

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Identifizierung und Charakterisierung von Immunzellen
des Innenohres

Identification and characterization of inner ear immune cells

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tatyana Dudnik
aus Taschkent

Datum der Promotion: 03.03.2023

Vorwort

Die vorliegende Dissertation ist aus einem allgemein im Studium der Medizin entwickelten Interesse an der Komplexität des menschlichen Immunsystems und einer gezielten Suche nach einem immunologischen Forschungsprojekt heraus entstanden. Es ergab sich die Gelegenheit einer erfolgreichen Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor der HNO-Klinik der Charité.

Erste Teilergebnisse habe ich bereits auf dem ADANO-Kongress 2016 in Berlin in einem wissenschaftlichen Vortrag mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung von Immunzellen des Innenohres“ präsentiert.

Endgültige Ergebnisse meiner Forschungsarbeit sind sowohl im wissenschaftlichen Journal Brain Sciences, MDPI 2020 als auch während des Meetings Experimental Biology 2022 im Pennsylvania Convention Center in Philadelphia veröffentlicht worden:

Agnieszka J. Szczepek, Tatyana Dudnik, Betül Karayay, Valentina Sergeeva, Heidi Olze und Alina Smorodchenko, Titel: Mast Cells in the Auditory Periphery of Rodents, Brain Sciences, MDPI, 2020 Oct 1;10(10):697, doi: 10.3390/brainsci10100697.

Alina Smorodchenko, Tatyana Dudnik, Betül Karayay, Valentina Sergeeva, Heidi Olze, Agnieszka J. Szczepek, Titel: Morphological characterization of mast cells in the cochlea during postnatal rodent development, Experimental Biology 2022, Pennsylvania Convention Center in Philadelphia, Pennsylvania, USA – Abstract Confirmation of Poster Presentation – Anatomy April 2 - 5, 2022.

Tatyana Dudnik

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungs- und Diagrammverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	13
Abkürzungsverzeichnis	15
Zusammenfassung	17
Abstract	18
1. Einleitung	19
1.1. Anatomie und Physiologie des Innenohres	19
1.1.1. Anatomie des Innenohrs	19
1.1.2. Cochlea und Corti-Organ	20
1.1.3. Innervation und Vaskularisation des Innenohres	22
1.1.4. Postnatale Entwicklungsprozesse in der Cochlea von Wistar-Ratten	23
1.2. Immunsystem	24
1.2.1. Angeborenes und erworbenes Immunsystem	24
1.2.2. Phänotypische Charakterisierung der Immunzellen.....	27
1.2.3. Mastzellen.....	30
1.2.4. Immunologische Prozesse im Innenohr.....	32
1.3. Cisplatin-induzierte Ototoxizität	33
1.4. Fragestellung und Hypothesen	34
2. Methoden	35
2.1. Versuchstiere für die Untersuchungen	35
2.2. Laborgeräte	35
2.3. Verbrauchsmaterialien	36
2.4. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	37
2.5. Antikörper	39

2.5.1.	Primär- und Sekundärantikörper	39
2.6.	Software und Internet	40
2.7.	Präparation der Cochleae der Wistar-Ratten.....	40
2.7.1.	Organotypische Kultur des Corti-Organ.....	40
2.7.2.	Zellkulturmedium.....	42
2.7.3.	Herstellung von Gefrierschnitten/ Kryoschnitten	42
2.8.	Cisplatin-Behandlung der Cochlea-Explantate	43
2.9.	Immunfluoreszenz und Zellzahlbestimmung	43
2.9.1.	Immunfluoreszenzfärbung.....	43
2.9.2.	Darstellung der Haarzellen mittels Phalloidin-Färbung	45
2.9.3.	Zellzahlbestimmung in organotypischen Kulturen.....	45
2.10.	Histologischer Nachweis von Mastzellen.....	47
2.11.	Western Blot	48
2.11.1.	Proteinisolierung	48
2.11.2.	Proteinbestimmung	49
2.11.3.	SDS-Page, Blotting und Immundetektion	49
2.12.	Statistische Auswertung der erhobenen Daten	51
3.	Ergebnisse.....	52
3.1.	Nachweis der CD45-positiven Immunzellen in der Cochlea.....	52
3.1.1.	Charakterisierung der CD45+ Zellen unter physiologischen Bedingungen	52
3.2.	Nachweis der CD11b-positiven Immunzellen in der Cochlea.....	59
3.2.1.	Charakterisierung der CD11b+ Zellen unter physiologischen Bedingungen	59
3.3.	Nachweis der CD68-positiven Immunzellen in der Cochlea.....	65
3.3.1.	Charakterisierung der CD68-positiven Zellen unter physiologischen Bedingungen.....	65
3.3.2.	Proteinexpression von CD68+ Zellen unter physiologischen Bedingungen	72
3.4.	Nachweis Avidin+ CD117/c-Kit+ Immunzellen in der Cochlea	73
3.4.1.	Charakterisierung der Avidin+ CD117/c-Kit+ unter physiologischen Bedingungen.....	73

3.4.2.	Nachweis der CD117/c-Kit+ Proteinmenge mittels Western Blot	78
3.5.	Wirkung des Cisplatin auf Immunzellen in der Cochlea	79
3.5.1.	Wirkungen verschiedener Konzentrationen von Cisplatin auf Mastzellen	79
3.5.2.	Wirkungen des Cisplatins auf CD45-positive Zellen	81
3.5.3.	Wirkungen des Cisplatins auf CD11b-positiven Zellen	83
3.5.4.	Wirkungen des Cisplatins auf CD68-positiven Zellen	85
3.5.5.	Wirkungen des Cisplatins auf die Haarzellen der Cochlea	87
4.	Diskussion	90
4.1.	Beantwortung der Forschungsfragen	90
4.2.	Interpretation der Ergebnisse und Literaturvergleich	92
4.3.	Limitationen der vorliegenden Arbeit	102
5.	Schlussfolgerung	103
	Literaturverzeichnis	105
	Eidesstattliche Erklärung	117
	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	118
	Curriculum Vitae	120
	Danksagung	122
	Bescheinigung des akkreditierten Statistikers	124

Abbildungs- und Diagrammverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines menschlichen Ohres, Querschnitt: Felsenbein, Quelle: eigene Darstellung.....	20
Abb. 2: Cochlea der Wistar-Ratte, postnataler Entwicklungstag 5 (pT5); a: nach der Präparation aus der knöchernen Kapsel, ohne Stria vascularis, Maßstab: 500 µm, b: Millicell EZ Pore 4-Well-Slide auf einem Objektträger (25 x 75 mm), Cochlea nach Auftrennung in ein apikales, mediales und basales Explantat; Quelle: eigene Darstellung.....	41
Abb. 3: Schematische Darstellung der Mastzellen, Degranulationsstadien der organotypischen Cochlea-Kulturen (Limbus, Modiolus); grün: Heparin granula; blau: Zellkern; a: intakt: ganze Zelle, mit sichtbarer Zellmembran; b: degranuliert: leichte Degranulation der Heparin-Granula aus der Mastzelle; c: diffus: Granula verstreut, ohne Zellmembrankontur; Quelle: eigene Darstellung.....	46
Abb. 4: Schematische Darstellung des Corti-Organ in organotypischer Cochlea- Kultur einer Wistar-Ratte – pT 5, mediales Explantat, nach Immunfluoreszenzfärbung und 24 Stunden Ruhezeit postpräparativ. a: Darstellung der Zonen I-IV. Zone I: marginal mit herausgewachsenen Claudius und Hensen`s Zellen (blau: ZK); Zone II: drei Reihen von ÄHZ, eine Reihe von IHZ (rot markiert); Zone III: Limbus spiralis mit Neurofilamenten (grün markiert); Zone IV: Modiolus mit Spiralganglionzellen, Neurofilamenten, b: Darstellung der Ebenen 1-5. 1. Stratum superficiale 1 (Seite Scala vestibuli), 2.-4. Stratum profundum 1-3, 5. Stratum superficiale 2 mit Vas spirale (Seite Scala tympani); Quelle: eigene Darstellung.....	48
Abb. 5: Western Blot-Verfahren, Elektrophoresekammer: elektrophoretische Auftrennung der Proteine der membranösen Cochlea; Quelle: eigene Darstellung.	50
Abb. 6: Schematische Darstellung der Verteilung CD45-positiver Zellen in den Zonen I (herausgewachsene Stützzellen), II (innere und äußere Haarzellen), III (Limbus spirale) und IV (Modiolus) in der OC von Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat (organotypische Kultur). Quelle: eigene Darstellung.....	53
Abb. 7: CD45-positive Zellen, OC der Wistar-Ratten – pT1, pT3, pT5, pT7, pT9, pT30, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, IF- Färbungen – rot: CD45-positive Zellen (Alexa Fluor 594), a-f: Übersicht über Zone I- IV, Maßstab:400 µm, g-l: Stratum superficiale I, Maßstab:100 µm; m-r: Stratum profundum 1-3, Maßstab: 100 µm; Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=6, Kontrolle n=2; pT3 n=6, Kontrolle n=2; pT5 n=6, Kontrolle n=2; pT7 n=6, Kontrolle n=2; pT9 n=6, Kontrolle n=2; pT30 n=4, Kontrolle n=2.....	55

- Abb. 8: Anzahl der CD45-positiven Zellen membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich, Box-Whisker-Plots – a: Cochlea gesamt, b: apikales Explantat, c: mediales Explantat, d: basales Explantat; Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=6, pT3 n=6, pT5 n=6, pT7 n=6, pT9 n=6. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (*p<0,05,**p<0,01 statistisch signifikanter Unterschied). 57
- Abb. 9: Schematischer Querschnitt durch Anteile der Cochlea. Verteilung CD45-positiver Zellen, Wistar-Ratten (pT1); a: Querschnitt durch gesamte Cochlea (Vergrößerung x25), b: Querschnitt durch Einzelwindung der Cochlea, Hörgan (Vergrößerung x150); SV: Scala vestibuli, SM: Scala media (Ductus cochlearis), ST: Scala tympani, LI: Ligamentum spirale, MOD: Modiolus, LO: Lamina spiralis ossea, LS: Limbus spiralis, OC: Organ Corti, TM: Tektorialmembran, BM: Basilmembran mit Vas spirale, RM: Reissner'sche Membran, StV: Stria vascularis, GS: Ganglion spirale; Quellen: eigene Darstellung..... 58
- Abb. 10: CD45-positive Zellen im Vas spirale (weiße Pfeile), OC der Wistar-Ratte – pT3, basales Explantat, Färbungen – a: rot: CD45-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung, b: rot: F-Aktin Phalloidin-Färbung von IHZ/ÄHZ (Alexa Fluor 594) grün: CD45-positive Zellen (Alex Fluor 488); Maßstäbe: a: 200 µm, b: 100 µm. 59
- Abb. 11: Schematische Darstellung der Verteilung CD11b-positiver Zellen in den Zonen I (herausgewachsene Stützzellen), II (innere und äußere Haarzellen), III (Limbus spirale) und IV (Modiolus) in der OC von Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat (organotypische Kultur); Quelle: eigene Darstellung..... 59
- Abb. 12: CD11b-positive Zellen, OC der Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, IF-Färbung – rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), a-e: Übersicht über Zone I-IV, Maßstab:400 µm, f-j: Stratum superficiale I, Maßstab:100 µm, k-o: Stratum profundum 1-3, Maßstab:100 µm; Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=6, Kontrolle n=2; pT3 n=6, Kontrolle n=2; pT5 n=6, Kontrolle n=2; pT7 n=6, Kontrolle n=2; pT9 n=6, Kontrolle n=2. 60
- Abb. 13: Anzahl CD11b-positiver Zellen des apikalen, medialen, basalen Explantats membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich; Box-Whisker-Plots – a: Cochlea gesamt, b: apikales Explantat, c: mediales Explantat, d: basales Explantat, Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=6, pT3 n=6, pT5 n=6, pT7 n=6, pT9 n=6. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (**p<0,01, statistisch signifikanter Unterschied)..... 63

Abb. 14: Schematischer Querschnitt durch Anteile der Cochlea, Verteilung CD11b-positiver Zellen, Wistar-Ratten – pT1, a: Querschnitt durch gesamte Cochlea (Vergrößerung x25), b: Querschnitt durch Einzelwindung der Cochlea, Hörgan (Vergrößerung x150); SV: Scala vestibuli, SM: Scala media (Ductus cochlearis), ST: Scala tympani, LI: Ligamentum spirale, MOD: Modiolus, LO: Lamina spiralis ossea, LS: Limbus spiralis, OC: Organ Corti, TM: Tektorialmembran, BM: Basilarmembran mit Vas spirale, RM: Reissner'sche Membran, StV: Stria vascularis, GS: Ganglion spirale; Quellen: eigene Darstellung..... 64

Abb. 15: CD11b-positive Zellen im Vas spirale (weiße Pfeile), OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat, Färbungen – a-b: rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung; Maßstäbe: a: 200 µm, b: 100 µm.... 65

Abb. 16: Präsenz der CD11b-positiven Zellen in der Region mit der experimentell hervorgerufenen mechanischen Schädigung des Limbusgewebe (*) innerhalb des OC-Explantats, Wistar-Ratte – pT3, mediales Explantat, Färbungen – a: rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung, b: DIC und rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), Maßstab: 100 µm. 65

Abb. 17: Schematische Darstellung der Verteilung CD68-positiver Immunzellen in den Zonen I (herausgewachsene Stützzellen), II (innere und äußere Haarzellen), III (Limbus spirale) und IV (Modiolus) in der OC von Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat (organotypische Kultur). Quelle: eigene Darstellung..... 66

Abb. 18: CD68-positive Zellen, OC der Wistar-Ratten – pT1, pT3, pT5, pT7, pT9, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, IF-Färbung, rot: CD68-positive Zellen (Alexa Fluor 594), a-e: Übersicht über Zone I-IV, Maßstab:400 µm, f-j: Stratum superficiale I, Maßstab: 100 µm, k-o: Stratum profundum 1-3, 100 µm; Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=6, Kontrolle n=2; pT3 n=6, Kontrolle n=2; pT5 n=6, Kontrolle n=2; pT7 n=6, Kontrolle n=2; pT9 n=6, Kontrolle n=2. 67

Abb. 19: Anzahl CD68-positiver Zellen membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich, Box-Whisker-Plots – a: Cochlea gesamt, b: apikales Explantat, c: mediales Explantat, d: basales Explantat, Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=6, pT3 n=6, pT5 n=6, pT7 n=6, pT9 n=6. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (*p<0,05,**p<0,01 statistisch signifikanter Unterschied). 69

Abb. 20: Schematischer Querschnitt durch Anteile der Cochlea. Verteilung der CD68-positiven Zellen, Wistar-Ratten – pT1; a: Querschnitt durch gesamte Cochlea (Vergrößerung x25), b: Querschnitt durch Einzelwindung der Cochlea, Hörgan (Vergrößerung x150); SM: Scala media (Ductus cochlearis), ST: Scala tympani, SV:

Scala vestibuli, LI: Ligamentum spirale, MOD: Modiolus, LO: Lamina spiralis ossea, LS: Limbus spiralis, OC: Organ Corti, TM: Tektorialmembran, BM: Basilmembran mit Vas spirale, RM: Reissner'sche Membran, StV: Stria vascularis, GS: Ganglion spirale; Quellen: eigene Darstellung..... 71

Abb. 21: CD68-positive Zellen im Vas spirale (b: weiße Pfeil), OC der Wistar-Ratte – pT1, basales Explantat, IF-Färbung – grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung (Alexa Fluor 488), rot: CD68-positive Zellen (Alexa Fluor 594); Maßstäbe: a: 200 μm , b: 100 μm 71

Abb. 22: Präsenz der CD68-positiven Zellen innerhalb des OC-Explantats in der Region mit einer experimentell hervorgerufene mechanische Schädigung des Limbusgewebe (*), OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat, a: IF-Färbungen – grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung (Alexa Fluor 488), rot: CD68-positive Immnzellen (Alexa 594), b: DIC und rot: CD68-positive Zellen (Alexa 594); Maßstab a+b: 400 μm 72

Abb. 23: Nachweis der CD68 Proteinmenge mit CD68 Antikörper in OC und Milz der Wistar-Ratten – pT3, pT5, pT7, pT9 im Vergleich zu pT1 (alle n=16); a: Exemplarischer Western-Blot mit OC-Zelllysate von pT1, 3, 5, 7 und 9; Detektion mittels CD68 mit 95 kDa (oben), β -Aktin mit 42 kDa (unten). Die 1 und 2 stehen für das linke und rechte Ohr einer Wistar Ratte b: Exemplarischer Western Blot mit Milz-Zelllysate von pT1, 3, 5, 7 und 9; Detektion mittels CD68 mit 95 kDa (oben), β -Aktin mit 42 kDa (unten). Es wurden zwei Proben der gleichen Milz separat aufgearbeitet. c: Box-Whisker-Plots, DID CD68 zu DID β -Aktin, OC; Box: IQR, obere Grenze der Box: 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied). 73

Abb. 24: Avidin-positive Zellen in der OC der Wistar-Ratte – pT1, pT3, pT5, pT7, pT9, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, Färbung – grün: Avidin-positive Zellen (Alexa Fluor 488), a-e: Außenansicht, Maßstab: 400 μm , f-j: Stratum superficiale 1 und Stratum profundum 1, Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=32, pT3 n=32, pT5 n=32, pT7 n=32, pT9 n=32; Maßstab: 100 μm 74

Abb. 25: Gesamtanzahl der Avidin-positiven Zellen in membranösen Cochleae von Wistar-Ratten, abhängig vom postnatalen Alter, Cochlea gesamt, Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=32; pT3 n=32; pT5 n=32; pT7 n=32; pT9 n=32. Box-Whisker-Plots – Box: IQR, obere Grenze der Box: 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied). 75

- Abb. 26: Konfokalmikroskopische Darstellung Avidin-positiver Zellen im Modiolus, Kryoschnitt der Cochlea von Wistar-Ratten – pT3, IF-Färbungen – rot: Phalloidin-färbung von F-Aktin (Alexa Fluor 594), grün: Avidin-positive Zellen (Avidin Alexa Fluor 488), blau: Zellkerne (DAPI); Maßstäbe: a: 400 μm , b-d: 20 μm ; SM: Scala media, SV: Scala vestibuli, ST: Scala tympani..... 76
- Abb. 27: Histologischer Nachweis der Mastzellen in der gesamten Cochlea, Kryoschnitt, Wistar-Ratte – pT3, Färbung: Toluidin blue, a: Vergrößerung x10, b-c: Vergrößerung x100..... 76
- Abb. 28: Konfokalmikroskopie, repräsentative Darstellung der Kolo-kalisation Avidin-positiver Mastzellen und CD45+, CD117/c-Kit+ Zellen aus Wistar-Ratten, a: pT1, mediales Explantat, rot: CD45-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Heparin-granula (Avidin Alexa Fluor 488), b: pT3, basales Explantat, violett: CD117/c-Kit+ (Alexa Fluor 594), grün: Heparin-granula (Avidin Alexa Fluor 488); Maßstab: a: 10 μm , b: 20 μm 77
- Abb. 29: Detektion von CD11b-positiven und Avidin-positiven Zellen in der OC der Wistar-Ratten – pT1, basales Explantat, IF-Färbungen – a: rot: CD11b-positive Immunzellen (Alexa Fluor 594), b: grün: Avidin-positive Mastzellen (Avidin Alexa Fluor 488), c: Overlay von a und b; Maßstab: 100 μm 77
- Abb. 30: Detektion von CD68-positiven und Avidin-positiven Zellen in der OC der Wistar-Ratten – pT3, mediales Explantat, IF-Färbungen – a: rot: CD68-positive Immunzellen (Alexa Fluor 594), b: grün: Avidin-positive Mastzellen (Avidin Alexa Fluor 488), c: Overlay von a und b; Maßstab: 100 μm 77
- Abb. 31: Nachweis der CD117/c-Kit-Proteinmenge mit CD117/c-Kit Antikörper in OC der Wistar-Ratten – pT3, pT5, pT7, pT9 im Vergleich zu pT1 (alle n=16) und Thymus der Wistar-Ratte – pT3; a: Exemplarischer Western Blot mit OC-Zellysate von pT1, 3, 5, 7 und 9; Detektion mittels CD117/c-Kit mit 145 kDa (oben), β -Aktin-Antikörper mit 42 kDa (unten). Die 1 und 2 stehen für das linke und rechte Ohr einer Wistar Ratte, b: Box-Whisker-Plots, DID CD117/c-Kit zu DID β -Aktin, OC; Box: IQR, obere Grenze der Box: 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (*p<0,05, ***p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied). 78
- Abb. 32: Avidin-positive Mastzellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat, IF-Färbungen – rot: F-Aktin-Farbstoff – Phalloidin, Alexa Fluor 594 (IHZ, ÄHZ), grün: Avidin-positive Mastzellen, Heparin-Granula, blau: Zellkerne (DAPI), a/ e/ i: Kontrolle nach 24 h Inkubation im Kulturmedium; e-h: Mastzellen-Granula, i-l: IHZ, ÄHZ; b-d / f-h/ j-l: Cisplatin-Behandlung [10 μM], [20 μM], [40 μM], nach 24 h Inkubation; Die weißen Quadrate markieren die jeweilige

- Stelle an der in das Gewebe hineingezoomt wurde für die Darstellungen in den Spalten e-h bzw. i-l. Maßstab: a-d: 400 µm, e-h: 20 µm, i-l: 100 µm. 79
- Abb. 33: Verteilung der Mastzellen nach Behandlung mit Cisplatin in der gesamten Cochlea, Wistar-Ratten – pT 5, Box-Whisker-Plots. 24 h Kontrolle n=6, [10 µM] Cisplatin n=6, [20 µM] Cisplatin n=6, [40 µM] Cisplatin n=6; 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (*p<0,05, statistisch signifikanter Unterschied). 80
- Abb. 34: CD45-positive Zellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat; Färbung – grün: Alexa Fluor 488, a-c: Kontrolle nach 3, 24 und 48 h Inkubation im Kulturmedium, d-f: Cisplatin-Behandlung [20 µM], nach 3, 24 und 48 h Inkubation, Maßstab: 100 µm. 81
- Abb. 35: Bestimmung der Zellzahl der CD45-positive Zellen nach Behandlung mit Cisplatin [20 µM], OC der Wistar-Ratten – pT5, Cochlea gesamt, Box-Whisker-Plots – a: 3 h Kontrolle n=6, 3 h Cisplatin n=6, 24 h Kontrolle n=6, 24 h Cisplatin n=6, 48 h Kontrolle n=6, 48 h Cisplatin n=6, b: nach 3 h Inkubation, c: nach 24 h Inkubation, d: nach 48 h Inkubation. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (**p<0,01 statistisch signifikanter Unterschied). 82
- Abb. 36: CD11b-positive Zellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat, Färbung – grün: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 488), a-c: Kontrolle nach 3, 24 und 48 h Inkubation im Kulturmedium, d-f: Cisplatin-Behandlung [20 µM], nach 3, 24 und 48 h Inkubation. Maßstab: 100 µm. 83
- Abb. 37: CD11b-positive Zellen, Bestimmung der Zellzahl nach Behandlung mit Cisplatin [20 µM], OC der Wistar-Ratte – pT5, Cochlea gesamt, Box-Whisker-Plots – a: nach 3 h Inkubation; 3h Kontrolle n=6, 3 h Cisplatin n=6, 24 h Kontrolle n=6, 24 h Cisplatin n=6, 48 h Kontrolle n=6, 48 h Cisplatin n=6, b: nach 3 h Inkubation c: nach 24 h Inkubation d: nach 48 h Inkubation. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (**p<0,01 statistisch signifikanter Unterschied). 84
- Abb. 38: CD68-positive Zellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat, Färbung, grün: CD68-positive Immunzellen (Alexa Fluor 488), a: Kontrolle nach 3, 24 und 48 h Inkubation im Kulturmedium, b: Cisplatin-Behandlung [20 µM], nach 3, 24 und 48 h Inkubation; Maßstab: 100 µm. 85
- Abb. 39: CD68-positive Zellen, Bestimmung der Zellzahl nach Behandlung mit Cisplatin [20 µM], OC der Wistar-Ratten – pT5, Box-Whisker-Plots – a: nach 3 h

Inkubation, 3 h Kontrolle n=6, 3 h Cisplatin n=6, 24 h Kontrolle n=6, 24 h Cisplatin n=6, 48 h Kontrolle n=6, 48 h Cisplatin n=6, b: nach 3 h Inkubation, c: nach 24 h Inkubation d: nach 48 h Inkubation 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (**p<0,01,***p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied). 86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewebsmakrophagen – Vorkommen und Funktion.....	26
Tabelle 2: Geräte.....	35
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 4: Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	37
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.....	39
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.....	39
Tabelle 7: Software.....	40
Tabelle 8: Exzitations- und Emissionsmaxima der benutzen Alexa-Fluorochrome...	43
Tabelle 9: CD45-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea, Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9, pT 30 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden)..	56
Tabelle 10: CD45-positive Zellen, Lokalisation in der Cochlea (Kryoschnitte), Wistar-Ratten – n = Zahl: pT1=6, pT3=6, pT5=6, pT7=6, pT9=6, pT30=6 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden). ..	58
Tabelle 11: CD11b-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea von Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden)..	61
Tabelle 12: CD11b-positive Zellen, Lokalisation in der Cochlea (Kryoschnitte), Wistar-Ratten – n = Zahl: pT1=6, pT3=6, pT5=6, pT7=6, pT9=6, pT30=6 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden)..	64
Tabelle 13: CD68-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea, Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden)..	68
Tabelle 14: CD68-positive Zellen, Lokalisation in der Cochlea (Kryoschnitte), Wistar-Ratten – n = Zahl: pT1=6, pT3=6, pT5=6, pT7=6, pT9=6, pT30=6 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden). ..	70

Tabelle 15: Bestimmung der intakten IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat des Corti-Organs nach Behandlung mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen, Inkubationszeit: 24 h, Wistar-Ratten – pT5, doppelte IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten Avidin+ Immunzellen. 88

Tabelle 16: Anzahl der intakten IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5, doppelte IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten CD45+ Immunzellen (Cisplatin-Konzentration: 20 µM). 89

Tabelle 17: Anzahl der intakten IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5. Die Werte wurden nach doppelter IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten CD11b+ Zellen erhoben (Cisplatin-Konzentration: 20 µM). 89

Tabelle 18: Anzahl der IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5. Die Werte wurden nach doppelter IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten CD68+ Zellen erhoben (Cisplatin-Konzentration: 20 µM). 90

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
CD	cluster of differentiation, Unterscheidungsgruppen
Cis	Cisplatin
CO ₂	Kohlendioxid
DAMP	damage-associated molecular pattern, Schaden-assoziiertes molekulares Muster
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	differenzial interference contrast, Differentialinterferenzkontrast
DID	differential integrated density, Bestimmung der Dichte der Banden
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetra-essigsäure
F-Aktin	filamentäres Aktin
IgG	Immunglobulin G, Antikörper
IGF	Insulin-like growth factor, Wachstumsfaktor
IF	Immunfluoreszenz
IMIED	immune-mediated inner ear disease
IQR	Interquartilsabstand
K	Kontrolle, Kontrollprobe
MHC I	major histocompatibility complex class I, Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I
MW	Mittelwert
n. s.	not significant, nicht signifikant
p	Signifikanz
PAMP	pathogen-associated molecular pattern, Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	phosphate buffer saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
pT	postnataler Tag
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung

SEM	Standardfehler der Mittelwerte
THZ	T-Helferzellen
TMEM	transmembrane protein, Transmembranprotein
TLR	Toll-like Rezeptor
TRPV	transient receptor potential channel, Transienter Rezeptor-Potential-Kationenkanal
VF	Verdünnungsfaktor
WR	Wistar-Ratte

Anatomische Begriffe:

ÄHZ	äußere Haarzellen
BM	Basilarmembran
GS	Ganglion spirale
IHZ	innere Haarzellen
LI	Ligamentum spirale
Lo	Lamina spiralis ossea
LS	Limbus spiralis
MOD	Modiolus
OC	Corti-Organ, <i>organ of Corti</i>
RM	Reissner'sche Membran
SM	Scala media (Ductus cochlearis)
ST	Scala tympani
StV	Stria vascularis
SV	Scala vestibuli
TM	Tektorialmembran
VS	Vas spirale
ZNS	Zentralnervensystem
ZK	Zellkern der Zellen

Zusammenfassung

Einleitung

Das Innenohr enthält verschiedene Immunzellen, die sowohl zur Immunabwehr und der Entwicklung als auch zur Vermittlung einer pathologischen Degeneration beitragen können. Die Lokalisation und Bedeutung von Leukozyten in der Cochlea während der Entwicklung sind bisher noch nicht genau bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Leukozyten während der postnatalen Reifung der Cochlea im Rattenmodell zu untersuchen und einen möglichen Zusammenhang mit Cisplatin-induzierter Ototoxizität herzustellen.

Methodik

Cochleae von Wistar-Ratten des 1., 3., 5., 7. und 9. postnatalen Tages wurden zur Herstellung organotypischer Explantatkulturen isoliert. Relevante Immunzellen wurden an Kryoschnitten mittels Antikörpernachweis der CD45-, CD11b-, CD68- und CD117/c-Kit-Expression und Avidin-Färbung von intrazellulärer Heparin granula in den Mastzellen nachgewiesen und ausgezählt. Die Cochlea-Kulturen wurden mit 20 μ M Cisplatin inkubiert, um den Effekt auf die Immunzellpopulationen zu untersuchen.

Ergebnisse

CD45-positive, CD11b-positive, CD68-positive und CD117/c-Kit-positive Zellen wurden in der Cochlea nachgewiesen. Die Leukozyten waren in unterschiedlichen Abschnitten der Cochlea lokalisiert: CD68+- und CD11b+-Zellen befanden sich überwiegend im Limbus spirale und im Modiolus, CD117/c-Kit+- und CD45+-Zellen überwiegend im Modiolus. Die Anzahl der Leukozyten veränderte sich während der postnatalen Entwicklung. CD45+-Zellen nahmen im apikalen Teil bis Tag 5 zu und blieben danach konstant, während sie im medialen Teil ab Tag 5 abnahmen. CD11b+-Zellen nahmen beginnend mit pT1 stetig ab und waren nach neun Tagen nur noch im Modiolus und im Ligamentum spirale nachweisbar. CD68+-Zellen nahmen während der ersten drei Tage zu, danach stetig ab. Die Inkubation der Cochlea-Explantate mit 20 μ M Cisplatin resultierte in einer Schädigung der Mastzellen, der CD45+-, CD11b+- und CD68+-Zellen und der Haarzellen.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren die Existenz residenter Leukozyten in der Cochlea und eine Veränderung der Zellzahlen während der postnatalen Entwicklung. Die Schädigung dieser Zellen durch Cisplatin könnte auf einen Zusammenhang mit Cisplatin-induzierter Ototoxizität hindeuten.

Abstract

Introduction

The inner ear contains various immune cells that may contribute to immune defense and development but also mediate pathological degeneration. The localization and importance of leukocytes in the cochlea during development have not been well understood. The aim of the present work was to investigate leukocytes during postnatal maturation of the cochlea in a rat model and to establish a possible link with cisplatin-induced ototoxicity.

Methodology

Cochleae from Wistar rats of postnatal days 1, 3, 5, 7, and 9 were isolated to generate organotypic explant cultures. Relevant immune cells were detected using antibodies against CD45, CD11b, CD68, or CD117/c kit, as well as avidin staining. The positive cells were scored in cochlear cryosections. Cochlear cultures were exposed to 20 μ M cisplatin to examine the effect on immune cell populations.

Results

The resident CD45-positive, CD11b-positive, CD68-positive, and CD117/c-Kit positive cells were identified in different cochlear sections. CD68+ and CD11b+ cells were found predominantly in the spiral limbus and modiolus, while CD117/c-Kit+ and CD45+ cells were primarily located in the modiolus. The number of leukocytes changed during postnatal development. In detail, the number of CD45+ cells in the apical part increased until postnatal day five and remained constant after that. In contrast, the number of CD45+ cells in the medial part of the cochlea decreased after the fifth postnatal day. The number of CD11b+ cells steadily decreased from the first day after birth, and in p9 animals, the CD11b+ cells were detectable only in the modiolus and spiral ligament. The number of CD68+ cells increased during the first three days and steadily decreased after that. Incubation of cochlear explants with 20 μ M cisplatin resulted in damage to mast cells, CD45+ cells, CD11b+ cells, CD68+ cells, and hair cells.

Conclusion

The present work results demonstrate the existence of resident leukocytes in the cochlea and a change in cell numbers during postnatal development. Damage to these cells induced by cisplatin may indicate an association with cisplatin-induced ototoxicity.

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Physiologie des Innenohres

1.1.1. Anatomie des Innenohrs

Das Ohr der Säugetiere besteht aus drei voneinander anatomisch getrennten Teilen, dem äußeren Ohr (*Auris externa*), dem Mittelohr (*Auris media*) und dem Innenohr (*Auris interna*). Das Innenohr entwickelt sich aus einer als Ohrplakode bezeichneten Einstülpung des Ektoderms, welches sich zum Ohrbläschen weiterentwickelt und aus dem sich schließlich alle Bestandteile des Innenohrs (Schneckengang, Corti-Organ, Sacculus, Utriculus, Bogengänge und Ductus endolymphaticus) bilden (Aumüller et al., 2017). Im Mittelohr sitzen drei knöcherne Strukturen, Malleus (Hammer), Incus (Amboss) und Stapes (Steigbügel), die die Schalldruckwellen vom Trommelfell zum Innenohr weiterleiten (Pfaff et al., 2019). Das Innenohr ist mit Lymphflüssigkeit gefüllt, sodass die Schwingungen vom Außenohr zum Innenohr einem Übergang zwischen zwei unterschiedlichen akustischen Impedanzen entsprechen. Die Schallwelle wird in eine mechanische Schwingung der Gehörknöchelchen umgewandelt. Der Druck am ovalen Fenster des Innenohres weist durch den Mechanismus der Impedanzanpassung einen etwa 22-mal höheren Wert auf als der Druck am Trommelfell (Aumüller et al., 2017).

Das Innenohr besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Teilen, dem Vestibularapparat und der Cochlea. Es ist mit Membranen ausgekleidet, die die mit Endolymphe gefüllten Räume von denen sie umschließenden Räumen trennt, welche mit perilymphatischer Flüssigkeit gefüllt sind.

Das Gleichgewichtsorgan besteht aus Sacculus, Utriculus und drei senkrecht zueinander ausgerichteten, knöchernen, flüssigkeitsgefüllten Bogengängen (Pfaff et al., 2019). Es existiert eine neuroanatomische Verbindung des Innenohrs mit dem Gehirn. Am Ende des Sacculus befindet sich ein als Ductus endolymphaticus bezeichneter, mit Perilymphe gefüllter Gang. Er endet blind im Saccus endolymphaticus. Der Saccus endolymphaticus steht hierbei mit der Dura mater der Meningen im Felsenbein in direkter Verbindung. Die Funktion dieser Verbindung ist bis heute nicht vollständig geklärt, jedoch sind sekretorische Funktionen wahrscheinlich (Lo et al., 1997). Die Anwesenheit von phagozytischen und anderen immunologischen Zellen wie Lymphozyten spricht auch für seine Funktion in der Immunüberwachung (Kämpfe Nordström et al., 2018; W. Liu et al., 2019).

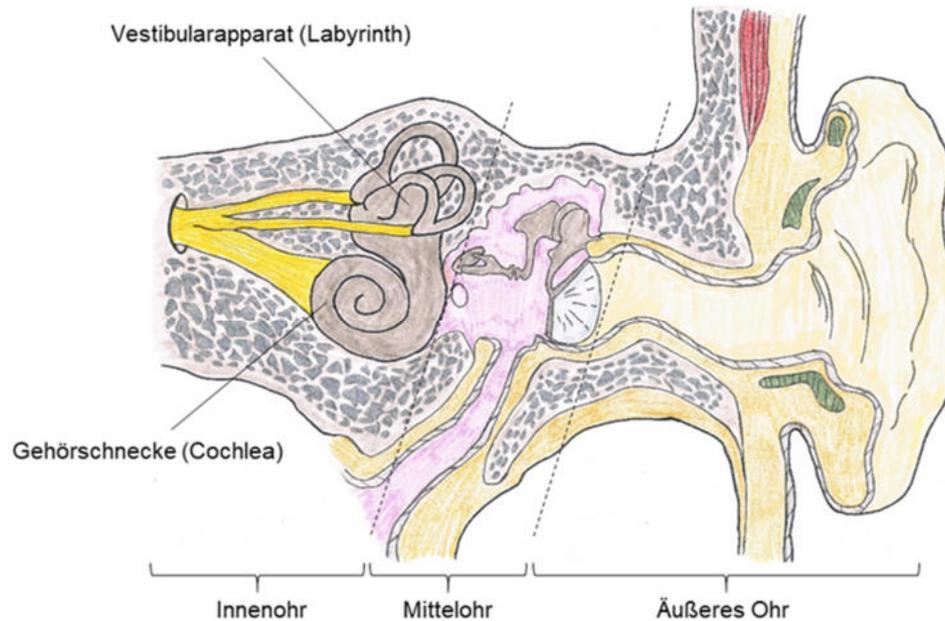


Abb. 1: Schematische Darstellung eines menschlichen Ohres, Querschnitt: Felsenbein, Quelle: eigene Darstellung.

1.1.2. Cochlea und Corti-Organ

Die Cochlea der Säugetiere ist eine schneckenförmige Struktur, die die Schallwelle in ein neuronales Signal transformiert. In der Cochlea breitet sich eine, durch die Schwingungen des Stapes am ovalen Fenster ausgelöste, wellenförmige Schwingung in der Basilarmembran aus. Diese ist am fensternahen Ende steif und wird zum Apex hin weicher und biegsamer. Dadurch kann sie am fensternahen Ende mit hohen Frequenzen der Wanderwelle, die hohen Schallfrequenzen entsprechen, in Resonanz schwingen, während niedrige Frequenzen weiter in die Cochlea hineinwandern können (Pfaff et al., 2019). Von der Cochlea wird das Schallsignal als neuronales Signal an das Gehirn weitergeleitet. Die Haarzellen in der Cochlea stellen hierbei die Sensoren dar. Die Neuronen des Spiralganglions stellen mit ihren Axonen eine synaptische Verbindung mit dem Zellkörper der Haarzellen her. Die Gesamtheit der Axone dieser Neuronen bildet den Hörnerv.

Die Cochlea beherbergt das Corti-Organ (Gilroy et al., 2008), den sensorischen Rezeptor des Hörorgans. Die knöcherne, kegelförmige Achse der Cochlea (Modiolus cochleae) formt die Innenwand des Schneckenkanals (Canalis spiralis cochleae), welche das cochleäre Spiralganglion enthält. Vom Modiolus ausgehend entspringt eine dünne Knochenleiste (Lamina spiralis ossea), welche die zusammen mit den an ihr ansetzenden Membranen drei flüssigkeitsgefüllte Kammern bildet.

Die obere, mit Perilymphe gefüllte Scala vestibuli beginnt am ovalen Fenster, dem der Stapes auf der Mittelohrseite beweglich aufliegt. Die mittlere Kammer ist die mit Endolymphe gefüllte Scala media. Die untere Kammer wird als Scala tympani bezeichnet und beginnt am runden Fenster. Die Scala vestibuli ist von der Scala media durch die Reissner-Membran getrennt. Die beiden äußeren Scalae vestibuli und tympani sind im Apex der Cochlea durch das Helicotrema miteinander verbunden, was dem Druckausgleich zwischen diesen beiden Kammern dient (Pfaff et al., 2019).

Die die Scala tympani und vestibularis füllende Perilymphe ist in ihrer Zusammensetzung dem Liquor des zentralen Nervensystems (ZNS) sehr ähnlich (145 mmol Natrium, 3 mmol Kalium). Das Blutgefäßsystem ist eine weitere Quelle der Perilymphe, die durch Ultrafiltration aus den Blutgefäßen exsudieren kann (Kellerhals, 1979; Sterkers et al., 1988). Allerdings ist der Übergang von Blut zu Perilymphe strikt reguliert und wird als Blut-Perilymph Schranke bezeichnet (Juhn et al., 1982). Der Austausch von Soluten zwischen diesen beiden Kompartimenten wird primär durch den Spiral limbus vermittelt (Firbas et al., 1981).

Endolymphe, die kaliumreiche (150 mmol) und natriumarme (1 mmol) Flüssigkeit in der Scala media, entsteht durch Ultrafiltration und selektive Permeabilität der die Scala media auskleidenden Reissner'sche Membran und der Stria vascularis für bestimmte Ionen aus der Perilymphe (Sterkers et al., 1988; Casale et al., 2019). Diese Zusammensetzung ist essentiell für die Reizweiterleitung und somit um das Hören möglich zu machen. Die Stria vascularis ist eine komplexe epitheliale Struktur, die Kaliumionen sezerniert und damit einen wichtigen Beitrag zur Endolymphe liefert. Dabei werden Kaliumionen über mehrere Zellschichten hinweg aus der kaliumreichen Perilymphe transportiert (Fibrozyten → Basalzelle → Intermediärzelle → Marginalzelle → Endolymphe). Die Reissner'sche Membran transportiert selektiv über Natrium- und Chlorid-Kanäle entsprechende Ionen aus der Endolymphe (S. H. Kim et al., 2011; K. X. Kim et al., 2014) und sorgt somit ebenfalls für die Homöostase der Endolymphe.

Die äußeren und inneren Haarzellen sind durch spezialisierte Epithelzellen voneinander getrennt und dienen der Stabilisierung der Struktur des Corti-Organs. Deiterszellen bilden auch ein isolierendes und stützendes Grundgerüst innerhalb der Haarzellreihen (Malgrange et al., 2002). Hensenzellen haben ebenfalls stützende Funktion im Corti-Organ und befinden sich zwischen den äußeren Haarzellen und Claudiuszellen (Merchan et al., 1980; Defourny et al., 2015). Die Hensenzellen liegen wiederum auf einer Schicht von Zellen, die am Rand des Corti-Organs direkten Kontakt

mit der Endolymphe haben und mittels Tight Junctions zwischen ihnen die Scala media auf der Seite der Basilarmembran flüssigkeitsdicht versiegeln. Diese Zellen werden Claudiuszellen genannt (Kanazawa et al., 2004). Eine weitere Zellart, die Boettcherzellen, findet sich unter der Schicht der Claudiuszellen im oberen fensternahen Bereich der Basilarmembran. Diese hexaedrischen Epithelzellen dienen wahrscheinlich der Versteifung der Basilarmembran und damit der Spezifität für hohe Schallfrequenzen im oberen Bereich der Cochlea (Kanazawa et al., 2004).

1.1.3. Innervation und Vaskularisation des Innenohres

1.1.3.1. *Innervation*

Das Innenohr wird vom Hirnnerven, dem N. vestibulocochlearis (VIII. Hirnnerv), der sich aus dem phylogenetisch älteren N. vestibularis und dem N. cochlearis zusammensetzt, innerviert. Etwa 30.000 bipolare Typ-I-Neuronen und pseudounipolare Typ-II-Neuronen, deren Perikarya sich im Ganglion spirale konzentrieren, bilden mit ihren Afferenzen und Efferenzen den N. cochlearis. Sowohl Ganglion als auch Nervus befinden sich im Rosenthal'schen Kanal innerhalb des Modiolus.

Die äußeren und inneren Haarzellen in der Cochlea stehen über Synapsen mit Neuronen des N. cochlearis in Verbindung, wobei ca. 90% des Inputs dieser Neuronen von den inneren Haarzellen stammt. Diese Axone bilden den Hörnerv (Peterson et al., 2019). Die äußeren Haarzellen erhalten dagegen Input aus dem Cortex, der die Sensitivität der Cochlea beeinflussen und so dieses Organ vor Schäden durch laute Geräusche schützen kann (Brownell et al., 1985; Mulders et al., 2000). Verschiedene Aspekte des Signals wie Lautstärke, Lokalisation, Frequenz, Modulation und Ähnliches werden dabei jeweils in verschiedenen, spezialisierten Regionen des Gehirns analysiert und im auditorischen Cortex zu einem akustischen Gesamtbild verarbeitet (Felix et al., 2018; Peterson et al., 2019).

1.1.3.2. *Vaskularisation*

Die Vaskularisation der Cochlea wurde bereits seit ihrer Entdeckung im 16. Jahrhundert erforscht, wobei zuerst die makroskopische Anatomie der Blutversorgung beschrieben wurde. Darauf folgte im 19. Jahrhundert eine mikroskopische Beschreibung. Im 20. Jahrhundert wurden viele Experimente durchgeführt, bei denen mittels Injektion von Farbstoffen in das Gefäßsystem an frischen

Schläfenbeinpräparaten dessen Verbindungen aufgeklärt wurden (Mudry et al., 2009). Erst in neuer Zeit wurden nicht-invasive, bildgebenden Verfahren wie Mikro-Computertomografie (mikro-CT) und Synchrotronstrahlung-Phasenkontrast-Imaging (SSPKI) verwendet, um die Vaskularisation der Cochlea dreidimensional darzustellen (Mei et al., 2018).

