosin (Sigma) sowie 1,0 und 5,0 mM o-Vanadate (Sigma). Die SERCA-Blocker wurde in folgenden Konzentrationen in Normoxie und Ischämie getestet: 10,0; 100 nM und 1,0; 10,0 µM Thapsigargin (Sigma) sowie 10,0 und 50,0 µM CPA (Sigma). Die Cochlea-Kulturen wurden einer Ischämie von 3 bzw. 4 h ausgesetzt.

#### *Wachstumsfaktoren*

Als Medium diente das neurobasale Medium mit N1 Supplement (Gibco) und 100 U/ml Penicillin (Sigma). Es wurden drei Gruppen von Kulturen untersucht: Kontrolle, Ischämie und Ischämie mit Wachstumsfaktoren. Die Dauer der Ischämie betrug 3,5 h. Dem Medium wurde der Wachstumsfaktor rhEpo (5,2 ng/ml = 0,3 nM, Roche, Basel, Schweiz) vor Beginn der Ischämie zugesetzt. Zum Vergleich wurden die Wachstumsfaktoren rhIGF-1 (100 ng/ml = 15 nM, R&D) und rhEGF (200 ng/ml = 30 nM, R&D) getestet.

#### *Argon*

Zur Untersuchung des Einflusses von Argon (AGA Gas GmbH, Bottrop, Germany) auf den hypoxischen Haarzellverlust wurden die Kulturen in Argon-Hypoxie (Ar-Hypoxie; 95 % Ar, 5 % CO<sub>2</sub>) und Stickstoff-Hypoxie (N<sub>2</sub>-Hypoxie; 95 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) für 30 h inkubiert.

Die Erlaubnis zur Explantation der Cochleae der Ratten erteilte das Landesamt für Arbeitsschutz, Umweltschutz und technische Sicherheit, Berlin-LAGetSi (T 0234/00).

## Ergebnisse

### *Haarzellverlust durch Ischämie*

Die Kontrollen zu den verschiedenen experimentellen Bedingungen (Normoxie, 5 mM  $K^+$ ) zeigten eine normale Architektur des Cortischen Organs mit einer Reihe innerer Haarzellen (IHZ) und drei Reihen äußerer Haarzellen (ÄHZ). In unseren Untersuchungen zum Einfluss von PMCA- und SERCA-Blockern betrug die Anzahl der IHZ und ÄHZ  $9,5 \pm 0,1$  bzw.  $12,2 \pm 0,1/100\mu\text{m}$  pro Reihe (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler;  $n = 19$ ) (Amarjargal et al., 2007).

Ischämie (5 mM  $K^+$ ) resultierte in einem signifikanten Verlust von IHZ und ÄHZ 24 h nach einer Ischämie von 3 bis 4 h Dauer. Der Verlust betrug im apikalen, medialen und basalen Segment der Cochlea 15-25 % ÄHZ und 35-51 % IHZ, wobei das apikale Segment eine geringere Schädigung aufwies als das basale (Amarjargal et al., 2007). Ähnliche Verhältnisse fanden wir auch in den anderen Studien (Gross et al., 2005; Mazurek et al., 2003; Yarin et al., 2004).

### *Einfluss der $K^+$ -Konzentration auf die Haarzellen*

Unter Normoxie hatte die Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration auf 30, 50 und 70 mM keinen Einfluss auf die Anzahl der IHZ und ÄHZ im Vergleich zu 5 mM  $K^+$  (Mazurek et al., 2006). Unter Ischämie verursachte die Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration auf 30 und 50 mM ebenfalls keine weitere Haarzellschädigung und verringerte sogar den ÄHZ-Verlust im basalen Segment dosisabhängig. Bei 70 mM  $K^+$  konnte eine signifikante Verringerung des Verlustes an IHZ und ÄHZ im medialen und basalen Bereich der Cochlea nachgewiesen werden.

### *Einfluss von Blockern des $Ca^{2+}$ -Transportes auf die Haarzellen*

Die SERCA-Blocker Thapsigargin und CPA zeigten bei den verwendeten Konzentrationen weder unter normoxischen noch unter ischämischen Bedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Haarzellen (Amarjargal et al., 2007).

Die PMCA-Blocker Eosin und o-Vanadat hatten unterschiedliche Effekte auf die Haarzellen unter Normoxie. Eosin schädigte die Haarzellen dosisabhängig, während o-Vanadat keinen Einfluss hatte. Unter Ischämie verstärkten Eosin und o-Vanadat den Ischämie induzierten Haarzellverlust im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung. Eine Eosinkonzentration von 1,5  $\mu\text{M}$  hatte keinen signifikanten Effekt, während 5  $\mu\text{M}$  Eosin den IHZ-Schaden um 60 % deutlich erhöhte. Der ÄHZ-Verlust blieb dabei unverändert. Bei einer Eosinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$

wurde der Verlust der IHZ um 80 % und der von ÄHZ um 50 % erhöht. o-Vanadat verursachte bei der höheren Konzentration von 5 mM ebenfalls eine Erhöhung des Haarzellschadens um 45-50 %.