Die arterielle Versorgung der Cochlea geschieht meist (85-100%) über die Arteria cerebelli anterioris inferioris (ACAI), von der die A. labyrinthi als langer, graziler Ast und Hauptversorgungsader des Innenohrs abzweigt. Es existieren jedoch große interindividuelle Unterschiede in der Vaskularisation der Cochlea. So ist es möglich, dass die A. labyrinthi in zirka 15% der Fälle bei gesunden Individuen direkt aus der A. basilaris entspringt (Carlo, 2018). Die A. labyrinthi wiederum verzweigt sich in die A. cochlearis communis, die die Cochlea versorgt, und die A. vestibularis anterior, die den unteren Teil des Vestibularapparates versorgt. Die A. cochlearis communis spaltet sich in zwei Teile, die A. propria cochlearis, die entlang der gesamten Cochlea verläuft, und die A. vestibulocochlearis, die ihrerseits zum einen Teil der Cochlea versorgt, aber auch einen Zweig zum Vestibularapparat mit den drei Bogengängen sendet (Axelsson et al., 1974; Hansen, 1971; Mei et al., 2018). Farbstoffinjektions-experimente konnten in der Vergangenheit nachweisen, dass zwischen diesen Hauptversorgungsgefäßen zahlreiche Anastomosen bestehen (Axelsson et al., 1974; Hansen, 1971). Die Vv. spiralis anterioris und posterioris leiten venöses Blut aus der Cochlea und münden in den Ramus cochlearis (Mei et al., 2018).

Beim Menschen verringert sich in den knöchernen Teilen der Cochlea der Knochenmarksraum und damit seine Vaskularisation durch chondrale Ablagerung von Knochenmaterial um Knorpelinseln herum, beginnend in der Embryonalentwicklung und für die ersten beiden Lebensjahre. Danach findet mehr Remodellierung der Knochenstruktur und Vaskularisation statt (Hansen, 1971).

1.1.4. Postnatale Entwicklungsprozesse in der Cochlea von Wistar-Ratten

Die embryonale Entwicklung des Gehörs und des gesamten Ohres ist ein komplizierter Prozess. Die knöchernen Anteile des Mittel- und des Innenohres werden im Embryo zunächst als Knorpel angelegt und in einem Prozess, der chondrale Ossifikation genannt wird, in Knochen umgebaut. Eine Fähigkeit des Hörens ist vor dieser Anlage der anatomischen Strukturen nicht möglich, sie bildet sich aber parallel mit der Entwicklung dieser Strukturen aus (Basch et al., 2016; Whyte Orozco et al., 2003).

Bei Ratten des Stammes Wistar sind spätestens am 18. Tag nach der Geburt die wichtigsten anatomischen Strukturen im Wesentlichen fertig ausgebildet. Bis zum 16. postnatalen Tag ist das Außenohr mit Periderm überzogen, dasselbe gilt auch für die Augenlider (Witschi, 1962). Die Fähigkeit des Hörens von durch Luft übertragenen Schallwellen beginnt am 12. Entwicklungstag postnatal. Davor treten bereits Aktionspotentiale innerer Haarzellen nach beginnender Freisetzung von Transmittern auf, die zum Hirnstamm fortgeleitet werden. Am postnatalen Tag 22 hat diese neuronale Aktivität den Level von erwachsenen Ratten erreicht. Knochengeleitete Schallsignale können ebenfalls bereits ab dem postnatalen Tag 7 oder 8 zu Aktionspotentialen im Innenohr führen (Geal-Dor et al., 1993). Dies spricht dafür, dass das Innenohr bei Ratten früher funktionsfähig ist, als das Außen- und Mittelohr.

1.2. Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr von Pathogenen aller Art. Das Immunsystem der Vertebraten ist hochspezialisiert und besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlichen, miteinander kommunizierenden Zelltypen, die allesamt hämatopoetischen Ursprungs sind. Es wird in zwei Untersysteme eingeteilt, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Beide Bereiche wiederum haben zelluläre und humorale Anteile, in denen jeweils Zellen und spezialisierte Proteine die Abwehrfunktion durchführen. Das Immunsystem der Säugetiere unterscheidet sich dabei leicht von einer Säugetierart zu anderen, weswegen Nagetiere häufig als Modell für den Menschen verwendet werden (Murphy et al., 2018).

1.2.1. Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen eindringende Pathogene. Es besteht auf der zellulären Seite aus phagozytisch aktiven Zellen wie Makrophagen, die Bakterien und andere Pathogene neutralisieren. Andere Zellen, wie die verschiedenen Arten von Granulozyten (azidophile, basophile und neutrophile) und Mastzellen, enthalten Granula, aus denen aktive Mediatoren wie beispielsweise Granzyme ausgeschüttet werden können und die Pathogene extrazellulär angreifen können.

Das erworbene Immunsystem muss zuerst durch Signale des angeborenen Immunsystems aktiviert werden, sodass die Reaktion erst einige Tage später erfolgt. Allerdings ist diese dann spezifisch und wesentlich effizienter auf den Erregertyp

abgestimmt. Zudem bildet sich ein immunologisches Gedächtnis, das es befähigt, bei der nächsten Begegnung mit diesem Pathogen früher und stärker zu reagieren (Murphy et al., 2018).

Die T-Lymphozyten lassen sich grundsätzlich in zwei weitere Hauptgruppen einteilen. Die einen T-Zellen exprimieren das Protein CD4 und bilden die Gruppe der T-Helferzellen. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Etablierung einer adaptiven Immunantwort, da sie nach ihrer Aktivierung andere Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems aktivieren können. Sie können anhand weiterer Oberflächenmarker in weitere Subklassen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt werden (Th₁, Th₂, Th₁₇ u.a.). Eine weitere wichtige Art von CD4+ Zellen zeichnet sich durch eine starke Expression von CD25 und dem intrazellulären, nukleären Protein FOXP3 aus. Diese T-Zellen erfüllen hemmende, regulatorische Funktionen und werden deshalb als T_{reg}-Zellen bezeichnet (Murphy et al., 2018).

Die anderen T-Zellen exprimieren CD8 und bilden die Gruppe der zytotoxischen T-Zellen. CD8+ T-Zellen werden durch Bindung an ihr spezifisches Antigen (Signal 1) aktiviert, insofern es über MHC I Antigen-präsentierender Zellen vermittelt wird (Signal 2). Eine vollständige Aktivierung erfolgt aber erst durch Zytokine (Signal 3) anderer Zellen des Immunsystems, wie z.B. T-Helferzellen von TH₁ und ein zweites Signal ihrer APZ erhalten. Diese strikte Regulation über drei sukzessive Signale ist nötig, denn anschließend werden Zellen, auf denen dieses Antigen exprimiert wird, durch die zytotoxischen T-Zellen abgetötet. Ein Mechanismus der unter anderem bei viralen Infektionen aber auch bei der Bekämpfung von Tumorzellen relevant ist (Murphy et al., 2018).

Die Hämatopoese der bisher beschriebenen Zelltypen findet im frühen Stadium der Entwicklung bei Säugetieren noch nicht im Knochenmark, sondern im Dottersack des Embryos statt. Diese, während der „primitiven“ und „definitiven“ Hämatopoese erzeugten Zellen, wandern nach Einsetzen des Blutflusses in alle Regionen des Embryos, unter anderem auch in das Gehirn, und bilden die ersten gewebespezifischen Makrophagen. Dabei leisten sie bereits während der Entwicklung der ersten neuronalen Strukturen wichtige Aufgaben. Nach dem Einwandern hämatopoetischer Stammzellen in das Knochenmark werden dort alle weiteren hämatopoetischen Zellen erzeugt (Hoeffel et al., 2015; Perdiguero et al., 2016), welche sich aber von den embryonal im Dottersack erzeugten Zellen unterscheiden. Zirkulierende Makrophagen und gewebespezifische Makrophagen (z.B. Osteoklasten,

Kupffer'sche Zellen, Microglia) unterscheiden sich phänotypisch ebenfalls voneinander, wobei sie jedoch immer noch gemeinsame typische Makrophagenmarker exprimieren. Dazu gehören die Zellmembranproteine CD11b, CD45 und CD68 (Davies et al., 2013). Eine Übersicht über verschiedene Arten von Gewebemakrophagen, ihrer Funktion und wichtigste Zelloberflächenmarker sind in Tabelle 1 dargestellt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Mehrheit der gewebespezifischen Makrophagen von den im Dottersack erzeugten Zellen abstammen (Kierdorf et al., 2013) und deshalb möglicherweise auch unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die Zusammensetzung von Dottersack- und Knochenmark-abgeleiteten gewebespezifischen Makrophagen ist darüber hinaus alters- und organspezifisch und wird durch lokale Entzündungsreaktionen ebenfalls beeinflusst (Molawi et al., 2014). Einige Dottersack-abgeleitete Populationen verschwinden mit dem Alter komplett, aber viele bleiben dauerhaft erhalten, da sie permanent zur Proliferation fähig sind (Langerhans-Zellen, Kupffer'sche Zellen, Mikroglia, alveoläre und peritoneale Makrophagen).

Tabelle 1: Gewebemakrophagen – Vorkommen und Funktion.

Gewebe	Zelltyp	Funktion	Phänotypische Marker
Nervensystem	Microglia	Überleben der Neuronen Immunüberwachung Synaptisches Remodelling Phagozytose	CD11b+, CD45+
	Makrophagen - perivaskulär - Meningen	Immunüberwachung Immunüberwachung	CD11b+, CD45+ CD11b+, CD45+
Leber	Kupffer-Zellen	Phagozytose	CD11b+, CD68+
Lunge	Alveolarmakrophagen	Immunüberwachung Homöostase Gewebefunktionen (Surfactantreabsorption)	CD11b+, CD68+
Milz	Makrophagen		
	- Marginalzone	Immunüberwachung Zirkulation	CD68+
	- metallophil	Immunüberwachung	CD68+
	- rote Pulpa	Phagozytose von Erythrozyten, Eisen-Metabolismus	
	- weiße Pulpa	Phagozytose von apoptotischen Zellen der Keimzentren	CD68+

Quelle: Mod.Version Immunity in the tissues. 2013. Tissue-resident macrophages, Luke C. Davies. Nature Immunology.

Sollten aber äußere Einflüsse wie Gammastrahlung oder eine Listerieninfektion die gewebespezifische Population zerstören, dann wäre anschließend eine Population ausschließlich durch Knochenmark-abgeleitete Makrophagen die Folge.

1.2.2. Phänotypische Charakterisierung der Immunzellen

Zellen, insbesondere Immunzellen, exprimieren im Laufe ihrer Entwicklung verschiedene Oberflächenproteine. Im Zuge der Erforschung der Funktion dieser Proteine wurden diesen von verschiedenen Forschungsgruppen weltweit unterschiedliche Namen gegeben und meist anhand dieser auch ersten Klassifizierungen durchgeführt. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper ist mittlerweile eine eindeutige Detektion einer Vielzahl von Oberflächenproteinen möglich. Um eine einheitliche Struktur bei der Charakterisierung von Zellen zu erhalten, wurde die Nomenklatur der „Cluster of differentiation“ (CD) eingeführt, anhand derer man Immunzellen eindeutig typisieren kann.

Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Oberflächenmarker zur Charakterisierung von Leukozyten näher beschrieben.

1.2.2.1. Die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45

Das Protein CD45, das ursprünglich leukocyte common antigen (LCA) genannt wurde, ist ein Mitglied der Protein-Tyrosin-Phosphatasen-Familie und auch unter dem Namen Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor vom Typ C (PTPRC) bekannt (Clark et al., 1989; Kaplan et al., 1990). Wie sein alter Name LCA schon andeutet, wird CD45 von allen Leukozyten, also sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen als auch von Lymphozyten wie T- und B-Zellen exprimiert (Clark et al., 1989). Das Gen PTPRC, das für das CD45-Protein codiert, enthält 34 Exone und durch unterschiedliches Splicing entstehen unterschiedliche Isoformen, die zelltypspezifische Expressionen zeigen und deshalb häufig für Subtypisierungen verwendet werden (Hermiston et al., 2003).

Protein-Tyrosin-Phosphatasen fungieren als Signalmoleküle, die in der Lage sind, zelluläre Prozesse wie Mitose und Differenzierung zu steuern und die Zellwachstum und auch pathologische Prozesse wie maligne Transformationen regulieren. CD45 ist unter anderem in der Lage Zytokin-Signale zu hemmen, da es z.B. die JAK/ STAT-Kaskade inhibieren kann. Dadurch erfüllt es wichtige Funktionen in der Initiierung, der Regulation und dem Abschalten einer Immunantwort (Altin et al., 1997; Babon et al., 2014; Hermiston et al., 2003; Rheinländer et al., 2018).

In der Cochlea existieren CD45-positive Immunzellen, deren Anzahl nach einem akustischen Trauma oder Gabe eines ototoxischen Medikaments zunimmt. Die größte Anzahl dieser nach Hörverlust einwandernden CD45-positiven Immunzellen kann dabei im Ligamentum spirale und den Wänden des Perilymphraumes nachgewiesen werden (Tan et al., 2008). Ihre Rolle bei der Schädigung der Haarzellen durch solche Traumata ist bisher unzureichend geklärt, aber es existieren Hinweise, dass zumindest die residente CD45-positive Makrophagen-Population, die den Chemokin-Rezeptor CX3CR1+ exprimiert, protektive Funktion hat (Wood et al., 2017). Eine grundlegende Interaktion von CD45-positiven Makrophagen mit Mastzellen im Kontext der Einleitung von inflammatorischen Reaktionen wurde bereits mehrfach nachgewiesen, sowohl für gewebespezifische Reaktionen (Filippo et al., 2013) als auch schwerwiegende Erkrankungen (Wan et al., 2018). Entsprechende Belege für Interaktionen innerhalb der Cochlea liegen bisher nicht vor.

1.2.2.2. Das Adhäsionsmolekül CD11b

CD11b ist die alpha-Kette eines Adhäsionsmolekül der Integrin-Familie und auch unter dem Namen Integrin-alpha M (ITGAM) bekannt. CD11b bildet mit CD18, einer auch als β_2 bekannten Integrin-beta-Kette, das vollständige Integrin-Molekül $\alpha_M\beta_2$ (Larson et al., 1990). Es wird vor allem von dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten exprimiert (Iwasaki, 2003). Während alle dendritischen Zellen die verwandte Integrin-alpha-Kette CD11c exprimieren, findet sich CD11b allerdings nur auf verschiedenen Subpopulationen (Merad et al., 2013). CD11b kann neben Monozyten und Makrophagen und ihren Abkömmlingen wie Mikroglia und von Kupffer'schen Sternzellen auch auf vielen anderen Zellen des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten und natürlichen Killerzellen nachgewiesen werden (Solovjov et al., 2005).

Neben seiner Funktion als Adhäsionsmolekül dient CD11b auch als Rezeptor für verschiedene, im angeborenen Immunsystem wichtige Signalmoleküle, wie Komplementfaktoren oder Plättchenfaktor 4 (PF 4). Es hat dementsprechend auch eine Funktion in der Signaltransduktion und Aktivierung der Zellen, auf dessen Oberfläche es exprimiert wird (Klein et al., 1990; Larson et al., 1990; Lishko et al., 2018; G. D. Ross et al., 1993; Gordon D. Ross, 2002; Solovjov et al., 2005; Wang et al., 2002; Xiong et al., 2003).

In der Cochlea von adulten Säugetieren existieren CD45-positive, residente Makrophagen, die auch CD11b exprimieren und nach einer Schädigung des Gehörs durch ein akustisches Trauma oder ototoxische Substanzen wie Cisplatin, bei der Heilung eine positive Rolle zu spielen scheinen (Wood et al., 2017). Sie scheinen auch für die korrekte Entwicklung des Hörnervs wichtig zu sein. So konnte bei transgenen Mäusen, bei denen Makrophagen transient entfernt wurden, ein Gliazellenüberschuss im Hörnerv und funktionelle Defizite bei der Ausbildung der Schwann'schen Scheiden um die Axone in dem Nerv nachgewiesen werden. Die betroffenen Mäuse zeigten auch einen Hörverlust (Brown et al., 2017).

1.2.2.3. Der Scavenger Rezeptor CD68

CD68 ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa und wird primär von Monozyten, zirkulierenden und gewebespezifischen Makrophagen exprimiert, aber auch von nicht-myeloiden Zelltypen, wenn auch in geringen Mengen (Betjes et al., 1991). CD68 gehört zur Familie der „lysosomal/ endosomal-associated membrane proteins“, kurz LAMP. Die Funktion von CD68 ist nur sehr wenig untersucht. Die Lokalisation in endosmalen Kompartimenten spricht allerdings für eine Funktion bei der Bindung von Fremdpartikeln, Peptidfragmenten und als Hilfsrezeptor zur Einleitung der Phagozytose (Dhaliwal et al., 1999; Gordon, 1999; da Silva et al., 1996). Inflammatorische Signale können die Expression von CD68 in Makrophagen verstärken, was ebenfalls darauf hinweist, dass es für die Immunantwort, respektive die Phagozytose, wichtig ist (Rabinowitz et al., 1991). Weitere Funktionen werden aktuell untersucht. So wurde gezeigt, dass CD68 oxLDL binden und internalisieren kann und es somit bei Arteriosklerose relevant sein könnte (Otnad et al., 1995) und CD68-positive Tumor-associated-macrophages (TAM) sorgen für eine immunsuppressive Umgebung, in der der Tumor wachsen kann (Chistiakov et al., 2017). Darüber hinaus bauen die knochenspezifischen Makrophagen, Osteoklasten, Knochen ab und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Homöostase von Knochenbildung und -abbau (Teitelbaum, 2000). In Mäusen konnte bestätigt werden, dass sich auch in der Cochlea perivaskuläre CD68- und CD11b-positive Makrophagen befinden und diese, nach Eliminierung der residenten Population durch Bestrahlung, durch infiltrierende Makrophagen ersetzt werden können (Shi, 2010).

1.2.2.4. Die Rezeptortyrosinkinase CD117/ c-Kit

CD117/ c-Kit ist eine Rezeptortyrosinkinase mit einem Molekulargewicht von 145 kDa, die zuerst beim Menschen als das zelluläre Homolog des in einem für Katzen pathologischen Virus vorkommenden Onkogens v-Kit (Yarden et al., 1987) entdeckt wurde. Unter physiologischen Bedingungen wird c-Kit stark von hämatopoetischen Stammzellen, multipotenten und gemeinsamen Vorläuferzellen exprimiert.

Lymphozytenvorläuferzellen exprimieren dagegen nur geringe Mengen von c-Kit. In der Peripherie ist c-Kit unter den Leukozyten nur auf Mastzellen nachzuweisen (Miettinen et al., 2005). Im Zuge der Zelldifferenzierung geht die Expression von c-Kit verloren, mit Ausnahme von Mastzellen, Melanozyten der Haut und Cajalzellen des Darms. Einige Tumore exprimieren ebenfalls c-Kit (Miettinen et al., 2005), was das Wachstum und Überleben von Tumoren begünstigt, weshalb es auch als Tumormarker Verwendung findet (Dirnhofer et al., 2006).

Für die Bezeichnung des Liganden von c-Kit existieren verschiedene Synonyme: SCF (stem cell factor), MGF (mast cell growth factor), steel factor oder KIT-Ligand. Die Bindung des Liganden an c-Kit fördert das Wachstum von hämatopoetischen Stammzellen (Ashman, 1999; Lennartsson et al., 2012) und regt Wachstum und Differenzierung von Mastzellvorläuferzellen an (Ribatti et al., 2014). Als Mitglied der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) führt die Bindung seines Liganden auf der Membranaußenseite der Zelle zu einer Homodimerisierung, die auf der Innenseite der Zellmembran eine Autophosphorylierung und damit Aktivierung der Tyrosinkinasefunktion zur Folge hat. c-Kit aktiviert anschließend eine Signalkaskade, die Überlebenssignale aussendet und Zellteilung anregen kann (Blume-Jensen et al., 1991).

1.2.3. Mastzellen

Mastzellen sind runde bis ovale, mononukleäre Zellen mit auffälligen intrazellulären Granula. Sie ähneln optisch und funktionell basophilen Granulozyten und wurden deshalb als Gewebegranulozyten bezeichnet (Franco et al., 2010), da sie sich auch mit damals gängigen Färbetechniken nicht unterscheiden ließen. Allerdings konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass Mastzellen von separaten, CD34-positiven Stammzellen im Knochenmark gebildet werden und man anhand des Oberflächenmarkers CD117 gut zwischen CD117-positiven Mastzellen und CD117-negativen Granulozyten unterscheiden kann. Während der Embryonalentwicklung

verlassen unreife Mastzellen das Knochenmark in das vaskuläre System. Die Reifung, Differenzierung und anschließende Proliferation erfolgt gewebespezifisch und hängt stark von den dort gebildeten Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Oberflächenrezeptoren des Gewebes ab (Hallgren et al., 2011). Reife Mastzellen finden sich vor allem in Geweben mit Verbindung zur Umwelt, wie der Haut, den Atemwegen oder dem Darm, wurden aber auch in stark abgegrenzten Bereichen des Körpers entdeckt, wie z.B. dem Gehirn, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen. In einer Publikation von 1976 wurden Mastzellen auch im Innenohr nachgewiesen (Sleeckx et al., 1976). Da mechanische Reizung bereits die Degranulierung der Mastzellen auslösen kann, die Cochlea für ihre Analyse allerdings aufwendig präpariert werden muss, ist solch ein Nachweis allerdings sehr schwierig, vor allem, da vor über 40 Jahren noch keine spezifischen monoklonalen Antikörper zur Verfügung standen. Ausgereifte Mastzellen können nach einem spezifischen Reiz die in ihren intrazellulär gebildeten Granula gelagerten Mediatoren durch Fusion mit der Zellmembran in den extrazellulären Raum abgeben. Der wohl am besten erforschte Reiz hierfür ist die Aktivierung über den hochaffinen $Fc\epsilon$ -Rezeptor ($Fc\epsilon$ RI), aber diverse weitere Reize wurden ebenfalls charakterisiert (Zytokine, Neuropeptide, physikalischer Stimulus) (Church, El-Lati, et al., 1991; Beaven et al., 1993; Church, Okayama, et al., 1991). Die ausgeschütteten Mediatoren erfüllen physiologische und pathophysiologische Effekte, d.h. sie unterstützen zum einen die entzündliche Reaktion, durch z.B. Ausschüttung von Prostaglandin D2 und Leukotrien C4 (Metz et al., 2008), und zum anderen Blutgerinnung, Homöostase oder Gewebeabbau und -umbau. Dieser Gewebeumbau kann sowohl destruktiv sein und z.B. zusammen mit Fibroblasten die Entwicklung von Fibrose fördern (Levi-Schaffer et al., 1995) oder aber eine essentielle Funktion für die neuronale Entwicklung darstellen. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass während der Entwicklung des Hippocampus, dass von Mastzellen erzeugte Serotonin essentiell für eine funktionelle Entwicklung des Gehirns ist (Nautiyal et al., 2012). Die genaue Anzahl der Mastzellen im Gehirn ist sehr schwer nachweisbar und abhängig von Alter, Geschlecht und äußeren Einflüssen (Trauma, Stress) (Silver et al., 2013). Klar ist aber, dass Mastzellen, zusammen mit Gliazellen, die Homöostase der Neurone regulieren und eine basale Immunaktivität der Mastzellen positiv dazu beiträgt (Avital et al., 2003). Gerät diese allerdings außer Kontrolle, können Mastzellen auch Ursache für (Auto-) Immunerkrankungen sein (Skaper et al., 2014). Eine Ursache für solche Autoimmunerkrankungen ist der Mediator Histamin, der ebenfalls von Mastzellen

ausgeschüttet wird. Ein weiterer in den Granula der Mastzellen gelagerter Botenstoff ist Heparin, welches hemmend auf die Gerinnungskaskade wirkt. Es bindet unter anderem an Avidin, was für die vorliegende Arbeit ausgenutzt wurde, um spezifisch Heparin-beladene Granula anzufärben und somit indirekt Mastzellen zu identifizieren.

1.2.4. Immunologische Prozesse im Innenohr

Der erste Beleg für eine immunologisch relevante Reaktion im Innenohr wurde 1979 von McCabe beschrieben, da sich ein idiopathischer, sensineuronaler Hörverlust durch die Behandlung mit Corticosteroiden und anderen immunsuppressiven Therapeutika behandeln ließ (McCabe, 2004). Konkrete Belege dafür wurden von Rask-Andersen und Stahle geliefert, da nachgewiesen werden konnte, dass es engen Kontakt von Makrophagen und Lymphozyten in der Endolymphe und dem Sacculus gibt und dadurch Antigen-spezifische Prozesse angeregt werden können (Rask-Andersen et al., 1979; Harris et al., 1997). Mittlerweile konnten immunreaktive Zellen in vielen weiteren Bereichen des Innenohrs nachgewiesen werden (Lang et al., 2006; Okano et al., 2008). Die Rolle dieser Immunzellen ist allerdings noch immer unklar. Schäden an der Cochlea, ausgelöst durch laute Geräusche oder chemische Stoffe, sorgen für die Anreicherung von CD45-positiven Zellen in der Cochlea, was darauf schließen lässt, dass sie an der darauffolgenden Entzündungsreaktion beteiligt sind (Hirose et al., 2005; Tornabene et al., 2006; Sato et al., 2010). In einem Mausmodell zur Simulation des Pendred Syndroms (genetisch bedingter beidseitiger Hörverlust) konnte zudem gezeigt werden, dass CD68-positive Makrophagen die Stria vascularis und das Corti Organ infiltrieren und zu deren Degeneration führen (Jabba et al., 2006). Umgekehrt wurde in einem Mausmodell zur Untersuchung von durch Diphtherie-Toxin zerstörten Haarzellen gezeigt, dass die infiltrierenden Makrophagen die Zellbestandteile toter Zellen phagozytieren und damit aktiv zum Schutz des umliegenden Gewebes und zur Regeneration des Gewebes beitragen (Kaur et al., 2015). Die neuen Modelle zur Einteilung der Makrophagen in inflammatorischen M1 und anti-inflammatorischen M2 Makrophagen spielen vermutlich auch im Innenohr eine wichtige Rolle. Sollte z.B. die natürliche Deaktivierung der M1 Makrophagen nach einiger Zeit nicht stattfinden, so wäre eine ungehemmte und schädliche (Auto-) Immunreaktion die Folge (Wynn et al., 2013).

1.3. Cisplatin-induzierte Ototoxizität

Ein spezieller temporärer oder reversibler Hörverlust, ausgelöst durch die Behandlung mit Substanzen während z.B. einer Krebsbehandlung, wird als Ototoxizität bezeichnet. Zu diesen ototoxischen Substanzen gehören Aminoglycoside, Chinin, nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente und platinhaltige Krebsmedikamente wie Carboplatin und Cisplatin (L. P. Rybak, 2007; Schellack et al., 2013).

Cisplatin besteht aus einem zentralen, divalenten Platinatom und vier daran gebundenen Liganden (2 Chlor- und 2 Aminogruppen) (L. P. Rybak, 2007). Seit der Entdeckung von Cisplatin wurde es erfolgreich bei der Behandlung vieler unterschiedlicher Tumorerkrankungen eingesetzt und wird auch heute noch häufig verwendet, obwohl die Liste der Nebenwirkungen sehr lang ist. So führt es neben dem Abtöten des Tumors auch zu nephrotoxischen, neurotoxischen und besagten ototoxischen Schäden. Während sich nephrotoxische Schäden durch eine begleitende Therapie mit Kochsalz- und Mannitol-Infusionen vorbeugen lässt, verbleiben neuro- und ototoxische Schäden weiterhin noch untherapierbar (Drögemöller et al., 2019), trotz diverser Ansätze mit Antioxidantien und Schwermetallchelatoren, deren Effektivität niemals mit Sicherheit nachgewiesen werden konnte (Leonard P. Rybak et al., 2005; Reiter et al., 2011; Kalkanis et al., 2004).

Die Mechanismen, welche die ototoxischen Schäden verursachen, wurden bereits sehr gut untersucht und identifiziert. Zum einen wird das Enzym NOX3 aktiviert (L. P. Rybak, 2007), welche essentiell bei der Produktion von ROS beteiligt ist und sich folglich die ROS Konzentration in der Cochlea erhöht. Zum anderen wird der Rezeptor TRPV1, eigentlich Rezeptor für Capsaicin, überstimuliert und sorgt dafür durch Aktivierung von nachgeschalteten Signalkaskaden für lokale Entzündungsreaktionen und Apoptose (Bhatta et al., 2019). Diese Entzündungsreaktion mündet in eine Autoimmunreaktion, die zusammen mit der erhöhten ROS Produktion den Hörverlust vorantreiben kann. Beiden Mechanismen gemein ist entsprechend ein sukzessiver Schaden an den äußeren Haarzellen, Endothelzellen, den Marginalzellen der Stria vascularis, des Spiralligaments und des Spiralganglions (Chirtes et al., 2014). Am stärksten betroffen sind die basalen, äußeren Haarzellen des Corti-Organs, sodass sich zu Beginn der Erkrankung ein progressiver Verlust feststellen lässt (L. P. Rybak et al., 2007; Schacht et al., 2012).

Die klinischen Symptome einer Cisplatin-induzierten Ototoxizität sind sehr einheitlich, unterscheiden sich aber in ihrer Ausprägung. In der Regel manifestiert sich der

Hörverlust als irreversibler, progressiver, beidseitiger Verlust der hohen Frequenzen (Sakamoto et al., 2000), mit gleichzeitigem permanenten oder temporären Tinnitus. Es liegen aber auch Berichte vor, in denen nur ein Ohr betroffen wurde oder der Hörverlust teilweise reversibel war (Paken et al., 2019). Der Grad des verursachten Schadens wiederum wird durch die Cisplatin Dosis, die Häufigkeit, Methode und Dauer der Gabe beeinflusst (Waters et al., 1991; Allen et al., 1998). Die Verwendung von Cisplatin bei der Behandlung von Tumoren bei Kindern ist entsprechend besonders kritisch, um so wenig Schaden wie möglich anzurichten. Ob ototoxische Schäden durch Cisplatin bei Kindern häufiger auftreten als bei Erwachsenen, wird allerdings kontrovers diskutiert. So berichten manche Studien von einer Hörschäden-Häufigkeit von 23 - 50 % bei Erwachsenen und > 50% bei Kindern (Wensing et al., 2013), aber eine 2016 veröffentlichte Literaturstudie zu durchgeführten Cisplatin-Behandlungen weltweit, konnte keinen stichhaltigen Beleg dafür finden, dass besonders Kinder betroffen sind (Paken et al., 2016). In jedem Fall empfiehlt es sich, in Ermangelung einer entsprechenden Therapie einmal entstandenen Schadens, so früh wie möglich nach der ersten Cisplatingabe Hörtests durchzuführen und die Therapie anzupassen, falls nötig.

1.4. Fragestellung und Hypothesen

Das Hauptziel dieser Forschung war die Identifizierung und immunphänotypische Charakterisierung von residenten Immunzellen in der intakten Cochlea gesunder Wistar-Ratten während der ersten neun Tage ihrer postnatalen Entwicklung unter normalen Bedingungen und unter Anwesenheit des Chemotherapeutikums Cisplatin.

Folgende Forschungsfragen sollten dabei beantwortet werden:

1. Gibt es residente Leukozyten in der intakten Cochlea von Wistar-Ratten?
2. Kann man die Cochlea-Leukozyten anhand eines Satzes von Marker-Expressionspanels (CD45, CD11b, CD68, CD117/c-Kit, Heparin granula) charakterisieren?
3. Wie viele Leukozyten befinden sich in der Cochlea und in welchen bestimmten Abschnitten der Cochlea befinden sie sich?
4. Verändern sich Anzahl der Leukozyten und ihre Position in der Cochlea während der postnatalen Reifung der Cochlea?
5. Beeinflusst die Exposition gegenüber Cisplatin die Anzahl und Lage der residenten Leukozyten in der Cochlea?

Folgende Hypothesen wurden hierbei getestet:

Hypothese 1: Verschiedene Arten von residenten Leukozyten sind physiologischer Bestandteil der intakten Cochlea.

Hypothese 2: Das Stadium der postnatalen Entwicklung der Wistar-Ratte beeinflusst die Anzahl, Verteilung und Lokalisation der Cochlea-Leukozyten.

Hypothese 3: Cisplatin beeinflusst die Anzahl, Verteilung und Lokalisation von Cochlea-Leukozyten.

2. Methoden

2.1. Versuchstiere für die Untersuchungen

Die durchgeführten Laborexperimente richteten sich nach dem gegenwärtig geltenden europäischen Tierschutzgesetz vom 22. September 2010 (**10/63/EU**) und sind vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (**T 0234/00**) legitimiert worden. Für diese experimentelle Promotionsarbeit wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten vom 1. bis 9. und des 30. postnatalen Entwicklungstages verwendet.

2.2. Laborgeräte

Tabelle 2: Geräte.

Bezeichnung	Hersteller/ Ort
Stereomikroskop SteREO Discovery.V8	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Steril-Werkbank Typ C424 H	Ceag Schirp, Burladingen, DE
Steril-Werkbank LaminAir HBB 2442	Heraeus, Holding GmbH, Hanau, DE
CO ₂ -Inkubator MCO-16AIC	SANYO, Moriguchi, J
Wasseraufbereitungssystem Direct-Q	MERCK Millipore, Darmstadt, DE
Mikrowelle R-208	SHARP, Wentorf, DE
Membran-Vakuumpumpe Typ N711 KN18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Ultratiefkühlschrank -86°C HERA freeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tiefkühlschrank -20°C Liebherr comfort	Liebherr, Biberach an der Riß, DE
Kühlschrank 4°C Liebherr Profiline	Liebherr, Biberach an der Riß, DE
Refrigerated Aspirator UNIJET II	UniEquip, Planegg, DE
Rotations-Vakuumkonzentrator UNIVAPO 100H	UniEquip, Planegg, DE
Laborabzug	MLW, Leipzig, DE

Pipettierhilfe Pipetboy 2	Integra, Fernwald, DE
C-Digit LI-COR Blotscanner 3600	LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA
Scanner Cannon Scan Lide 200	Cannon, Krefeld, DE
Spektra Max M2 Mikroplate Reader	Molekular Devices, USA
Elektrophorese Set	VWR International, Radnor, PE, USA
Feinwaage: 1-1000 mg	Sartorius AG, Göttingen, DE
Minizentrifuge	NeoLab, Migge GmbH, Heidelberg, DE
Pipetten Physio Care variable	Eppendorf Research, Hamburg, DE
Shaker DTS-2	NeoLab, Migge GmbH, Heidelberg, DE
Thermomixer Comfort	Eppendorf Research, Hamburg, DE
Variomag Electronicrührer, Monotherm	H+P Medizintechnik AG, Oberschleißheim, DE
Plattenschüttler Typ RO 10	Gerhardt GmbH & Ko KG, Königswinter, DE
Magnetrührer mit Heizplatte RH basic	IKA Labortechnik, Staufen, DE
XCell II Blot Module	Invitrogen, Darmstadt, DE
XCell Sure Lock Electrophoresis Cell	Invitrogen, Darmstadt, DE
Kryostat-Mikrotom	Leica CM 3050S, Leica, Wetzlar, DE
12-Kanal Pipette, Eppendorf Xplorer	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, DE
EVOS FL Cell Imaging System	Thermo Scientific, Rockford, USA
Konfokal Mikroskopie Leica TCS SP5	Leica DM 6000, Wetzlar, DE

2.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Größe/ Hersteller/ Ort
Novex WedgeWell 4-20%, Tris-Glycine Mini Gels	15,12,10 well, Thermo Scientific, DK
Falcon Transferpipetten sterile	5, 10, 25 ml, Corning, Riverfront Plaza, USA
Chromatography Paper 17 CHR	A4, Whatman/ GE Healthcare, München, DE
Immobilon-P Transfer Membrane	0,45 µm, Merck/ Millipore, Darmstadt, DE
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	18x24cm, Roche, Mannheim, DE
Reagiergefäße	1,5ml mit Deckel, Safe Seal, Sarstedt, DE
VWR Tissue Culture Dishes, sterile	35mm, VWR North American, USA

Mullkompressen-Set	10x10 RK/X-Ray, Fuhrmann, DE
Softtubes	0,2 ml, Bioenzym Scientific GmbH, Wien, A
Kapillarspitzen 200 µl Rundkopf	0,5 mm, Biozym Scientific GmbH, DE
Pinzette Dumont Medical Biology Forceps	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Nunc IVF 4-Well Dish	4/Bag, Thermo Scientific, DK
Millicell EZ Pore 4-well-slide	6/Bag, Millipore Corporation, USA
Falcon Tube	15, 50 ml, B. Dickinson, Franklin Lakes, USA
Objektträger SuperFrost/Plus	25 x 75 mm, Langenbrinck, Emmendingen, DE
Deckgläser, Glasdicke 0,13-0,16 mm	24 x 50 mm, Langenbrinck, Emmendingen, DE
Chirurgische Schere gerade	14,5 cm, Aesculap, B. Braun, Melsungen, DE
Pinzette FST	Fine Science Tool, Heidelberg, DE
Spritze	10, 20ml, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Filter CA-S 7 bar max, Whatman	0,2 µm, , GE Healthcare, München, DE
X-Strahl Film-Kassette	15 x 30 cm, Advansta Inc, San Jose, CA, USA

2.4. Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Tabelle 4: Chemikalien, Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller/ Ort
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
NuPage® MES SDS Buffer Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Tris-Glycine SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
NuPAGE MES SDS Running Buffer	Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
Entwickler	AGFA, Mortsel, B
Fixierer	AGFA, Mortsel, B
Ethanol abs.96 Vol. %	Merck, Darmstadt, DE
Milchpulver, Blotting Grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Super Signal West Femto	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Re-blot Plus Strong Solution	Merck/ Millipore, Darmstadt, DE

RIPA Buffer	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
PBS-TWEEN Tablets	Calbiochem, Merck/ Millipore, Darmstadt, DE
Beta-Mercaptoethanol	Stratagene, San Diego, CA, USA
Western Sure ECL Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Roti-Load 1 (4fach-Konz.)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Normal Goat Serum	Jackson Immuno Research Lab., USA
Fetales Bovines Serum (FKS)	Merck Biochrom, Darmstadt, DE
Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, CH
Insulin-like growth factor I	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Penicillin G Sodium Salt	Merck Biochrom, Darmstadt, DE
D-(+)-Glucose solution	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Elektrolyt-Infusionslösung mit Glukose	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, DE
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM/F12)	Gibco® by Life technologies™, UK
PBS Tabletten (0,01 M)	Gibco® by Life technologies™, UK
Natriumchlorid Pulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Clear Mount Mounting Solution	Novex by Life technologies,USA
Tissue Freezing Medium, Einbettmedium	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, DE
Formalin 10%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Triton X 100	Fluka, Biochemika Sigma-Alchrich, DE
Saccharose	Merck, Darmstadt, DE
EDTA 20%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Cisplatin-CAS 15663-27-1	Calbiochem, Merck, Darmstadt, DE
ProLong Gold antifade reagent	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, USA
DAPI-Farbstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Alexa Fluor 594 Phalloidin, Farbstoff	Molecular Probes by Life Technologies,USA
Alexa Fluor 488 Phalloidin, Farbstoff	Molecular Probes by Life Technologies,USA
Toluidinblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Avidin Conjugat, Alexa Fluor 488, Farbstoff	Invitrogen by Life technologies™, USA

2.5. Antikörper

2.5.1. Primär- und Sekundärantikörper

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den unten stehenden Tabellen aufgeführt. Die Antikörperkonzentrationen wurden vor den Experimenten optimiert. Das Minuszeichen bedeutet, dass Primär- oder Sekundärantikörper für den Western Blot oder die Immunfluoreszenzfärbung nicht geeignet sind.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.

Bezeichnung	Beschreibung/ Isotyp	Herkunft	Katalog-Nr.	VF im WB [μ l]	VF in IF [μ l]
Anti-CD45 [MRC OX-1]	Mouse monoclonal/IgG1	Abcam	ab33923	-	1:100
Anti-CD11b (OX-42)/ ITGAM	Mouse monoclonal/IgG2a	Thermo Scientific	MA1-81606	-	1:100
Anti-CD68 [KP1]	Mouse monoclonal/ IgG1	Abcam	ab955	1:500	1:100
Anti-CD117/c-Kit	Rabbit polyclonal/IgG	Thermo Scientific	PA5-16770	1:500	1:100
Anti- β -Actin	Mouse monoclonal/ IgG	Sigma-Aldrich	A5441	1:10.000	-

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Konjugate	Herkunft	Katalog-Nr.	VF im WB [μ l]	VF in IF [μ l]
Goat anti-Mouse	Alexa Fluor®488	Thermo Scientific	A 11001	-	1:400
Goat anti-Mouse	Alexa Fluor®594	Thermo Scientific	A11005	-	1:600
Goat anti-Rabbit	Alexa Fluor 488™	Thermo Scientific	A11034	-	1:400
Goat anti-Rabbit	Alexa Fluor 594™	Thermo Scientific	R37117	-	1:300
Goat anti-Rabbit	DyLight®594	Thermo Scientific	A11037	-	1:500
Goat anti-Mouse	HRP	Promega	W4021	1:5.000	-
Goat anti-Rabbit	HRP	Promega	W4011	1:5.000	-

2.6. Software und Internet

Tabelle 7: Software.

Anwendung	Bezeichnung	Hersteller
Photometer/BCA Messungen	Soft Max Pro v5	Molecular Devices, USA
Scannen der Röntgen-Filme	MP Navigator-CanoScan LiDE200	Canon, Ota, J
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop Elm.14, ImageJ	Adobe Inc., Wayne Rasband, USA
Literaturverwaltung	Mendeley	RELX Group, London, UK
Proteindichtemessung	Gel Scan Pro V.6.0	BioSciTec GmbH, Frankfurt am Main, DE
Daten-Analyse	Office 2013/2016 Professional Plus	Microsoft Inc., USA
Epifluoreszenzmikroskopie	EVOS FL Cell Imaging System	Thermo Scientific GmbH, DE
Konfokalmikroskopie	Leica 2017	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Statistik	Sigma Plot 13.0	Systat Software GmbH, Erkrath, DE

2.7. Präparation der Cochleae der Wistar-Ratten

2.7.1. Organotypische Kultur des Corti-Organs

Die membranösen Cochleae der Wistar-Ratten im Alter vom 1. bis 9. postnatalen Entwicklungstag wurden mit der Präparationsmethode nach Sobkowicz durchgeführt (Sobkowicz et al., 1993). An jedem Versuchstag wurden Cochleae von vier bis acht Versuchstieren präpariert. Um einer Exikose vorzubeugen injizierte man 150 µl Elektrolyt-Glucose-Lösung (ionosteril) in die Nackenfalte der Ratten. Anschließend wurden die Versuchstiere in einer Styroporbox mit einer Vorwärmtemperatur von zirka 37 °C gelagert. Lieferscheine und Geburtsdaten wurden dokumentiert.

Mit Hilfe einer chirurgischen Schere sind die Versuchstiere dekapitiert worden. Die Schädelhaut wurde mit 70%-iger Ethanol-Lösung desinfiziert. Und die Haut und Kopfschwarte vom Schädelknochen gelöst und mit einem sagittalen Schnitt getrennt. Der Schädel wird als dann, ausgehend von der Crista occipitalis externa, entlang der Sutura sagittalis, aufgeschnitten. Das Gehirn wurde aus der Schädelhöhle entfernt, um

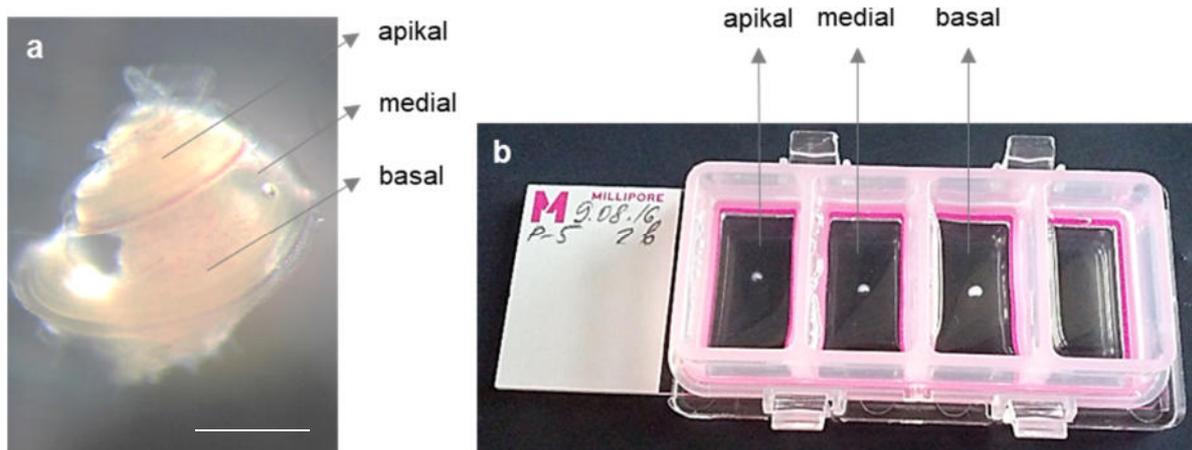


Abb. 2: Cochlea der Wistar-Ratte, postnataler Entwicklungstag 5 (pT5); a: nach der Präparation aus der knöchernen Kapsel, ohne Stria vascularis, Maßstab: 500 μ m, **b:** Millicell EZ Pore 4-Well-Slide auf einem Objektträger (25 x 75 mm), Cochlea nach Auftrennung in ein apikales, mediales und basales Explantat; Quelle: eigene Darstellung.

die Pars petrosa ossis temporalis freizulegen. Der Komplex aus Meatus acusticus externus, Recessus parafloccularis und Meatus acusticus internus wird entnommen. Beide Felsenbeine wurden in eine 30 mm-Petrischale auf 4°C abgekühlte DMEM-Lösung überführt. Die vollständige Präparation der Cochleae wurde unter dem Stereomikroskop in achtfacher Vergrößerung unter der Sterilbank durchgeführt. Alle angewendeten Instrumente zur Grob- und Feinpräparation wurden vor der Präparation mit einer 70%igen Ethanollösung desinfiziert. Das Vestibularorgan, Membrana tympani, Anulus fibrosus, die Gehörknöchelchen Stapes, Incus und Malleus wurden entfernt. Sodann wurde die knorpelige Kapsel der Wistar-Ratten entfernt, nachdem die freigelegten Cochleae zunächst in eine weitere Petrischale, gefüllt mit DMEM/F-12 (1:1) (1X)-Lösung (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 Nutrient Mixture (Ham), überführt wurden. In einem weiteren Schritt wurden Stria vascularis und Teile des Modiolus entfernt. Die noch vollständig aufgerollte membranöse Cochlea (Abb. 2a) wurde entrollt und in ihr apikales, mediales und basales Explantat geteilt. Jedes Explantat ist praktisch eine Einzelwindung der Cochlea mit Anteilen des Modiolus, Limbus spirale und dem Corti-Organ mit Sinnes- und Stützzellen.

Die Cochlea-Explantate sind dann in eine sterile 4-Well-Kulturplatte oder in ein Millicell EZ Slide 4 Well Glas mit einem Zellkulturmedium übertragen worden (Abb. 2b). Eine 24-stündige Inkubationszeit in einem Inkubator (Sanyo CO₂-Inkubator, MCO-16AIC, Moriguchi, Japan) unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) wurde durchgeführt, um dem Gewebe Zeit zur Regeneration zu geben.

2.7.2. Zellkulturmedium

Das eingesetzte Cochlea-Zellkulturmedium entspricht im Grundsatz dem von Löwenheim (1999) verwendeten Kulturmedium, welches vor jedem neuen Experiment frisch angesetzt wurde. Das Kulturmedium beinhaltete ein fetales Kälberserum, Glukose (45%), ein Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement, Penicillin G und IGF-1.

2.7.3. Herstellung von Gefrierschnitten/ Kryoschnitten

Kryoschnittfärbung erlaubt die Lokalisation der Immunzellen in der gesamten Cochlea. Die Felsenbeine (Partes petrosae) der Wistar-Ratten von pT 1, 3, 5, 7, 9 und 30 wurden untersucht. Als Positivkontrolle sind Thymus und Milz denselben Versuchstieren entnommen worden, um zu überprüfen welche Antikörper in welcher Verdünnung am besten verwendet werden können.

Nach der Dekapitation wurde zunächst die Kopfschwarte, die funktionelle Einheit von Haut, Unterhaut und Galea aponeurotica, Schädelkalotte und Gehirnteile entfernt. Nach einer 45-minütigen Fixierung in 4% Formaldehyd wurden die Gewebe zuerst in einem 15%-igen und danach in einem 30%-igen Saccharose-Medium zur Entwässerung des knöchernen Gewebes inkubiert. Lediglich die Schädel der Wistar-Ratten des 7., 9. und 30. Entwicklungstages postnatal, sind nach der Fixierung noch in eine 20%ige EDTA-Lösung für 48 Stunden zur Entkalkung gegeben worden.

Der präparierte Schädel wurde mit der Schädelbasis jeweils auf dem Boden einer selbstangefertigten Aluminiumfolienschachtel (3 x 2 x 1,5 cm) positioniert. Zuvor wurde der Boden bereits mit einem Tissue Tek O.C.T.-Medium bedeckt. Der untere Teil der Aluminiumform wurde vorsichtig in flüssigen Stickstoff eingetaucht, um das Präparat in der Form zu stabilisieren. Mit demselben Medium wurde nunmehr im Wechsel mit dem Stickstoff-Gefrierprozess nachtitriert, bis das Gewebe ohne Lufteinschluss völlig bedeckt war. Bis zum Schneiden der Kryoschnitte wurden die eingebetteten Schädel auf Trockeneis zwischengelagert und bei -80°C gelagert.

Vor dem Vorgang des Schneidens wurden die im Tissue Tek O.C.T.-Medium eingebetteten Schädel, Thymi und Milzen der Wistar-Ratten für ein bis zwei Stunden im Kryotom (Cryostat) gelagert, damit sie sich an die Kammertemperatur anpassen konnten. Die 7-10 µm dicken Kryoschnitte wurden falten- und blasenfrei bei einer Gewebeprobentemperatur von -15°C bis -19°C hergestellt. Direkt nach dem Schneidevorgang wurden die Gefrierschnitte auf beschichteten Superfrost-Plus-

Objektträger aufgezogen und bis zur Immunfluoreszenz- oder histologischen Färbung bei -20°C aufbewahrt.

2.8. Cisplatin-Behandlung der Cochlea-Explantate

Das Cisplatin (Cis-Diammineplatinum(II)-dichlorid) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, um eine Konzentration von 100 mg/ml zu erreichen. Danach wurde eine Cisplatin-haltige Stammlösung mit einer Konzentration von 3,33 mM (1 mg/ml) hergestellt. Zur Herstellung der Cisplatin-Lösungen zu den entsprechenden Endkonzentrationen wurde Stammlösung mit Cochlea-Zellkulturmedium vermischt.

Für Ermittlung der LD_{50} -Konzentration von Cisplatin wurden die Cochlea-Explantate postnataler Wistar-Ratten des 5. Entwicklungstages (pT5) in den 4-Well-Platten für 24 Stunden mit Cisplatin in Konzentrationen von 10 μM , 20 μM und 40 μM behandelt. Anschließend wurden die Ansätze erneut für 24 Stunden in den Inkubator gestellt und hiernach miteinander verglichen. Als Negativ-Kontrollen dienten Explantate, die ohne Cisplatin kultiviert wurden.

Als LD_{50} -Konzentration ist letztlich die Cisplatin-Konzentration von 20 μM ausgewählt worden, weil die IHZ und ÄHZ in den basalen Explantaten zur Hälfte beschädigt waren. „Optimal“ war in diesem Kontext ein sichtbarer, aber nicht vollständiger Schaden an IHZ und ÄHZ. Als Negativ-Kontrolle dienten wiederum Explantate in einem Zellkulturmedium ohne Cisplatin-Zusatz.

2.9. Immunfluoreszenz und Zellzahlbestimmung

2.9.1. Immunfluoreszenzfärbung

Für die indirekte Markierung wird ein unkonjugierter Primärantikörper benötigt, der an das Antigen bindet. Mit dem Fluorochrom konjugierte Sekundärantikörper werden hinzugefügt. Die Bindung mehrerer markierter Sekundärantikörper an die Antigen Primärantikörper-Einheit führt zu einer verbesserten Visualisierung durch Signalverstärkung.

Tabelle 8: Exzitations- und Emissionsmaxima der benutzen Alexa-Fluorochrome.

Fluorochrom	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum	Emissionsfarbe
Alexa Fluor® 488	495 nm	519 nm	grün
Alexa Fluor® 594	590 nm	617 nm	rot
DAPI	405 nm	420 nm	blau

Mit dem Epifluoreszenz- und Konfokalmikroskop können die Fluorochrome durch Anregung mit definierter Wellenlänge (Tabelle 8) detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops EVOS mit den Objektiven 10x, 20x, 40x eine Vielfalt von digitalen Bildern von Explantaten und Kryoschnitten der Cochleae betrachtet, analysiert, ausgewertet und digital gespeichert. Eine Zellzählung von inneren und äußeren Haarzellen sowie Immunzellen wurde mit dem Objektiv unter 400-facher Vergrößerung durchgeführt.

Außerdem sind mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SPT5 (Leica DM 6000) digitale, konfokale Bilder der immunfluoreszenz-gefärbten Proben erzeugt worden. Dabei wurden die angefertigten Objektträger invers mikroskopiert und Öl-Objektive mit 400- und 630-facher Vergrößerung für eine noch bessere Auflösung und Darstellung von Gewebe und Zellen im 3D-Format eingesetzt. Die Darstellung und Auswertung der Signale des Konfokalmikroskops ist mithilfe der Leica Software (Version 2017) ermöglicht worden.

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ sind die erzeugten Bilder beider Mikroskope rekonstruiert, mit RGB pseudocoloriert und bearbeitet (Zuschnitt, Kontraständerung etc.) worden.

Zum Nachweis und zur Analyse der Immunzellen des Innenohres wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Dabei handelte es sich um die primären Antikörper CD45, CD11b, CD68 und CD117/c-Kit. Bevor mit den Hauptexperimenten begonnen werden konnte, wurden die Primärantikörper-Konzentrationen in Vorversuchen optimiert um optimale Verdünnung zu erreichen. Bei jedem Experiment wurde auch eine ungefärbte Kontrolle (Reaktionspufferlösungen ohne Primärantikörper) mitgeführt, um die unspezifische Fluoreszenz des Gewebes ermitteln zu können.

Zunächst wurden die Explantate für 24 Stunden im cochleären Zellkulturmedium kultiviert und danach mit 10% Formaldehyd-Lösung bei RT für 40 Minuten fixiert. Hiernach wurden die Explantate einmal kurz mit 0,01 M PBS-Lösung und drei Mal für 10 Minuten in 0,01 M PBS-Bädern gewaschen. Um die Explantate zu permeabilisieren, sind diese in einer PBS-Spülpuffer-Lösung (200 ml PBS mit 0,5 ml 0,25%-Triton X-100) inkubiert worden. Nach einem erneuten PBS-Waschschritt wurden unspezifische Epitope mit Präinkubationslösung aus 4 % normal goat-Serum in 0,01 M PBS-Lösung 60 Minuten lang bei RT blockiert. Das verwendete Serum musste hierbei mit der Spezies des Sekundärantikörpers übereinstimmen. Die primären Antikörper wurden in

einem Reaktionspuffer (250 ml 0,01 M-PBS-Lösung mit 250 µl 0,1%-Triton X-100, 2% NaCl (0,34 M), 1% NGS) verdünnt, wobei 30 µl dieser Lösung, mit je einem OC-Explantat, einpipettiert und anschließend entweder für 30 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert wurden.

Dann wurden Sekundärantikörper (anti-Mouse oder anti-Rabbit) passend zum Primärantikörper in demselben Reaktionspuffer wie oben beschrieben verdünnt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 14.000 rpm, wurden von dem Überstand je 30 µl Antikörper-Lösung auf jedes Explantat gegeben, bei RT für 60 Minuten im Dunkeln inkubiert, in einer PBS-Lösung gewaschen und anschließend drei Mal für 10 Minuten in einem 0,01 M-PBS-Bad belassen. Zur Färbung der Kerne nutzte man DAPI (1:10.000). Zur Färbung von Mastozyten wurde Avidin Alexa Fluor 488 (1:400) für das Anfärben von Heparin-Granula der Mastzellen verwendet. Beides wurde in einer 0,01 M PBS-Lösung, die vorher den Explantaten zugeführt worden ist, bei RT für 15 Minuten inkubiert. Nach der Färbung wurden direkt 20 µl des Prolong Gold Antifade Mountant, ein flüssiges Eindeckmittel, auf einen Objektträger pipettiert und das Explantat appliziert. Mit einem Deckgläschen wurde der Objektträger abgedeckt und eine Zeit lang ausgehärtet, um die Explantate schlussendlich zur längerfristigen Lagerung bei 4°C in den Kühlschrank zu geben.

Nach demselben Prinzip wurden die Gefrierschnitte der transversal geschnittenen Cochleae immunfluoreszent gefärbt.

2.9.2. Darstellung der Haarzellen mittels Phalloidin-Färbung

Die Färbung von IHZ und ÄHZ wurde mittels Phalloidin durchgeführt. Die Stammlösung Alexa Fluor 594 Phalloidin [6,6 µM] wurde in einer 0,01 M PBS-Lösung (1:40) verdünnt. 30 µl Phalloidin-Lösung wurden in jedes Präparat pipettiert. Nach 40 min Inkubation wurden die Explantate mit 0,01 M PBS-Lösung gewaschen.

2.9.3. Zellzahlbestimmung in organotypischen Kulturen

2.9.3.1. Bestimmung der Zellzahl der Haarzellen nach Phalloidin-Färbung

Stereozilien und Kutikularplatten innerer und äußerer Haarzellen sind durch einen hohen F-Aktin Gehalt gekennzeichnet. Mit dem Farbstoff Phalloidin lassen sich die filamentären F-Aktin-Stränge anfärben, so dass die Stereozilien als ein geordnetes Muster in jeder Haarzelle zu erkennen sind. Auffälligkeiten oder Unordnung im charakteristischen F-Aktinmuster deuten auf Schädigung der Haarzellen. Die Zählung

der Haarzellen in den Corti-Organen der Wistar-Ratten erfolgte nach einem etablierten Vorgehen (standardisiertes Zählprotokoll). Drei repräsentative Abschnitte mit jeweils einer Länge von 100 µm wurden gezählt, um dann mittels einer Maßstabsskala die drei ÄHZ-Reihen und eine IHZ-Reihe systematisch auszuzählen. Bereiche mit Haarzellen, die durch die Präparation selbst geschädigt wurden, blieben unberücksichtigt. Innere und äußere Haarzellen sind nach intakt, beschädigt oder fehlend kategorisiert worden. Für die statistische Auswertung wurden nur intakte Haarzellen als relevant betrachtet. Beim Cisplatin-Ansatz diente die Cochlea einer Seite als Kontrollprobe, die andere Cochlea wurde zur Untersuchung der Haarzellschädigung nach dem Einfluss von ototoxischen Cisplatin benutzt.

2.9.3.2. Bestimmung der Zellzahl intakter und degranulierter Mastzellen

Um die Anzahl der im Gewebe enthaltenen Mastzellen bestimmen zu können wurden mittels Avidin-Alexa Fluor 488 intrazelluläre Heparin-Granula sichtbar gemacht. Man kann grob drei verschiedene Stadien unterscheiden, wie die Granula in Mastzellen vorliegen (Abb. 3). Für die Zählung wurden ausschließlich intakte und degranulierte Mastzellen ausgewertet, nicht aber vollständig desintegrierte Mastzellen, deren Granula diffus vorlagen, da es in diesem Fall nicht möglich war anhand der Zellmembrankontur eine Zelle klar zu erkennen.

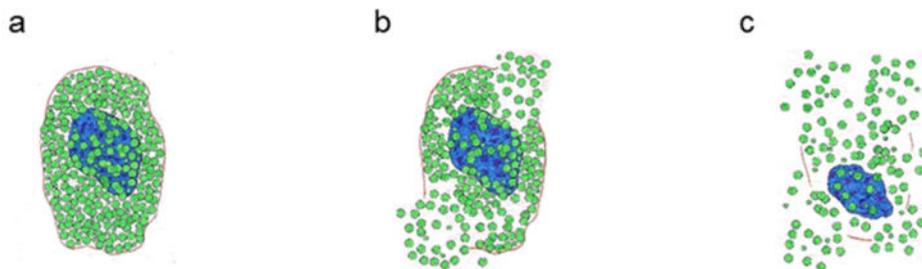


Abb. 3: Schematische Darstellung der Mastzellen, Degranulationsstadien der organotypischen Cochlea-Kulturen (Limbus, Modiolus); grün: Heparin-Granula; blau: Zellkern; **a**: intakt: ganze Zelle, mit sichtbarer Zellmembran; **b**: degranuliert: leichte Degranulation der Heparin-Granula aus der Mastzelle; **c**: diffus: Granula verstreut, ohne Zellmembrankontur; Quelle: eigene Darstellung.

2.9.3.3. Quantitative Ermittlung der Immunzellzahl in der Cochlea

Nach der Immunfluoreszenzfärbung organotypischer Corti-Organ-Kulturen von Wistar-Ratten des Entwicklungstages 1, 3, 5, 7 und 9 postnatal unter physiologischen Bedingungen wurden alle spezifisch (CD45+, CD11b+, CD68+, Avidin+) gefärbten Immunzellen in den apikalen, medialen und basalen Cochlea-Explantaten, die in Größe und Ausdehnung nahezu identisch präpariert wurden (Länge: 2.000 µm, Breite:

1000 µm), gezählt. Am 30. Entwicklungstag wurden die Kulturen nur mit dem CD45-AK gefärbt.

Jedes zu untersuchte apikale, mediale und basale Cochlea-Explantat wurde in fünf übereinander liegenden, horizontalen Ebenen innerhalb der Scala media hinsichtlich des Vorkommens von Immunzellen ausgezählt. Die erste ausgewählte Ebene liegt im oberen Bereich, an der Oberfläche des Cochlea-Explantats in Richtung Scala vestibuli (Stratum superficiale 1), aber noch in der Scala media. Die zweite, dritte und vierte Ebene (Stratum profundum 1, 2, 3) liegen im zentralen Bereich des Cochlea-Explantats (Limbus spiralis, Modiolus) und die fünfte Ebene darunter, auf Höhe der Basilarmembran des Cochlea-Explantats, in Richtung Scala tympani (Stratum superficiale 2).

Jede Horizontalschnitt-Darstellung des Cochlea-Explantates wurde von außen nach innen in vier Zonen gegliedert. Zone I umfasst die innerhalb von 24 Stunden herausgewachsenen Stützzellen (Deiters-, Hensen-, Claudius-Zellen). Zone II enthält innere und äußere Haarzellen. In Zone III befindet sich der Limbus spiralis mit Neurofilamenten. Folglich ist im vierten Zonenbereich (Zone IV) der Modiolus mit Spiralganglienzellen und Neurofilamenten gelegen. Die Stria vascularis wird nicht berücksichtigt, da sie bereits im Zuge der Präparation entfernt worden ist.

In Abb. 4 sind die fünf beschriebenen Ebenen und vier Zonen zum besseren Verständnis schematisch dargestellt. Detektierte Immunzellen sind in den vorhandenen Zonen auf allen fünf untersuchten Gewebe-Ebenen vollständig ausgezählt worden (Four-Zones-Five-Levels-Zählmethode).

Infolge der Präparation und Schnittführungen entstanden traumatisierte, belastete Gewebereiche, die ein neues Ziel für die sich in der Nähe befindenen Immunzellen darstellten und diese hier einwanderten. Diese Immunzell-Anhäufungen werden grundsätzlich nicht gezählt, da sie als Artefakte bewertet werden.

2.10. Histologischer Nachweis von Mastzellen

Die vorbereiteten Cochlea-Explantate und Kryoschnitte der Cochlea wurden für den Nachweis von Mastzellen in 0,1 M PBS-Puffer gewaschen. Für drei Minuten wurde 1% Toluidin Blau-Lösung hinzugegeben. Danach wurden die Proben drei Mal für jeweils 10 Minuten in 0,1 M PBS-Bädern erneut ausgiebig gewaschen. Zur Fixierung auf dem Objektträger wurden 20 µl des Prolong Gold Antifade Mountant aufgetragen und die

gefärbten Explantate mit einem Deckgläschen versiegelt. Schlussendlich erschienen im Präparat die Heparin-Granula der Mastzellen in einer violetten Färbung.

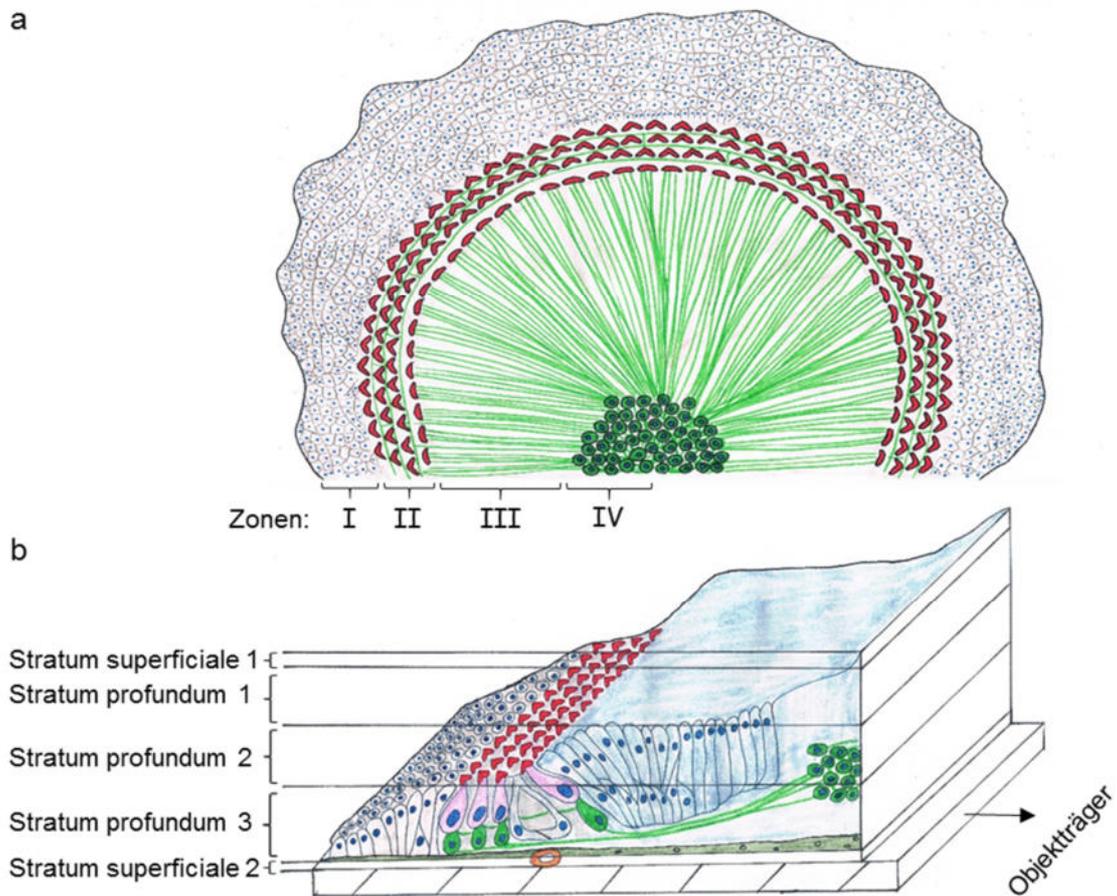


Abb. 4: Schematische Darstellung des Corti-Organs in organotypischer Cochlea-Kultur einer Wistar-Ratte – pT 5, mediales Explantat, nach Immunfluoreszenzfärbung und 24 Stunden Ruhezeit postpräparativ. **a:** Darstellung der Zonen I-IV. Zone I: marginal mit herausgewachsenen Claudius und Hensen's Zellen (blau: ZK); Zone II: drei Reihen von ÄHZ, eine Reihe von IHZ (rot markiert); Zone III: Limbus spiralis mit Neurofilamenten (grün markiert); Zone IV: Modiolus mit Spiralganglionzellen, Neurofilamenten, **b:** Darstellung der Ebenen 1-5. 1. Stratum superficiale 1 (Seite Scala vestibuli), 2.-4. Stratum profundum 1-3, 5. Stratum superficiale 2 mit Vas spirale (Seite Scala tympani); Quelle: eigene Darstellung.

2.11. Western Blot

2.11.1. Proteinisolierung

Für proteinanalytische Bestimmungen wurden frische Proben aus membranösen Cochleae pT1, pT3, pT5, pT7 und pT9 alter Wistar-Ratten extrahiert. Die Stria vascularis wurde entfernt. Als Positivkontrolle dienten Thymus-, und Milzgewebe derselben Versuchstiere gleichen Alters. Danach wurden die Proben in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4 °C für 10 Minuten und bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die

Überstände wurden vom Pellet getrennt und anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen gesammelt und bei -80°C gelagert.

2.11.2. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde mittels Micro BCA Protein Assay Kits bestimmt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Proben 1:20 in steriler isotonischer 0,9%-NaCl-Lösung verdünnt und auf die 96-Well Mikrotiterplatte Doppelbestimmung gegeben. Die Platte wurde bei 37°C im Shaker (300 rpm) für zwei Stunden inkubiert. Je nach Proteinkonzentration im Well, fällt ein violetter Kupferionen-Komplex mit unterschiedlicher Intensität aus. Nach zehnmütigem Abkühlen wurde zunächst die Extinktion mit Hilfe des Spectra Max M2 Photometers bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen, um anschließend mit der Software SoftMax Pro die Proteinkonzentrationen gegen Standard zu ermitteln.

2.11.3. SDS-Page, Blotting und Immundetektion

Nach Herstellung von Arbeitslösungen mit 6-12 µg Proteingehalt (Mixen), die aus den Lysaten, Wasser und 4x Roti-Load Auftragspuffer (2-Mercaptoethanol, 25%) bestanden, wurden die Proteine bei 90°C im Thermomixer 5 min lang denaturiert, die nach Abkühlung, circa 2 min, letztendlich der Elektrophorese zugeführt werden konnten.

Zur Durchführung der Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) wurde ein Tris-Glyzin SDS Puffer und ein Tris-Glyzin Mini Gel mit 15 wells in die Elektrophoresekammer gegeben (Abb. 5). In das erste Well wurde der Marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (250 - 10 kDa) einpipettiert, in die anderen Wells jeweils 24 µl der frisch angesetzten Arbeitslösung mit 6 µg Proteinanteil. Nachdem die Kammer verschlossen wurde, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei einer Spannung von 150 V für circa 90 min lang, anhand ihres Molekulargewichts, bis zur vollständigen Auftrennung des Proteinmarkers.

Im weiteren Verlauf wurden die Proteine in einer Blotting-Kammer, die mit Tris-Glyzin-Blotting-Puffer (10% Ethanol) gefüllt war, bei 300 mA vom SDS-Gel auf eine Transfer-Membran (Blot-Membran: Polyvinylidendifluorid (PVDF), positiv geladen, mit einer Porengröße von 0,45 µm), in 44 min elektrophoretisch übertragen.

Bei allen Arbeitsschritten, die dem Blotting folgten, wurden die Blot-Membranen bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in entsprechenden Plastikboxen mit 30 ml Reagenz gehalten.

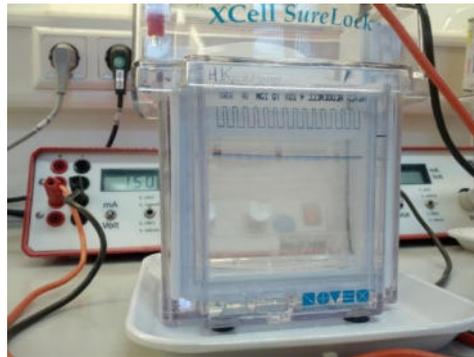


Abb. 5: Western Blot-Verfahren, Elektrophoresekammer: elektrophoretische Auftrennung der Proteine der membranösen Cochlea; Quelle: eigene Darstellung.

Zunächst wurden die Membranen mit entfetteten 5 % Milchpulver in PBS mit 0,1% Tween (Blocking-Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem Blocking-Schritt wurde die Blot-Membran mit den Primärantikörpern anti-CD68 (1:500), anti-CD117/c-Kit (1:500) oder anti- β -Actin (Housekeeping-Protein, 1:10.000), die vorher auch mit 5% Milchpulver in PBS mit 0,1% Tween verdünnt wurden, für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter kontinuierlichem Schwenken inkubiert. Danach wurde die Blot-Membran nochmals drei Mal für 10 Minuten mit PBS, 0,1% Tween gewaschen. Als nächstes wurde eine verdünnten Lösung (5% Milchpulver, in PBS mit 0,1% Tween) mit sekundärem anti-mouse IgG Antikörper (1:5.000) oder anti-rabbit Antikörper (1:3.000) für eine Stunde angewendet mit drei sich anschließenden Waschschritten für jeweils 10 Minuten in PBS mit 0,1% Tween. Anhand der Markerproteine wurde das Molekulargewicht der Proteinbanden bestimmt. Die Proteine wurden mit dem Chemilumineszenz-Verfahren oder dem LICOR Scanverfahren visualisiert.

Im Rahmen des Reblottings wurden die Blot-Membranen für 30 min mit Re-Blot Plus Strong Solution auf einem Rüttler inkubiert und anschließend 5 min in PBS mit 0,1% Tween gewaschen. Primäre und sekundäre Antikörper wurden auf diese Weise von den Membranen entfernt, so dass die Membranen erneut einer Immunodetektion unterzogen werden konnten. Das Reblotting wurde für die gleiche Membran insgesamt zwei Mal durchgeführt.

2.11.3.1. *Visualisierung und Einschätzung des Proteingehalts*

Im Chemilumineszenz-Verfahren lässt man die Blot-Membran in einem ECL-Reagenz oder Femto-Reagenz 5 min einwirken und legt sie im Anschluss in eine Röntgen-Kassette, damit darauf folgend in einer Dunkelkammer die Exposition der Proteine von der Blot-Membran auf einen Chemilumineszenzfilm erfolgen kann und belichtete

Areale durch die Entwicklung des Films sichtbar gemacht werden können. Die Zeitdauer der Exposition wird hierbei den Signalstärken der Proteinbanden entsprechend angepasst. Die entwickelten Filme wurden mit Hilfe des CanonScan LIDE 200 Scanners eingescannt und mit der Analysesoftware GelScan V 5.0 (BIOSCITEC) densitometrisch erfasst. Das heißt, dass die Farbdichte quantitativ gemessen wurde (Farbmenge pro Flächeneinheit). Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel 2013 aufbereitet und mit dem Programm SigmaPlot 13.0 statistisch ausgewertet.

Im Li-COR Verfahren scannte man die Blot-Membran mit dem Li-COR C-DiGit Blot Scanner mit Femto/WS-Lösung (Scan-Zeit: 6 min oder 12 min) ein und wertete die Visualisierungen dann aus.

Zur Auswertung wurden die Intensitätswerte der gesuchten Proteinfractionen durch die Intensitätswerte des anti- β -Aktins geteilt. Das Housekeeping-Protein anti- β -Aktin dient als Ladekontrolle.

2.12. Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten und Erstellung von Box-Whisker-Plots erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Sigma Plot (Systat Software Inc Sigma Plot - Version 13.0). Mindestens sechs Cochleae aus jeder Altersgruppe wurden in die statistische Berechnung aufgenommen.

Der Shapiro-Wilk-Test fand zuerst Anwendung, um sämtliche Daten auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen hin zu analysieren. Falls mehr als zwei Gruppen zu vergleichen waren und Normalverteilung, sowie Gleichheit der Varianzen vorlag, untersuchte man sie mit einer einfachen ANOVA (Equal Variance Test) auf signifikante Unterschiede. Waren die Datensätze nicht normalverteilt oder lag eine Normalverteilung ohne Gleichheit der Varianzen vor, setzte man eine einfache ANOVA für Rangsummen ein (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, Mann-Whitney-Test), um statistisch signifikante Unterschiede zu finden.

Zur Darstellung der Testergebnisse wurden Box-Whisker-Plots ausgewählt. Die Streuung der Daten wird als Interquartilsabstand ($IQR = Q3 - Q1$) gegeben. Die obere Quartilsgrenze $Q3$ liegt bei 75% der mittleren Daten. Die untere Quartilsgrenze $Q1$ repräsentiert 25% der mittleren Verteilung der Daten. Als signifikant galten p -Werte $< 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) und wurden im Diagramm gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, einigen grundlegenden Fragen bezüglich der Anwesenheit und Verteilung von immunologisch relevanten Zelltypen in der gesunden und intakten Cochlea nachzugehen. Insbesondere für die Mastzellen konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, dass sie sich überhaupt im Innenohr der Wistar-Ratte befinden. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe von Cochlea-Explantaten von Wistar-Ratten, die Zellzahl für CD45-, CD11b-, CD68-, CD117/c-Kit- und Avidin-positive Zellen bestimmt. Die Analyse wurde auf apikale, mediale und basale Abschnitte der Cochlea aufgeteilt aber auch in ihrer Gesamtheit ausgewertet. Um Redundanz zu vermeiden, werden hier lediglich Abbildungen basaler Explantate dargestellt. Die statistische Auswertung bezieht sich zum einen auf die Cochlea im Ganzen und zum anderen die drei Cochleaabschnitte apikal, medial und basal. Zusätzlich wurde mittels Kryoschnitttechnik die Lokalisation entsprechender Zelltypen untersucht und mit Western Blot der Proteingehalt der genannten CD-Marker in der Cochlea in Abhängigkeit der postnatalen Entwicklungsstufe der Ratten nachgewiesen. Der Einfluss der ototoxischen Substanz Cisplatin auf die genannten Zellpopulationen, als auch auf die Anzahl der inneren und äußeren Haarzellen, untersucht. Zum besseren Verständnis dienen eine Reihe von der Autorin selbst angefertigte schematische Darstellungen.

Im Folgenden werden die erhaltenen Ergebnisse, aufgeteilt nach untersuchtem Oberflächenmarker, einzeln zusammengefasst.

3.1. Nachweis der CD45-positiven Immunzellen in der Cochlea

3.1.1. Charakterisierung der CD45+ Zellen unter physiologischen Bedingungen

Die Anwesenheit und Verteilung von CD45-positiven Zellen (Leukozyten) innerhalb der vier Zonen des Corti Organs (Abb. 6) wurde für Versuchstiere, die 1, 3, 5, 7, 9 und 30 Tage alt waren, untersucht. Abb. 6 zeigt Übersichten über die vier verschiedenen Zonen des Corti-Organ. Die Verteilung der CD45+ Zellen innerhalb der Zonen in Abhängigkeit des Alters der Ratten wurde untersucht.

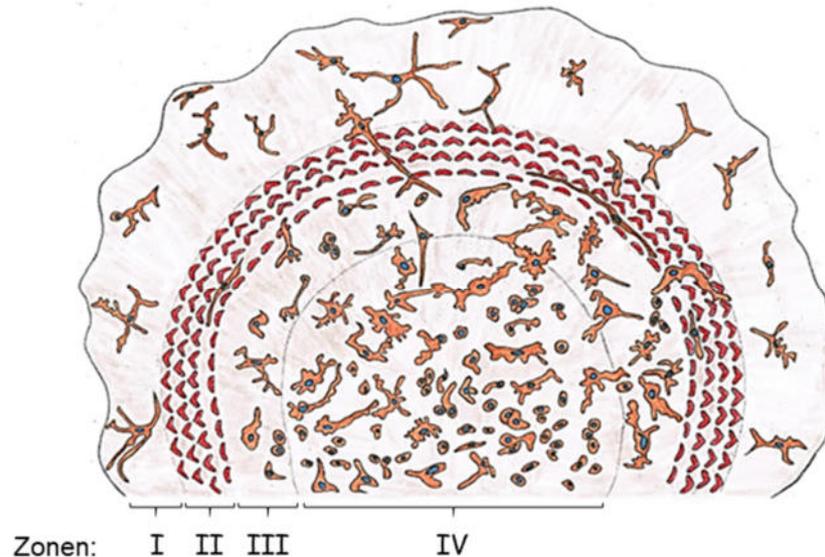


Abb. 6: Schematische Darstellung der Verteilung CD45-positiver Zellen in den Zonen I (herausgewachsene Stützzellen), II (innere und äußere Haarzellen), III (Limbus spirale) und IV (Modiolus) in der OC von Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat (organotypische Kultur). Quelle: eigene Darstellung.

Es wurden für jeden untersuchten Tag der Entwicklung der Wistar-Ratten jeweils 6 Explantate vollständig ausgewertet bezüglich der Anwesenheit von CD45-positiven Zellen. Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD): In ein Tage alten Tieren befanden sich die CD45+ Zellen vor allem in Zone IV (136 ± 81), gefolgt von III (90 ± 56), II (22 ± 8) und I (9 ± 4). In drei Tage alten Tieren befanden sich die CD45+ Zellen vor allem in Zone IV (149 ± 57), gefolgt von III (75 ± 17), II (23 ± 10) und I (17 ± 8). In fünf Tage alten Tieren befanden sich die CD45+ Zellen vor allem in Zone IV (196 ± 58), gefolgt von III (82 ± 26), II (28 ± 14) und I (18 ± 11). In sieben Tage alten Tieren befanden sich die CD45+ Zellen vor allem in Zone IV (99 ± 47), gefolgt von III (78 ± 61), II (25 ± 16) und I (12 ± 9). In neun Tage alten Tieren befanden sich die CD45+ Zellen vor allem in Zone IV (110 ± 31), gefolgt von III (92 ± 33), II (22 ± 11) und I (11 ± 6).

Morphologisch unterscheiden sich die Zellen der Stratum superficiale (Abb. 7g - l) und Stratum profundum 1 - 3 (Abb. 7m - r) kaum an den Tagen 1 bis 9. Im Stratum superficiale sind die Zellen amöboid mit rundlichem Zellkern und länglichen verzweigten Zellkörpern ($7 - 13 \mu\text{m}$). Pseudopodien kann man hier in Typ 1 ($15 - 60 \mu\text{m}$) und Typ 2 ($25 - 90 \mu\text{m}$) unterscheiden. In der Stratum profundum, dagegen sind die Zellen mehrheitlich rund bis oval, unverzweigt oder mit kurzen $2 - 4 \mu\text{m}$ langen Pseudopodien und Zellkörpergrößen von $5 - 12 \mu\text{m}$ (Typ 3). Die wenigen detektierten Zellen an pT30 sind für beide Ebenen morphologisch identisch und ähneln Zelltyp 1 und 2.

Die Häufigkeit der drei morphologisch unterscheidbaren CD45-positiven Zelltypen variiert in Abhängigkeit des Alters der Ratte und auch der Lokalisation innerhalb der Cochlea (apikal, medial, basal). Tabelle 9 fasst alle diesbezüglich ausgewerteten Parameter zusammen und Abb. 8 zeigt die statistische Auswertung der ermittelten absoluten Zellzahlen.

Während Zell-Typ 1 und Zell-Typ 2 sich eher an der Oberfläche der Explantate befanden (Stratum superficiale 1), sind in den tieferen Schichten (Stratum profundum 1 - 3), die in der Region des Limbus spiralis und Modiolus liegen, CD45-positive Zellen vom Typ 3 entdeckt worden.

Wie bereits in Abb. 7 zu erkennen, nimmt die Anwesenheit der CD45-positiven Zell-Typen gegen pT30 hin stark ab, Typ 3- und Typ 1-Zellen sind anwesend. Zwischen den apikalen, medialen und basalen Explantaten sind relativ wenige Unterschiede zu erkennen. Dagegen fällt auf, dass sich im Limbus spiralis ausschließlich Zellen des Typ 3 befinden und im Vas spirale cochleae nur Typ 1. In den anderen untersuchten Abschnitten finden sich alle drei Zelltypen (OC, Spiralganglien-Zellen, Modiolus) oder nur Typ 1 und 2 (Hensen- und Claudius-Zellen).

Bei Betrachtung der Verteilung von CD45+ Zellen in der gesamten Cochlea konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden: pT1 (Median = 650,00; IQR = 581), pT3 (Median = 759,50; IQR = 421,50), pT5 (Median = 984,50; IQR = 296), pT7 (Median = 522,50; IQR = 682,50) und pT9 (Median = 671,00; IQR = 271,25). Es liegt keine Normalverteilung vor, * $p < 0,026$, Mann-Whitney Rank Sum Test). (Abb. 8a). Ein identisches Bild ergibt sich für die anteilig im basalen Teil der Cochlea enthaltenen Zellen pT1 (Median = 249,00; IQR = 263), pT3 (Median = 292,00; IQR = 105,25), pT5 (Median = 342,5; IQR = 137,75), pT7 (Median = 160,00; IQR = 290,50), pT9 (Median = 213,5; IQR = 112,75) mit einem signifikanten Abfall der Zellzahl von Tag 5 zu Tag 9. (keine Normalverteilung, $p < 0,026$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (Abb. 8d). Die Anzahl der CD45-positiven Zellen verhält sich im apikalen und medialen Teil invers zu einander. Während sich die Zellzahl im apikalen Teil der Cochlea von Tag 1 - 5 erhöht und dann konstant hoch bleibt pT1 (Median = 191,0; IQR = 63,25); pT3 (Median = 243,5; IQR = 104,25); pT5 (Median = 289,5; IQR = 179,75); pT7 (Median = 213,5; IQR = 296), pT9 (Median = 262,0; IQR = 154,5), fällt sie im medialen Explantat nach Tag 5 um fast die Hälfte und bleibt dann stabil bis Tag 9. pT1 (Median = 229,5; IQR = 265,5),

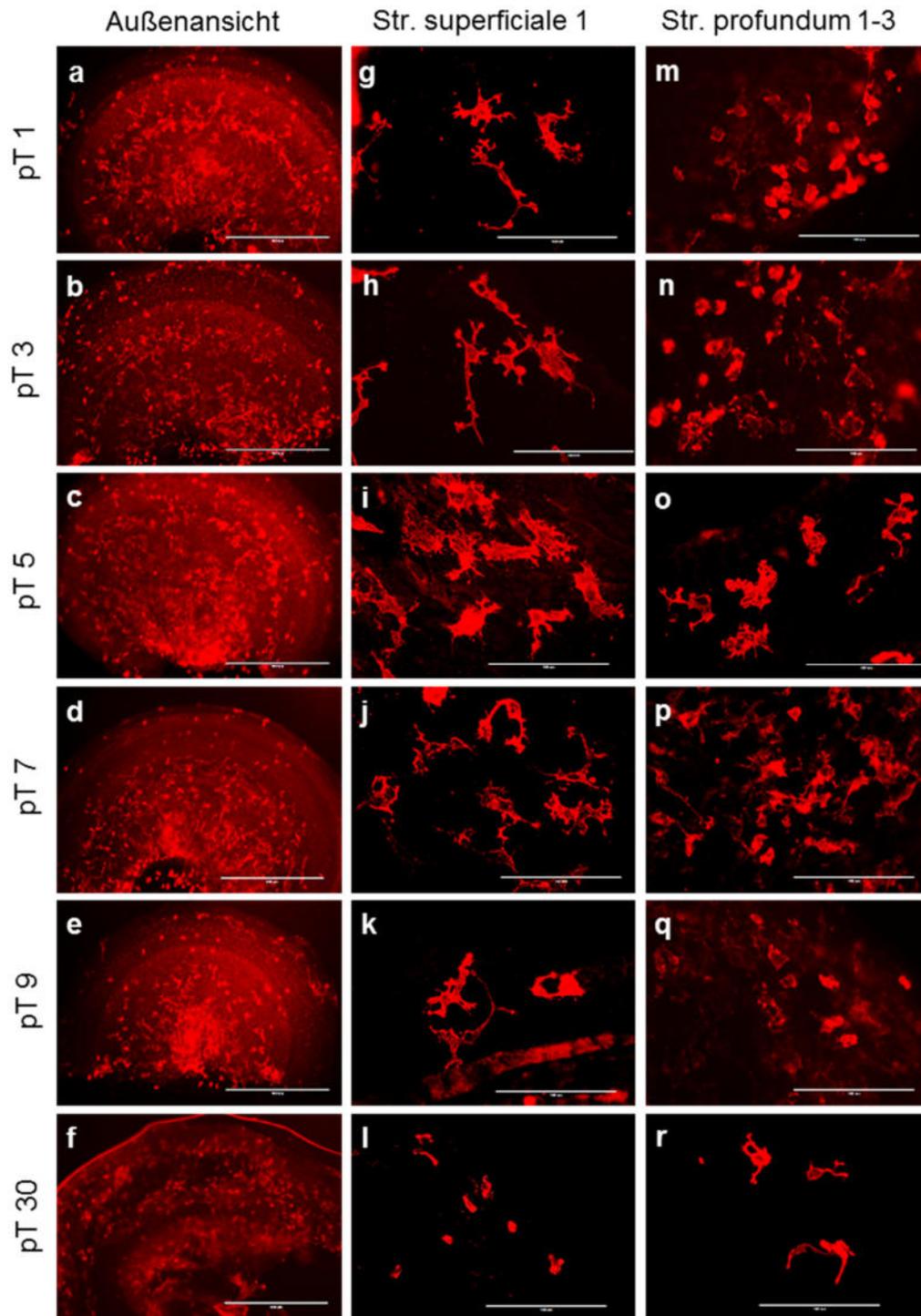
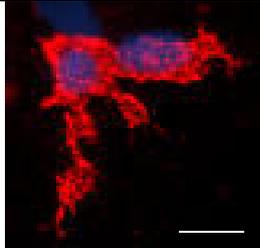
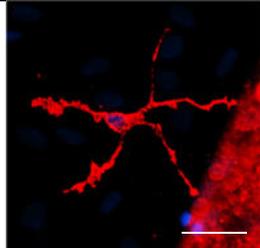
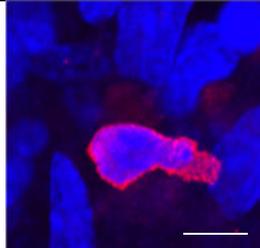


Abb. 7: CD45-positive Zellen, OC der Wistar-Ratten – pT1, pT3, pT5, pT7, pT9, pT30, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, IF-Färbungen – rot: CD45-positive Zellen (Alexa Fluor 594), a-f: Übersicht über Zone I-IV, Maßstab:400 µm, g-l: Stratum superficiale I, Maßstab:100 µm; m-r: Stratum profundum 1-3, Maßstab: 100 µm; Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=6, Kontrolle n=2; pT3 n=6, Kontrolle n=2; pT5 n=6, Kontrolle n=2; pT7 n=6, Kontrolle n=2; pT9 n=6, Kontrolle n=2; pT30 n=4, Kontrolle n=2.

pT3 (Median = 203,5; IQR = 211,75), pT5 (Median = 333,5; IQR = 123), pT7 (Median = 157,5; IQR = 84,75), pT9 (Median = 199,5; IQR = 60,5). Der beschriebene Anstieg ist statistisch signifikant zwischen pT1 und pT5 (* $p < 0,015$) und pT1 und pT9 (** $p < 0,009$).

Tabelle 9: CD45-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea, Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9, pT 30 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden).