#### *Einfluss von rhEPO auf die Ischämievulnerabilität der Haarzellen*

In diesem Versuch wurde der Effekt von rhEPO im Vergleich zu rhIGF-1 und rhEGF beurteilt. rhIGF und rhEpo zeigten einen signifikant protektiven Effekt auf den Haarzellverlust bei Ischämie, während rhEGF keine Wirkung hatte (Hu et al., 1998).

#### *Wirkung von Argon auf die Hypoxievulnerabilität von Haarzellen*

Die Wirkung von Argon auf die Haarzellen wurde unter hypoxischen Bedingungen (Ar-Hypoxie; 95 % Ar, 5 % CO<sub>2</sub>) im Vergleich zur Hypoxie ohne Argon (N<sub>2</sub>-Hypoxie; 95 %N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) und zur Normoxie (Kontrolle) untersucht. Bei N<sub>2</sub>-Hypoxie betrug der Verlust der ÄHZ 35-85 %. Ar-Hypoxie verringerte den Verlust von ÄHZ um 28 % im Vergleich zur N<sub>2</sub>-Hypoxie. Der Verlust der IHZ betrug gegenüber den Kontrollen 48 % in N<sub>2</sub>-Hypoxie und verringerte sich bei Ar-Hypoxie signifikant um 24 % (Yarin et al., 2004).

## **Diskussion**

#### *In-vitro-Modell des Cortischen Organs*

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die organotypische Kultur des Cortischen Organs gut für die Untersuchung der Einflussfaktoren auf die Vitalität der Haarzellen geeignet ist. Die Kultur ist gut reproduzierbar und bietet die Möglichkeit, die gewünschten Bedingungen einfach und schnell herzustellen (Amarjargal et al., 2007; Andreeva et al., 2006; Gross et al., 2005; Mazurek et al., 2003; Mazurek et al., 2006). Allerdings muss beachtet werden, dass die organotypische Kultur von neugeborenen Ratten stammt. Die Gewebe von neugeborenen und erwachsenen Tieren unterscheiden sich deutlich in der Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie/Ischämie. Daher ist eine Übertragung der Resultate auf den adulten Organismus bzw. den Menschen nicht oder nur begrenzt möglich.

#### *Einfluss der K<sup>+</sup>-Konzentration auf die Haarzellen in Normoxie und Ischämie*

In der Literatur wird der K<sup>+</sup>-Toxizität im Innenohr eine hohe Bedeutung beigemessen (Zenner 1986). Sie soll besonders bei der Entstehung des Morbus Menière wirksam sein (Semaan et al.,

2005). Das Einreißen der Reissnerschen Membran führt zu einer Vermischung von EL und PL, in deren Folge die  $K^+$ -Konzentration in der PL erhöht wird, was zum Haarzelluntergang führen soll.

Überraschenderweise fanden wir, dass eine Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration auf 70 mM *in vitro* eher protektiv als schädigend auf die cochleären Haarzellen bei Ischämie wirkt. Warum eine hohe  $K^+$ -Konzentration protektiv wirkt, ist nicht bekannt. Es ist gut möglich, dass eine hohe  $K^+$ -Konzentration den  $Na^+$ - und  $K^+$ -Influx hemmt und zu einer Hyperpolarisation führt (Nieber 1999). Es könnte auch zu einem Abfall der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration über eine verstärkte Aktivität des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers kommen (Breder et al., 2000).

#### *Einfluss des $Ca^{2+}$ -Transportes auf den Ischämie bedingten Haarzellverlust*

Der bedeutendste Befund der vorliegenden Untersuchungen ist, dass der PMCA-Blocker Eosin eine dosisabhängige schädigende Wirkung auf die Haarzellen unter Normoxie hat und den Ischämie induzierten Haarzellverlust verstärkt. Im Gegensatz dazu zeigen die SERCA-Blocker Thapsigargin und CPA weder unter Normoxie noch unter Ischämie eine Wirkung auf das Überleben der Haarzellen. Diese Daten zeigen, dass die PMCA ein Schlüsselenzym für das Überleben der Haarzellen unter Ischämie ist.

Die Beteiligung der PMCA am ischämischen Zellschaden wurde auch von Lehotsky et al. (1999) gezeigt. Vorübergehende Ischämie (10 min) mit anschließender Reperfusion verursachte ein vermindertes PMCA-Immunsignal.

Die SERCA scheint eine Rolle bei der lokalen  $Ca^{2+}$ -Veränderung zu haben, wahrscheinlich hat sie nur einen geringen oder gar keinem Einfluss auf die totale zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Konzentration.