Alter/ Zell-Typ	Typ 1	Typ 2	Typ 3						
Maßstab:									
Typ 1 – bis 70 μm									
Typ 2 – bis 90 μm									
Typ 3 – bis 15 μm									
pT 1	++	++	+++						
pT 3	++	++	+++						
pT 5	++	++	+++						
pT 7	++	+	++						
pT 9	++	+	++						
pT 30	+	-	++						
Morphologie									
Zellkörpergrösse	7 - 13 μm	9 - 13 μm	5 - 12 μm						
Pseudopodien (Länge)	ca. 15 - 60 μm	ca. 25 - 90 μm	selten bis 2 - 4 μm						
Zellform	Amöboid	amöboid	rund bis leicht oval						
Kernform	Rundlich	rundlich	rund bis oval						
Lokalisation in der Cochlea (organotypische Kultur)									
Explantate	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal
Corti-Organ (IHZ, ÄHZ)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vas spirale cochleae	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Hensen-Zellen	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Claudius-Zellen	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Limbus spiralis	-	-	-	-	-	-	++	++	++
Spiralganglien-Zellen	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Modiolus	++	++	++	+	+	+	+	+	+

Der Abfall ist statistisch signifikant zwischen pT1 und pT7 (* $p < 0,041$), pT5 und pT7 (** $p < 0,009$) und pT5 und pT9 (** $p < 0,002$). In beiden Fällen, apikal und medial, liegt keine Normalverteilung vor und der Mann-Whitney Rank Sum Test wurde zur Auswertung verwendet.

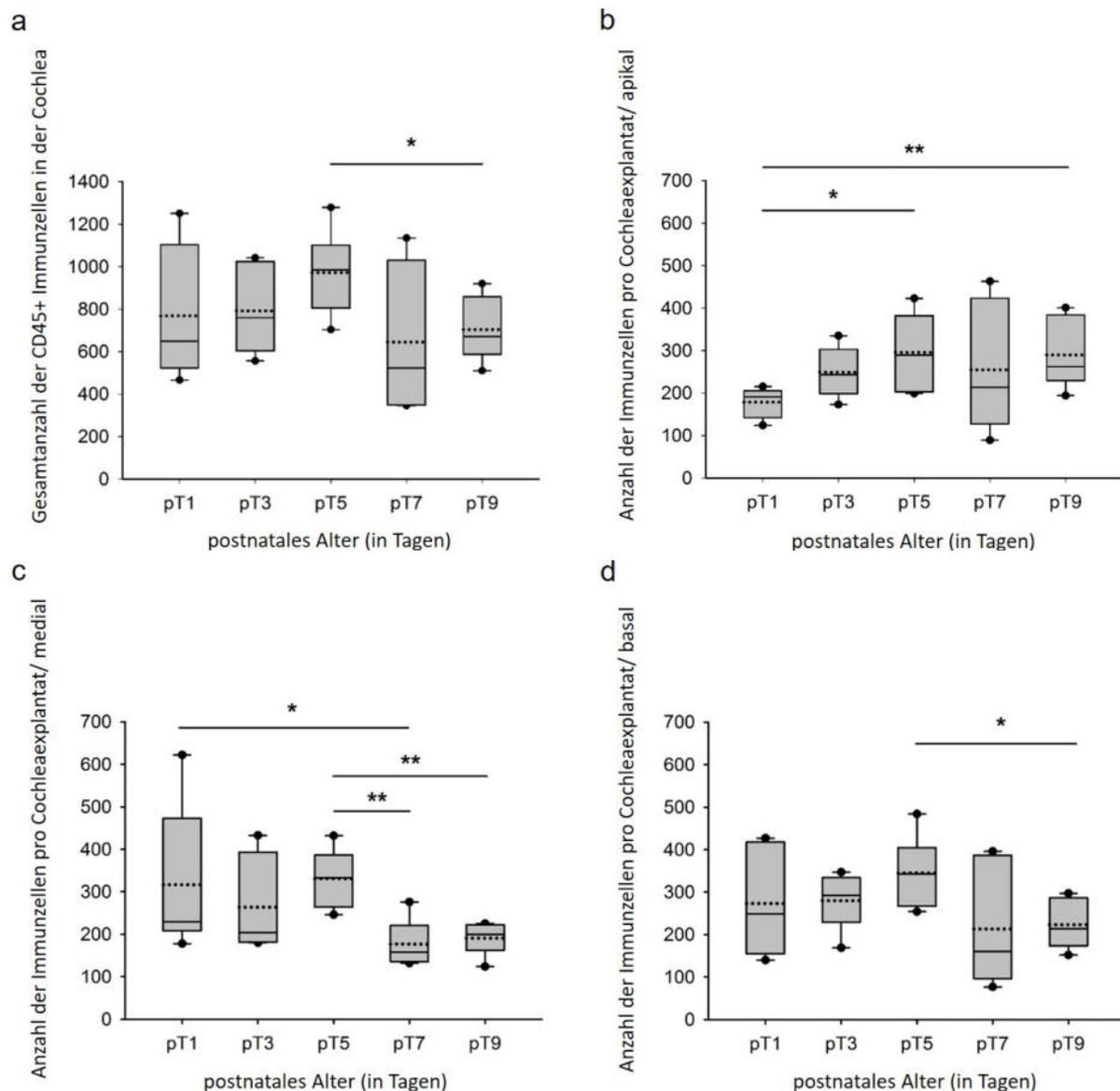


Abb. 8: Anzahl der CD45-positiven Zellen membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich, Box-Whisker-Plots – **a:** Cochlea gesamt, **b:** apikales Explantat, **c:** mediales Explantat, **d:** basales Explantat; Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=6, pT3 n=6, pT5 n=6, pT7 n=6, pT9 n=6. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied).

Betrachtet man die Anwesenheit der Zellen im Verlauf der Entwicklung der Ratte noch detaillierter und bezieht anatomisch unterschiedliche Regionen mit ein, wird erneut der Abfall der CD45-positiven Zellen in allen untersuchten Bereichen erkennbar. Zusätzlich wird aber auch sichtbar, dass in der Reissner Membran, innerhalb der Scala media und dem Corti-Organ, zu keinem Zeitpunkt CD45-positive Zellen vorzukommen scheinen (Tabelle 10). Zur besseren Visualisierung dieser lokalen Unterschiede ist in Abb. 9 ein selbsterstellter Querschnitt durch die Cochlea dargestellt, beispielhaft für pT1.

Tabelle 10: CD45-positive Zellen, Lokalisation in der Cochlea (Kryoschnitte), Wistar-Ratten – n = Zahl: pT1=6, pT3=6, pT5=6, pT7=6, pT9=6, pT30=6 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden).

Altersgruppe	pT1	pT3	pT5	pT7	pT9	pT30
entlang Scala vestibule	+	+	-	-	-	-
Reissner-Membran	-	-	-	-	-	-
innerhalb Scala media	-	-	-	-	-	-
Corti-Organ (IHZ/ÄHZ)	-	-	-	-	-	-
Vas spirale cochleae	+	+	+	+	-	-
Basilarmembran	+	+	+	-	-	-
Cochlea-Gefäße	+	+	+	-	-	-
Stria vascularis	++	++	++	+	+	+
Ligamentum spirale	++	++	++	+	+	-
Limbus spiralis	+++	++	++	++	+	+
Ganglion spirale	++	++	++	++	+	+
Lamina spiralis ossea	++	+	+	-	-	-
Modiolus	+++	++	++	+	+	+
N. cochlearis	+	+	+	+	-	-
entlang Scala tympani	+	+	-	-	-	-

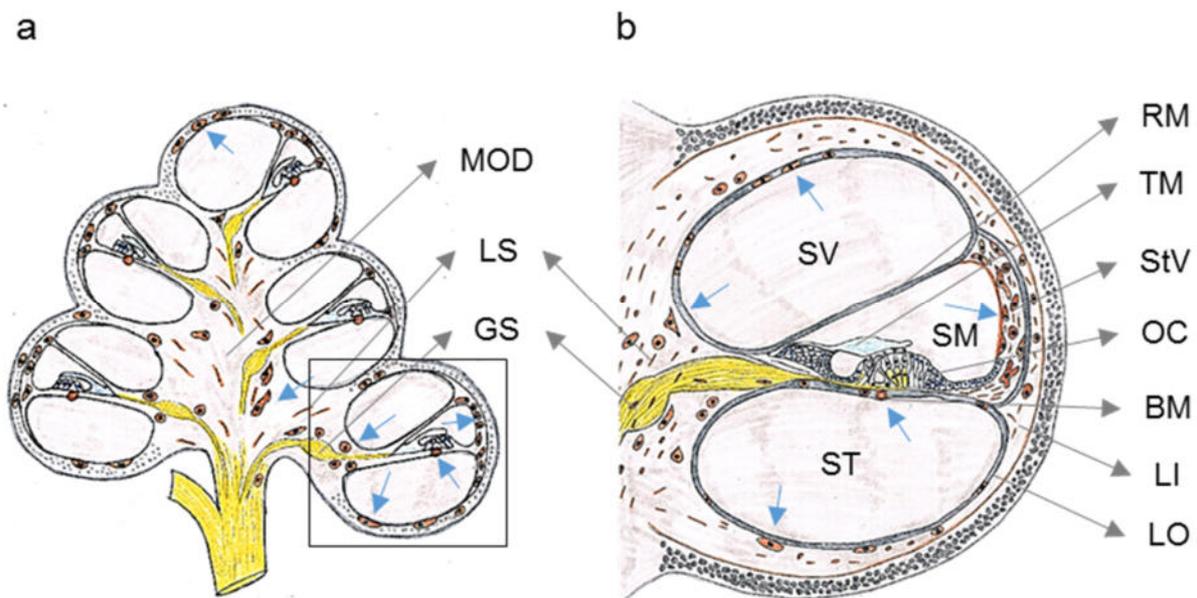


Abb. 9: Schematischer Querschnitt durch Anteile der Cochlea. Verteilung CD45-positiver Zellen, Wistar-Ratten (pT1); a: Querschnitt durch gesamte Cochlea (Vergrößerung x25), **b:** Querschnitt durch Einzelwindung der Cochlea, Hörorgan (Vergrößerung x150); SV: Scala vestibuli, SM: Scala media (Ductus cochlearis), ST: Scala tympani, LI: Ligamentum spirale, MOD: Modiolus, LO: Lamina spiralis ossea, LS: Limbus spiralis, OC: Organ Corti, TM: Tektorialmembran, BM: Basilarmembran mit Vas spirale, RM: Reissner'sche Membran, StV: Stria vascularis, GS: Ganglion spirale; Quellen: eigene Darstellung.

Abb. 10 zeigt die Färbung von CD45-positiven Zellen im Vas spirale der Cochlea drei Tage alter Ratten (Abb. 10a), sowie die Anfärbung von F-Aktin in IHZ/ ÄHZ (Abb. 10b).

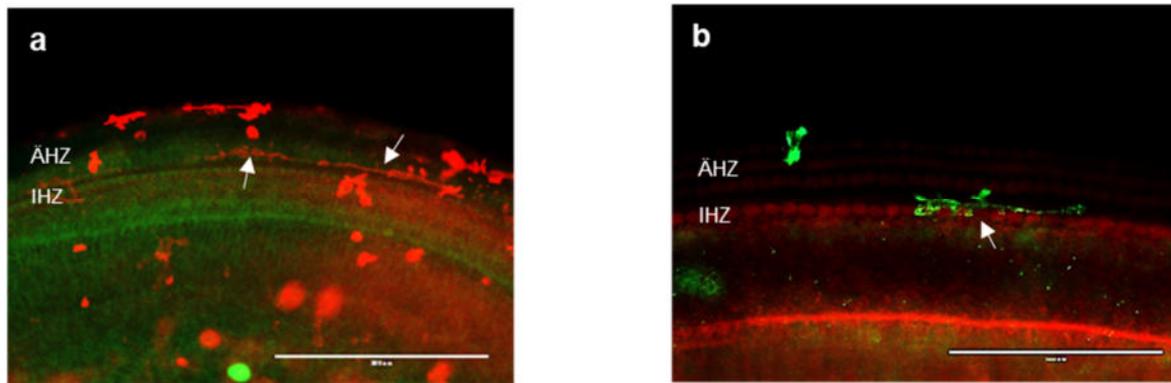


Abb. 10: CD45-positive Zellen im Vas spirale (weiße Pfeile), OC der Wistar-Ratte – pT3, basales Explantat, Färbungen – a: rot: CD45-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung, b: rot: F-Aktin Phalloidin-Färbung von IHZ/ ÄHZ (Alexa Fluor 594) grün: CD45-positive Zellen (Alex Fluor 488); Maßstäbe: a: 200 μ m, b: 100 μ m.

3.2. Nachweis der CD11b-positiven Immunzellen in der Cochlea

3.2.1. Charakterisierung der CD11b+ Zellen unter physiologischen Bedingungen

Die Verteilung von CD11b+ Zellen innerhalb der vier Zonen des Corti-Organs wurde für Tag 1, 3, 5, 7 und 9 postnatal untersucht. CD11b+ Zellen befinden sich vornehmlich im Bereich der herausgewachsenen Stützzellen, dem Limbus spirale und Modiolus (Zone I, III und IV) und nur vereinzelt zwischen den inneren und äußeren Haarzellen (Zone II) (Abb. 11).

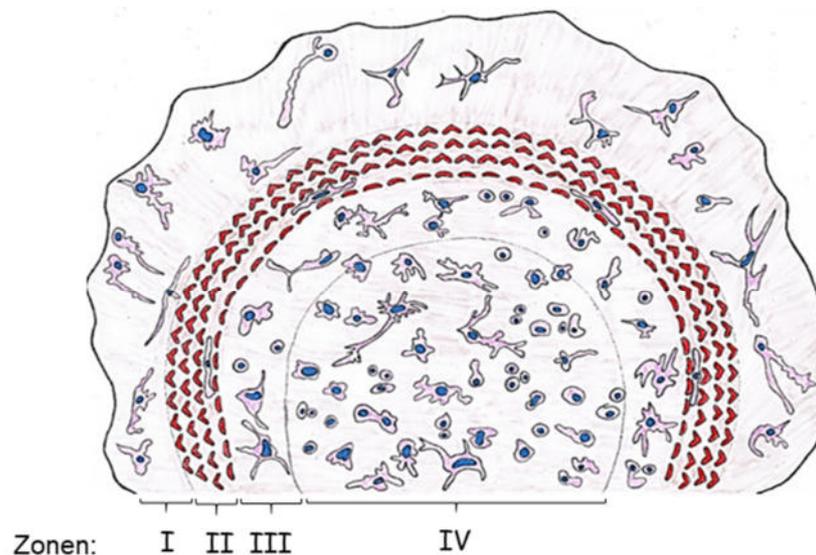


Abb. 11: Schematische Darstellung der Verteilung CD11b-positiver Zellen in den Zonen I (herausgewachsene Stützzellen), II (innere und äußere Haarzellen), III (Limbus spirale) und IV (Modiolus) in der OC von Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat (organotypische Kultur); Quelle: eigene Darstellung.

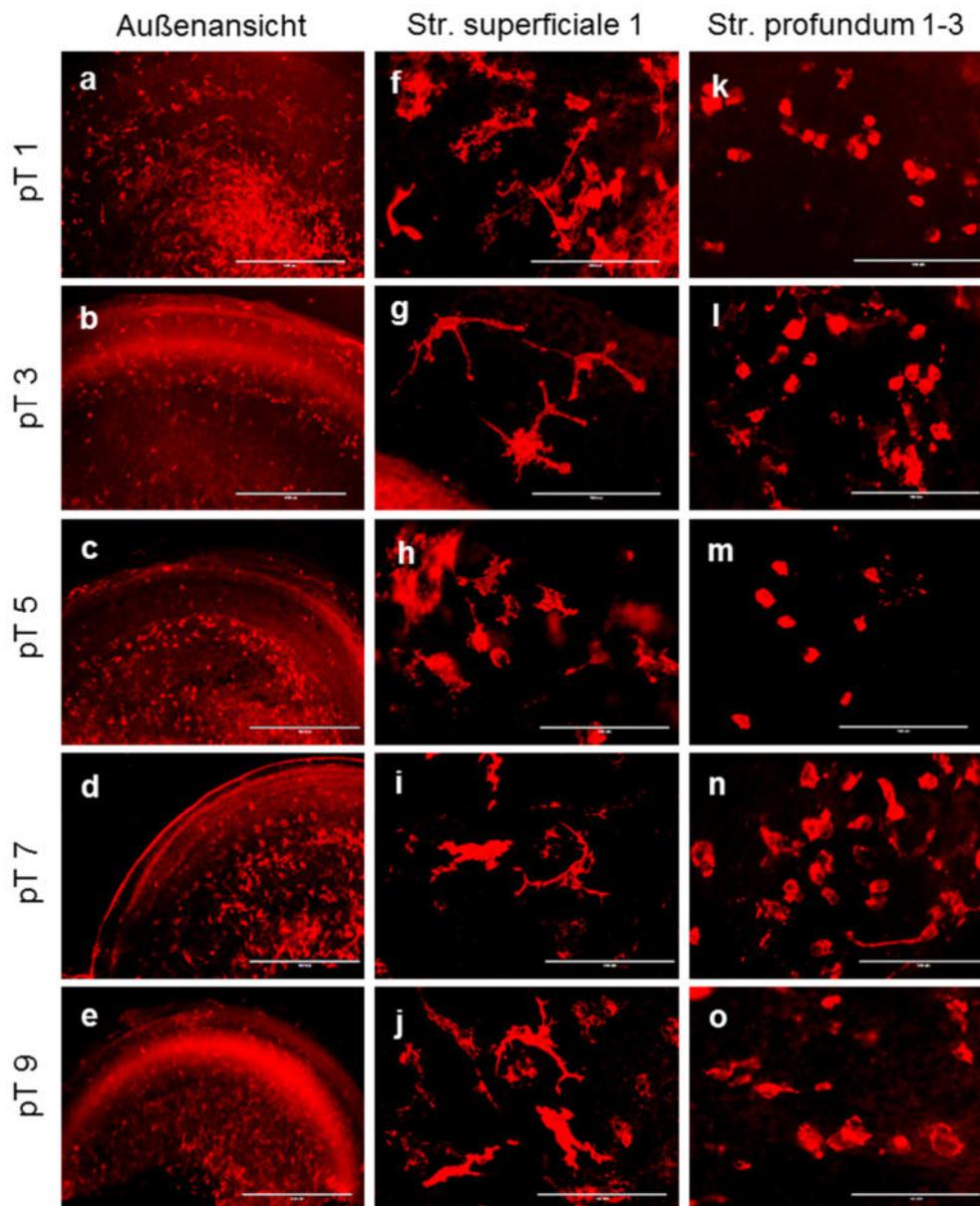


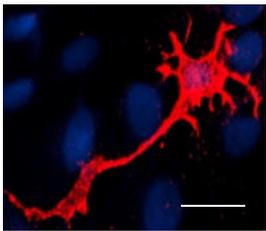
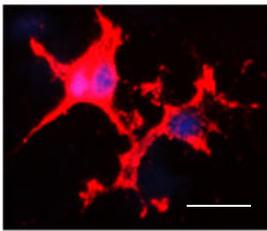
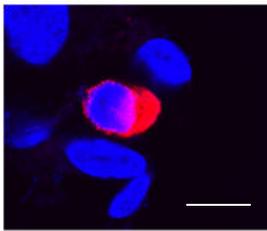
Abb. 12: CD11b-positive Zellen, OC der Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, IF-Färbung – rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), a-e: Übersicht über Zone I-IV, Maßstab:400 μ m, f-j: Stratum superficiale I, Maßstab:100 μ m, k-o: Stratum profundum 1-3, Maßstab:100 μ m; Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=6, Kontrolle n=2; pT3 n=6, Kontrolle n=2; pT5 n=6, Kontrolle n=2; pT7 n=6, Kontrolle n=2; pT9 n=6, Kontrolle n=2.

Abb. 12 zeigt eine Übersicht über die vier verschiedenen Zonen des Schnitts durch das Corti Organ. Die Verteilung der CD11b-positiven Zellen innerhalb der Zonen wurde mittels 6 Explantaten untersucht und vollständig ausgewertet bezüglich der Anwesenheit von CD11b-positiven Zellen. Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD): In ein Tag alten Tieren befanden sich die CD11b+ Zellen vor allem in Zone IV (85 \pm 23), gefolgt von III (67 \pm 20), I (9 \pm 7) und II (14 \pm 4). In drei Tage alten Tieren befanden sich die CD11b+ Zellen vor allem in Zone IV (48 \pm 14), gefolgt von III (35 \pm 15), II (7 \pm 2) und I (3 \pm 3). In fünf Tage alten Tieren befanden sich die CD11b+ Zellen

vor allem in Zone IV (47 ± 21), gefolgt von III (30 ± 16), II (11 ± 2) und I (5 ± 4). In sieben Tage alten Tieren befanden sich die CD11b+ Zellen vor allem in Zone IV (43 ± 26), gefolgt von III (29 ± 23), II (6 ± 2) und I (3 ± 2). In neun Tage alten Tieren befanden sich die CD11b+ Zellen vor allem in Zone IV (44 ± 16), gefolgt von III (23 ± 9), II (8 ± 2) und I (4 ± 4).

Morphologisch unterscheiden sich die Zellen der Stratum superficiale (Abb. 12f - j) und Stratum profundum 1 - 3 (Abb. 12k - o) kaum an den Tagen 1 bis 9. Im Stratum superficiale befinden sich Zellen mit länglichen verzweigten Zellkörpern (10 - 15 μm). Anhand der Länge der Pseudopodien kann man Typ 1 (15 - 100 μm) und Typ 2 (10 - 45 μm) unterscheiden. Im Stratum profundum dagegen sind die Zellen mehrheitlich rund bis leicht oval und unverzweigt mit 5 - 10 μm großen Zellkörpern.

Tabelle 11: CD11b-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea von Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden).

Alter/ Zell-Typ	Typ 1	Typ 2	Typ 3						
<u>Maßstab:</u>									
Typ 1 – bis 70 μm									
Typ 2 – bis 50 μm									
Typ 3 – bis 15 μm									
pT 1	++	++	+++						
pT 3	++	++	+++						
pT 5	++	++	+++						
pT 7	++	++	+++						
pT 9	++	++	+++						
Morphologie									
Zellkörpergröße	10 - 15 μm	10 - 15 μm	5 - 10 μm						
Pseudopodien (Länge)	ca. 15 - 100 μm	ca. 10 - 45 μm	keine						
Zellform	Polyaxial	polyaxial	rund bis leicht oval						
Kernform	rund bis oval	rund bis oval	rund, bohnenförmig						
Lokalisation in der Cochlea (organotypische Kultur)									
Explantate	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal
Corti-Organ (IHZ, ÄHZ)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vas spirale cochleae	++	++	++	-	-	-	-	-	-
Hensen-Zellen	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Claudius-Zellen	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Limbus spiralis	-	-	-	+	+	+	++	++	++
Spiralganglien-Zellen	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Modiolus	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++

Die Anzahl der drei morphologisch unterscheidbaren CD11b-positiven Zelltypen ist, basierend auf den erhobenen Daten, unabhängig vom Alter der Ratte und auch der Lokalisation innerhalb der Cochlea (apikal, medial, basal). Tabelle 11 fasst alle

diesbezüglich ausgewerteten Parameter zusammen und Abb. 13 zeigt die statistische Auswertung der ermittelten absoluten Zellzahlen.

Während Zell-Typ 1 und Zell-Typ 2 sich eher an der Oberfläche der Explantate befanden (Stratum superficiale 1), sind in den tieferen Schichten (Stratum profundum 1 - 3), die in der Region des Limbus spiralis und Modiolus liegen, CD11b-positive Immunzellen vom Typ 3 gefunden worden. Zwischen den Regionen selbst (apikal, medial, basal) sind keine Unterschiede zu erkennen. Dagegen fällt auf, dass sich im Corti-Organ zu keinem Zeitpunkt CD11b-positive Zellen befinden und im Vas spirale cochleae ausschließlich Zellen des Typs 1. In den anderen untersuchten Abschnitten finden sich alle drei Zelltypen (Spiralganglien-Zellen, Modiolus), nur Typ 1 und 2 (Hensen- und Claudius-Zellen) oder nur Typ 2 und 3 (Limbus spiralis).

Betrachtet man die absoluten Zahlenwerte der in der gesamten Cochleae detektierten CD11b-positiven Zellen, ohne Berücksichtigung der Morphologie, dann ergibt sich ein signifikanter Abfall der CD11b-positiven Zellen nach pT1, der anschließend bis pT9 gleich niedrig bleibt pT1 (Median = 533,50; IQR = 112,50), pT3 (Median = 280,00; IQR = 59,00), pT5 (Median = 271,50; IQR = 108,50), pT7 (Median = 232,50; IQR = 120,75), pT9 (Median = 220,00; IQR = 86,75). Ein signifikanter Abfall an CD11b-positiven Zellen besteht somit zwischen pT1 und pT3/ 5/ 7/ 9. (keine Normalverteilung, $p < 0,002$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (Abb. 13a).

Ein identisches Bild ergibt sich für die anteilig im apikalen Teil für pT1 (Median = 162,50; IQR = 36,70); pT3 (Median = 67,00; IQR = 18,00); pT5 (Median = 75,50; IQR = 27,00); pT7 (Median = 44,00; IQR = 13,2), pT9 Median = 54,50; IQR = 27,00); signifikante Unterschiede zwischen pT1 und pT3, pT5, pT7, pT9 mit $p=0,002$, sowie dem medialen Teil der Cochlea enthaltenen Zellen pT1 (Median = 170,00; IQR = 47,75), pT3 (Median = 82,50; IQR = 23,00), pT5 (Median = 83,50; IQR = 41,5), pT7 (Median = 56,50; IQR = 34,00), pT9 (Median = 86,50; IQR = 43,50); signifikante Unterschiede zwischen pT1 und pT3, pT5, pT7, pT9 mit $p = 0,002$ (Abb. 13b + c).

Lediglich für das basale Explantat der Cochlea unterschied sich dieses Muster, Altersgruppe pT1 (Median = 146,00; IQR = 118,00), pT3 (Median = 122,00; IQR = 49,25), pT5 (Median = 126,00; IQR = 102,25), pT7 (Median = 130,00; IQR = 106,00), pT9 (Median = 100,00; IQR = 49,25), da hier die Anzahl der CD11b-positiven Zellen nur langsam von pT1 nach pT9 fällt und zu einem signifikanten Abfall zwischen Tag 1

und Tag 9 führt (keine Normalverteilung, $*p < 0,009$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (Abb. 13d).

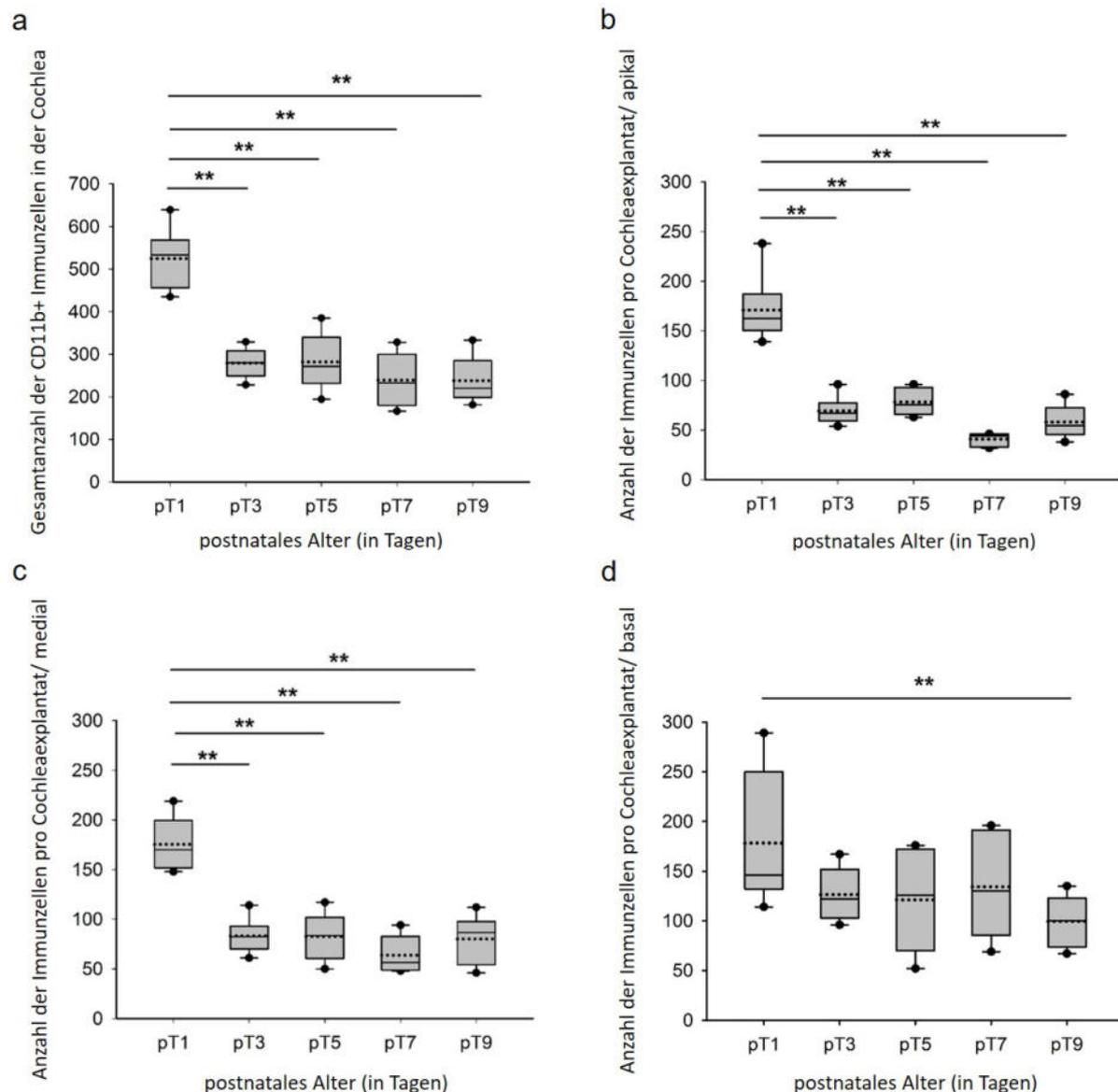


Abb. 13: Anzahl CD11b-positiver Zellen des apikalen, medialen, basalen Explantats membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich; Box-Whisker-Plots – **a:** Cochlea gesamt, **b:** apikales Explantat, **c:** mediales Explantat, **d:** basales Explantat, Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=6, pT3 n=6, pT5 n=6, pT7 n=6, pT9 n=6. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (** $p < 0,01$, statistisch signifikanter Unterschied).

Betrachtet man die Anwesenheit der Zellen im Verlauf der Entwicklung der Ratte noch detaillierter und bezieht anatomisch unterschiedliche Regionen mit ein, wird erneut der Abfall der CD11b-positiven Zellen erkennbar. Zusätzlich wird aber auch sichtbar, dass in der Reissner'schen Membran, innerhalb der Scala media und dem Corti-Organ, zu keinem Zeitpunkt CD11b-positive Zellen vorzukommen scheinen und sie sich an pT30

Tabelle 12: CD11b-positive Zellen, Lokalisation in der Cochlea (Kryoschnitte), Wistar-Ratten – n = Zahl: pT1=6, pT3=6, pT5=6, pT7=6, pT9=6, pT30=6 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden).

Altersgruppe	pT1	pT3	pT5	pT7	pT9	pT30
entlang Scala vestibuli	++	+	+	-	-	-
Reissner-Membran	-	-	-	-	-	-
innerhalb Scala media	-	-	-	-	-	-
Corti-Organ (IHZ/ÄHZ)	-	-	-	-	-	-
Vas spirale cochleae	++	+	+	-	-	-
Basilarmembran	+	+	-	-	-	-
Cochlea-Gefäße	++	++	+	+	-	-
Stria vascularis	++	++	+	+	+	+
Ligamentum spirale	+	+	+	+	-	-
Limbus spiralis	++	++	++	+	-	-
Ganglion spirale	+	+	+	+	+	-
Lamina spiralis ossea	++	++	+	-	-	-
Modiolus	+++	++	++	+	+	+
N. cochlearis	+	+	+	+	-	-
entlang Scala tympani	++	++	+	-	-	-

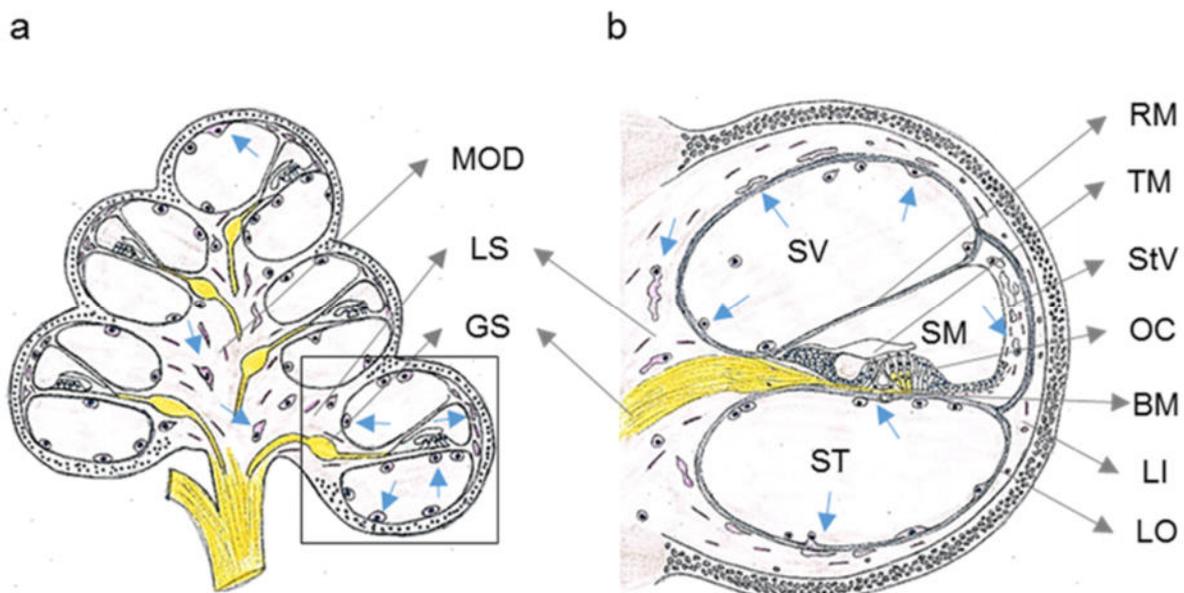


Abb. 14: Schematischer Querschnitt durch Anteile der Cochlea, Verteilung CD11b-positiver Zellen, Wistar-Ratten – pT1, a: Querschnitt durch gesamte Cochlea (Vergrößerung x25), b: Querschnitt durch Einzelwindung der Cochlea, Hörorgan (Vergrößerung x150); SV: Scala vestibuli, SM: Scala media (Ductus cochlearis), ST: Scala tympani, LI: Ligamentum spirale, MOD: Modiolus, LO: Lamina spiralis ossea, LS: Limbus spiralis, OC: Organ Corti, TM: Tektorialmembran, BM: Basilarmembran mit Vas spirale, RM: Reissner'sche Membran, StV: Stria vascularis, GS: Ganglion spirale; Quellen: eigene Darstellung.

nur noch in der Stria vascularis und dem Modiolus befinden (Tabelle 12). Zur besseren Visualisierung dieser lokalen Unterschiede für CD11b-positive Zellen ist in Abb. 14 ein selbsterstellter Querschnitt durch die Cochlea dargestellt, beispielhaft für pT1.

Abb. 15 zeigt die Färbung von CD11b+ Zellen von Typ 1 im Vas spirale cochleae der Cochlea fünf Tage alter Ratten. Abb. 16 ist ein Beleg für die durch mechanischen Reiz

ausgelöste Taxis von CD11b+ Zellen nach 24 Stunden. Die weiße Markierung in Form eines Sterns im Bild zeigt den Ort der Reizung.

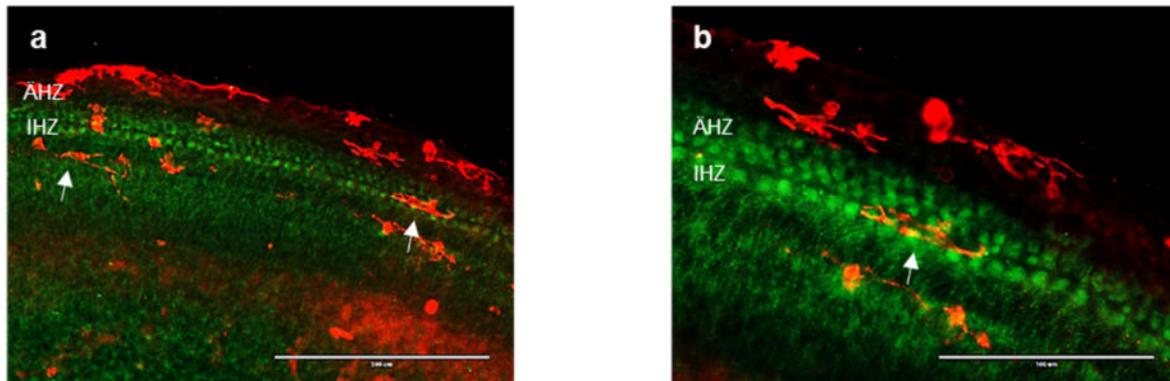


Abb. 15: CD11b-positive Zellen im Vas spirale (weiße Pfeile), OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat, Färbungen – a-b: rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung; Maßstäbe: a: 200 μm , b: 100 μm .

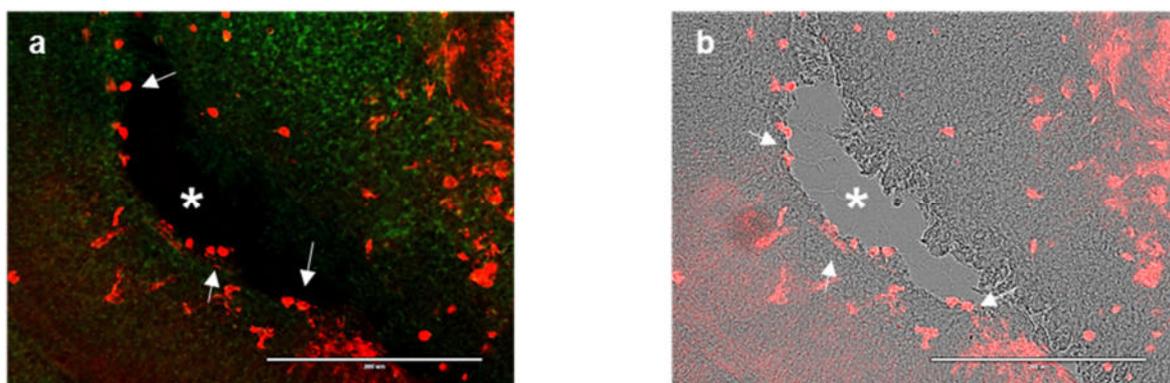


Abb. 16: Präsenz der CD11b-positiven Zellen in der Region mit der experimentell hervorgerufenen mechanischen Schädigung des Limbusgewebe (*) innerhalb des OC-Explantats, Wistar-Ratte – pT3, mediales Explantat, Färbungen – a: rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung, b: DIC und rot: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 594), Maßstab: 100 μm .

3.3. Nachweis der CD68-positiven Immunzellen in der Cochlea

3.3.1. Charakterisierung der CD68-positiven Zellen unter physiologischen Bedingungen

Die Verteilung von CD68-positiven Zellen innerhalb der vier Zonen des Corti-Organs wurde für Tag 1, 3, 5, 7 und 9 postnatal untersucht. Wie in Abb. 17 zu erkennen, befinden sich CD68-positive Zellen vornehmlich im Limbus spirale und Modiolus (Zone III und IV). Von dort transmigrieren sie durch die inneren und äußeren Haarzellen in die Region der herausgewachsenen Stützzellen (Zone II und I).

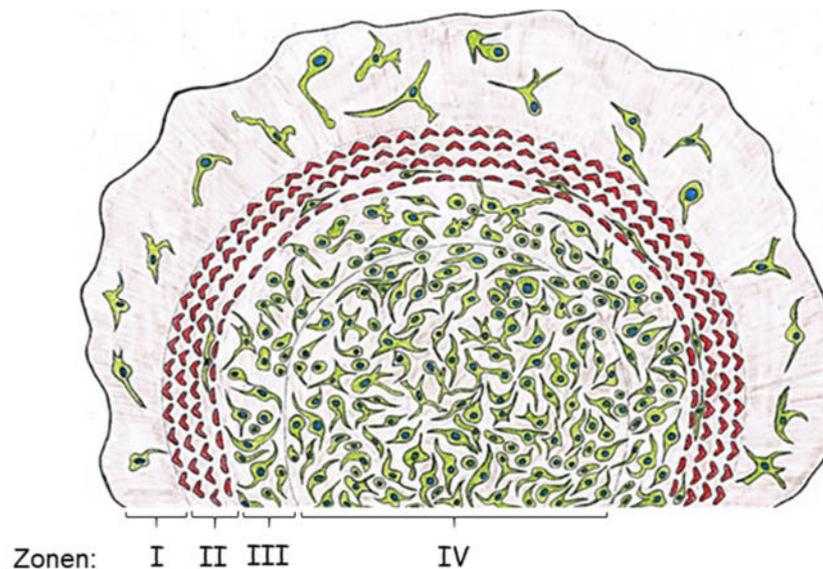


Abb. 17: Schematische Darstellung der Verteilung CD68-positiver Immunzellen in den Zonen I (herausgewachsene Stützzellen), II (innere und äußere Haarzellen), III (Limbus spirale) und IV (Modiolus) in der OC von Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat (organotypische Kultur). Quelle: eigene Darstellung.

Abb. 17 zeigt eine Übersicht über die vier verschiedenen Zonen des Schnitts durch das Corti Organ. Die Verteilung der CD68-positiven Zellen innerhalb der Zonen in Abhängigkeit des Alters der Ratten wurde untersucht. Die Verteilung der CD68-positiven Zellen innerhalb der Zonen wurde mittels sechs Explantaten untersucht und vollständig ausgewertet hinsichtlich der Anwesenheit von CD68-positiven Zellen, Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD): In ein Tage alten Tieren befanden sich die CD68+ Zellen vor allem in Zone IV (55 ± 9), gefolgt von III (27 ± 8), II (6 ± 8) und I (4 ± 2). In drei Tage alten Tieren befanden sich die CD68+ Zellen vor allem in Zone IV (117 ± 38), gefolgt von III (67 ± 20), I (9 ± 4) und II (8 ± 4). In fünf Tage alten Tieren befanden sich die CD68+ Zellen vor allem in Zone IV (63 ± 20), gefolgt von III (37 ± 13), II (5 ± 2) und I (5 ± 3). In sieben Tage alten Tieren befanden sich die CD68+ Zellen vor allem in Zone IV (78 ± 7), gefolgt von III (43 ± 8), II (7 ± 3) und I (6 ± 3). In neun Tage alten Tieren befanden sich die CD68+ Zellen vor allem in Zone IV (103 ± 22), gefolgt von III (62 ± 13), II (7 ± 3) und I (6 ± 3).

Morphologisch unterscheiden sich die Zellen des Stratum superficiale (Abb. 18f - j) kaum an den Tagen 1 - 9 und wachsen amöboid, mit länglichen verzweigten Zellkörpern (7 - 13 μ m). Anhand der Länge der Pseudpodien lassen sich Typ 1 (10 - 50 μ m) und Typ 2 (25 - 90 μ m) unterscheiden. Die Zellen im Stratum profundum 1 - 3 ähneln an pT1 - 5 ebenfalls noch Typ 1- und Typ 2-Zellen (Abb. 18k - m), während die CD68-positiven Zellen an pT7 und pT9 mehrheitlich rund bis leicht oval und

unverzweigt oder mit kurzen Pseudopodien wachsen und eine Größe von 5 - 12 μm erreichen (Typ 3).

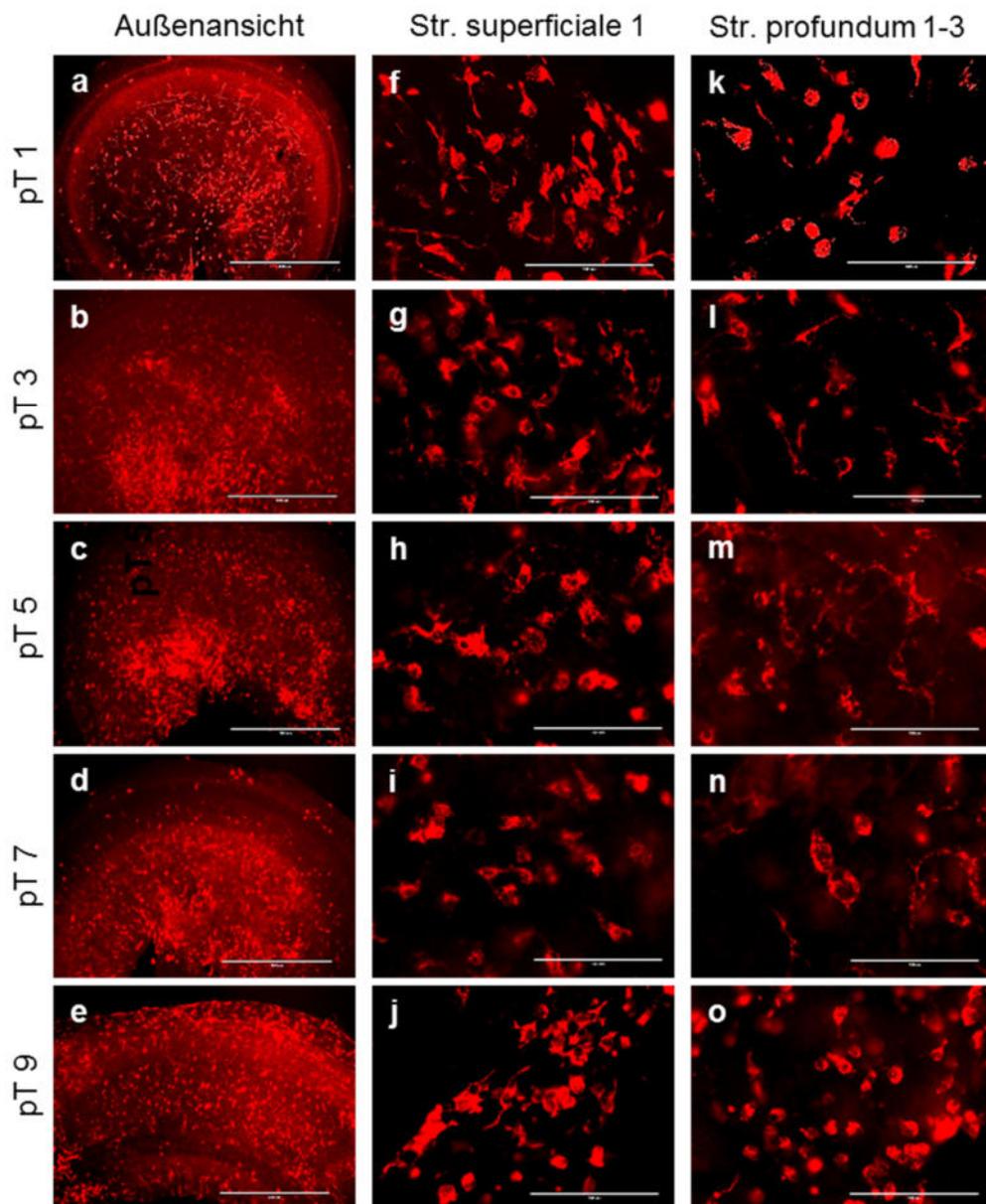
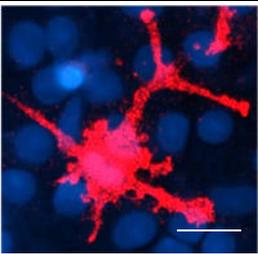
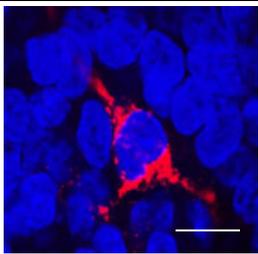
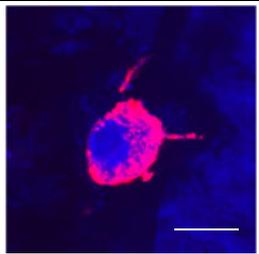


Abb. 18: CD68-positive Zellen, OC der Wistar-Ratten – pT1, pT3, pT5, pT7, pT9, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, IF-Färbung, rot: CD68-positive Zellen (Alexa Fluor 594), a-e: Übersicht über Zone I-IV, Maßstab:400 μm , f-j: Stratum superficiale I, Maßstab: 100 μm , k-o: Stratum profundum 1-3, 100 μm ; Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=6, Kontrolle n=2; pT3 n=6, Kontrolle n=2; pT5 n=6, Kontrolle n=2; pT7 n=6, Kontrolle n=2; pT9 n=6, Kontrolle n=2.

Die Verteilung der drei morphologisch unterscheidbaren CD68-positiven Zelltypen ist, basierend auf den erhobenen Daten, unabhängig von der Lokalisation innerhalb der Cochlea (apikal, medial, basal). Die Anwesenheit aller drei Zell-Typen nimmt allerdings ab Tag 7 ab. Tabelle 13 fasst alle diesbezüglich ausgewerteten Parameter zusammen und Abb. 19 zeigt die statistische Auswertung der ermittelten absoluten Zellzahlen.

Tabelle 13: CD68-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea, Wistar-Ratten – pT 1, pT 3, pT 5, pT 7, pT 9 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden).

Alter/ Zell-Typ	Typ 1	Typ 2	Typ 3
<u>Maßstab:</u>			
Typ 1 – bis 40 µm			
Typ 2 – bis 20 µm			
Typ 3 – bis 20 µm			
pT 1	++	+++	+++
pT 3	++	+++	+++
pT 5	++	+++	+++
pT 7	++	++	++
pT 9	+	++	++
Morphologie			
Zellkörpergrösse	7 - 13 µm	9 - 13 µm	5 - 12 µm
Pseudopodien (Länge)	ca.10 - 50 µm	ca. 25 - 90 µm	selten 2 - 4 µm
Zellform	Amöboid	amöboid	rund bis leicht oval
Kernform	Rundlich	rundlich	rund bis oval
Lokalisation in der Cochlea (organotypische Kultur)			
Explantate	apikal medial basal	apikal medial basal	apikal medial basal
Corti-Organ (IHZ, ÄHZ)	- - -	- - -	+ + +
Vas spirale cochleae	- - -	- - -	+ + +
Hensen-Zellen	+ + +	+ + +	- - -
Claudius-Zellen	+ + +	+ + +	+ + +
Limbus spiralis	- - -	++ ++ ++	+++ +++ +++
Spiralganglien-Zellen	++ ++ ++	+ + +	++ ++ ++
Modiolus	+ + +	+++ +++ +++	+++ +++ +++

Drei verschiedene Zelltypen von CD68-positiven Zellen mit deutlichen Unterschieden in der Morphologie und Lokalisation konnten nachgewiesen werden. Während Zell-Typ 1 sich eher an der Oberfläche der Explantate befand (Stratum superficiale 1), sind in den tieferen Schichten (Stratum profundum 1 - 3), die in der Region des Limbus spiralis und Modiolus liegen, CD68-positive Zellen sowohl vom Typ 2 als auch vom Typ 3 entdeckt worden. Im Corti-Organ und dem Vas spirale cochleae konnte nur Zell-Typ 3 nachgewiesen werden. In den anderen untersuchten Abschnitten finden sich alle drei Zelltypen (Spiralganglien-Zellen, Modiolus, Claudius-Zellen), nur Typ 1 und 2 (Hensen-Zellen) oder nur Typ 2 und 3 (Limbus spiralis).

Betrachtet man die absoluten Zahlenwerte der in der gesamten Cochleae detektierten CD68-positiven Zellen, ohne Berücksichtigung der Morphologie, dann ergibt sich ein biphasischer Verlauf der Zellzahl über die Zeit. An pT1 finden sich die wenigsten CD68-positiven Zellen in der Cochlea, gefolgt von einem signifikanten Anstieg um das 2-fache an pT3, einem signifikanten Abfall an pT5 und einem erneuten stetigen Anstieg

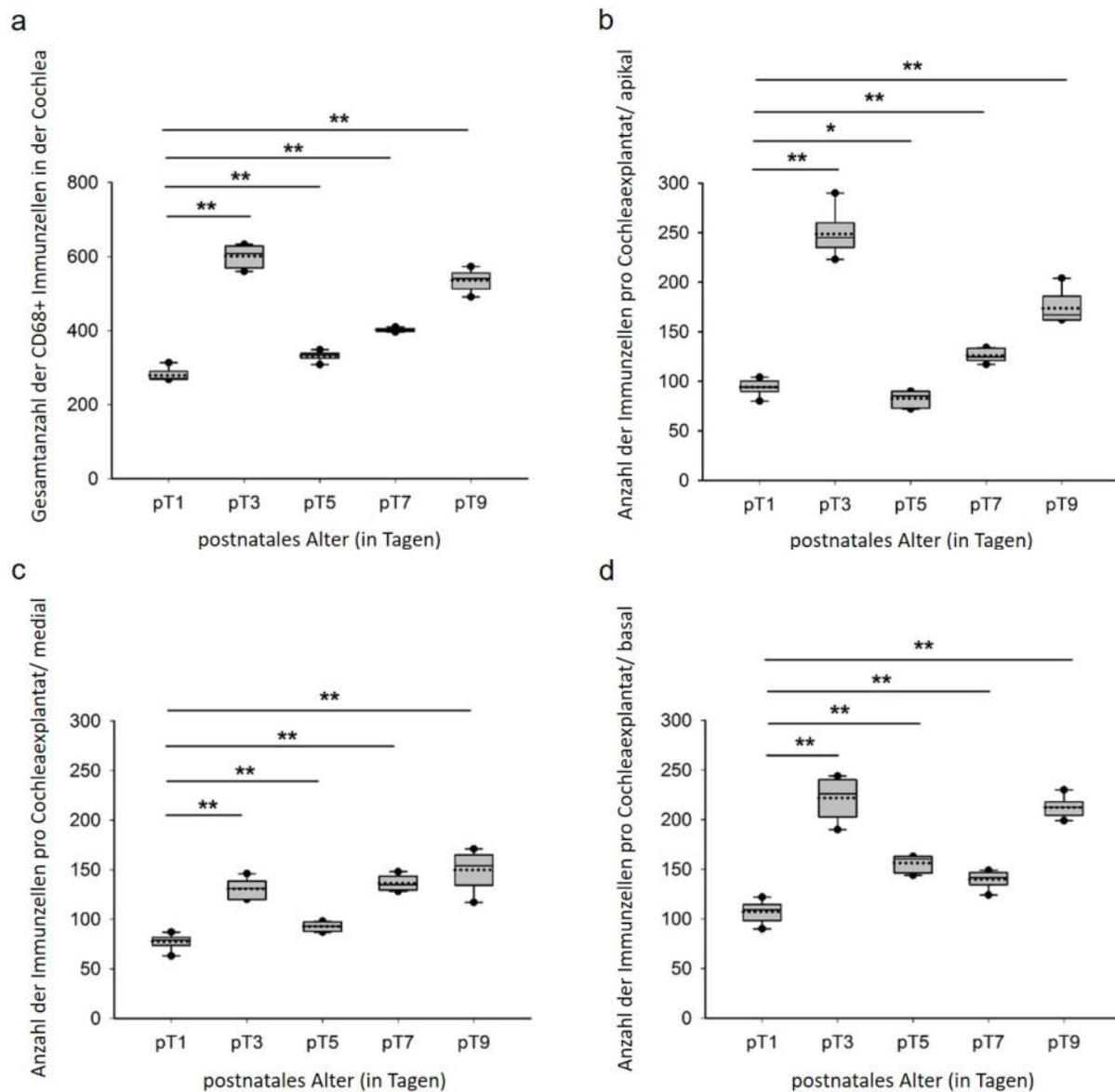


Abb. 19: Anzahl CD68-positiver Zellen membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich, Box-Whisker-Plots – **a**: Cochlea gesamt, **b**: apikales Explantat, **c**: mediales Explantat, **d**: basales Explantat, Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=6, pT3 n=6, pT5 n=6, pT7 n=6, pT9 n=6. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ statistisch signifikanter Unterschied).

der Zellzahl bis pT9 (pT1 Median = 270,50; IQR = 21,75), pT3 (Median = 608,00; IQR = 59,50), pT5 (Median = 333,50; IQR = 13,00), pT7 (Median = 402,00; IQR = 7,25), pT9 (Median = 540,50; IQR = 43,00).

Ein signifikanter Anstieg an CD68-positiven Zellen besteht zwischen pT1 und pT3/ 7/ 9 (** $p < 0,002$) und in geringerem Maße für pT5 (** $p < 0,004$) (keine Normalverteilung, Mann-Whitney Rank Sum Test) (Abb. 19a).

Ein tendenziell ähnliches Bild (biphasisch) ergibt sich für die anteilig im apikalen (pT1 Median = 94,00; IQR = 10,50, pT3 (Median = 245,00; IQR = 25,00); pT5 (Median =

85,00; IQR = 17,25); pT7 (Median = 124,50; IQR = 12,5), pT9 Median = 167,00; IQR = 24,00), medialen (pT1 Median = 79,00; IQR = 8,25), pT3 (Median = 131,00; IQR = 18,50), pT5 (Median = 93,00; IQR = 9,5), pT7 (Median = 135,00; IQR = 14,00), pT9 (Median = 154,00; IQR = 30,75), sowie basalen Teil der Cochlea enthaltenen Zellen (pT1 Median = 109,00; IQR = 16,25), pT3 (Median = 226,00; IQR = 37,50), pT5 (Median = 160,5; IQR = 16,75), pT7 (Median = 141,50; IQR = 12,25), pT9 (Median = 212,50; IQR = 13,75). (Abb. 19b - d). Das Muster der Zellzahl über die Zeit ist im apikalen Explantat different (zur Cochlea gesamt) an pT5, an der die Zellzahl sogar niedriger liegt, als an pT1 (*p < 0,026) (Abb. 19b). Des Weiteren wird an pT9 im medialen Explantat eine höhere Zellzahl erreicht als an pT3 (Abb. 19c).

Tabelle 14: CD68-positive Zellen, Lokalisation in der Cochlea (Kryoschnitte), Wistar-Ratten – n = Zahl: pT1=6, pT3=6, pT5=6, pT7=6, pT9=6, pT30=6 (+++ permanent vorhanden, ++ meistens präsent, + wenig präsent, - nicht vorhanden).

Altersgruppe	pT1	pT3	pT5	pT7	pT9	pT30
entlang Scala vestibuli	++	++	+	-	-	-
Reissner-Membran	++	+	+	-	-	-
innerhalb Scala media	+	+	-	-	-	-
Corti-Organ (IHZ/ÄHZ)	+	+	+	+	-	-
Vas spirale cochleae	+	+	+	+	+	-
Basilarmembran	+	+	+	-	-	-
Cochlea-Gefäße	++	++	++	-	-	+
Stria vascularis	+++	++	++	+	+	+
Ligamentum spirale	-	+	+	+	-	-
Limbus spiralis	++	++	++	+	+	+
Ganglion spirale	+	+	+	+	+	-
Lamina spiralis ossea	+	+	+	+	+	-
Modiolus	+++	++	++	+	+	+
N. cochlearis	+	+	+	+	+	-
entlang Scala tympani	++	++	+	-	-	-

Betrachtet man die Anwesenheit der Zellen im Verlauf der Entwicklung der Ratte noch detaillierter und bezieht anatomisch unterschiedliche Regionen mit ein, wird erneut der Abfall der CD68-positiven Zellen während der postnatalen Entwicklung erkennbar. Während an pT3 in allen getesteten Explantaten CD68-positiver Zellen gefunden wurden befinden sich ab pT7 entlang der Scala vestibuli, der Reissner'schen Membran, innerhalb der Scala media, der Basilarmembran, den Cochlea-Gefäßen und entlang der Scala tympani keine CD68-positiven Zellen mehr. Lediglich in den Cochlea-Gefäßen kehren an pT30 einige zurück (Tabelle 14). Zur besseren Visualisierung dieser lokalen Unterschiede für CD68-positive Zellen ist in Abb. 20 ein selbst erstellter Querschnitt durch die Cochlea dargestellt, beispielhaft für pT1.

Abb. 21 zeigt die Immunfluoreszenz-Färbung von CD68-positiven Zellen im Stratum superficiale einen Tag alter Wistar-Ratten (Abb. 21a + b). Die Pfeile weisen auf CD68-positiv Zellen hin, die durch Haarzellreihen des Stratum superficiale migrieren und mit IHZ/ ÄHZ in direkten Kontakt treten. Abb. 22 ist ein Beleg für die durch mechanischen Reiz ausgelöste Infiltration von CD68-positiven Zellen nach 24 Stunden. Die weiße Markierung in Form eines Sterns im Bild zeigt wiederum den Ort der Gewebeverletzung.

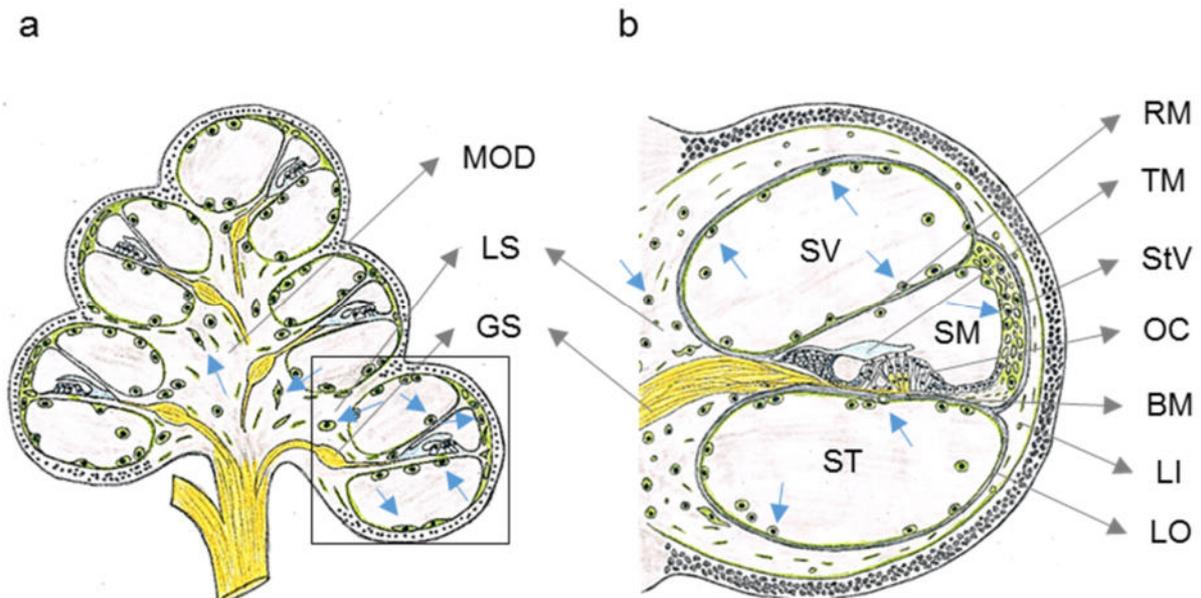


Abb. 20: Schematischer Querschnitt durch Anteile der Cochlea. Verteilung der CD68-positiven Zellen, Wistar-Ratten – pT1; a: Querschnitt durch gesamte Cochlea (Vergrößerung x25), **b:** Querschnitt durch Einzelwindung der Cochlea, Hörorgan (Vergrößerung x150); SM: Scala media (Ductus cochlearis), ST: Scala tympani, SV: Scala vestibuli, LI: Ligamentum spirale, MOD: Modiolus, LO: Lamina spiralis ossea, LS: Limbus spiralis, OC: Organ Corti, TM: Tektorialmembran, BM: Basilarmembran mit Vas spirale, RM: Reissner'sche Membran, StV: Stria vascularis, GS: Ganglion spirale; Quellen: eigene Darstellung.

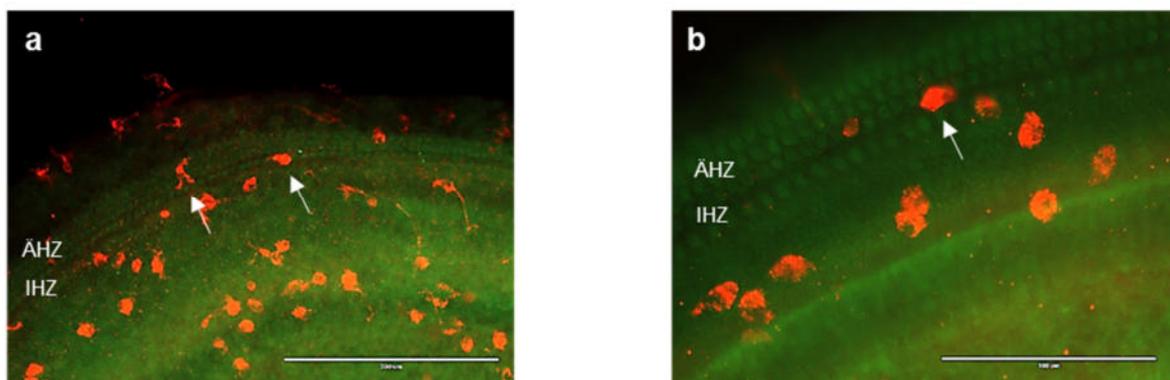


Abb. 21: CD68-positiv Zellen im Vas spirale (b: weiße Pfeil), OC der Wistar-Ratte – pT1, basales Explantat, IF-Färbung – grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung (Alexa Fluor 488), rot: CD68-positiv Zellen (Alexa Fluor 594); Maßstäbe: a: 200 µm, b: 100 µm.

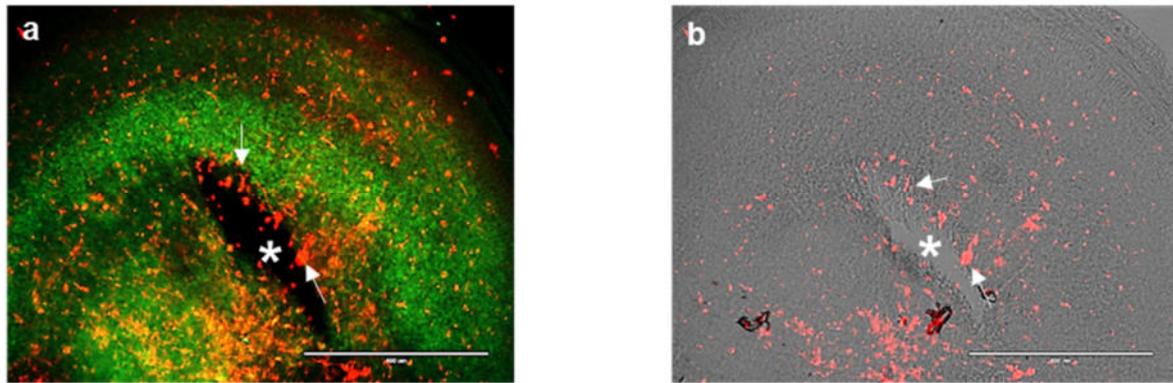


Abb. 22: Präsenz der CD68-positiven Zellen innerhalb des OC-Explantats in der Region mit einer experimentell hervorgerufene mechanische Schädigung des Limbusgewebe (*), OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat, a: IF-Färbungen – grün: Hintergrund durch Avidin-Färbung (Alexa Fluor 488), rot: CD68-positive Immunzellen (Alexa 594), b: DIC und rot: CD68-positive Zellen (Alexa 594); Maßstab a+b: 400 μ m.

3.3.2. Proteinexpression von CD68+ Zellen unter physiologischen Bedingungen

Zum Nachweis von CD68-Proteinen wurden Zelllysate von Milz und Cochlea von 1, 3, 5, 7 und 9 Tage alten Wistar-Ratten hergestellt und per Western Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mittels CD68-Antikörpern und als interne Ladekontrolle wurde β -Aktin (Housekeeping mit 42 kDa Molekülmasse) verwendet, mit dessen Hilfe alle Werte normalisiert wurden. Die densitometrische Analyse von 16 unabhängigen Versuchen ergab, dass die Menge an CD68 mit 95 kDa im Cochlea-Gewebe der Wistar-Ratten stark vom postnatalen Alter abhängt. Während an pT1 praktisch kleinere CD68 nachzuweisen war (Median = 0,012, IQR = 0,029), wurde an pT3 der höchste DID-Wert für alle Messpunkte erreicht (Median = 0,672, IQR = 1,156) (**p < 0,001). An pT5-7 bleibt die CD68-Proteinmenge signifikant erhöht (*p < 0,043 bzw. **p < 0,001) und erreicht an pT9 wieder ein niedriges Niveau ohne signifikanten Anstieg mit p < 0,220 gegenüber pT1 (Median: pT5 = 0,093, pT7 = 0,167, pT9 = 0,052; IQR: pT5= 0,210, pT7 = 0,318, pT9 = 0,13) (Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks/ Tukey Test).

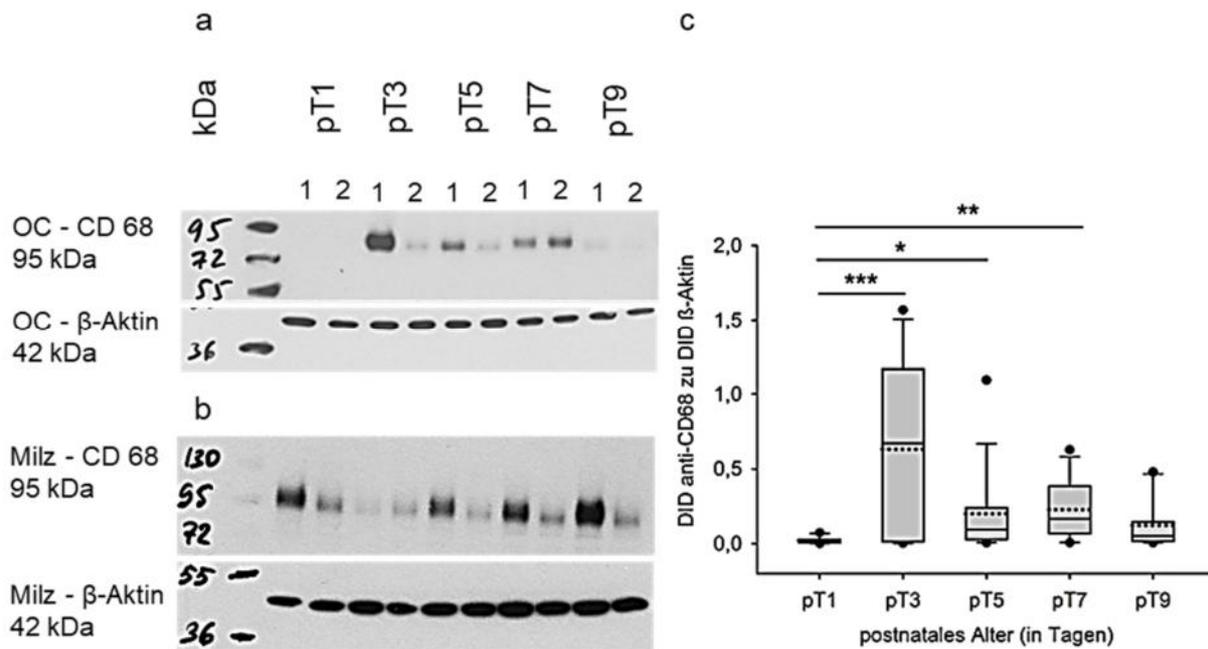


Abb. 23: Nachweis der CD68 Proteinmenge mit CD68 Antikörper in OC und Milz der Wistar-Ratten – pT3, pT5, pT7, pT9 im Vergleich zu pT1 (alle n=16); a: Exemplarischer Western-Blot mit OC-Zelllysate von pT1, 3, 5, 7 und 9; Detektion mittels CD68 mit 95 kDa (oben), β-Aktin mit 42 kDa (unten). Die 1 und 2 stehen für das linke und rechte Ohr einer Wistar Ratte **b:** Exemplarischer Western Blot mit Milz-Zelllysate von pT1, 3, 5, 7 und 9; Detektion mittels CD68 mit 95 kDa (oben), β-Aktin mit 42 kDa (unten). Es wurden zwei Proben der gleichen Milz separat aufgearbeitet. **c:** Box-Whisker-Plots, DID CD68 zu DID β-Aktin, OC; Box: IQR, obere Grenze der Box: 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied).

3.4. Nachweis Avidin+ CD117/c-Kit+ Immunzellen in der Cochlea

3.4.1. Charakterisierung der Avidin+ CD117/c-Kit+ unter physiologischen

Bedingungen

In diesem Abschnitt soll geprüft werden, ob sich Avidin-positive CD117/c-Kit+ Zellen in der Cochlea befinden und wenn ja, inwiefern sich die Population der CD117-positiven Zellen in der Cochlea von Wistar-Ratten in Abhängigkeit des Alters verändert. Zudem sollte untersucht werden, ob CD117/c-Kit+ Zellen auch CD45, CD68 oder CD11b exprimieren bzw. mit Zellen, die diese Marker exprimieren koloalisieren.

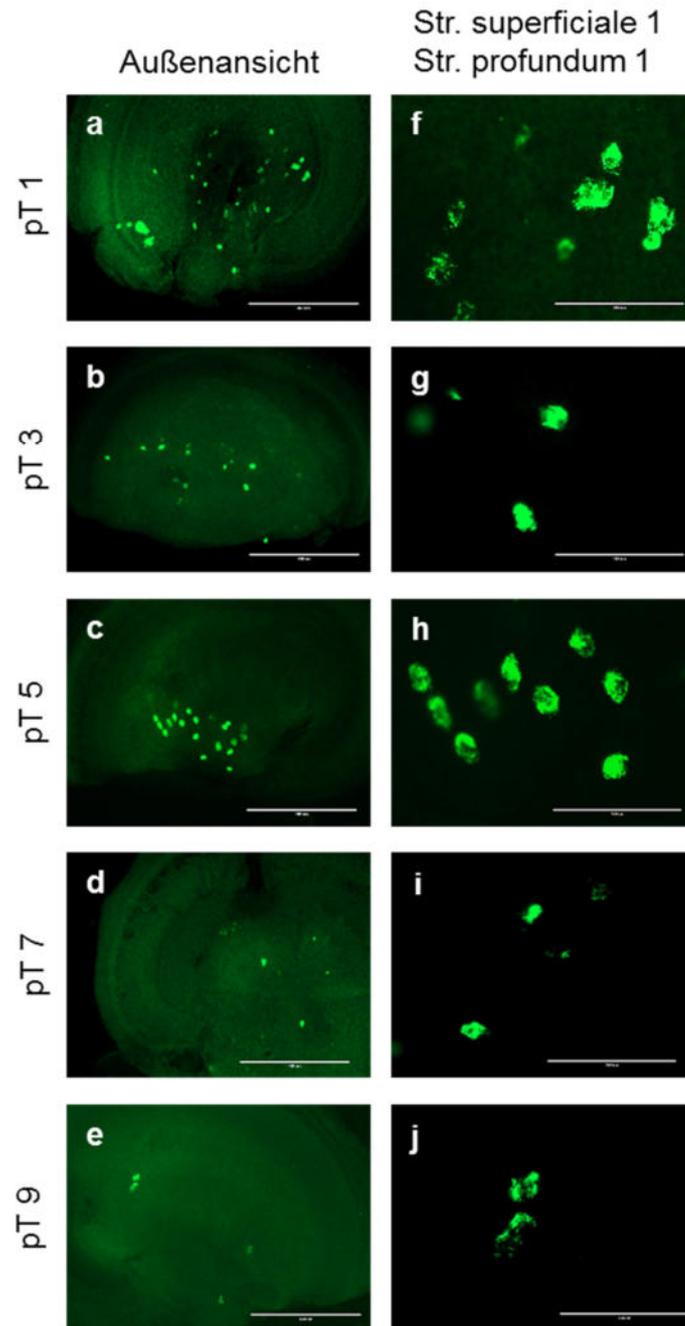


Abb. 24: Avidin-positive Zellen in der OC der Wistar-Ratte – pT1, pT3, pT5, pT7, pT9, Aufnahmen von basalen Explantaten, Epifluoreszenzmikroskop EVOS, Färbung – grün: Avidin-positive Zellen (Alexa Fluor 488), a-e: Außenansicht, Maßstab: 400 µm, f-j: Stratum superficiale 1 und Stratum profundum 1, Anzahl je Altersgruppe: pT1 n=32, pT3 n=32, pT5 n=32, pT7 n=32, pT9 n=32; Maßstab: 100 µm.

Zellen mit Avidin-positiver Granula befinden sich in ein Tag alten Versuchstieren zunächst nur im Limbus spirale und Modiolus (Zone III und IV) und treten im Verlauf der Zeit auch mehr in Zone IV auf (Abb. 24a - c). Ab pT7 finden sich kaum noch Avidin-positive Zellen innerhalb der OC, sodass über deren Verteilung bzw. vornehmliche Lokalisation keine Rückschlüsse gezogen werden kann (Abb. 24d - e). Zellen mit Avidin-positiver Granula liegen in Stratum superficiale und profundum 1 vor allem als

kleine runde, als 7 - 10 μm große ovale und bis 25 μm mononukleäre Zellen vor (Abb. 24f - i). Lediglich an pT9 finden sich einige ovale Zellen mit Avidin-positiver Granula (Abb. 24j).

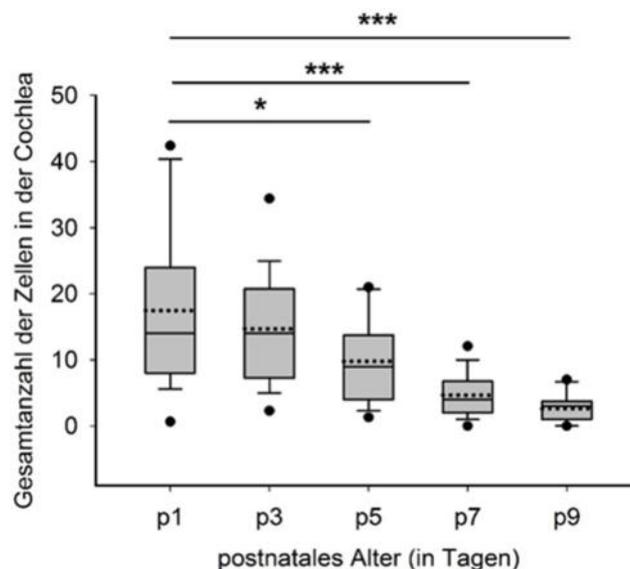


Abb. 25: Gesamtanzahl der Avidin-positiven Zellen in membranösen Cochleae von Wistar-Ratten, abhängig vom postnatalen Alter, Cochlea gesamt, Anzahl der Explantate je Altersgruppe: pT1 n=32; pT3 n=32; pT5 n=32; pT7 n=32; pT9 n=32. Box-Whisker-Plots – Box: IQR, obere Grenze der Box: 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied).

Mit ansteigendem Alter der Ratte fällt die Anzahl der Avidin-positiven Zellen in der Cochlea der Ratte ab pT5 (pT1 (Median = 14,00; IQR = 16,00), pT3 (Median = 14,00; IQR = 13,5), pT5 (Median = 9,00; IQR = 9,75), pT7 (Median = 4,00; IQR = 4,75), pT9 (Median = 3,00; IQR = 2,75) auf etwa ein Fünftel an pT9 (pT1 vs. pT5 * $p < 0,011$, pT1 vs. pT7/9 *** $p < 0,001$; Nicht-Normalverteilung, ANOVA, Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks/ Tukey Test) (Abb. 25).

Abb. 26 zeigt einen repräsentativen Kryoschnitt durch die Cochlea einer drei Tage alten Wistar-Ratte, um die Verteilung Avidin-positiver Zellen in den verschiedenen Regionen der Cochlea analysieren zu können. Abgesehen von einigen vereinzelt Avidin-positiven Zellen im Bereich des Modiolus (vergrößert in Abb. 26b - d) finden sich die Zellen vor allem im Limbus spirale und in den knöchernen Bereichen, die die Cochlea umgeben.

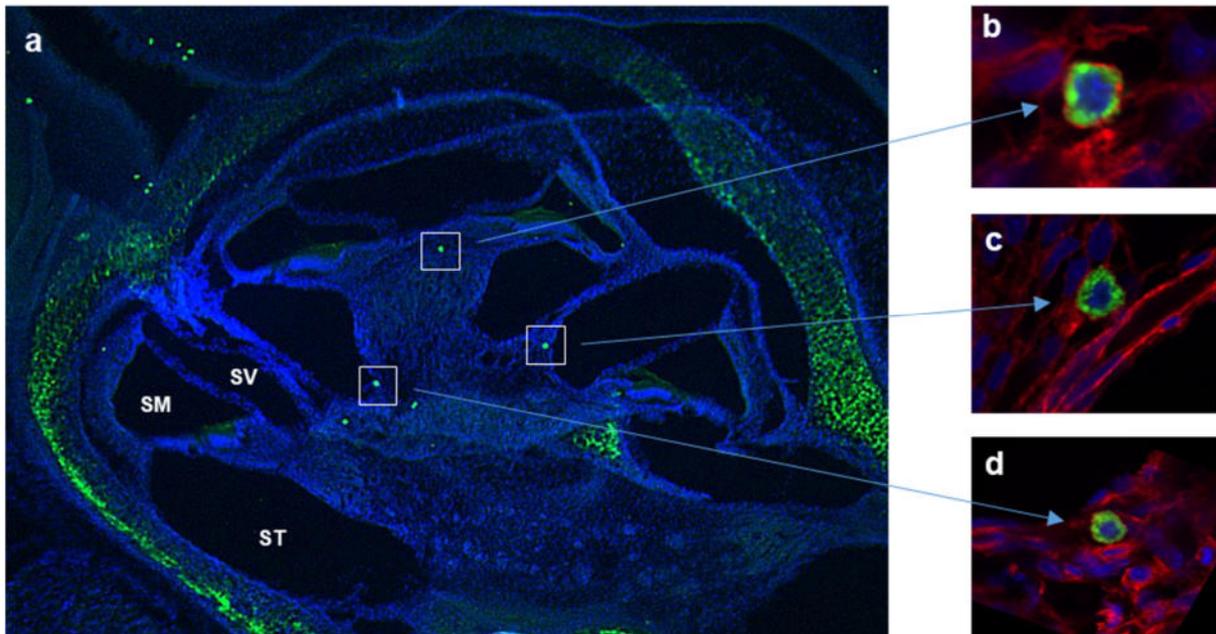


Abb. 26: Konfokalmikroskopische Darstellung Avidin-positiver Zellen im Modiolus, Kryoschnitt der Cochlea von Wistar-Ratten – pT3, IF-Färbungen – rot: Phalloidin färbung von F-Aktin (Alexa Fluor 594), grün: Avidin-positive Zellen (Avidin Alexa Fluor 488), blau: Zellkerne (DAPI); Maßstäbe: a: 400 μ m, b-d: 20 μ m; SM: Scala media, SV: Scala vestibuli, ST: Scala tympani.

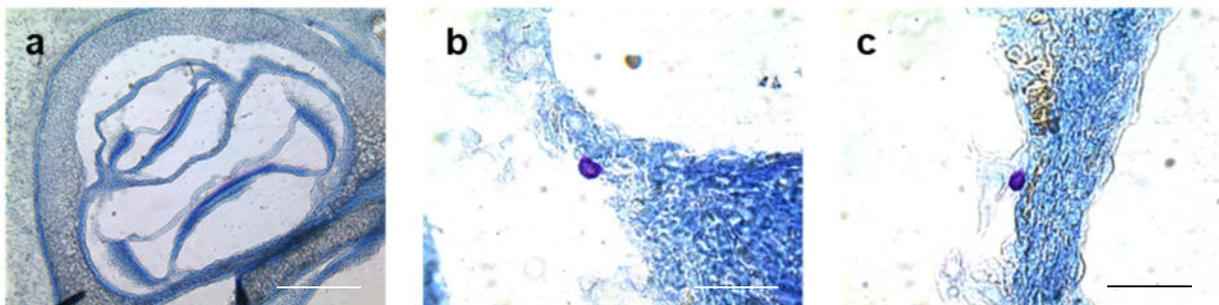


Abb. 27: Histologischer Nachweis der Mastzellen in der gesamten Cochlea, Kryoschnitt, Wistar-Ratte – pT3, Färbung: Toluidin blue, a: Vergrößerung x10, b-c: Vergrößerung x100.

Abb. 27 zeigt eine lichtmikroskopische Ansicht der gesamten Cochlea und zwei Vergrößerungen im Bereich von Stria vascularis und Modiolus. Das Gewebe wurde mit Toluidin blue gefärbt, um Heparin granula sichtbar zu machen. Die Verteilung der Toluidin blue-positiven Zellen ähnelt der, der in Abb. 26 dargestellten Avidin-positiven Zellen.



Abb. 28: Konfokalmikroskopie, repräsentative Darstellung der Kolokalisation Avidin-positiver Mastzellen und CD45+, CD117/c-Kit+ Zellen aus Wistar-Ratten, a: pT1, mediales Explantat, rot: CD45-positive Zellen (Alexa Fluor 594), grün: Heparin granula (Avidin Alexa Fluor 488), **b:** pT3, basales Explantat, violett: CD117/c-Kit+ (Alexa Fluor 594), grün: Heparin granula (Avidin Alexa Fluor 488); Maßstab: **a:** 10 μm , **b:** 20 μm .

Abb. 28 zeigt repräsentative Zellen aus einem medialen (pT1) und basalen (pT3) Teil des Cochlea-Explantats, deren Heparin granula angefärbt wurden und doppelte IF dazu mit CD45 (a) oder CD117/c-Kit (b) Antikörpern. Avidin-positive Zellen erscheinen sowohl CD45- als auch CD117/c-Kit-positiv.

Dem gegenüber konnte keine Präsenz von CD11b (Abb. 29c) oder CD68 (Abb. 30c) an Avidin-positiven Zellen nachgewiesen werden. Allerdings liegen Zellen mit CD11b- oder CD68-Expression in räumlicher Nähe zu Avidin-positiven Zellen.

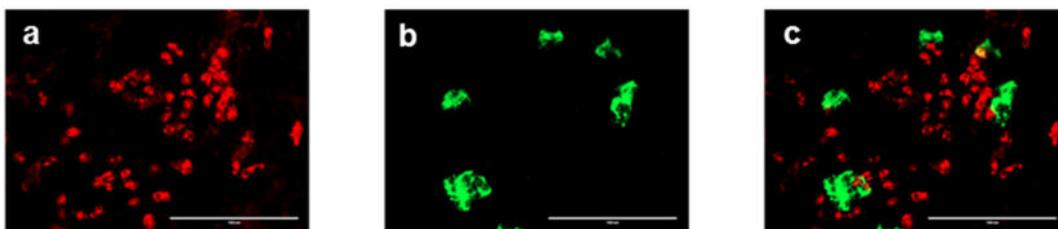


Abb. 29: Detektion von CD11b-positiven und Avidin-positiven Zellen in der OC der Wistar-Ratten – pT1, basales Explantat, IF-Färbungen – a: rot: CD11b-positive Immunzellen (Alexa Fluor 594), **b:** grün: Avidin-positive Mastzellen (Avidin Alexa Fluor 488), **c:** Overlay von a und b; Maßstab: 100 μm .

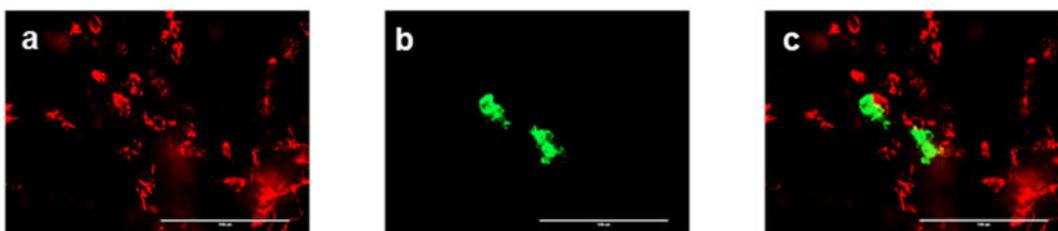


Abb. 30: Detektion von CD68-positiven und Avidin-positiven Zellen in der OC der Wistar-Ratten – pT3, mediales Explantat, IF-Färbungen – a: rot: CD68-positive Immunzellen (Alexa Fluor 594), **b:** grün: Avidin-positive Mastzellen (Avidin Alexa Fluor 488), **c:** Overlay von a und b; Maßstab: 100 μm .

3.4.2. Nachweis der CD117/c-Kit⁺ Proteinmenge mittels Western Blot

Zum Nachweis von CD117/c-Kit Proteinen wurden Zelllysate von der Cochlea von 1, 3, 5, 7 und 9 Tage und Thymus von drei Tage alten Wistar-Ratten hergestellt und per Western Blot analysiert. Der Nachweis erfolgte mittels CD117/c-Kit Antikörper und als interne Ladekontrolle wurde β -Aktin (Housekeeping mit 42 kDa Molekülmasse) verwendet, mit dessen Hilfe alle Werte normalisiert wurden. Die densitometrische Analyse von 16 unabhängigen Versuchen ergab, dass die Menge an CD117/c-Kit Proteinen im Cochlea-Gewebe der Wistar-Ratten vom postnatalen Alter abhängt, aber nicht entscheidend schwankt, wie beim Nachweis von CD68 Proteinen (Vergleiche Abb. 23 und Abb. 31). An pT1 findet man die geringste CD117/c-Kit Proteinmenge aller getesteten Zeitpunkte (Median = 0,053; IQR = 0,127); Ab pT3 steigt die nachweisbare Menge signifikant an (Median = 0,110; IQR = 0,241; * $p < 0,048$) und erreicht an pT5 und pT7 einen 4- bis 5-fach höheren Wert als an pT1 (pT5 Median = 0,226; IQR = 0,243); pT7 = Median = 0,261; IQR = 0,215); beides *** $p < 0,001$). An pT9 fällt die Zellzahl wieder auf Werte wie bei pT3 ab (Median = 0,124; IQR = 0,192; $p < 0,162$) (Alle statistischen Auswertungen per Mann-Whitney Rank Sum Test).