Die verstärkende Wirkung der PMCA-Blocker Eosin und o-Vanadat auf den Haarzelltod unterstützt die Vermutung, dass die PMCA ein Schlüsselenzym für die Ausschleusung von erhöhtem intrazellulären  $Ca^{2+}$  aus den Haarzellen ist (Yamoah et al., 1998). In Neuronen der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PMCA mit einer Zunahme der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration verbunden ist (Wanaverbecq et al., 2003). Die durch Eosin verursachte Zunahme des intrazellulären  $Ca^{2+}$  ist sogar in normoxischen Kulturen höchstwahrscheinlich der Grund für den Haarzellverlust. Im Gegensatz dazu hat o-Vanadat keine Wirkung auf das Haarzellüberleben unter normoxischen Bedingungen. Dieser Unterschied kann mit bestimmten Wirkungen von o-Vanadat, zusätzlich zur PMCA-Hemmung, verbunden sein. Zum Beispiel ist  $Na^+$ -o-Vanadat ein Eiweiß-Tyrosin-Phosphatase-Hemmstoff und blockiert den

verzögerten neuronalen Tod in der CA1-Region nach ischämischem Insult (Fukunaga und Kawano, 2003). Unsere Daten zeigen, dass der Ischämie induzierte Haarzellverlust durch PMCA-Blocker in einer additiven oder synergistischen Weise verstärkt wird. Dies führte uns zu dem Schluss, dass die Wirkung von PMCA-Blockern und Ischämie auf die Haarzellen auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden kann.

#### *Protektive Wirkung von rhEPO*

RhEPO wird seit längerer Zeit klinisch angewendet und gut toleriert. Die Wirkung von Erythropoetin im neuronalen System regte uns an, den Einfluss von rhEPO in unserem Modell zu untersuchen (Brines und Cerami, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte eine protektive Wirkung von rhEPO auf die Haarzellen unter ischämischen Bedingungen nachgewiesen werden (Andreeva et al., 2006). Bisher sind neuroprotektive Effekte durch rhEPO sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Gehirn und in der Retina nachgewiesen worden (Jelkmann, 2004). rhEPO schützt die neurosensorischen Zellen wahrscheinlich über verschiedene Mechanismen: 1. Bindung von rhEPO an den Erythropoetin-Rezeptor führt zu einer Aktivierung verschiedener Protein-Kinasen wie z. B. Phosphoinosid-3-Kinase und Akt-Proteinkinase; 2. Bindung von rhEPO an den Erythropoetin-Rezeptor und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB; 3. rhEpo verringert selektiv die Zytokin-Produktion (Villa et al., 2003). Inzwischen wurde der Erythropoetin-Rezeptor immunhistochemisch in der Cochlea nachgewiesen (Caye-Thomasen et al., 2005).

#### *Protektive Wirkung von Argon*

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Edelgas Argon eine deutliche protektive Wirkung auf den Hypoxie induzierten Verlust von Haarzellen in der organotypischen Kultur hat (Yarin et al., 2004). Diese Protektion ist vermutlich auf den Einfluss von Argon auf die  $Ca^{2+}$ -Homeostase oder auf die Hemmung von Radikal bildenden Prozessen zurückzuführen.

#### *Bedeutung der Untersuchungen*

Mit dieser Arbeit wurde erstmals die organotypische Kultur des Cortischen Organs zur Quantifizierung des Haarzellschadens unter hypoxischen und ischämischen Bedingungen angewandt. Unsere Ergebnisse stimmen in wesentlichen Aussagen (z. B. Vulnerabilität von IHZ und ÄHZ, apikal-basaler Gradient) gut mit *in vivo* Untersuchungen überein. Damit wurde der Nachweis erbracht, dass die organotypische Kultur der neugeborenen Ratte gut für die

Untersuchung von protektiven Einflussfaktoren (u. a. Medikamente) eingesetzt werden kann. Zugleich bietet sie die Möglichkeit, theoretische Überlegungen zum Schädigungsmechanismus von Haarzellen zu prüfen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind wichtig für das Verständnis der Mechanismen, die zu einer Hypoxie- bzw. Ischämieschädigung von Haarzellen des Cortischen Organs führen. Von großer Bedeutung für den Haarzellverlust scheint die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu sein. Verfahren zur Aktivierung der PMCA könnten hilfreich in der Prävention oder Therapie von Erkrankungen des Innenohres sein. Die extrazelluläre  $\text{K}^{+}$ -Konzentration scheint hingegen weniger gefährlich für Haarzellen zu sein.

Die Daten zeigen, dass rhEPO, das seit vielen Jahren in der Klinik zur Behandlung von Anämien eingesetzt wird, nicht nur ein Wachstumsfaktor für rote Blutzellen ist, sondern auch auf Haarzellen schützend wirkt. Es sollte geprüft werden, ob klinische Studien zur Wirkung am Innenohr sinnvoll sind.

Die Aufdeckung der protektiven Wirkung von Argon kann weit reichende Bedeutung in der Zukunft haben. Für einige Einsatzgebiete könnte es Xenon ersetzen, da es wesentlich billiger ist.