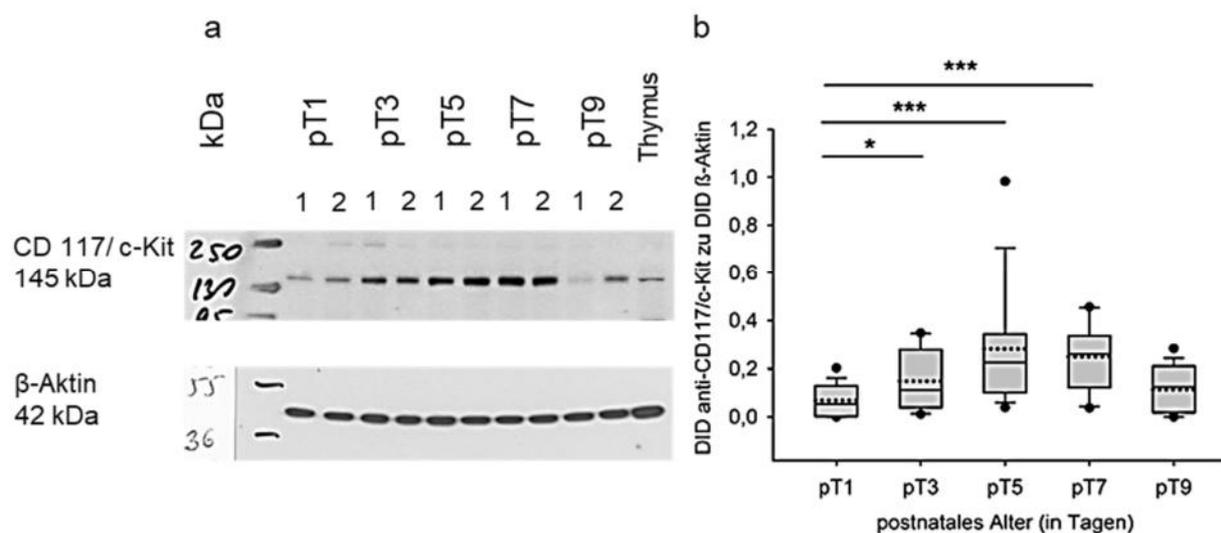


Abb. 31: Nachweis der CD117/c-Kit-Proteinmenge mit CD117/c-Kit Antikörper in OC der Wistar-Ratten – pT3, pT5, pT7, pT9 im Vergleich zu pT1 (alle n=16) und Thymus der Wistar-Ratte – pT3; a: Exemplarischer Western Blot mit OC-Zelllysate von pT1, 3, 5, 7 und 9; Detektion mittels CD117/c-Kit mit 145 kDa (oben), β -Aktin-Antikörper mit 42 kDa (unten). Die 1 und 2 stehen für das linke und rechte Ohr einer Wistar Ratte, b: Box-Whisker-Plots, DID CD117/c-Kit zu DID β -Aktin, OC; Box: IQR, obere Grenze der Box: 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied).

3.5. Wirkung des Cisplatin auf Immunzellen in der Cochlea

3.5.1. Wirkungen verschiedener Konzentrationen von Cisplatin auf Mastzellen

Um zu ermitteln, welche Cisplatin-Konzentration geeignet ist, um einen Effekt auf CD45-CD11b-, CD68- und Avidin-positive Zellen über die Zeit zu erhalten, wurden in einem ersten Schritt Corti-Organe von Wistar Ratten pT5 mit drei verschiedenen Konzentrationen inkubiert (10 μM , 20 μM und 40 μM). Der direkte Vergleich erfolgte gegenüber unbehandelten OC (Mediumkontrolle). In diesem Vorversuch wurden

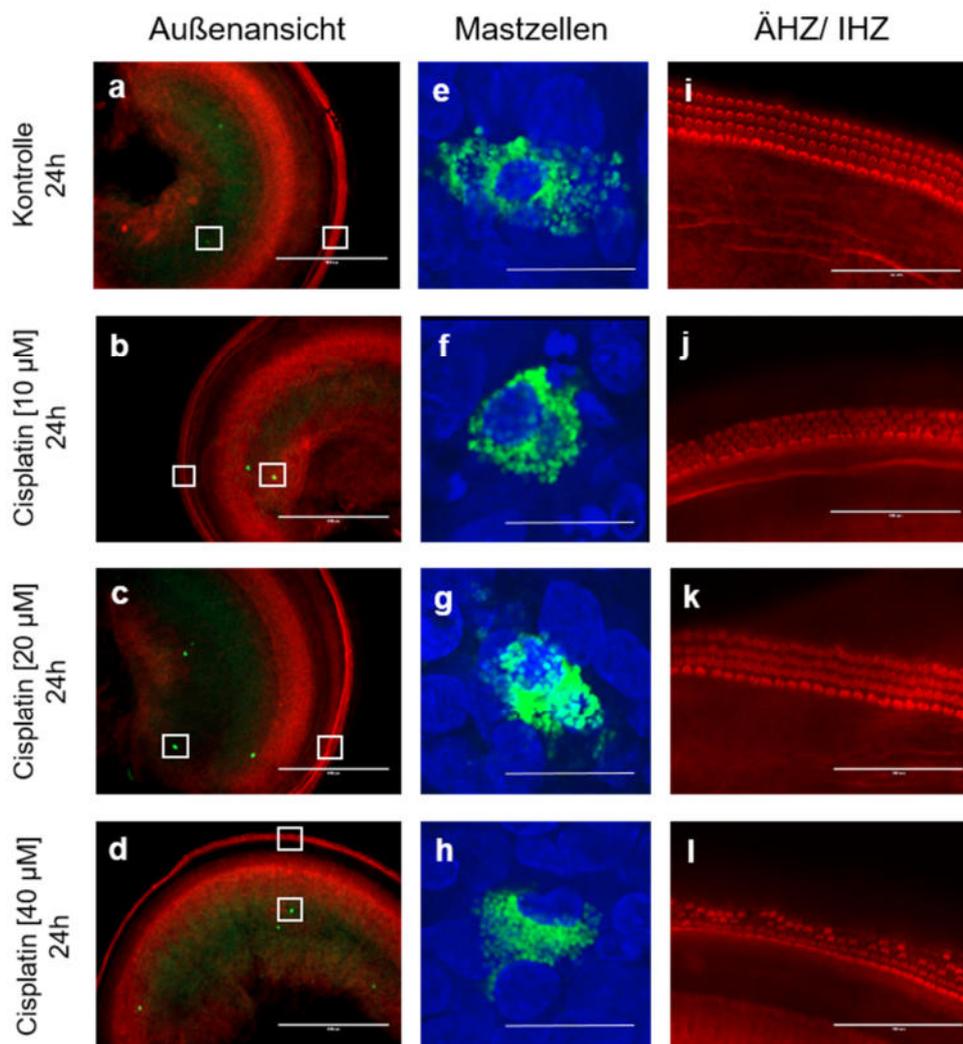


Abb. 32: Avidin-positive Mastzellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat, IF-Färbungen – rot: F-Aktin-Farbstoff – Phalloidin, Alexa Fluor 594 (IHZ, ÄHZ), grün: Avidin-positive Mastzellen, Heparin-Granula, blau: Zellkerne (DAPI), a/ e/ i: Kontrolle nach 24 h Inkubation im Kulturmedium; e-h: Mastzellen-Granula, i-l: IHZ, ÄHZ; b-d / f-h/ j-l: Cisplatin-Behandlung [10 μM], [20 μM], [40 μM], nach 24 h Inkubation; Die weißen Quadrate markieren die jeweilige Stelle an der in das Gewebe hineingezoomt wurde für die Darstellungen in den Spalten e-h bzw. i-l. Maßstab: a-d: 400 μm , e-h: 20 μm , i-l: 100 μm .

zeitgleich zwei verschiedene Aspekte untersucht. Erstens der Einfluss von Cisplatin auf die Mastzellen der OC (Anzahl und Degranulierung) und zweitens der entstehende Schaden auf die IHZ und ÄHZ, welcher in Abschnitt 3.5.5 beschrieben wird.

In Abb. 32a - d ist eine Übersicht über die mit Phalloidin und Avidin gefärbten OC der Wistar-Ratten dargestellt. Die weißen Quadrate markieren die Stellen innerhalb der OC, die näher betrachtet wurden (Abb. 32e - h und i - l).

Nach 24 Stunden Inkubation ohne Cisplatin ist die Granula der Mastzellen gleichmäßig über den Zellkörper verteilt und die Haarzellen unbeschädigt (Abb. 32e + i). Bereits mit 10 μM Cisplatin sind die Mastzellen nicht mehr so lang gestreckt, sodass auch die Granula dichter zusammen liegt (Abb. 32f + j). Bei 20 μM hingegen kann die Degranulierung von Mastzellen nachgewiesen werden (Abb. 32g + k). Bei der höchsten Konzentration von 40 μM schließlich, liegt die Granula der Mastzellen diffus innerhalb des Gewebes vor, was durch vollständige Degranulierung und Auflösung der Membran der Mastzellen entstanden sein dürfte (Abb. 32h + l). Trotz dem hohen Grad der Degranulierung finden sich weiterhin auch Mastzellen, die noch nicht degranuliert sind oder sich möglicherweise bereits wieder regeneriert haben.

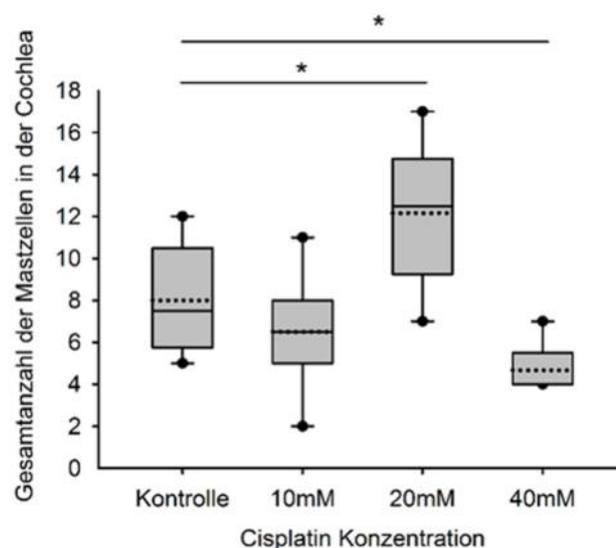


Abb. 33: Verteilung der Mastzellen nach Behandlung mit Cisplatin in der gesamten Cochlea, Wistar-Ratten – pT 5, Box-Whisker-Plots. 24 h Kontrolle n=6, [10 μM] Cisplatin n=6, [20 μM] Cisplatin n=6, [40 μM] Cisplatin n=6; 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (* $p < 0,05$, statistisch signifikanter Unterschied).

Die Gesamtanzahl der Mastzellen in der Cochlea, nachgewiesen durch Avidin-Färbung der Heparin granula, wurde durch die Cisplatinbehandlung ebenfalls verändert. Die 10 μM Cisplatin-Behandlung beeinflusste die Anzahl der Zellen nicht signifikant $p = 0,37$ (Mittelwert \pm SD: Kontrolle = $8 \pm 2,61$, 10 μM Cisplatin = $6,5 \pm 2,9$),

während 20 μM die Avidin-positive Zellzahl signifikant ansteigen und die 40 μM signifikant sinken ließ im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert \pm SD: 20 μM = $12,17 \pm 3,54$, $*p < 0,043$; 40 μM Cisplatin = $4,66 \pm 1,21$, $*p < 0,018$) (t-Test).

3.5.2. Wirkungen des Cisplatins auf CD45-positive Zellen

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen das ototoxische Medikament Cisplatin auf Anzahl und Morphologie der CD45-positiven Zellen hat, wurden die Cochleae der Wistar-Ratten mit 20 μM Cisplatin für 3, 24 und 48 Stunden im Zellkulturmedium inkubiert.

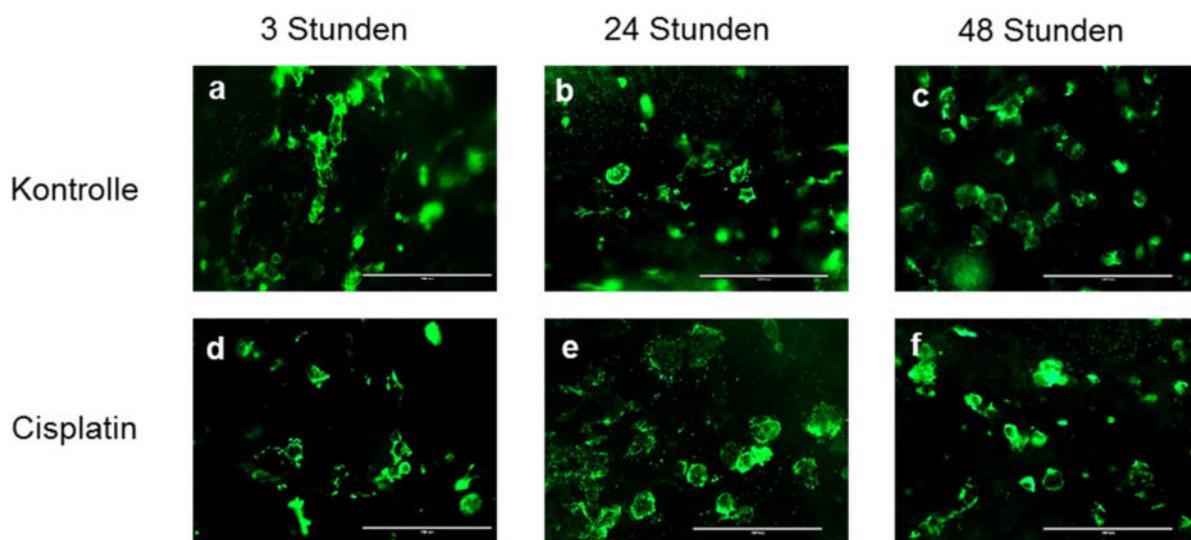


Abb. 34: CD45-positive Zellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat; Färbung – grün: Alexa Fluor 488, **a-c:** Kontrolle nach 3, 24 und 48 h Inkubation im Kulturmedium, **d-f:** Cisplatin-Behandlung [20 μM], nach 3, 24 und 48 h Inkubation, Maßstab: 100 μm .

Eine dreistündige Inkubation des basalen Explantats von pT5 zeigte keine Effekte auf die Morphologie der Zellen (Abb. 34a + d). Nach 24 und 48 Stunden bildeten sich die Pseudopodien bei den mit Cisplatin behandelten Zellen zurück, bei gleichbleibender Zellkörpergröße (Abb. 34b + e und c + f).

Für die in Abb. 35 zusammengefassten Zellzählungen wurden die durch mechanische Reizung eingewanderten CD45-positiven Zellen, wie zuvor unter physiologischen Bedingungen, nicht mit einbezogen.

Die Anzahl CD45-positiver Zellen nimmt alleine durch die Inkubation über 48 Stunden nach und nach ab (Abb. 35a). Der Effekt des Cisplatin ist aber in allen Fällen nachweisbar und zeigt sich durch hochsignifikante ($***p < 0,001$) niedrigere Zellzahlen

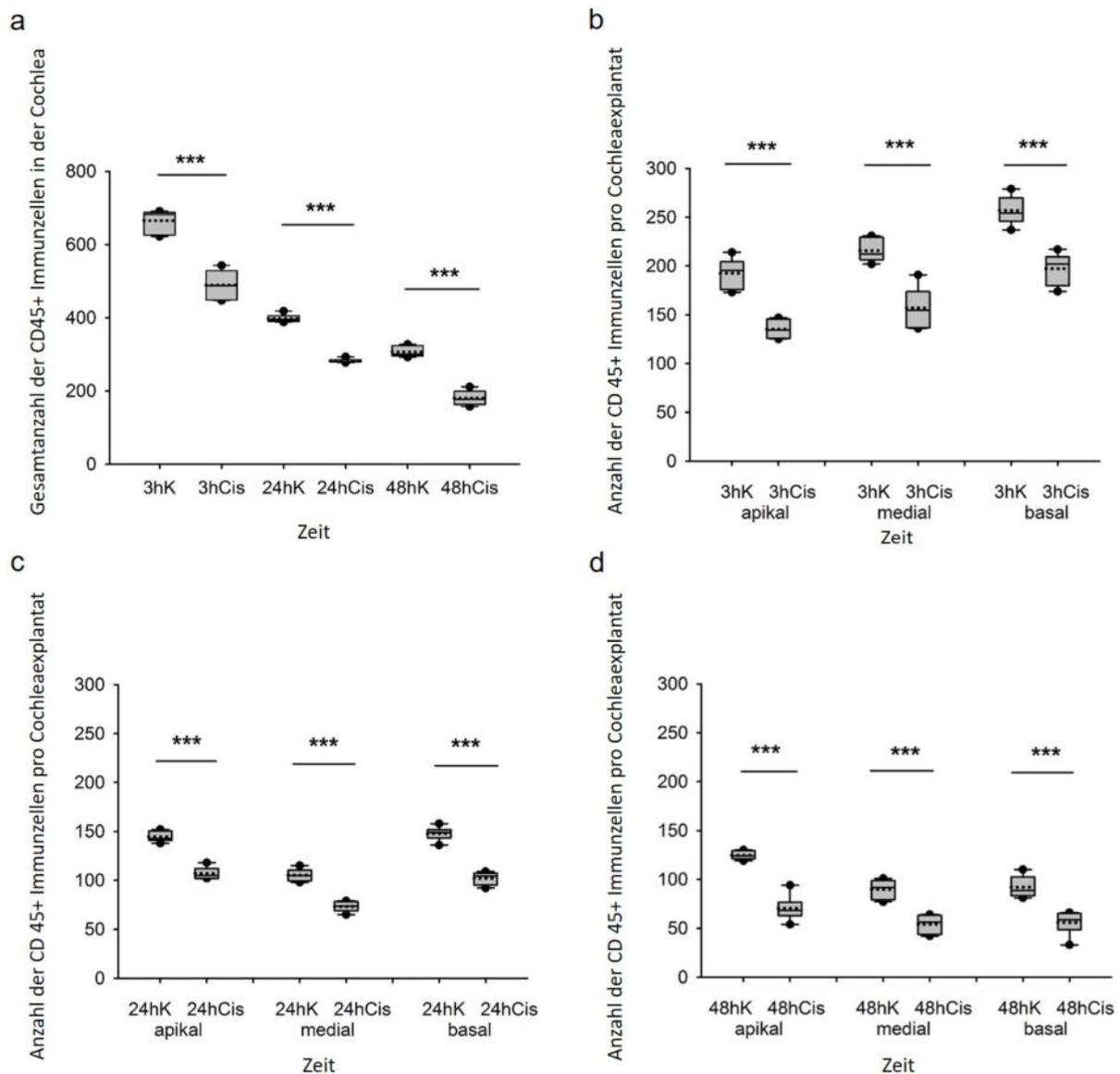


Abb. 35: Bestimmung der Zellzahl der CD45-positive Zellen nach Behandlung mit Cisplatin [20 μM], OC der Wistar-Ratten – pT5, Cochlea gesamt, Box-Whisker-Plots – a: 3 h Kontrolle n=6, 3 h Cisplatin n=6, 24 h Kontrolle n=6, 24 h Cisplatin n=6, 48 h Kontrolle n=6, 48 h Cisplatin n=6, b: nach 3 h Inkubation, c: nach 24 h Inkubation, d: nach 48 h Inkubation. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (*)p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied).**

an allen drei getesteten Zeitpunkten (Kontrolle [Mittelwert \pm SD]: 3 h = 665,33 \pm 31,84, 24 h = 398,00 \pm 10,75, 48 h = 306,50 \pm 14,8; Cisplatin [Mittelwert \pm SD]: 3 h = 489,66 \pm 39,04, 24 h = 282,33 \pm 5,57, 48 h = 180,33 \pm 19,82).

Dieser Cisplatin-Effekt bestätigt sich auch für alle drei unterschiedlich betrachteten Explantate der Cochlea, ist aber erst nach 24 Stunden [Mittelwert \pm SD]: apikal: 24 h K = 144,67 \pm 5,28, 24 h Cis = 107,00 \pm 6,26; medial: 24 h K = 105,33 \pm 6,44, 24 h Cis = 73,16 \pm 5,20; basal: 24 h K = 148,00 \pm 7,15, 24h Cis = 102,16 \pm 6,67) und 48 h apikal: 48 h K = 124,67 \pm 4,38, 48 h Cis = 70,33 \pm 13,10; medial: 48 h K = 89,83 \pm 9,57,

48 h Cis = $54,17 \pm 9,32$; basal: 48 h K = $92,00 \pm 11,04$, 48 h Cis = $55,83 \pm 12,15$) signifikant verringert (** $p < 0,001$).

Nach 3 Stunden sind die Unterschiede dagegen alle nicht signifikant; apikal: 3 h K = $192,66 \pm 15,58$, 3 h Cis = $135,33 \pm 9,64$; medial: 3 h K = $215,83 \pm 11,65$, 3 h Cis = $157,00 \pm 21,09$; basal: 3 h K = $256,83 \pm 14,64$, 3 h Cis = $197,33 \pm 16,45$). ANOVA One Way Analysis of Variance/Tukey Test (Abb. 35b - d).

3.5.3. Wirkungen des Cisplatins auf CD11b-positiven Zellen

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die ototoxische, chemotherapeutische Substanz Cisplatin auf Anzahl und Morphologie der CD11b-positiven Zellen hat, wurden die Cochleae der Wistar-Ratten mit $20 \mu\text{M}$ Cisplatin für 3, 24 und 48 Stunden im Zellkulturmedium inkubiert.

Eine dreistündige Inkubation des basalen Explantats von pT5 zeigte keine Effekte auf die Morphologie der Zellen (Abb. 36a + d). Nach 24 und 48 Stunden bildeten sich die Pseudopodien bei den mit Cisplatin behandelten Zellen zurück, bei gleichbleibender Zellkörpergröße (Abb. 36b + e und c + f).

Für die in Abb. 37 zusammengefassten Zellzählungen wurden die durch mechanische Reizung eingewanderten CD11b-positiven Zellen, wie zuvor unter physiologischen Bedingungen, nicht mit einbezogen.

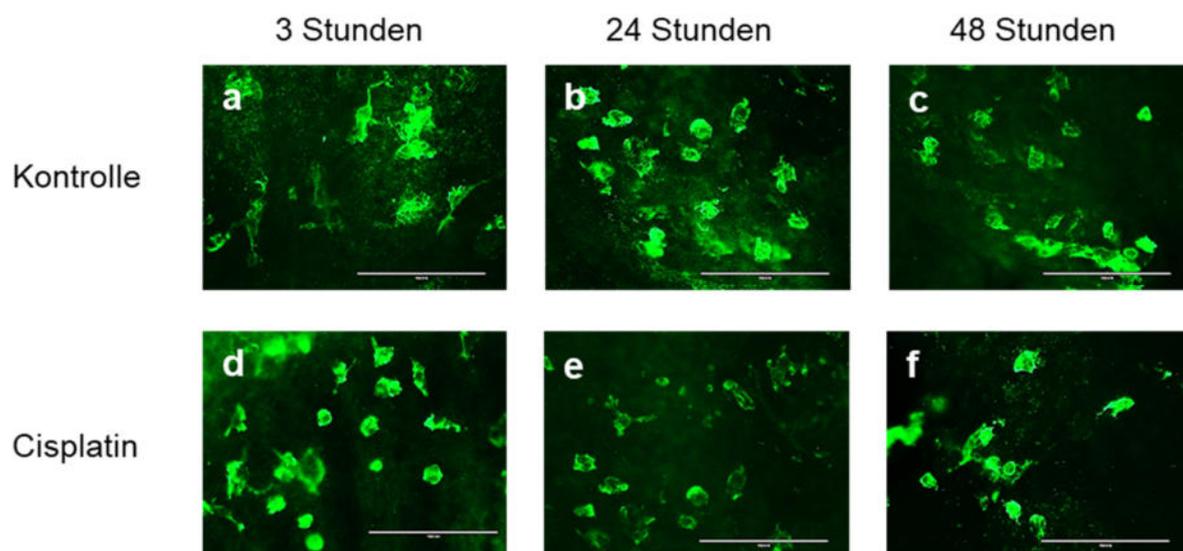


Abb. 36: CD11b-positive Zellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratte – pT5, basales Explantat, Färbung – grün: CD11b-positive Zellen (Alexa Fluor 488), **a-c**: Kontrolle nach 3, 24 und 48 h Inkubation im Kulturmedium, **d-f**: Cisplatin-Behandlung [$20 \mu\text{M}$], nach 3, 24 und 48 h Inkubation. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Die Anzahl CD11b-positiver Zellen nimmt alleine durch die Inkubation über 48 Stunden nach und nach ab (Abb. 37a). Der Effekt des Cisplatin ist aber in allen Fällen

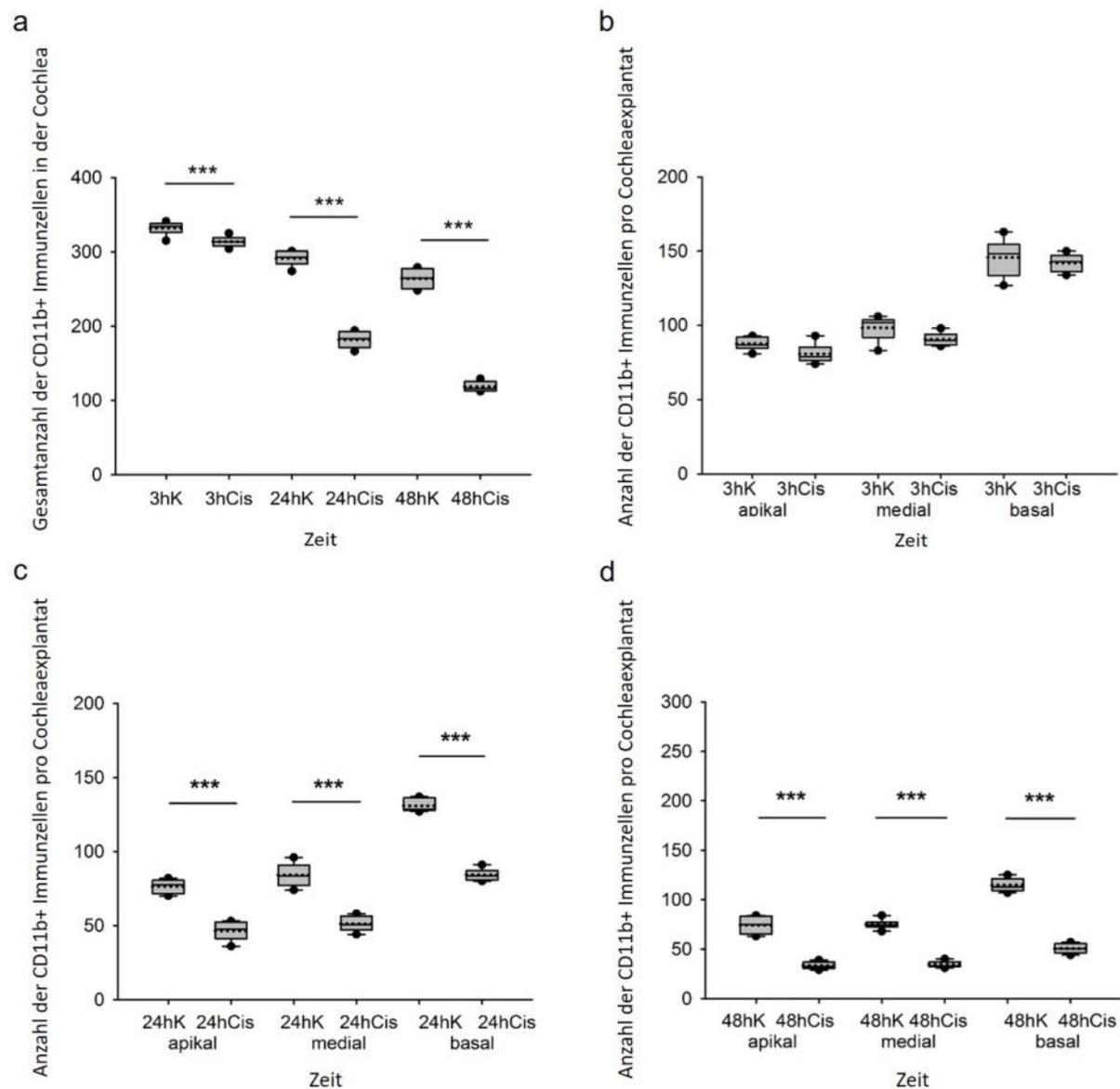


Abb. 37: CD11b-positive Zellen, Bestimmung der Zellzahl nach Behandlung mit Cisplatin [20 µM], OC der Wistar-Ratte – pT5, Cochlea gesamt, Box-Whisker-Plots – a: nach 3 h Inkubation; 3h Kontrolle n=6, 3 h Cisplatin n=6, 24 h Kontrolle n=6, 24 h Cisplatin n=6, 48 h Kontrolle n=6, 48 h Cisplatin n=6, **b:** nach 3 h Inkubation **c:** nach 24 h Inkubation **d:** nach 48 h Inkubation. 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (***)p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied).

nachweisbar und zeigt sich durch hochsignifikante (*p = 0,037 für 3 h K vs. 3 h Cis und ***p < 0,001) niedrigere Zellzahlen an allen drei getesteten Zeitpunkten (Kontrolle [Mittelwert ± SD]: 3 h = 332,00 ± 9,12; 24 h = 291,33 ± 10,67; 48 h = 264,00 ± 13,65; und Cisplatin [Mittelwert ± SD]: 3 h = 313,66 ± 7,2; 24 h = 181,83 ± 10,87; 48 h = 118,33 ± 6,83).

Dieser Cisplatin-Effekt bestätigt sich auch für alle drei unterschiedlich betrachteten Explantate der Cochlea, ist aber erst nach 24 Stunden (Mittelwert \pm SD; apikal: 24 h K = 76 ± 50 , 24 h Cis = $46,50 \pm 6,47$; medial: 24 h K = $84,00 \pm 7,82$, 24 h Cis = $51,16 \pm 5,23$; basal: 24 h K = $130,83 \pm 4,44$, 24 h Cis = $84,16 \pm 4,26$) und 48 h (Mittelwert \pm SD; apikal: 48 h K = $74,33 \pm 8,93$, 48 h Cis = $33,33 \pm 3,61$; medial: 48 h K = $75,00 \pm 5,13$, 48 h Cis = $34,33 \pm 3,2$; basal: 48 h K = $114,66 \pm 6,68$, 48 h Cis = $50,66 \pm 5,08$) signifikant verringert ($***p < 0,001$) (Abb. 37b - d). Nach 3 Stunden sind die Unterschiede dagegen alle nicht signifikant (Mittelwert \pm SD; apikal: 3 h K = $87,66 \pm 4,36$, 3 h Cis = $80,83 \pm 6,67$; medial: 3 h K = $98,5 \pm 8,4$, 3 h Cis = $90,67 \pm 4,36$; basal: 3 h K = $145,83 \pm 12,64$, 3 h Cis = $142,17 \pm 5,88$). ANOVA- One-Way Analysis of Variance/ Tukey Test.

3.5.4. Wirkungen des Cisplatins auf CD68-positiven Zellen

Genau wie bei CD45- bzw. CD11b-positiven Zellen zuvor, sollte auch untersucht werden, inwiefern das ototoxische Medikament Cisplatin Auswirkungen auf Anzahl und Morphologie der CD68-positiven Zellen hat. Hierzu wurden die Cochleae der Wistar-

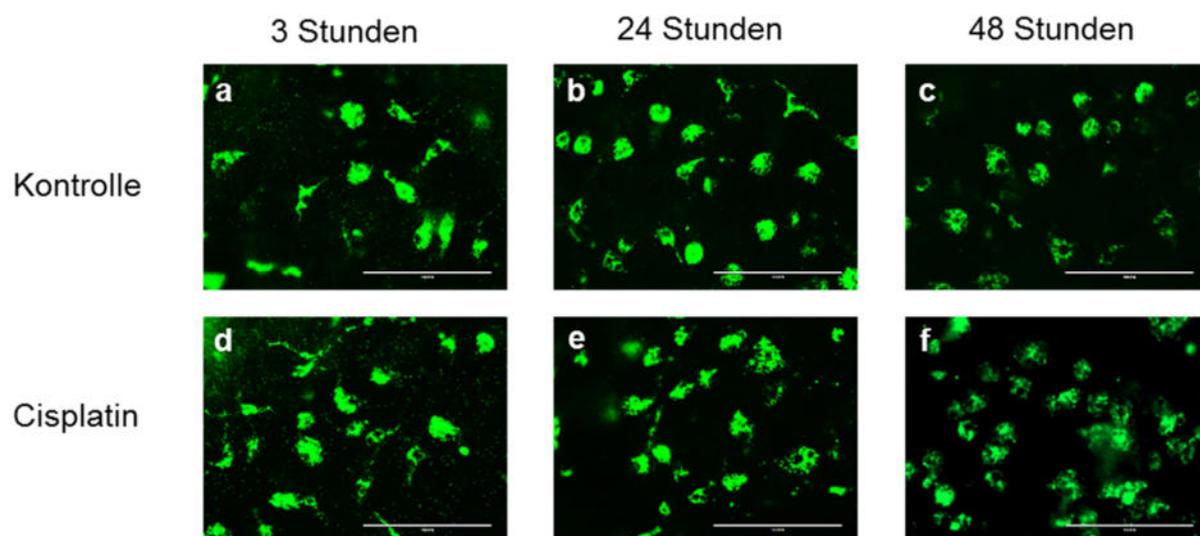


Abb. 38: CD68-positive Zellen nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5, basales Explantat, Färbung, grün: CD68-positive Immunzellen (Alexa Fluor 488), **a:** Kontrolle nach 3, 24 und 48 h Inkubation im Kulturmedium, **b:** Cisplatin-Behandlung [20 μ M], nach 3, 24 und 48 h Inkubation; Maßstab: 100 μ m.

Ratten mit 20 μ M Cisplatin für 3, 24 und 48 Stunden im Zellkulturmedium inkubiert. Eine dreistündige Inkubation des basalen Explantats von pT5 zeigte keine Effekte auf die Morphologie der Zellen (Abb. 38a + d). Nach 24 und 48 Stunden bildeten sich die Pseudopodien bei den mit Cisplatin behandelten Zellen zurück, bei gleichbleibender

Zellkörpergröße (Abb. 38b + e und c + f). Darüber hinaus schienen einige mit Cisplatin-behandelten Zellen nach 24 und 48 Stunden miteinander zu fusionieren.

Für die in Abb. 39 zusammengefassten Zellzählungen wurden die durch mechanische Reizung eingewanderten CD68-positiven Zellen, wie zuvor unter physiologischen Bedingungen, nicht mit einbezogen.

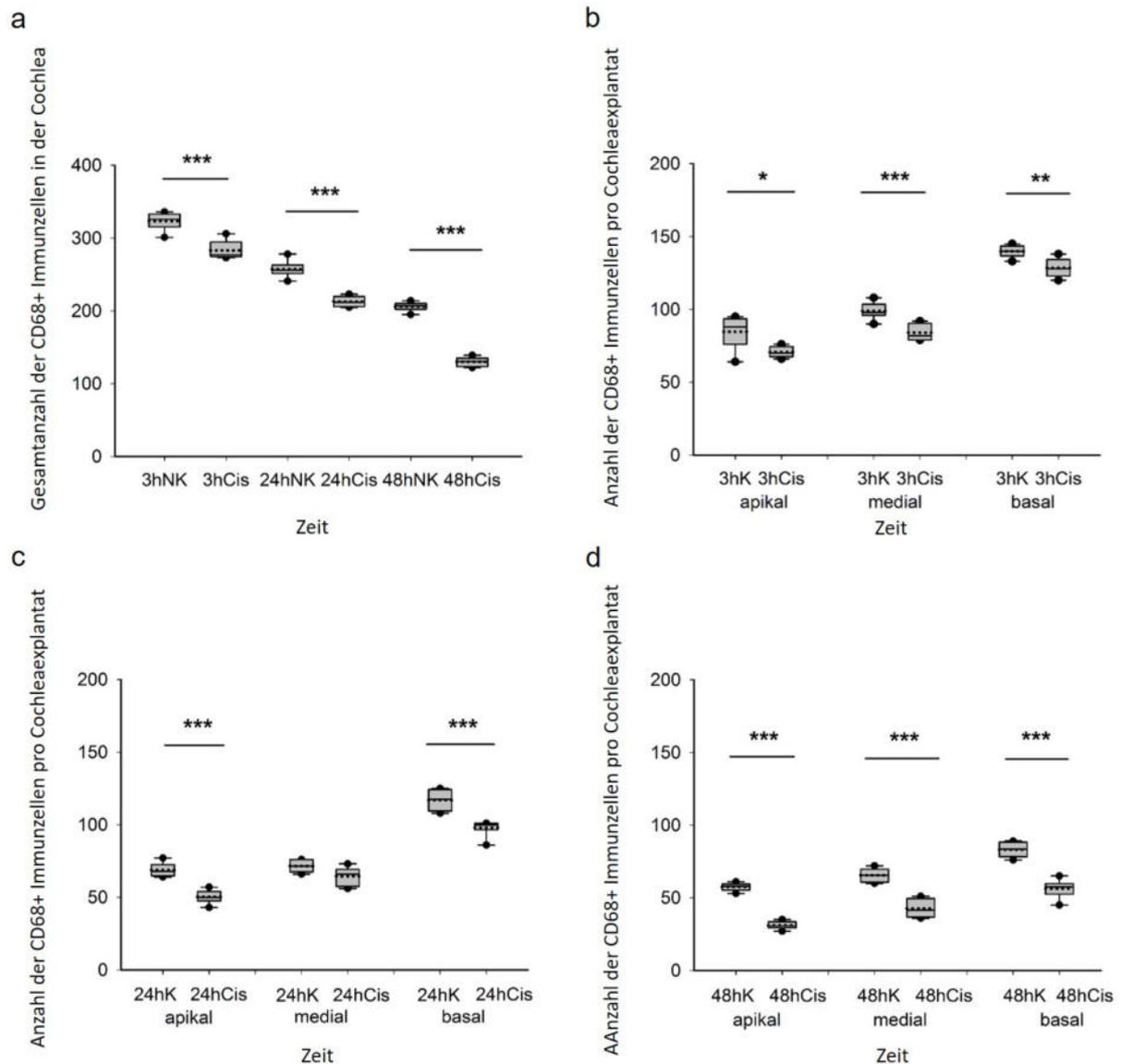


Abb. 39: CD68-positive Zellen, Bestimmung der Zellzahl nach Behandlung mit Cisplatin [20 µM], OC der Wistar-Ratten – pT5, Box-Whisker-Plots – a: nach 3 h Inkubation, 3 h Kontrolle n=6, 3 h Cisplatin n=6, 24 h Kontrolle n=6, 24 h Cisplatin n=6, 48 h Kontrolle n=6, 48 h Cisplatin n=6, **b:** nach 3 h Inkubation, **c:** nach 24 h Inkubation **d:** nach 48 h Inkubation 1. Quartil, untere Grenze der Box: 3. Quartil, schwarze Linie: Mittellinie, gepunktete Linie: Median, schwarze Punkte: Ausreißer, Whiskers: Minimum und Maximum (**p<0,01, ***p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied).

Die Anzahl CD68-positiver Zellen nimmt alleine durch die Inkubation über 48 Stunden nach und nach ab (Abb. 39a). Der Effekt des Cisplatin ist aber in allen Fällen nachweisbar und zeigt sich durch hochsignifikante ($***p < 0,001$) niedrigere Zellzahlen an allen drei getesteten Zeitpunkten, insbesondere nach 48 Stunden (Kontrolle [Mittelwert \pm SD]: 3 h = $323,50 \pm 12,39$; 24 h = $257,33 \pm 11,87$; 48 h = $206,16 \pm 6,27$; und Cisplatin [Mittelwert \pm SD]: 3 h = $283,16 \pm 12,89$, 24 h = $212,83 \pm 7,75$, 48 h = $130,00 \pm 6,35$). ANOVA One-Way Analysis of Variance/ Tukey Test.

Dieser Cisplatin-Effekt bestätigt sich auch für alle drei unterschiedlich betrachteten Explantate der Cochlea nach 3 Stunden (Mittelwert \pm SD; apikal: 3 h K = $84,67 \pm 11,81$, 3 h Cis = $70,67 \pm 3,77$; medial: 3 h K = $99,00 \pm 6,3$, 3 h Cis = $84,00 \pm 5,65$; basal: 3 h K = $139,83 \pm 4,21$, 3 h Cis = $129,50 \pm 6,38$) und 48 h (Mittelwert \pm SD; apikal: 48 h K = $57,50 \pm 2,81$, 48 h Cis = $31,00 \pm 2,75$; medial: 48 h K = $65,50 \pm 4,48$, 48 h Cis = $42,67 \pm 6,34$; basal: 48 h K = $83,17 \pm 5,11$, 48 h Cis = $56,33 \pm 6,5$) mit Ausnahme des medialen Explantats nach 24 Stunden (Mittelwert \pm SD; apikal: 24 h K = $68,83 \pm 4,75$, 24 h Cis = $50,33 \pm 4,67$; medial: 24 h K = $71,5 \pm 4,37$, 24 h Cis = $64,50 \pm 6,38$; basal: 24 h K = $117,00 \pm 7,80$, 24 h Cis = $98,00 \pm 6$). Alle Effekte sind hoch signifikant ($***p < 0,001$), mit Ausnahme der 3 Stunden-Werte für apikal ($*p < 0,05$) und basal ($**p < 0,01$) und des bereits erwähnten medialen Explantats nach 24 Stunden ($p < 0,051$).

3.5.5. Wirkungen des Cisplatins auf die Haarzellen der Cochlea

Das Auszählen der inneren und äußeren Haarzellen der mit Cisplatin behandelten OC der Wistar Ratte ergab, dass $10 \mu\text{M}$ die IHZ/ ÄHZ nicht signifikant schädigen. Erst ab einer Behandlung mit $20 \mu\text{M}$ Cisplatin zeigen sich signifikante Schädigungen in allen drei Explantaten und für IHZ/ ÄHZ gleichermaßen. Bei der höchsten Konzentration von $40 \mu\text{M}$ schließlich, liegen ausgiebige Schäden an den Haarzellen vor ($> 50\%$, Abb. 32 und Tabelle 15).

Insbesondere die Haarzellen des basalen Teils der Cochlea zeigen bei $20 \mu\text{M}$ eine starke Schädigung im Verhältnis zu medial/ apikal. $40 \mu\text{M}$ Cisplatin erzeugt immensen Schaden an den Haarzellen aller Regionen und reduziert die Anzahl intakter IHZ/ ÄHZ um etwa 60%.

Parallel zur Auszählung von CD45-, CD11b- und CD68-positiven Zellen in den mit Cisplatin behandelten organotypischen Explantaten, wurde der Effekt von $20 \mu\text{M}$

Cisplatin auf IHZ/ ÄHZ in Abhängigkeit der Inkubationszeit untersucht. Die Analyse dazu wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten mit jeweils sechs verschiedenen Explantaten durchgeführt und entsprechend separat statistisch ausgewertet (Tabelle 16, Tabelle 17 und Tabelle 18). Aufgrund der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente unterscheiden sich die absoluten Zahlenwerte leicht voneinander, zeigen aber tendenziell das gleiche Ergebnis. Im Gegensatz zur Zellzahl, die über den Verlauf der 48 Stunden auch in unbehandelten Explantaten abfällt, bleibt die Anzahl der intakten inneren und äußeren Haarzellen in der Kontrollgruppe gleich und unterscheidet sich auch nicht von apikal bis basal. Nach dreistündiger Cisplatin-Inkubation zeigt sich noch kein Effekt auf IHZ/ ÄHZ. Dagegen wird nach 24 Stunden ein signifikanter Schaden sichtbar, der sich nach 48 Stunden weiter verstärkt. Nach 24- und 48-stündiger Cisplatin-Inkubation kann man außerdem erkennen, dass der Schaden an den basalen IHZ/ ÄHZ stärker ausgeprägt ist, als medial und apikal.

Tabelle 15: Bestimmung der intakten IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat des Corti-Organs nach Behandlung mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen, Inkubationszeit: 24 h, Wistar-Ratten – pT5, doppelte IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten Avidin+ Immunzellen.

Mittelwert ± SD (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied).

Zeitintervall/ Bedingungen	Innere Haarzellen			Äußere Haarzellen		
	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal
Kontrolle (n = 6)	9,56 ± 0,58	10,28 ± 1,02	10,00 ± 0,69	12,33 ± 0,54	11,72 ± 0,54	11,37 ± 1,33
10 µM Cisplatin (n = 6)	8,78 ± 1,10 (p = 0,310)	9,11 ± 1,04 (p = 0,093)	9,83 ± 0,81 (p = 0,589)	12,20 ± 0,93 (p = 0,937)	11,56 ± 0,58 (p = 0,485)	11,02 ± 0,46 (p = 0,180)
20 µM Cisplatin (n = 6)	6,17 ± 0,35 (**p = 0,002)	7,61 ± 0,92 (**p = 0,004)	4,94 ± 1,71 (**p = 0,002)	8,54 ± 1,32 (**p = 0,002)	9,31 ± 1,32 (**p = 0,002)	5,74 ± 0,31 (**p = 0,002)
40 µM Cisplatin (n = 6)	4,78 ± 0,40 (**p = 0,002)	4,89 ± 2,74 (**p = 0,002)	3,83 ± 0,86 (**p = 0,002)	3,69 ± 1,84 (**p = 0,002)	4,87 ± 2,99 (**p = 0,002)	3,35 ± 1,02 (**p = 0,002)

Tabelle 16: Anzahl der intakten IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5, doppelte IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten CD45+ Immunzellen (Cisplatin-Konzentration: 20 µM).

Mittelwert ± SD (**p<0,01, statistisch signifikanter Unterschied).

Zeitintervall/ Bedingungen	Innere Haarzellen			Äußere Haarzellen		
	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal
3h Kontrolle (n = 6)	9,72 ± 0,49	10,22 ± 1,04	9,89 ± 0,68	12,06 ± 0,39	11,69 ± 0,55	11,57 ± 0,79
3h Cisplatin (n = 6)	9,28 ± 0,97 (p = 0,310)	9,11 ± 0,86 (p = 0,093)	9,11 ± 0,68 (p = 0,132)	12,07 ± 0,88 (p = 0,699)	12,09 ± 0,55 (p = 0,310)	11,89 ± 0,59 (p = 0,589)
24h Kontrolle (n = 6)	9,44 ± 0,27	9,78 ± 0,77	10,17 ± 0,96	11,98 ± 0,90	12,37 ± 0,74	12,69 ± 0,87
24h Cisplatin (n = 6)	7,11 ± 1,47 (**p = 0,002)	6,83 ± 2,26 (**p = 0,009)	5,11 ± 0,77 (**p = 0,002)	9,69 ± 0,77 (**p = 0,004)	9,57 ± 0,54 (**p = 0,002)	8,41 ± 1,13 (**p = 0,002)
48h Kontrolle (n = 6)	8,67 ± 0,84	8,50 ± 0,75	8,22 ± 0,34	11,59 ± 0,63	10,98 ± 1,09	11,41 ± 0,73
48h Cisplatin (n = 6)	5,89 ± 0,27 (**p = 0,002)	6,00 ± 0,76 (**p = 0,002)	5,06 ± 0,71 (**p = 0,002)	8,72 ± 0,46 (**p = 0,002)	8,19 ± 0,37 (**p = 0,002)	6,04 ± 0,43 (**p = 0,002)

Tabelle 17: Anzahl der intakten IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5. Die Werte wurden nach doppelter IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten CD11b+ Zellen erhoben (Cisplatin-Konzentration: 20 µM).

Mittelwert ± SD (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 statistisch signifikanter Unterschied).

Zeitintervall/ Bedingungen	Innere Haarzellen			Äußere Haarzellen		
	apikal	medial	basal	apikal	medial	basal
3h Kontrolle (n = 6)	9,44 ± 1,42	10,50 ± 1,34	10,50 ± 1,15	12,02 ± 0,45	12,50 ± 0,89	12,05 ± 0,49
3h Cisplatin (n = 6)	8,11 ± 1,18 (**p = 0,005)	9,17 ± 1,38 (**p = 0,007)	9,35 ± 1,22 (*p = 0,012)	11,24 ± 1,21 (*p = 0,030)	11,65 ± 0,84 (**p = 0,012)	11,57 ± 0,78 (*p = 0,027)
24h Kontrolle (n = 6)	10,00 ± 1,28	9,72 ± 0,67	10,11 ± 0,83	12,31 ± 0,80	12,46 ± 0,72	12,33 ± 0,74
24h Cisplatin (n = 6)	7,78 ± 1,43 (***p < 0,001)	7,83 ± 1,38 (***p < 0,001)	5,22 ± 1,31 (***p < 0,001)	10,31 ± 1,77 (*p = 0,015)	9,06 ± 2,22 (***p < 0,001)	8,06 ± 1,97 (***p < 0,001)
48h Kontrolle (n = 6)	8,77 ± 1,35	8,72 ± 1,77	9,05 ± 1,21	11,66 ± 1,44	11,15 ± 1,66	11,20 ± 1,18
48h Cisplatin (n = 6)	6,55 ± 1,95 (***p < 0,001)	6,22 ± 1,59 (***p < 0,001)	4,44 ± 1,54 (***p < 0,001)	9,18 ± 0,73 (***p < 0,001)	7,91 ± 0,92 (***p < 0,001)	6,22 ± 0,90 (***p < 0,001)

Tabelle 18: Anzahl der IHZ und ÄHZ pro 100 µm einer Haarzelle in der apikalen, medialen und basalen Explantat nach Cisplatin-Behandlung, OC der Wistar-Ratten – pT5. Die Werte wurden nach doppelter IF-Färbung der mit Cisplatin geschädigten CD68+ Zellen erhoben (Cisplatin-Konzentration: 20 µM).

Mittelwert ± SD (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ statistisch signifikanter Unterschied).

Zeitintervall/ Bedingungen	Innere Haarzellen			Äußere Haarzellen		
	Apikal	medial	basal	apikal	medial	basal
3h Kontrolle (n = 6)	9,66 ± 1,03	10,28 ± 1,22	10,11 ± 0,83	12,22 ± 0,70	12,00 ± 0,89	11,87 ± 0,68
3h Cisplatin (n = 6)	8,39 ± 1,09 (*** $p = 0,001$)	9,41 ± 1,06 (* $p = 0,035$)	9,23 ± 1,35 ($p = 0,069$)	11,81 ± 1,25 ($p = 0,425$)	11,42 ± 0,67 (* $p = 0,031$)	10,68 ± 0,46 (*** $p < 0,001$)
24h Kontrolle (n = 6)	9,94 ± 1,11	9,66 ± 0,59	9,89 ± 0,83	11,55 ± 1,15	11,79 ± 1,41	12,74 ± 0,92
24h Cisplatin (n = 6)	7,11 ± 1,90 (*** $p < 0,001$)	7,16 ± 1,69 (*** $p < 0,001$)	5,55 ± 1,69 (*** $p < 0,001$)	10,53 ± 1,06 (* $p = 0,015$)	9,66 ± 1,40 (*** $p < 0,001$)	8,28 ± 1,28 (*** $p < 0,001$)
48h Kontrolle (n = 6)	7,89 ± 2,14	8,89 ± 1,41	8,89 ± 1,93	11,50 ± 0,88	10,61 ± 0,61	11,44 ± 0,77
48h Cisplatin (n = 6)	6,22 ± 0,97 (* $p = 0,014$)	5,29 ± 1,12 (*** $p < 0,001$)	4,00 ± 1,49 (*** $p < 0,001$)	9,09 ± 0,92 (*** $p < 0,001$)	8,85 ± 0,82 (*** $p < 0,001$)	6,05 ± 0,97 (*** $p < 0,001$)

4. Diskussion

4.1. Beantwortung der Forschungsfragen

Das Hauptziel der Arbeit war es, die Art und Lage der residenten Leukozyten in der gesunden Cochlea der Wistar-Ratte zu charakterisieren. Außerdem zielte diese Studie auf die Charakterisierung der Leukozyten-Verteilung im Innenohr während der postnatalen Entwicklung von Wistar-Ratten (postnatale Entwicklungstage 1 bis 9 und 30) ab. Weiterhin sollte in dieser Arbeit bestimmt werden, ob die Exposition gegenüber Cisplatin die Anzahl und Verteilung der residenten Cochlea-Leukozyten beeinflussen würde. Im Folgenden werden die eingangs gestellten Forschungsfragen beantwortet und die Hypothesen geprüft.

Die erste Forschungsfrage lautete: Gibt es residente Leukozyten in der intakten Cochlea von Wistar-Ratten? Die Ergebnisse zeigten, dass es verschiedene Populationen residenter Leukozyten in der intakten Cochlea von Wistar-Ratten gibt. Hierzu zählen CD45-positive, CD11b-positive, CD68-positive und Avidin-positive Zellen.

Die zweite Forschungsfrage lautete: Kann man die Cochlea-Leukozyten anhand eines Satzes von Marker-Expressionspanels (CD45, CD11b, CD68, CD117/c-Kit, Heparin granula) charakterisieren? Auch diese Frage konnte basierend auf den vorliegenden Ergebnissen bejaht werden. Alle getesteten Leukozyten-Marker des Expressionspanels konnten in den untersuchten Geweben detektiert werden.

Die dritte Forschungsfrage lautete: Wie viele Leukozyten befinden sich in der Cochlea und in welchen bestimmten Abschnitten der Cochlea befinden sie sich? Der Median der absoluten Leukozytenzahlen pro Explantat lag bei 522 – 984,5 CD45+ Zellen (Abb. 8), 220 – 533,5 CD11b+ Zellen (Abb. 13), 270,5 – 608 CD68+ Zellen (Abb. 19) und 2 – 14 Avidin+ Zellen (Abb. 25). Die Leukozyten waren in unterschiedlichen Abschnitten der Cochlea lokalisiert. CD68+- und CD11b+-Zellen befanden sich überwiegend im Limbus spirale und im Modiolus (Abb. 17 und Abb. 11), CD45+-Zellen und Mastzellen überwiegend im Modiolus (Abb. 6 und Abb. 24).

Die vierte Forschungsfrage lautete: Verändern sich Anzahl der Leukozyten und ihre Position in der Cochlea während der postnatalen Reifung der Cochlea? Es konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die Anzahl der Leukozyten sich in den ersten postnatalen Tagen ändert. CD45+-Zellen nahmen im apikalen Teil bis Tag 5 zu und blieben danach konstant, während sie im medialen Teil ab Tag 5 abnahmen (Abb. 8, Tabelle 10). CD11b+-Zellen nahmen beginnend mit pT1 stetig ab und waren nach neun Tagen nur noch im Modiolus und im Ligamentum spirale nachweisbar (Abb. 11, Tabelle 11). CD68+-Zellen nahmen während der ersten drei Tage zu, danach stetig ab (Abb. 23). Die Anzahl der Mastzellen ist im Laufe der Entwicklung eindeutig von pT1 bis pT9 zurückgegangen (Abb. 25).

Die fünfte Forschungsfrage lautete: Beeinflusst die Exposition gegenüber Cisplatin die Anzahl und Lage der residenten Leukozyten in der Cochlea? Die Inkubation der Cochlea-Explantate mit 10 μ M Cisplatin resultierte in einer Schädigung der Mastzellen. Die Anzahl der Mastzellen nahm bis zu einer Konzentration von 20 μ M zu, danach nahm sie wieder ab. CD45+-Zellen zeigten unter Cisplatin-Behandlung ab einer Inkubationszeit von 24 Stunden einen Rückgang der Immunzellen (Abb. 35) und der Pseudopodien (Abb. 34). Die Zellzahl der CD11b+- und CD68+-Zellen nahm ebenfalls nach einer Inkubation über 24 und 48 Stunden ab, und es wurde auch bei diesen Zellen apikal, medial und basal ein Rückgang der Immunzellen (Abb. 37 und Abb. 39) und der Pseudopodien (Abb. 36 und Abb. 38) beobachtet. Haarzellen zeigten ab einer Konzentration von 20 μ M eine Schädigung.

Zu Beginn der Arbeit wurden die folgenden drei Hypothesen formuliert.

Hypothese 1: Verschiedene Arten von residenten Leukozyten sind physiologischer Bestandteil der gesunden, nativen Cochlea.

Hypothese 2: Das Stadium der postnatalen Entwicklung der Wistar-Ratte beeinflusst die Anzahl, Verteilung und Lokalisation der Cochlea-Leukozyten.

Hypothese 3: Cisplatin beeinflusst die Anzahl, Verteilung und Lokalisation von in der Cochlea befindlichen Leukozyten.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen konnten alle drei Hypothesen angenommen werden. Im Folgenden werden diese Ergebnisse im Detail beschrieben und mit vorherigen Studien verglichen.

4.2. Interpretation der Ergebnisse und Literaturvergleich

Die Analyse der organotypischen Cochlea-Kulturen bestätigte das Vorhandensein von CD45-positiven Zellen in der Cochlea von Wistar-Ratten. Diese Zellen wurden während der ersten neun Tage nach der Geburt der Ratte vornehmlich in der Zone IV (Modiolus) detektiert (Abb. 6). Bei genauerer Betrachtung einzelner Strukturen innerhalb der Cochlea (Abb. 8, Tabelle 10) zeigte sich, dass im Zuge der Entwicklung der Ratten die Anzahl der CD45-positiven Zellen abnahm, diese Zellen aber in einigen Bereichen wie der Stria vascularis und Modiolus auch an pT30 noch nachweisbar waren. Die Analyse der Anzahl CD45-positiver Zellen ergab, dass sie über den Verlauf der Entwicklung der Wistar Ratten relativ stabil blieben, mit einem leichten Anstieg an pT5. Betrachtete man die einzelnen Abschnitte der Cochlea, nahm die Zellzahl im apikalen Explantat von pT1-pT9 signifikant zu und zur gleichen Zeit im medialen Explantat signifikant ab (Abb. 8, Tabelle 10). Dies erlaubte die Schlussfolgerung, dass es hier zur Ansammlung CD45-positiver Zellen im apikalen Explantat kam. Für CD45-positive Zellen fanden sich vornehmlich Typ 3 Zellen, während Typ 1 und 2 Zellen im Laufe der Entwicklung an Häufigkeit abnahmen (Tabelle 9). Im Limbus spirale fanden sich ausschließlich Zellen des Typs 3 und im Vas spirale cochleae nur Zellen des Typs 1. Die Morphologie der CD45-positiven Zellen unterschied sich zwischen den drei Zelltypen. Die Zellkörpergröße der Zellen des Typs 3 war kleiner als die der Typen 1 und 2 und wies nur kurze Pseudopodien auf. Im Gegensatz zu den Zellen der Typen 1 und 2 war die Zellform der Zellen des Typs 3 nicht amöboid, sondern rund bis leicht oval, und auch die Kernform dieser Zellen war teilweise oval und nicht rundlich wie in den anderen beiden Zelltypen.

Dong et al. untersuchten die postnatale Entwicklung von Makrophagen in der Cochlea im Corti-Organ und der Basilarmembran von C57BL/6J-Mäusen. Die Entwicklung wurde beginnend vom postnatalen Tag 1 anhand der Expression der Makrophagen-Marker F4/80 und Iba1 sowie der Zellmorphologie untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche Makrophagenpopulationen im Corti-Organ und der Basilarmembran identifiziert, eine in der Scala tympani der Basilarmembran, die anderen oberhalb der Basilarmembran, entweder unter den Zellen des Corti-Organs oder entlang des Spiralgefäßes der Basilarmembran. Die Anzahl der Makrophagen nahm während der postnatalen Entwicklung ab (Dong et al., 2018). Seigel et al. untersuchten die Biologie der Mikrogliazellen in der Cochlea der Ratte. Es wurden TMEM119⁺-, CD11b⁺-, CD45⁺- und Iba1⁺-Zellpopulationen immunhistochemisch in der Cochlea nachgewiesen, insbesondere im Rosenthal-Kanal, im inneren Sulcus und in der Stria vascularis (Seigel et al., 2017). Eine Isolierung von CD11b⁺-Zellen aus der Cochlea und anschließende Immortalisierung mit einem Adenovirus resultierte in der Generierung einer neuen Zelllinie, die als Mocha (Mikroglia der Cochlea) bezeichnet wurde. Diese Zellen exprimierten Mikroglia-typische Markerproteine und konnten mit Lipopolysacchariden stimuliert werden. Ebenso waren diese Zellen in der Lage, fluoreszierende Beads zu phagozytieren. Bhave et al. analysierten die Anzahl der Leukozyten nach Haarzellverlust des Innenohrs von Vögeln (Bhave et al., 1998). Bromodeoxyuridin (BrdU)-Immunhistochemie wurde zur Identifizierung proliferierender Zellen in auditorischen und vestibulär-sensorischen Epithelien verwendet. LT40, ein Antikörper gegen das Vogelhomolog von CD45, wurde zur Markierung von Leukozyten innerhalb der Rezeptorepithelien verwendet. Es konnten in physiologischen vestibulären Epithelien Makrophagen und Mikroglia-ähnliche Zellen identifiziert werden. Nach dem Haarzellverlust nahm die Zahl der Makrophagen- und Mikroglia-ähnlichen Zellen im Sinnesepithel zu. Die Autoren schlussfolgerten, dass Makrophagen- und Mikroglia-ähnliche Zellen bei der Freisetzung früher Signale für die Zellzyklusprogression im geschädigten sensorischen Innenohrepithel eine Rolle spielen könnten. Diese früheren Studien stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen überein, dass es in der Cochlea auch unter physiologischen Bedingungen eine Makrophagenpopulation gibt. Auch die Lokalisation im Stria vascularis in der Studie von Seigel et al. ist in Übereinstimmung mit der hier identifizierten Lokalisation.

Die Analyse der organotypischen Kulturen der OC belegten das Vorhandensein von CD11b- und CD68-positiven Zellen an allen untersuchten Entwicklungstagen der

Wistar-Ratten im Vas spirale, zwischen inneren und äußeren Haarzellen (Abb. 11 und Abb. 17). Die Anzahl der CD11b-positiven Zellen in der Cochlea war an pT1 am höchsten und fiel signifikant um fast die Hälfte an pT3 ab, blieb dann aber stabil über die gesamte ausgewertete Zeit bis pT9. Dem gegenüber stieg die Anzahl der CD68-positiven Zellen zur gleichen Zeit (pT3) um mehr als das Doppelte an. Auch wenn an pT5 die Zellzahl zurückging, so war bis pT9 wieder ein Anstieg der Zellzahl zu beobachten. Dieser Verlauf wurde durch Quantifizierung der Gesamtmenge an CD68-Protein im Western Blot bestätigt. Nach einem Anstieg der CD68-Proteinmenge an pT3 folgte ein Rückgang an pT5 und eine gleichbleibend niedrige Menge bis pT9.

Dieser scheinbare Gegensatz zwischen zwei Oberflächenmarkern, die theoretisch auf den gleichen Zellen exprimiert sein sollten, lässt sich auf verschiedene Arten diskutieren. Die einfachste Erklärung ist die, dass es eine CD11b-positive und CD68-negative Population gibt. Ein Beispiel dafür wären z.B. Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (DC), die ebenfalls CD11b exprimieren können, auch wenn konventionelle DCs in der Regel über Expression von CD11c identifiziert werden (Plantinga et al., 2013; Krishnaswamy et al., 2017). Die Nomenklatur der Oberflächenmarker basiert auf den Ergebnissen verschiedener Labore, die unterschiedlichste Methoden und Antikörper verwendet haben. Das bedeutet, dass die Liste der Zellen, die CD11b oder CD68 exprimieren sollen, und die Übergänge von Zelle zu Zelle fließend sein können. Im Zuge der Entwicklung der Zellen, aber auch durch Aktivierungssignale, können die Zellen darüber hinaus die Expression einiger Oberflächenmarker anpassen. So kommt es z.B. bei T-Zellen nach deren Aktivierung zu einer massiven Expression von CD69 innerhalb einiger Stunden aber bereits 24 Stunden später ist CD69 per FACS kaum noch nachzuweisen bzw. wieder auf den geringen Ausgangswert einer unstimulierten T-Zelle gesunken (Cibrián et al., 2017). Abgesehen davon, dass man also möglicherweise eine CD11b+/- CD68+-Population identifiziert hat, die nach pT1 langsam verschwindet, wäre es auch möglich, dass die Expression von CD11b auf den Zellen so stark sinkt, dass sie bei der Auszählung nicht mehr als CD11b-positiv erkannt werden konnten, während sie aber immer noch CD68 in ausreichender Menge exprimieren, um als solche identifiziert zu werden. Betrachtet man zusätzlich noch die Ergebnisse der Kryoschnitte für CD11b und CD68, dann ergibt sich noch eine dritte Möglichkeit: die Existenz einer CD11b+/- CD68+-Population. Während nämlich zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung der Wistar-Ratte CD11b-positiv Zellen in der Reissner'schen Membran, der Scala media und dem

Corti-Organ nachgewiesen wurden, befanden sich an pT1, und pT3 in allen genannten Bereichen CD68-positive Zellen und in der Reissner'schen Membran noch bis pT5 und dem Corti-Organ sogar bis pT7. In jedem Fall befinden sich somit CD68-positive Zellen in der Cochlea der Wistar-Ratten, deren Anzahl im Verlauf der Entwicklung der Ratte zunimmt, insbesondere an pT3. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von Wei Liu et al., die mittels hochauflösender immunhistochemischer Analysen Makrophagen in der menschlichen Cochlea nachweisen konnten, ähnlich wie O'Malley et al. bereits zwei Jahre zuvor.

Für Makrophagen ist diese Variabilität in Bezug auf die Expression von Oberflächenmarkern bereits in mehreren Studien nachgewiesen worden und bestätigte sich somit auch hier (Hu et al., 2018). Darüber hinaus ist es auch bekannt, dass die Immunzellen, insbesondere Makrophagen, auch die Form ihres Zellkörpers in Abhängigkeit der Umgebung anpassen können. In einer Studie von Hu et al. wird anschaulich gezeigt, dass die Makrophagen im apikalen Explantat der Cochlea dendritischen Zellen ähneln, mit langen verzweigten Pseudopodien. Im medialen Explantat sind die Pseudopodien weniger häufig ausgebildet und basal nahezu vollständig zurückgezogen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass diese drei verschiedenen Stufen existieren, allerdings wurde keine statistische Erhebung darüber durchgeführt, zu welcher Zeit welche Zelltypen in welchem Explantat der Cochlea auftreten, sondern deren Häufigkeit erfasst, zusammen mit einer phänotypischen Beschreibung in Abhängigkeit der Entwicklung der Wistar-Ratte und in Bezug auf apikale, mediale oder basale Lokalisation. Eine spezifische Ansammlung der verschiedenen Zelltypen in apikalen, medialen oder basalen Explantaten konnte für keinen der drei untersuchten Oberflächenmarker festgestellt werden. Dagegen konnten manche Typen in spezifischen Bereichen innerhalb der Cochlea hier nicht nachgewiesen werden. CD11b-positive Zellen jedes Typs kamen während der gesamten untersuchten neun Tage der Entwicklung der Wistar-Ratte in gleichem Maße vor, wohingegen CD68-positive Zellen des Typs 2 und 3 etwas häufiger vorzukommen schienen als Typ 1. Auch hier fanden sich Bereiche innerhalb der Cochlea, in dem nur ein Typ Zelle vorkam. So fanden sich im Corti-Organ und dem Vas spirale cochleae nur CD68-positive Zellen des Typs 3.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei allen drei Zelltypen im Grunde um die gleiche Zellart (Makrophagen) handelte, da Makrophagen, wie beschrieben, die Länge ihrer Pseudopodien anpassen können. Zudem besteht die Möglichkeit, dass sich

CD45-, CD11b- oder CD68-positive Typ 3-Zellen in Typ 1- oder Typ 2-Zellen umwandeln können. So führen Aktivierungssignale z.B. zu einem Wachsen des Zellkörpers und der Ausbildung vieler Pseudopodien in die Richtung der detektierten Inflammation (Frye et al., 2017). Da die Erfassung des Phänotyps und der Häufigkeit der Zellen in organotypischen Explantaten durchgeführt wurde und durch die Behandlung während der Präparation durchaus eine solche Entzündungsreaktion ausgelöst worden sein könnte, sollten die vorliegenden Daten entsprechend mit Vorsicht interpretiert werden. Es besteht z.B. die Möglichkeit, dass sich die Zellen vor der Präparation im Limbus und Modiolus befanden und später, nach 24 Stunden Ruhezeit, zu dem entfernten Teil der Stria vascularis wanderten, um zur Heilung des geschädigten Gewebes beizutragen. Möglicherweise diene dies zur Immunüberwachung des betroffenen Bereiches, damit die Heilung des Gewebes erfolgen konnte. In jedem Fall zeigte sich aber das komplexe Zusammenspiel von Immunzellen mit dem sie umgebenden Gewebe und wie wichtig es ist dieses zu verstehen, um es in Zukunft für eine mögliche Behandlung auszunutzen zu können.

Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Ossifikation der Cochlea bei der Ratte erst ab dem fünften Entwicklungstag postnatal abgeschlossen. Die Knochenbildung selbst ist eher ein Knochenumbauprozess, bei dem Gewebe auf und wieder abgebaut wird (Berendsen et al., 2015). Hierbei entsteht sehr viel abzubauenendes Gewebe, in Form von Zelltrümmern apoptotischen Zellen zum Beispiel. Die Beteiligung von Makrophagen bei diesen Ossifikationsprozessen ist bekannt und wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Levesque et al., 2018; Schlundt et al., 2018), allerdings noch nicht im Kontext der Ossifikation der Cochlea. Die vorliegenden Daten belegen somit zum ersten Mal einen zeitlichen und lokalen Zusammenhang zwischen Makrophagen und der Verknöcherung der Cochlea bei Wistar-Ratten. In Folgestudien müsste allerdings durch spezifischere Analysen nachgewiesen werden, ob eine direkte Beteiligung dieser Zellen bei der Ossifikation besteht oder ob es eine Ansammlung im Gewebe ist, die zur gleichen Zeit stattfindet.

Eine weitere Zellpopulation, die bei der Ossifikation eine entscheidende Rolle spielt, sind Mastzellen. Während die Anzahl der Avidin-positiven Zellen im Laufe der Entwicklung eindeutig von pT1 bis pT9 zurückgegangen ist (Abb. 25) und sich somit keine besondere Anreicherung der Zellen gen pT5 nachweisen ließ, so fanden sich bei genauerer Betrachtung doch auch hier Hinweise darauf, dass die Mastzellen bei der Ossifikation der Cochlea eine Rolle spielen könnten. In einer repräsentativen,

konfokal-mikroskopischen Darstellung eines Querschnitts durch die Cochlea war gut erkennbar, dass Avidin-positive Zellen, neben Modiolus und Limbus spirale, vor allem in den die Cochlea umgebenden Bereichen zu finden waren, die zum Zeitpunkt der Aufnahme an pT3 noch nicht verknöchert waren. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die Avidin-positiven Mastzellen, ähnlich wie die CD68-positiven Makrophagen an der Ossifikation der Cochlea beteiligt sind. Bestärkt wird dieser Befund dadurch, dass die Proteinmenge an CD117/c-Kit, als ein spezifischer Marker für Mastzellen, ab pT1 bis pT5 anstieg und dann ab pT7 wieder abfiel. Dies spricht dafür, dass vermehrt Mastzellen in die Cochlea migrierten oder vor Ort gebildet wurden.

Ein möglicherweise ähnlicher Zusammenhang könnte zwischen der Entwicklung des Gehörs der Wistar-Ratte und der Anwesenheit der untersuchten Immunzellen bestehen. Es ist bekannt, dass sich das Gehör der Ratte in den ersten Wochen nach der Geburt erst noch entwickeln muss und erst ab pT12 erste luftübertragene Schallwellen detektiert werden können, mit voller Funktionsfähigkeit ab pT22 (Geal-Dor et al., 1993).

Die Anzahl der Zellen, die die getesteten Oberflächenmarker exprimierten, variierte wie beschrieben innerhalb der untersuchten neun Tage postnatal. Betrachtete man die Zellverteilung innerhalb der organotypischen Explantate, war in allen Fällen nachweisbar, dass sich CD45-, CD11b und CD68-positive Zellen in der Nähe der inneren und äußeren Haarzellen aufhielten (Zone II), wenn auch in unterschiedlicher Anzahl. So befanden sich im Mittel 24 CD45-positive Zellen in der OC aber nur 9 CD11b-positive- und 5 CD68-positive Zellen.

Allerdings befanden sich in den Kryoschnitten der OC, die der realen Verteilung der Immunzellen innerhalb der Cochlea näher kommen, als die artifizielle, organotypische Kultur, zu keinem Zeitpunkt CD11b-positive Zellen innerhalb des Corti-Organs. Es besteht deshalb durchaus die Möglichkeit, dass sich CD11b-positive Zellen innerhalb der organotypischen Kultur fundamental anders verhalten als in vivo. Gleiches gilt für die CD45-positiven Zellen, die in Kryoschnitten des Corti-Organs zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten. Entsprechend ist hier eine Beteiligung ebenfalls fraglich, kann aber auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Für CD68-positive Zellen hingegen konnte eine Korrelation zwischen der Anwesenheit innerhalb IHZ/ ÄHZ der organotypischen Kultur und den Kryoschnitten durch das Corti-Organ nachgewiesen werden. So befanden sich in der organotypischen Kultur an pT1-9 CD68-positive Zellen vor allem im Limbus spirale und Modiolus aber auch neben den

Stützzellen und IHZ/ ÄHZ. In den Kryoschnitten waren sie ebenfalls nachweisbar, wenn auch nur innerhalb der ersten sieben Tage postnatal und nicht an pT9. Diese geringfügige Divergenz kann ebenfalls durch organotypische Kultivierung verursacht worden sein, z.B. durch die Präparation selbst, bei der nachgewiesen wurde, dass CD68-positive Makrophagen zum Ort des Gewebeschadens migrieren. Möglicherweise wurden dadurch am Ort des Gewebeschadens Zytokine ausgeschüttet, die die Migration der Immunzellen fundamental veränderten, wie im Falle der CD45- und CD11b-positiven Zellen, oder den normalen Verlauf der Entwicklung zeitlich verzögerten. Chemokine wie z.B. CXCL3, die über die Bindung an ihre Rezeptoren auf Seiten der migrierenden Zellen ein Signal zur Infiltration übermitteln, spielten in diesem Kontext eine wichtige Rolle. Insbesondere Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen und T-Zellen reagieren auf durch Chemokine ausgelöste Signale (Palomino et al., 2015).

Aufgrund der direkten Interaktion von Makrophagen mit den IHZ/ ÄHZ des Corti-Organs und der Tatsache, dass vor allem residente, während der Embryonalentwicklung eingewanderte Makrophagen besondere Funktionen bei Gewebshomöostase, Remodelling und Phagozytose erfüllen, besteht durchaus die Möglichkeit, dass sie auch bei der Reifung der IHZ/ ÄHZ eine ähnliche Funktion erfüllen; sei sie direkt (Phagozytose/ Remodelling) oder indirekt (Homöostase) (Frossi et al., 2017).

Gleiches könnte auch für die anwesende Population der Mastzellen zutreffen. Wie zu erwarten, waren lediglich CD117/c-Kit⁺ Zellen ebenfalls Avidin-positiv, sowie eine Subpopulation der CD45-Positiven. Für diese CD45⁺/CD117/c-Kit⁺/Avidin⁺ Mastzell-Population konnte innerhalb der organotypischen Kultur ein direkter Kontakt mit CD11b- und CD68-positiven Zellen nachgewiesen werden. Entsprechend wäre es möglich, dass Mastzellen zusammen mit anderen Leukozyten vor Ort an der Reifung der IHZ/ ÄHZ beteiligt waren. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass nachgewiesen werden konnte, dass Serotonin, ausgeschüttet durch Mastzellen, im zentralen Nervensystem die Reifung von Neuronen des Hippocampus unterstützen kann (Nautiyal et al., 2012). Dass die CD117/c-Kit-positiven Mastzellen eine Rolle bei der Homöostase des peripheren auditorischen Systems spielen könnten, wurde zudem in einigen klinischen Studien der letzten Jahrzehnte nachgewiesen. Manche Patienten, die mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Gleevec) behandelt wurden, entwickelten im Laufe der Behandlung einen irreversiblen, sensineuronalen Hörverlust

(Attili et al., 2008; Janssen et al., 2009; Lin et al., 2012; Wasif et al., 2016). CD117/c-Kit ist eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase und könnte in diesen Fällen durch die Behandlung betroffen worden sein, obwohl die eigentliche Indikation des Inhibitors die Behandlung von chronisch myeloischer Leukämie und gastrointestinaler Stromatumore darstellt. Tatsächlich konnte sowohl an Studien mit Mäusen aber auch mit Imatinib behandelten Langzeitpatienten eine Mastzellen-Defizienz nachgewiesen werden (Cerny-Reiterer et al., 2015). Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Imatinib, Nilotinib und Masitinib sind deshalb seit kurzem in den Fokus gerückt bei der Behandlung der fortgeschrittenen, systemischen Mastozytose, bei der es zu einer ausgeprägten Überproduktion von Mastzellen im gesamten Körper kommt. Erste Studien weisen darauf hin, dass diese Inhibitoren die Zahl der Mastzellen signifikant reduzieren und die Krankheit damit kontrollieren können. Da CD117 spezifisch auf Mastzellen zu finden ist, liegt folglich die Schlussfolgerung nahe, dass durch Inhibition, des für die Entwicklung der Mastzellen so wichtigen c-Kit, deren Funktion beeinträchtigt wurde. Alternativ könnte die Inhibition aber auch Apoptose in den Mastzellen ausgelöst haben und dadurch eine Entzündungsreaktion verursacht worden sein, durch die die IHZ/ ÄHZ irreversibel durch infiltrierende Immunzellen geschädigt wurden (Gilreath et al., 2019).

Unabhängig davon, ob Mastzellen an der Ossifikation der Cochlea oder der Reifung von IHZ/ ÄHZ beteiligt sind oder nicht, zeigen die für diese Doktorarbeit zusammengestellten Daten zum ersten Mal, dass sich grundsätzlich Mastzellen innerhalb der Cochlea (Modiolus, Spiral-Limbus und Spiral-Ligament) von Wistar-Ratten befinden, was bis dato nicht bekannt war. Ob sich diese Befunde auf den Menschen übertragen lassen und sich auch dort Mastzellen befinden, die ähnliche Funktionen übernehmen, müsste allerdings in entsprechenden Folgestudien untersucht werden. Es finden sich allerdings bereits einige Indizien dafür, dass an Erkrankungen bei Menschen, die zum Hörverlust führen, immunologische Prozesse beteiligt sind und in diesem Kontext auch Mastzellen eine Rolle spielen könnten. Morbus Menière z.B. wird anteilig durch die Entstehung eines sogenannten Hydrops verursacht, einem endolymphatischen Überdruck innerhalb des Sacculus utriculus. Die Ursache dafür wird noch diskutiert und untersucht, aber erste Befunde in Meerschweinchen bestätigen, dass man durch Injektion von Antigenen oder Antikörpern einen solchen Hydrops auslösen kann (Yoo et al., 1983). Eine diskutierte Funktion der Mastzellen in dem Kontext ist die, dass durch Aufnahme solcher Antigene/ Bindung der Antikörper die Ausschüttung von Histamin ausgelöst wird.

Durch Bindung des Histamins an den Histaminrezeptor, deren Existenz im Innenohr von Mäusen nachgewiesen wurde (Dagli et al., 2008; Derebery et al., 2010), könnte eine Dysregulation des endolymphatischen Flüssigkeitshaushalts und damit der Hydrops ausgelöst werden.

Der Nachweis von Mastzellen im Innenohr der Ratte stellt somit einen triftigen Grund dar, entsprechende Studien auch im Innenohr des Menschen durchzuführen. Dies könnte zum besseren Verständnis von Morbus Menière führen und schließlich auch eine potenzielle Therapie ermöglichen.

Die Substanz Cisplatin wird erfolgreich gegen Tumorerkrankungen eingesetzt, trotz der bekannten zahlreichen nephrotoxischen, neurotoxischen und ototoxischen Nebenwirkungen. Die klinischen Symptome einer Cisplatin-induzierten Ototoxizität sind sehr einheitlich, unterscheiden sich aber in ihrer Ausprägung und sind von Dosis, Häufigkeit, Methode und Dauer der Gabe abhängig (Drögemöller et al., 2019).

Eine Inkubation der organotypischen Kultur mit Cisplatin unterschiedlicher Konzentrationen ergab für die Anzahl der Mastzellen ein interessantes Ergebnis (siehe Abb. 32 und Abb. 33). Während eine Inkubation mit 10 μM weder Einfluss auf Morphologie noch Zellzahl zeigte, wurde durch 20 μM nicht nur die Degranulierung ausgelöst, sondern auch eine Zunahme der Anzahl von Mastzellen.

Degranulierung von Mastzellen wird durch die unterschiedlichsten Stimuli ausgelöst und inkludiert neben SCF vor allem PAMP-, TLR-Signale und Zytokine. Der durch Cisplatin ausgelöste Schaden an den Zellen führt zur Freisetzung von PAMPs und möglicherweise auch zur Freisetzung von relevanten Zytokinen. Die Zytokine Interleukin 4 und 10 sind bekannt dafür in diesem Kontext Proliferation, Funktion und Überleben von Mastzellen zu stimulieren (Mosmann et al., 1986; Polukort et al., 2016). Entsprechend wäre es denkbar, dass durch die Cisplatin-Inkubation SCF und Zytokine freigesetzt werden, die die Apoptose der Mastzellen blockiert und die Proliferation der Mastzellen anregt (Iemura et al., 1994). Neben diesen potentiellen indirekten Effekten auf die Biologie der Mastzellen kann Cisplatin allerdings auch direkte Effekte in Mastzellen auslösen. In einer Studie von 1996 wurde in Mausstudien gezeigt, dass die Degranulierung von Mastzellen direkt durch Inkubation mit Cisplatin ausgelöst werden kann (Brzezinska-Blaszczyk et al., 1996). Inkubation mit 40 μM Cisplatin führte dagegen zu einem starken Rückgang der Anzahl der Mastzellen innerhalb der OC. Möglicherweise ist bei dieser Konzentration ein Punkt erreicht worden, ab dem der Schaden an IHZ/ ÄHZ so groß war, dass das ausgelöste PAMP-Signal ebenfalls zu

einer Überstimulation der Mastzellen führte und diese in die Apoptose trieb (Tabelle 15). Alternativ könnten aber auch Monozyten und Makrophagen geschädigt worden sein, die die zuvor beschriebenen Zytokine ausgeschüttet und die Proliferation der Mastzellen gefördert haben. Eine dritte, nicht auszuschließende Option, ist experimenteller Natur. Für die Zählung der Mastzellen wurde die Heparin-Granula mittels Avidin-Alexa 488 angefärbt. Bei vollständiger Degranulierung lag die Fluoreszenz diffus vor und die Zellmembran der Mastzellen war sehr schwer zu erkennen. Entsprechend bestand die Möglichkeit, dass manche Mastzellen nicht als solche mitgezählt wurden und deren Anzahl unterschätzt wurde.

In den Folgeversuchen wurde neben den Effekten auf IHZ/ ÄHZ auch der Einfluss auf CD45-, CD11b- und CD68-positive Zellen in Abhängigkeit der Zeit untersucht. In allen drei Fällen hatte eine dreistündige Inkubation mit 20 µM Cisplatin keinen Effekt auf die Morphologie der Zellen. Nach 24 und 48 Stunden veränderte sich die Morphologie der Zellen, die diese Oberflächenmarker exprimieren, dahingehend, dass die Pseudopodien nahezu vollständig zurückgebildet wurden, was dafürspricht, dass die Zelle gestresst oder stimuliert wurde.

Die Anzahl der Zellen, die die drei untersuchten Oberflächenmarker exprimierten, nahm im Laufe der Inkubationszeit von 48 Stunden auch in der Kontrollgruppe ohne 20 µM Cisplatin ab. Dies galt sowohl für CD45-, als auch CD11b- und CD68-positive Zellen. In jedem Fall ließ sich auch trotz dieses Rückgangs der Zellzahl ein deutlicher Einfluss des Cisplatins auf die Anzahl der Zellen, die CD11b, CD45 oder CD68 exprimieren, erkennen. Nach drei Stunden konnte zwar noch kein Unterschied zur Kontrolle in der Zellzahl beobachtet werden, aber nach 24 und noch stärker nach 48 Stunden.

Die gesammelten Daten zu mit Cisplatin-behandelten organotypischen Kulturen belegen somit, dass sowohl die Anzahl als auch vermutlich die Funktionalität der untersuchten Immunzellpopulation stark beeinflusst werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Mechanismen, die den ototoxischen Schaden durch Cisplatin-Gabe verursachen, ziemlich gut untersucht und identifiziert. Sowohl die Produktion von ROS, als auch die durch den Rezeptor TRPV1 ausgelöste Signalkaskade, die zu lokalen Entzündungsreaktionen und Apoptose führt, sind hierfür ausschlaggebend (L. P. Rybak, 2007; Bhatta et al., 2019). Ausgehend von diesen Schäden wird angenommen, dass ein sukzessiver Schaden entsteht, der zusätzlich durch Immunreaktionen verstärkt wird. Die nun vorliegenden Daten belegen potentiell

eine weitere Dimension des ausgelösten Cisplatin-Schadens: eine direkte Schädigung der bei diesen Immunreaktionen beteiligten Makrophagen und Mastzellen. Möglicherweise entwickeln sich dadurch bereits geringfügige Schäden an den IHZ/ÄHZ zu ausgewachsenen Immunreaktionen, weil die Makrophagen, die eigentlich die Zelltrümmer (DAMP) aus dem Gewebe entfernen sollen, selbst geschädigt werden und nicht mehr zum Ort des Schadens wandern können oder in die Apoptose getrieben werden. Gleiches könnte für die Mastzellen gelten, allerdings müsste deren Existenz innerhalb des Innenohrs des Menschen zuerst belegt werden, bevor solch eine Schlussfolgerung sinnvoll gezogen werden kann.

4.3. Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die für diese Arbeit verwendeten Techniken an Explantaten der Wistar-Ratte sind bereits seit Jahren etabliert. Allerdings ist die Präparation der Cochlea aus dem Schädel der Wistar-Ratte ab dem 5. Entwicklungstag postnatal durch die einsetzende Verknöcherung erschwert. Da sich eine Präparation von Rattengewebe für eine organotypische Kultur ab Tag 30 schwierig darstellt, werden Organe von Versuchstieren diesen Alters üblicherweise anhand von Kryoschnitten dargestellt und interpretiert (Sobkowicz et al., 1993).

Mastzellen, als eine der zu untersuchenden Population innerhalb der Cochlea, sind sehr empfindliche Zellen, die sowohl auf mechanische Reizung, als auch Temperaturschwankungen reagieren können. Darüber hinaus sind Mastzellen dazu in der Lage zu regranulieren, was bei der Beurteilung des ausgelösten Schadens durch Cisplatin erschwerend hinzukam, da der Status der Degranulation ein Bewertungskriterium darstellte und es nicht möglich war, zwischen Zellen zu unterscheiden, die „nicht degranuliert“ oder bereits wieder „regranuliert“ sind. Diese Problematik ist leider nicht mit alternativen Techniken zu umgehen und ist vermutlich ein Grund dafür, warum so wenige Daten bezüglich Mastzellen im Innenohr existieren. Ein weiterer unvermeidbarer Effekt, ist die Migration von Immunzellen in das Gebiet des durch die Präparation mechanisch gereizten Gewebes. Um solche Einflüsse auf die statistische Auswertung der Anzahl der untersuchten Immunzellen zu minimieren, wurden die Zellen im Bereich des Schnittes der organotypischen Kulturen nicht mit einbezogen.

Darüber hinaus wurden die aus der Cochlea präparierten Explantate vor der eigentlichen Färbung für 24 Stunden in einem Medium inkubiert, so dass die

organotypische OC-Kultur vollständig an der Kulturplatte haften würde. Es ist nicht auszuschließen, dass in diesen 24 Stunden einige der zu untersuchenden Zelltypen apoptotisch abgebaut wurden oder sich anders als in vivo verhielten.

Die angewandte 4 Zonen/ 5 Ebenen-Methode wurde anhand sichtbarer Übergänge innerhalb der Präparate festgelegt. Dies ermöglichte zum einen eine einfacher durchzuführende Zählung in kleineren Abschnitten, als auch eine genauere Betrachtung der Verteilung der Immunzellen innerhalb spezifischer Bereiche der OC zusätzlich zur Aufteilung nach apikalen, medialen und basalen Explantaten. Dies minimierte, schloss jedoch die Fehler des Bewertens während der Zellenbeurteilung nicht aus. Das Fehlen von FACS-Analysen, die die mikroskopische, quantitative Auswertung bestätigen könnten und der damit verbundene Mangel an durchgeführten Doppelfärbungen, um spezifische Zelltypen konkret zu identifizieren, erschwerte die Interpretation der Daten.

5. Schlussfolgerung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in der unbehandelten, gesunden und intakten Cochlea von Wistar-Ratten Leukozyten zu identifizieren und zu charakterisieren.

Alle initial aufgestellten Forschungsfragen konnten ausreichend beantwortet werden. So konnte anhand organotypischer Kulturen und Kryoschnitten durch die Cochlea gezeigt werden, dass CD45-, CD11b-, CD68-, CD117/c-Kit- und Avidin-positive Zellen im Innenohr der Wistar-Ratte existieren und sich diese in Abhängigkeit des Alters der Ratte postnatal in verschiedenen Bereichen der Cochlea befinden. Insbesondere für die Avidin-positive Mastzellpopulation ist dies der erste Beleg für deren Existenz innerhalb des Innenohrs von Wistar-Ratten.

Abgesehen von diesen belegbaren Beobachtungen zu Anzahl und Verteilung der Immunzellen innerhalb der Cochlea erlauben die Daten die Schlussfolgerung, dass CD68-positive Makrophagen und Avidin-positive Mastzellen potentiell bei der Ossifikation der Cochlea mitwirken könnten, da sie sich zur entsprechenden Zeit im sich verknöchernden Bereich befinden und darüber hinaus nachgewiesenermaßen bei der Ossifikation von Knochen in anderen Bereichen des Körpers eine Rolle spielen.

Ein weiterer Zusammenhang besteht möglicherweise für CD68-positive Makrophagen und die Entwicklung des Gehörs der Ratte, da sich diese Zellen während der Entwicklung von IHZ/ ÄHZ in direkter Nähe befinden. Sowohl für die Ossifikation als auch die neuronale Reifung besteht die Möglichkeit, dass die Immunzellen eine Art

Immunüberwachung im Bereich des umzustrukturierenden Gewebes übernehmen, um eine Überreaktion des Immunsystems und eine damit verbundene Schädigung des umgebenden Gewebes zu vermeiden.

Die fünfte Forschungsfrage befasste sich mit der Wirkung von Cisplatin auf eben diese Immunzellpopulationen. Die Daten belegen eindeutig, dass Cisplatin in Abhängigkeit der Inkubationsdauer und der Cisplatinkonzentration alle untersuchten Zellen schädigt. Entsprechend liegt es nahe zu schlussfolgern, dass diese Schädigung der Immunzellen ein Teil des ototoxischen Effekts von Cisplatin während der Krebstherapie darstellen könnte.

Es bleibt zu beweisen, ob der Zusammenhang zur Ossifikation und Gehörentwicklung tatsächlich besteht und ob sich auch Mastzellen im Innenohr des Menschen befinden. Der vorgestellte Befund eröffnet wahrscheinlich neue Möglichkeiten für die Diagnose und Behandlung von Innenohrerkrankungen.

Literaturverzeichnis

- Allen, G. C. Tiu, C. Koike, K. Ritchey, A. K. Kurs-Lasky, M. and Wax, M. K. 1998. "Transient-Evoked Otoacoustic Emissions in Children after Cisplatin Chemotherapy." *Otolaryngol Head Neck Surg* 118 (5): 584–88. <https://doi.org/10.1177/019459989811800504>.
- Altin, J. G. and Sloan, E. K. 1997. "The Role of CD45 and CD45-Associated Molecules in T Cell Activation." *Immunology and Cell Biology* 75 (5): 430–45. <https://doi.org/10.1038/icb.1997.68>.
- Ashman, Leonie K. 1999. "The Biology of Stem Cell Factor and Its Receptor C-Kit." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (10): 1037–51. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00076-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00076-x).
- Attili, Venkata Satya Suresh Bapsy, P. P. Anupama, G. and Lokanatha, D. 2008. "Irreversible Sensorineural Hearing Loss Due to Imatinib." *Leukemia Research* 32 (6): 991–92. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.11.039>.
- Aumüller, G. Aust, G. and Conrad, A. 2017. *Duale Reihe Anatomie*. Stuttgart: Thieme.
- Avital, Avi Goshen, Inbal Kamsler, Ariel Segal, Menahem Iverfeldt, Kerstin Richter-Levin, Gal and Yirmiya, Raz. 2003. "Impaired Interleukin-1 Signaling Is Associated with Deficits in Hippocampal Memory Processes and Neural Plasticity." *Hippocampus* 13 (7): 826–34. <https://doi.org/10.1002/hipo.10135>.
- Axelsson, A. Miller, J. and Holmquist, J. 1974. "Studies of Cochlear Vasculature and Sensory Structures: A Modified Method." *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 83 (4): 537–49. <https://doi.org/10.1177/000348947408300417>.
- Babon, Jeffrey J. Lucet, Isabelle S. Murphy, James M. Nicola, Nicos A. and Varghese, Leila N. 2014. "The Molecular Regulation of Janus Kinase (JAK) Activation." *The Biochemical Journal* 462 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20140712>.
- Basch, Martin L. Brown, Rogers M. Jen, Hsin-I. and Groves, Andrew K. 2016. "Where Hearing Starts: The Development of the Mammalian Cochlea." *Journal of Anatomy* 228 (2): 233–54. <https://doi.org/10.1111/joa.12314>.
- Beaven, M. A. and Metzger, H. 1993. "Signal Transduction by Fc Receptors: The Fc Epsilon RI Case." *Immunology Today* 14 (5): 222–26.
- Berendsen, Agnes D. and Olsen, Björn R. 2015. "Bone Development." *Bone* 80: 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035>.
- Betjes, M. G. Haks, M. C. Tuk, C. W. and Beelen, R. H. 1991. "Monoclonal Antibody EBM11 (Anti-CD68) Discriminates between Dendritic Cells and Macrophages after Short-Term Culture." *Immunobiology* 183 (1–2): 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80187-7](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80187-7).
- Bhatta, Puspanjali Dhukhwa, Asmita Sheehan, Kelly Aameri, Raheem F. H. Al Borse, Vikrant Ghosh, Sumana Sheth, Sandeep Mamillapalli, Chaitanya Rybak, Leonard Ramkumar, Vickram and Mukherjea, Debashree. 2019. "Capsaicin

- Protects Against Cisplatin Ototoxicity by Changing the STAT3/STAT1 Ratio and Activating Cannabinoid (CB2) Receptors in the Cochlea." *Scientific Reports* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40425-9>.
- Bhave, Sujata A. Oesterle, Elizabeth C. and Coltrera, Marc D. 1998. "Macrophage and Microglia-Like Cells." *Journal of Comparative Neurology* 398(2) (September): 241–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980824\)398:23.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980824)398:23.0.CO;2-0).
- Blume-Jensen, P. Claesson-Welsh, L. Siegbahn, A. Zsebo, K. M. Westermark, B. and Heldin, C. H. 1991. "Activation of the Human C-Kit Product by Ligand-Induced Dimerization Mediates Circular Actin Reorganization and Chemotaxis." *The EMBO Journal* 10 (13): 4121–28.
- Brown, LaShardai N. Xing, Yazhi Noble, Kenyaria V. Barth, Jeremy L. Panganiban, Clarisse H. Smythe, Nancy M. Bridges, Mary C. Zhu, Juhong and Lang, Hainan. 2017. "Macrophage-Mediated Glial Cell Elimination in the Postnatal Mouse Cochlea." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 407. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00407>.
- Brownell, W. E. Bader, C. R. Bertrand, D. and Ribaupierre, Y. 1985. "Evoked Mechanical Responses of Isolated Cochlear Outer Hair Cells." *Science (New York, N.Y.)* 227 (4683): 194–96. <https://doi.org/10.1126/science.3966153>.
- Brzezinska-Blaszczyk, E. Mincikiewicz, M. and Ochocki, J. 1996. "Effect of Cisplatin and Cis-Platinum (II) Phosphonate Complex on Murine Mast Cells." *Eur J Pharmacol* 298 (2): 155–58. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00809-8](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00809-8).
- Carlo, Alpini Dario. 2018. "The Putative Role of Brain Lymphatic System in Ménière Disease Pathogenesis." *MOJ Immunology* 6 (5). <https://doi.org/10.15406/moji.2018.06.00211>.
- Casale, Jarett and Agarwal, Amit. 2019. *StatPearls: Anatomy, Head and Neck, Ear Endolymph*. Treasure Island (FL).
- Cerny-Reiterer, S. Rabenhorst, A. Stefanzi, G. Herndlhofer, S., Hoermann, G. Mullauer, L. Baumgartner, S. Beham-Schmid, C. Sperr, W. R. Mannhalter, C. Sill, H. Linkesch, W. Arock, M. Hartmann, K. and Valent, P. 2015. "Long-Term Treatment with Imatinib Results in Profound Mast Cell Deficiency in Ph+ Chronic Myeloid Leukemia." *Oncotarget* 6 (5): 3071–84. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3074>.
- Chirtes, Felician and Albu, Silviu. 2014. "Prevention and Restoration of Hearing Loss Associated with the Use of Cisplatin." *BioMed Research International* 2014: 925485. <https://doi.org/10.1155/2014/925485>.
- Chistiakov, Dimitry A. Killingsworth, Murry C. Myasoedova, Veronika A. Orekhov, Alexander N. and Bobryshev, Yuri V. 2017. "CD68/Macrosialin: Not Just a Histochemical Marker." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 97 (1): 4–13. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>.
- Church, M. K. Okayama, Y. and El-Lati, S. 1991. "Mediator Secretion from Human Skin Mast Cells Provoked by Immunological and Non-Immunological Stimulation." *Skin Pharmacology: The Official Journal of the Skin Pharmacology*

Society 4 Suppl 1: 15–24.

- Church, M .K. El-Lati, S. and Caulfield, J. P. 1991. "Neuropeptide-Induced Secretion from Human Skin Mast Cells." *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 94 (1–4): 310–18. <https://doi.org/10.1159/000235393>.
- Cibrián, Danay and Sánchez-Madrid, Francisco. 2017. "CD69: From Activation Marker to Metabolic Gatekeeper." *European Journal of Immunology* 47 (6): 946–53. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>.
- Clark, Edward A. and Ledbetter, Jeffrey A. 1989. "Leukocyte Cell Surface Enzymology: CD45 (LCA, T200) Is a Protein Tyrosine Phosphatase." *Immunology Today* 10 (7): 225–28. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(89\)90257-0](https://doi.org/10.1016/0167-5699(89)90257-0).
- Dagli, Muharrem Goksu, Nebil Eryilmaz, Adil Mocan Kuzey, Gamze Bayazit, Yildirim Gun, Banu Dogan and Gocer, Celil. 2008. "Expression of Histamine Receptors (H(1), H(2), and H(3)) in the Rabbit Endolymphatic Sac: An Immunohistochemical Study." *American Journal of Otolaryngology* 29 (1): 20–23. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2006.12.003>.
- Davies, Luke C. Jenkins, Stephen J. Allen, Judith E. and Taylor, Philip R. 2013. "Tissue-Resident Macrophages." *Nature Immunology* 14 (10): 986–95. <https://doi.org/10.1038/ni.2705>.
- Defourny, Jean Mateo Sánchez, Susana Schoonaert, Lies Robberecht, Wim Davy, Alice Nguyen, Laurent and Malgrange, Brigitte. 2015. "Cochlear Supporting Cell Transdifferentiation and Integration into Hair Cell Layers by Inhibition of Ephrin-B2 Signalling." *Nature Communications* 6: 7017. <https://doi.org/10.1038/ncomms8017>.
- Derebery, Jennifer and Berliner, Karen I. 2010. "Allergy and Its Relation to Meniere's Disease." *Otolaryngologic Clinics of North America* 43 (5): 1047–58. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2010.05.004>.
- Dhaliwal, Baljinder S. and Steinbrecher, Urs P. 1999. "Scavenger Receptors and Oxidized Low Density Lipoproteins." *Clinica Chimica Acta* 286 (1–2): 191–205. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(99\)00101-1](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(99)00101-1).
- Dirnhofer, Stefan Zimpfer, A. and Went, Ph. 2006. "Die Diagnostische Und Prädiktive Bedeutung von Kit (CD117)." *Therapeutische Umschau* 63 (4): 273–78.
- Dong, Youyi and Zhang, Celia. 2018. "Differential Fates of Tissue Macrophages in the Cochlea during Postnatal Development." In *Hearing Research*, 365:110–26. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.05.010>.
- Drögemöller, Britt I. Wright, Galen E. B. Lo, Cody Le, Tan Brooks, Beth Bhavsar, Amit P. Rassekh, Shahrads R. Ross, Colin J. D. and Carleton, Bruce C. 2019. "Pharmacogenomics of Cisplatin-Induced Ototoxicity: Successes, Shortcomings, and Future Avenues of Research." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 106 (2): 350–59. <https://doi.org/10.1002/cpt.1483>.
- Felix, Richard A. Gourévitch, Boris and Portfors, Christine V. 2018. "Subcortical Pathways: Towards a Better Understanding of Auditory Disorders." *Hearing Research* 362: 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.01.008>.

- Filippo, Katia Dudeck, Anne Hasenberg, Mike Nye, Emma Rooijen, Nico van Hartmann, Karin Gunzer, Matthias Roers, Axel and Hogg, Nancy. 2013. "Mast Cell and Macrophage Chemokines CXCL1/CXCL2 Control the Early Stage of Neutrophil Recruitment during Tissue Inflammation." *Blood* 121 (24): 4930–37. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-486217>.
- Firbas, W. Gruber, H. and Wicke, W. 1981. "The Blood Vessels of the Limbus Spiralis." *Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 232 (2): 131–37. <https://doi.org/10.1007/bf00505032>.
- Franco, Christopher B. Chen, Ching-Cheng Drukker, Micha Weissman, Irving L. and Galli, Stephen J. 2010. "Distinguishing Mast Cell and Granulocyte Differentiation at the Single Cell Level." *Cell Stem Cell* 6 (4): 361–68. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.013>.
- Frossi, Barbara Mion, Francesca Tripodo, Claudio Colombo, Mario P. and Pucillo, Carlo E. 2017. "Rheostatic Functions of Mast Cells in the Control of Innate and Adaptive Immune Responses." *Trends in Immunology* 38 (9): 648–56. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.001>.
- Frye, Mitchell D. Yang, Weiping Zhang, Celia Xiong, Binbin and Hu, Bo Hua. 2017. "Dynamic Activation of Basilar Membrane Macrophages in Response to Chronic Sensory Cell Degeneration in Aging Mouse Cochleae." *Hearing Research* 344: 125–34. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.11.003>.
- Geal-Dor, M. Freeman, S. Li, G. and Sohmer, H. 1993. "Development of Hearing in Neonatal Rats: Air and Bone Conducted ABR Thresholds." *Hearing Research* 69 (1–2): 236–42. [https://doi.org/10.1016/0378-5955\(93\)90113-f](https://doi.org/10.1016/0378-5955(93)90113-f).
- Gilreath, J. A. Tchertanov, L. and Deininger, M. W. 2019. "Novel Approaches to Treating Advanced Systemic Mastocytosis." *Clin Pharmacol* 11: 77–92. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S206615>.
- Gilroy, Anne M. Ross, Lawrence M. and MacPherson, Brian R. 2008. *Atlas of Anatomy*. Stuttgart: Thieme.
- Gordon, Siamon. 1999. "Macrophage-Restricted Molecules: Role in Differentiation and Activation." *Immunology Letters* 65 (1–2): 5–8. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(98\)00116-3](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(98)00116-3).
- Hallgren, Jenny and Gurish, Michael F. 2011. "Mast Cell Progenitor Trafficking and Maturation." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 716: 14–28. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9533-9{textunderscore}2>.
- Hansen, C. C. 1971. "Vascular Anatomy of the Human Temporal Bone. I. Anastomoses of the Membranous Labyrinth and Its Bony Capsule." *Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ohren- Nasen- Und Kehlkopfheilkunde* 200 (2): 83–98.
- Harris, J. P. Heydt, J. Keithley, E. M. and Chen, M. C. 1997. "Immunopathology of the Inner Ear: An Update." *Annals of the New York Academy of Sciences* 830: 166–78. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51888.x>.
- Hermiston, Michelle L. Xu, Zheng and Weiss, Arthur. 2003. "CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells." *Annual Review of*

- Immunology* 21: 107–37.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>.
- Hirose, Keiko Discolo, Christopher M. Keasler, Jodi R. and Ransohoff, Richard. 2005. “Mononuclear Phagocytes Migrate into the Murine Cochlea after Acoustic Trauma.” *The Journal of Comparative Neurology* 489 (2): 180–94.
<https://doi.org/10.1002/cne.20619>.
- Hoeffel, Guillaume and Ginhoux, Florent. 2015. “Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages.” *Frontiers in Immunology* 6: 486.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00486>.
- Hu, Bo Hua Zhang, Celia and Frye, Mitchell D. 2018. “Immune Cells and Non-Immune Cells with Immune Function in Mammalian Cochleae.” *Hearing Research* 362: 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.12.009>.
- Iemura, A. Tsai, M. Ando, A. Wershil, B. K. and Galli, S. J. 1994. “The C-Kit Ligand, Stem Cell Factor, Promotes Mast Cell Survival by Suppressing Apoptosis.” *The American Journal of Pathology* 144 (2): 321–28.
- Iwasaki, Akiko. 2003. “The Importance of CD11b+ Dendritic Cells in CD4+ T Cell Activation in Vivo: With Help from Interleukin 1.” *The Journal of Experimental Medicine* 198 (2): 185–90. <https://doi.org/10.1084/jem.20030737>.
- Jabba, Sairam V. Oelke, Alisha Singh, Ruchira Maganti, Rajanikanth J. Fleming, Sherry Wall, Susan M. Everett, Lorraine A. Green, Eric D. and Wangemann, Philine. 2006. “Macrophage Invasion Contributes to Degeneration of Stria Vascularis in Pendred Syndrome Mouse Model.” *BMC Medicine* 4: 37.
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-4-37>.
- Janssen, Jeroen J. W. M. Berendse, Henk W. Schuurhuis, Gerrit-Jan Merle, Pauline A. and Ossenkoppele, Gert J. 2009. “A 51-Year-Old Male CML Patient with Progressive Hearing Loss, Confusion, Ataxia, and Aphasia during Imatinib Treatment.” *American Journal of Hematology* 84 (10): 679–682.
<https://doi.org/10.1002/ajh.21489>.
- Juhn, S. K. Rybak, L. P. and Fowlks, W. L. 1982. “Transport Characteristics of the Blood–Perilymph Barrier.” *American Journal of Otolaryngology* 3 (6): 392–96.
[https://doi.org/10.1016/s0196-0709\(82\)80016-1](https://doi.org/10.1016/s0196-0709(82)80016-1).
- Kalkanis, James G. Whitworth, Craig and Rybak, Leonard P. 2004. “Vitamin E Reduces Cisplatin Ototoxicity.” *The Laryngoscope* 114 (3): 538–42.
<https://doi.org/10.1097/00005537-200403000-00028>.
- Kämpfe Nordström, C. Danckwardt-Lillieström, N. Laurell, G. Liu, W. and Rask-Andersen, H. 2018. “The Human Endolymphatic Sac and Inner Ear Immunity: Macrophage Interaction and Molecular Expression.” *Front Immunol* 9: 3181.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03181>.
- Kanazawa, Akimori Sunami, Kishiko Takayama, Masahiro Nishiura, Hiroshi Tokuhara, Yasutake Sakamoto, Hiramori Iguchi, Hiroyoshi and Yamane, Hideo. 2004. “Probable Function of Boettcher Cells Based on Results of Morphological Study: Localization of Nitric Oxide Synthase.” *Acta Oto-Laryngologica Supplementum*, no. 554: 12–16. <https://doi.org/10.1080/03655230410018444>.

- Kaplan, R. Morse, B. Huebner, K. Croce, C. Howk, R. Ravera, M. Ricca, G. Jaye, M. and Schlessinger, J. 1990. "Cloning of Three Human Tyrosine Phosphatases Reveals a Multigene Family of Receptor-Linked Protein-Tyrosine-Phosphatases Expressed in Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (18): 7000–7004. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.7000>.
- Kaur, Tejbeer Hirose, Keiko Rubel, Edwin W. and Warchol, Mark E. 2015. "Macrophage Recruitment and Epithelial Repair Following Hair Cell Injury in the Mouse Utricle." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9: 150. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00150>.
- Kellerhals, B. 1979. "Perilymph Production and Cochlear Blood Flow." *Acta Oto-Laryngologica* 87 (3–4): 370–74. <https://doi.org/10.3109/00016487909126435>.
- Kierdorf, Katrin Erny, Daniel Goldmann, Tobias Sander, Victor Schulz, Christian Perdiguero, Elisa Gomez Wieghofer, Peter Heinrich, Annette Riemke, Pia Hölscher, Christoph Müller, Dominik N Luckow, Bruno Brocker, Thomas Debowski, Katharina Fritz, Günter Opendakker, Ghislain Diefenbach, Andreas Biber, Knut Heikenwalder, Mathias et al. 2013. "Microglia Emerge from Erythromyeloid Precursors via Pu.1- and Irf8-Dependent Pathways." *Nature Neuroscience* 16 (3): 273–80. <https://doi.org/10.1038/nn.3318>.
- Kim, Kyunghye X. Sanneman, Joel D. Kim, Hyoung-Mi Harbidge, Donald G. Xu, Jie Soleimani, Manoocher Wangemann, Philine and Marcus, Daniel C. 2014. "Slc26a7 Chloride Channel Activity and Localization in Mouse Reissner's Membrane Epithelium." *PloS One* 9 (5): e97191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097191>.
- Kim, Sung Huhn and Marcus, Daniel C. 2011. "Regulation of Sodium Transport in the Inner Ear." *Hearing Research* 280 (1–2): 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2011.05.003>.
- Klein, Eva Renzo, Livia Di and Yefenof, Eitan. 1990. "Contribution of CR3, CD11b/CD 18 to Cytolysis by Human NK Cells." *Molecular Immunology* 27 (12): 1343–47. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(90\)90041-w](https://doi.org/10.1016/0161-5890(90)90041-w).
- Krishnaswamy, Jayendra Kumar, Gowthaman Uthaman, Zhang Biyan, Mattsson, Johan Szeponik, Louis Liu, Dong Wu, Renee White, Theresa Calabro, Samuele Xu, Lan Collet, Magalie A Yurieva, Marina Alsén, Samuel Fogelstrand, Per Walter, Anne Heath, William R. Mueller, Scott N. Yrlid, Ulf Williams, Adam and Eisenbarth, Stephanie C. 2017. "Migratory CD11b+ Conventional Dendritic Cells Induce T Follicular Helper Cell-Dependent Antibody Responses." *Science Immunology* 2 (18). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aam9169>.
- Lang, Hainan Ebihara, Yasuhiro Schmiedt, Richard A. Minamiguchi, Hitoshi Zhou, Daohong Smythe, Nancy Liu, Liya Ogawa, Makio and Schulte, Bradley A. 2006. "Contribution of Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells to Adult Mouse Inner Ear: Mesenchymal Cells and Fibrocytes." *The Journal of Comparative Neurology* 496 (2): 187–201. <https://doi.org/10.1002/cne.20929>.
- Larson, R. S. and Springer, T. A. 1990. "Structure and Function of Leukocyte Integrins." *Immunological Reviews* 114: 181–217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1990.tb00565.x>.

- Lennartsson, Johan and Rönstrand, Lars. 2012. "Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications." *Physiological Reviews* 92 (4): 1619–49. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>.
- Levesque, Jean-Pierre Sims, Natalie A. Pettit, Allison R. Alexander, Kylie A. Tseng, Hsu-Wen Torossian, Frédéric Genêt, François Lataillade, Jean-Jacques and Bousse-Kerdilès, Marie-Caroline Le. 2018. "Macrophages Driving Heterotopic Ossification: Convergence of Genetically-Driven and Trauma-Driven Mechanisms." *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 33 (2): 365–66. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3346>.
- Levi-Schaffer, F. and Rubinchik, E. 1995. "Mast Cell Role in Fibrotic Diseases." *Israel Journal of Medical Sciences* 31 (7): 450–53.
- Lin, Harrison W. Roberts, Daniel S. Kay, Jonathan and Stankovic, Konstantina M. 2012. "Sensorineural Hearing Loss Following Imatinib (Gleevec) Administration." *Otolaryngol Head Neck Surg* 146 (2): 335–37. <https://doi.org/10.1177/0194599811415008>.
- Lishko, Valeryi K. Yakubenko, Valentin P. Ugarova, Tatiana P. and Podolnikova, Natalya P. 2018. "Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18, AM β 2, CR3) Acts as a Functional Receptor for Platelet Factor 4." *The Journal of Biological Chemistry* 293 (18): 6869–6882. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000515>.
- Liu, W. Kämpfe Nordström, C. Danckwardt-Lillieström, N. and Rask-Andersen, H. 2019. "Human Inner Ear Immune Activity: A Super-Resolution Immunohistochemistry Study." *Front Neurol* 10: 728. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00728>.
- Liu, Wei Molnar, Matyas Garnham, Carolyn Benav, Heval and Rask-Andersen, Helge. 2018. "Macrophages in the Human Cochlea: Saviors or Predators-A Study Using Super-Resolution Immunohistochemistry." *Frontiers in Immunology* 9: 223. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00223>.
- Lo, W. W. Daniels, D. L. Chakeres, D. W. Linthicum, F. H. Ulmer, J. L. Mark, L. P. and Swartz, J. D. 1997. "The Endolymphatic Duct and Sac." *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 18 (5): 881–87.
- Malgrange, B. Thiry, M. Water, T. R. van de Nguyen, L. Moonen, G. and Lefebvre, P. P. 2002. "Epithelial Supporting Cells Can Differentiate into Outer Hair Cells and Deiters' Cells in the Cultured Organ of Corti." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 59 (10): 1744–57.
- McCabe, Brian F. 2004. "Autoimmune Sensorineural Hearing Loss. 1979." *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 113 (7): 526–30. <https://doi.org/10.1177/000348940411300703>.
- Mei, Xueshuang Atturo, Francesca Wadin, Karin Larsson, Sune Agrawal, Sumit Ladak, Hanif M. Li, Ha and Rask-Andersen, Helge. 2018. "Human Inner Ear Blood Supply Revisited: The Uppsala Collection of Temporal Bone-an International Resource of Education and Collaboration." *Uppsala Journal of Medical Sciences* 123 (3): 131–42. <https://doi.org/10.1080/03009734.2018.1492654>.

- Merad, Miriam Sathe, Priyanka Helft, Julie Miller, Jennifer and Mortha, Arthur. 2013. "The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting." *Annual Review of Immunology* 31: 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>.
- Merchan, M. A. Merchan, J. A. and Ludeña, M. D. 1980. "Morphology of Hensen's Cells." *Journal of Anatomy* 131 (Pt 3): 519–23.
- Metz, M Brockow, K Metcalfe, D D and Galli, S J, eds. 2008. *Clinical Immunology: Principles and Practice: Mast Cells, Basophils and Mastocytosis*. Elsevier.
- Miettinen, Markku and Lasota, Jerzy. 2005. "KIT (CD117): A Review on Expression in Normal and Neoplastic Tissues, and Mutations and Their Clinicopathologic Correlation." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM* 13 (3): 205–20.
- Molawi, Kaaweh Wolf, Yochai Kandalla, Prashanth K. Favret, Jeremy Hagemeyer, Nora Frenzel, Kathrin Pinto, Alexander R. Klapproth, Kay Henri, Sandrine Malissen, Bernard Rodewald, Hans-Reimer Rosenthal, Nadia A. Bajenoff, Marc Prinz, Marco Jung, Steffen and Sieweke, Michael H. 2014. "Progressive Replacement of Embryo-Derived Cardiac Macrophages with Age." *The Journal of Experimental Medicine* 211 (11): 2151–58. <https://doi.org/10.1084/jem.20140639>.
- Mosmann, T. R. Bond, M. W. Coffman, R. L. Ohara, J. and Paul, W. E. 1986. "T-Cell and Mast Cell Lines Respond to B-Cell Stimulatory Factor 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (15): 5654–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.15.5654>.
- Mudry, Albert and Tange, Rinze A. 2009. "The Vascularization of the Human Cochlea: Its Historical Background." *Acta Oto-Laryngologica. Supplementum*, no. 561: 3–16. <https://doi.org/10.1080/00016480902924469>.
- Mulders, W.H.A.M. and Robertson, D. 2000. "Evidence for Direct Cortical Innervation of Medial Olivocochlear Neurones in Rats." *Hearing Research* 144 (1–2): 65–72. [https://doi.org/10.1016/s0378-5955\(00\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5955(00)00046-0).
- Murphy, Kenneth and Weaver, Casey. 2018. *Janeway's Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 9. ed. New York, NY: Garland Publ.
- Nautiyal, Katherine M. Dailey, Christopher A. Jahn, Jaquelyn L. Rodriguez, Elizabeth Son, Nguyen Hong Sweedler, Jonathan V. and Silver, Rae. 2012. "Serotonin of Mast Cell Origin Contributes to Hippocampal Function." *The European Journal of Neuroscience* 36 (3): 2347–59. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08138.x>.
- O'Malley, Jennifer T. Nadol, Joseph B. and McKenna, Michael J. 2016. "Anti CD163+, Iba1+, and CD68+ Cells in the Adult Human Inner Ear: Normal Distribution of an Unappreciated Class of Macrophages/Microglia and Implications for Inflammatory Otopathology in Humans." *Otology & Neurotology : Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 37 (1): 99–108. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000879>.

- Okano, Takayuki Nakagawa, Takayuki Kita, Tomoko Kada, Shinpei Yoshimoto, Momoko Nakahata, Tatsutoshi and Ito, Juichi. 2008. "Bone Marrow-Derived Cells Expressing Iba1 Are Constitutively Present as Resident Tissue Macrophages in the Mouse Cochlea." *Journal of Neuroscience Research* 86 (8): 1758–67. <https://doi.org/10.1002/jnr.21625>.
- Otnad, E. Parthasarathy, S. Sambrano, G. R. Ramprasad, M. P. Quehenberger, O. Kondratenko, N. Green, S. and Steinberg, D. 1995. "A Macrophage Receptor for Oxidized Low Density Lipoprotein Distinct from the Receptor for Acetyl Low Density Lipoprotein: Partial Purification and Role in Recognition of Oxidatively Damaged Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (5): 1391–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1391>.
- Paken, Jessica Govender, Cyril D. Pillay, Mershen and Sewram, Vikash. 2019. "A Review of Cisplatin-Associated Ototoxicity." *Seminars in Hearing* 40 (2): 108–21. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1684041>.
- Paken, Jessica Govender, Cyril D Pillay, Mershen and Sewram, Vikash. 2016. "Cisplatin-Associated Ototoxicity: A Review for the Health Professional." *Journal of Toxicology* 2016: 1809394. <https://doi.org/10.1155/2016/1809394>.
- Palomino, Diana Carolina Torres and Marti, Luciana Cavaleiro. 2015. "Chemokines and Immunity." *Einstein* 13 (3): 469–73. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RB3438>.
- Perdiguero, Elisa Gomez and Geissmann, Frederic. 2016. "Development and Maintenance of Resident Macrophages." *Nature Immunology* 17 (1): 2–8. <https://doi.org/10.1038/ni.3341>.
- Peterson, Diana C. and Hamel, Renee N. 2019. *StatPearls: Neuroanatomy, Auditory Pathway*. Treasure Island (FL).
- Pfaff, Cathrin Schultz, Julia A. and Schellhorn, Rico. 2019. "The Vertebrate Middle and Inner Ear: A Short Overview." *Journal of Morphology* 280 (8): 1098–1105. <https://doi.org/10.1002/jmor.20880>.
- Plantinga, Maud Guillems, Martin Vanheerswyngheles, Manon Deswarte, Kim Branco-Madeira, Filipe Toussaint, Wendy Vanhoutte, Leen Neyt, Katrijn Killeen, Nigel Malissen, Bernard Hammad, Hamida and Lambrecht, Bart N. 2013. "Conventional and Monocyte-Derived CD11b(+) Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen." *Immunity* 38 (2): 322–35. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.10.016>.
- Polukort, Stephanie H. Rovatti, Jeffrey Carlson, Logan Thompson, Chelsea Ser-Dolansky, Jennifer Kinney, Shannon R. M. Schneider, Sallie S. and Mathias, Clinton B. 2016. "IL-10 Enhances IgE-Mediated Mast Cell Responses and Is Essential for the Development of Experimental Food Allergy in IL-10-Deficient Mice." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196 (12): 4865–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600066>.
- Rabinowitz, S. S. and Gordon, S. 1991. "Macrosialin, a Macrophage-Restricted Membrane Sialoprotein Differentially Glycosylated in Response to Inflammatory Stimuli." *The Journal of Experimental Medicine* 174 (4): 827–36.

<https://doi.org/10.1084/jem.174.4.827>.

- Rask-Andersen, H. and Stahle, J. 1979. "Lymphocyte-Macrophage Activity in the Endolymphatic Sac. An Ultrastructural Study of the Rugose Endolymphatic Sac in the Guinea Pig." *ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties* 41 (4): 177–92. <https://doi.org/10.1159/000275458>.
- Reiter, R. J. Tan, D.-X. Korkmaz, A. and Fuentes-Broto, L. 2011. "Drug-Mediated Ototoxicity and Tinnitus: Alleviation with Melatonin." *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 62 (2): 151–57.
- Rheinländer, Andreas Schraven, Burkhardt and Bommhardt, Ursula. 2018. "CD45 in Human Physiology and Clinical Medicine." *Immunology Letters* 196: 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>.
- Ribatti, Domenico and Crivellato, Enrico. 2014. "Mast Cell Ontogeny: An Historical Overview." *Immunology Letters* 159 (1–2): 11–14. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.02.003>.
- Ross, G. D. and Větvicka, V. 1993. "CR3 (CD11b, CD18): A Phagocyte and NK Cell Membrane Receptor with Multiple Ligand Specificities and Functions." *Clinical and Experimental Immunology* 92 (2): 181–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1993.tb03377.x>.
- Ross, Gordon D. 2002. "Role of the Lectin Domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in Regulating Intercellular Adhesion." *Immunologic Research* 25 (3): 219–28. <https://doi.org/10.1385/IR:25:3:219>.
- Rybak, L. P. 2007. *Pharmacology and Ototoxicity for Audiologists: Cancer and Ototoxicity of Chemotherapeutics*. K. C. M. Campell Ed.
- Rybak, L. P. and Ramkumar, V. 2007. "Ototoxicity." *Kidney International* 72 (8): 931–935. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002434>.
- Rybak, Leonard P. and Whitworth, Craig A. 2005. "Ototoxicity: Therapeutic Opportunities." *Drug Discovery Today* 10 (19): 1313–21. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03552-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03552-X).
- Sakamoto, M. Kaga, K. and Kamio, T. 2000. "Extended High-Frequency Ototoxicity Induced by the First Administration of Cisplatin." *Otolaryngol Head Neck Surg* 122 (6): 828–33. <https://doi.org/10.1016/S0194-59980070009-X>.
- Sato, Eisuke Shick, H. Elizabeth Ransohoff, Richard M. and Hirose, Keiko. 2010. "Expression of Fractalkine Receptor CX3CR1 on Cochlear Macrophages Influences Survival of Hair Cells Following Ototoxic Injury." *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO* 11 (2): 223–34. <https://doi.org/10.1007/s10162-009-0198-3>.
- Schacht, Jochen Talaska, Andra E. and Rybak, Leonard P. 2012. "Cisplatin and Aminoglycoside Antibiotics: Hearing Loss and Its Prevention." *Anatomical Record (Hoboken, N.J. : 2007)* 295 (11): 1837–50. <https://doi.org/10.1002/ar.22578>.
- Schellack, N. and Naude, A. 2013. *South African Family Practice: An Overview of*

Pharmacotherapyinduced Ototoxicity. 55.

- Schlundt, Claudia Khassawna, Thaqif El Serra, Alessandro Dienelt, Anke Wendler, Sebastian Schell, Hanna Rooijen, Nico van Radbruch, Andreas Lucius, Richard Hartmann, Susanne Duda, Georg N. and Schmidt-Bleek, Katharina. 2018. "Macrophages in Bone Fracture Healing: Their Essential Role in Endochondral Ossification." *Bone* 106: 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.10.019>.
- Seigel, G.M. and Manohar, S. 2017. "An Immortalized Microglial Cell Line (Mocha) Derived from Rat Cochlea." *Molecular and Cellular Neuroscience* 85 (Dezember): 202–10. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.11.001>.
- Shi, Xiaorui. 2010. "Resident Macrophages in the Cochlear Blood-Labyrinth Barrier and Their Renewal via Migration of Bone-Marrow-Derived Cells." *Cell and Tissue Research* 342 (1): 21–30. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1040-2>.
- Silva, R. P. da Platt, N. Villiers, J. S. and Gordon, S. 1996. "Membrane Molecules and Macrophage Endocytosis: Scavenger Receptor and Macrosialin as Markers of Plasma-Membrane and Vacuolar Functions." *Biochemical Society Transactions* 24 (1): 220–24. <https://doi.org/10.1042/bst0240220>.
- Silver, Rae and Curley, James P. 2013. "Mast Cells on the Mind: New Insights and Opportunities." *Trends in Neurosciences* 36 (9): 513–21. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.06.001>.
- Skaper, Stephen D. Facci, Laura and Giusti, Pietro. 2014. "Mast Cells, Glia and Neuroinflammation: Partners in Crime?" *Immunology* 141 (3): 314–27. <https://doi.org/10.1111/imm.12170>.
- Sleeckx, J. P. Shea, J. J. and Peremans, J. M. 1976. "The Mast Cells of the Inner Ear." *Acta Oto-Rhino-Laryngologica Belgica* 30 (5): 443–49.
- Sobkowicz, H. M. Loftus, J. M. and Slapnick, S. M. 1993. "Tissue Culture of the Organ of Corti." *Acta Oto-Laryngologica. Supplementum* 502: 3–36.
- Solovjov, Dmitry A. Pluskota, Elzbieta and Plow, Edward F. 2005. "Distinct Roles for the Alpha and Beta Subunits in the Functions of Integrin AlphaMbeta2." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2): 1336–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406968200>.
- Sterkers, O. Ferrary, E. and Amiel, C. 1988. "Production of Inner Ear Fluids." *Physiological Reviews* 68 (4): 1083–1128. <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.4.1083>.
- Tan, Brian Tiong Gee Lee, Myranda Mui Gek and Ruan, Runsheng. 2008. "Bone-Marrow-Derived Cells That Home to Acoustic Deafened Cochlea Preserved Their Hematopoietic Identity." *The Journal of Comparative Neurology* 509 (2): 167–79. <https://doi.org/10.1002/cne.21729>.
- Teitelbaum, S. L. 2000. "Bone Resorption by Osteoclasts." *Science (New York, N.Y.)* 289 (5484): 1504–8. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1504>.
- Tornabene, Stephen V. Sato, Kunihiro Pham, Liem Billings, Peter and Keithley, Elizabeth M. 2006. "Immune Cell Recruitment Following Acoustic Trauma." *Hearing Research* 222 (1–2): 115–24.

<https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.09.004>.

- Wan, Shu-Wen Wu-Hsieh, Betty A. Lin, Yee-Shin Chen, Wen-Yu Huang, Yan and Anderson, Robert. 2018. "The Monocyte-Macrophage-Mast Cell Axis in Dengue Pathogenesis." *Journal of Biomedical Science* 25 (1): 77. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0482-9>.
- Wang, Chunjie Hayashi, Hisayoshi Harrison, René Chiu, Basil Chan, Jason R. Ostergaard, Hanne L. Inman, Robert D. Jongstra, Jan Cybulsky, Myron I. and Jongstra-Bilen, Jenny. 2002. "Modulation of Mac-1 (CD11b/CD18)-Mediated Adhesion by the Leukocyte-Specific Protein 1 Is Key to Its Role in Neutrophil Polarization and Chemotaxis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (1): 415–23. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.415>.
- Wasif, Komal Wasif, Nawal and Saif, Muhammad W. 2016. "Imatinib-Induced Ototoxicity in a Patient with Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST)." *Cureus* 8 (10). <https://doi.org/10.7759/cureus.848>.
- Waters, G. S. Ahmad, M. Katsarkas, A. Stanimir, G. and McKay, J. 1991. "Ototoxicity Due to Cis-Diamminedichloroplatinum in the Treatment of Ovarian Cancer: Influence of Dosage and Schedule of Administration." *Ear and Hearing* 12 (2): 91–102. <https://doi.org/10.1097/00003446-199104000-00003>.
- Wensing, Kristina U. and Ciarimboli, Giuliano. 2013. "Saving Ears and Kidneys from Cisplatin." *Anticancer Research* 33 (10): 4183–88.
- Whyte Orozco, J. Cisneros Gimeno, A. I. Urieta Carpi, J. J. Yus Gotor, C. Gañet Solé, J. Torres del Puerto, A. and Sarrat Torreguitart, R. 2003. "Peculiaridades En La Organización de La Cadena Osicular Timpánica Humana a Lo Largo de Su Ontogenia." *Acta Otorrinolaringologica Espanola* 54 (1): 1–10.
- Witschi, E. 1962. *Growth, Including Reproduction and Morphological Development: In P. Altman & D. Growth (Eds.)*. Edited by PL Altman and DS Dittmer. Washington DC: Federation of American Societies for Experimental Biology.
- Wood, Megan B. and Zuo, Jian. 2017. "The Contribution of Immune Infiltrates to Ototoxicity and Cochlear Hair Cell Loss." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11: 106. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00106>.
- Wynn, Thomas A. Chawla, Ajay and Pollard, Jeffrey W. 2013. "Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease." *Nature* 496 (7446): 445–55. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.
- Xiong, Jian-Ping Stehle, Thilo Goodman, Simon L. and Arnaout, M. Amin. 2003. "New Insights into the Structural Basis of Integrin Activation." *Blood* 102 (4): 1155–59. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0334>.
- Yarden, Y. Kuang, W. J. Yang-Feng, T. Coussens, L. Munemitsu, S. Dull, T. J. Chen, E. Schlessinger, J. Francke, U. and Ullrich, A. 1987. "Human Proto-Oncogene c-Kit: A New Cell Surface Receptor Tyrosine Kinase for an Unidentified Ligand." *The EMBO Journal* 6 (11): 3341–51.
- Yoo, T. J. Yazawa, Y. Tomoda, K. and Floyd, R. 1983. "Type II Collagen-Induced Autoimmune Endolymphatic Hydrops in Guinea Pig." *Science (New York, N. Y.)* 222 (4619): 65–67. <https://doi.org/10.1126/science.6623056>.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Tatyana Dudnik, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Identifizierung und Charakterisierung von Immunzellen des Innenohres/ Identification and characterization of inner ear immune cells“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Frau **Tatyana Dudnik** hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Agnieszka J. Szczepek (A.J.S), **Tatyana Dudnik (T.D.)**, Betül Karayay (B.K.), Valentina Sergeeva (V.S.), Heidi Olze (H.O.) und Alina Smorodchenko (A.S.), Titel: Mast Cells in the Auditory Periphery of Rodents, Brain Sciences, MDPI, 2020 Oct 1;10(10):697, doi: 10.3390/brainsci10100697

Beitrag im Einzelnen:

Aus meiner statistischen Auswertung sind folgende Abbildungsdiagramme und Tabellen für die Publikation entstanden.

- Abb 2a + b: Konfokalmikroskopie, repräsentative Darstellung der Kolo-kalisation Avidin-positiver Mastzellen und CD117/c-Kit+ Zellen, Wistar-Ratten - pT3.
- Abb 4a + b: Nachweis der CD117/c-Kit-Proteinmenge mit CD117/c-Kit-Antikörper in OC der Wistar-Ratten - pT3, pT5, pT7, pT9 im Vergleich zu pT1 und Thymus der Wistar-Ratte; a. Exemplarischer Western Blot - pT1, 3, 5, 7 und 9; b. Box-Whisker-Plots, DID CD117/c-Kit zu DID β -Aktin.
- Abb. 5a + b, Gesamtanzahl der Avidin-positiven Zellen in membranösen Cochleae von Wistar-Ratten abhängig vom postnatalen Alter, Cochlea gesamt; Box-Whisker-Plots.
- Tabelle 2: Bestimmung der intakten inneren und äußeren Haarzellen pro 100 μ m einer Haarzellreihe im apikalen, medialen und basalen Explantat des Corti-Organs mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen, Inkubation - 24 h, Wistar-Ratten - pT5.
- Abb. 6: Verteilung der Mastzellen nach Behandlung mit Cisplatin in der gesamten Cochlea, Wistar-Ratten - pT5; Box-Whisker-Plots.

Publikation 2 – Wissenschaftliches Poster:

Tatyana Dudnik, Alina Smorodchenko, Betül Karayay, Valentina Sergeeva, Heidi Olze, Agnieszka J. Szczepek, Titel: Localization of mast cells in the rodent cochlea. 116th Annual Meeting of the Anatomische Gesellschaft/Joint Meeting with the Anatomy Society 2022, Germany, Berlin – Abstract Confirmation of Poster Presentation – AAA/ Anatomy September 20. - 23, 2022.

Publikation 3 – Wissenschaftliches Poster:

Alina Smorodchenko, **Tatyana Dudnik**, Betül Karayay, Valentina Sergeeva, Heidi Olze, Agnieszka J. Szczepek, Titel: Morphological characterization of mast cells in the cochlea during postnatal rodent development, Experimental Biology 2022, Pennsylvania Convention Center in Philadelphia, Pennsylvania, USA – Abstract Confirmation of Poster Presentation – AAA/ Anatomy April 2 - 5, 2022.

Beitrag im Einzelnen:

Die Anfertigung des wissenschaftlichen Posters beruht auf der Grundlage von Publikation 1. Demnach fanden auch hier oben genannte Diagramme und Tabellen meiner wissenschaftlichen Arbeit in der Postergestaltung Anwendung.

Publikation 4 – Wissenschaftlicher Fachvortrag:

Tatyana Dudnik, Heidi Olze, Alina Smorodchenko, Agnieszka J. Szczepek, Titel: „Identifizierung und Charakterisierung von Immunzellen des Innenohres“, Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn; Arbeitsgemeinschaft Deutschsprachiger Audiologen, Neurootologen und Otologen – ADANO. Leitung unter Frau Prof. Dr. med. Heidi Olze, Direktorin der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Charité (CCM/ CVK) in wissenschaftlicher Zusammenarbeit, ADANO-Kongress, Berlin, Oktober 20-21, 2016.

Beitrag im Einzelnen:

Ein Teil der Forschungsergebnisse wurde während des ADANO-Kongress‘ in einem Vortrag präsentiert.

- Abb. 7: CD45-positive Zellen in der Cochlea der Wistar-Ratten - pT5, Aufnahmen von basalen Explantaten.
- Tabelle 9. CD45-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea, Wistar-Ratten - pT5.
- Abb. 8d: Statistische Darstellung der Anzahl der CD45-positiven Zellen membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich; Box-Whisker-Plots.
- Abb.12: CD11b-positive Zellen in der Cochlea der Wistar-Ratten - pT5, Aufnahmen von basalen Explantaten.
- Tabelle 11. CD11b-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea von Wistar-Ratten - pT5.
- Abb.13: Statistische Darstellung der Anzahl CD11b-positiver Zellen des basalen Explantats membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich; Box-Whisker-Plots.
- Abb.18: CD68-positive Zellen in der Cochlea der Wistar-Ratten - pT5, Aufnahmen von basalen Explantaten.
- Tabelle 13. CD68-positive Zellen, morphologische Unterschiede, Verteilung und Lokalisation in der Cochlea, Wistar-Ratten - pT5.
- Abb.19: Statistische Darstellung der Anzahl CD68-positiver Zellen membranöser Cochleae von Wistar-Ratten im Altersvergleich; Box-Whisker-Plots.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Berlin, den 25. April 2022

Tatyana Dudnik

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Forschung und Anfertigung dieser Dissertation in vielfältiger Weise unterstützt und motiviert haben.

Insbesondere gilt mein Dank **Frau Prof. Dr. med. Heidi Olze**, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde an der Charité Universitätsmedizin Berlin CCM und CVK und Hauptbetreuerin meiner Promotion. Der konstruktive Austausch und die regelmäßigen fachlichen Gespräche waren stets eine große Hilfe für mich. Für die Teilnahme und Möglichkeit eines eigenen wissenschaftlichen Vortrages über erste errungene Ergebnisse meiner experimentellen Doktorarbeit während der Herbsttagung der Klinik für HNO der Charité Berlin in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft Deutschsprachiger Audiologen, Neurootologen und Otologen (ADANO) 2016 in Berlin möchte ich mich herzlich bedanken.

Auch danke ich **Frau Prof. Dr. Agnieszka Szczepek**, Leiterin des Forschungslabors der HNO-Klinik der Charité, für die ausgezeichnete Betreuung und hervorragenden Arbeitsbedingungen vor Ort im Laboratorium, die stets konstruktive Kritik, zudem ihre Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit und das in mich gesetzte Vertrauen. Sie ist für mich ein großes Vorbild und hat mich mit ihrer außergewöhnlichen Expertise auf dem schwierigen Weg von der Planung erster experimenteller Versuche bis hin zur Fertigstellung dieser Promotionsarbeit stets begleitet.

Weiterhin möchte ich meinen Dank auch **Frau Prof. Dr. med. Alina Smorodchenko** für die fundierte Anleitung und Einarbeitung in die Arbeitstechniken und überaus anregenden wissenschaftlichen Diskussionen aussprechen.

Auch möchte ich mich bei **Frau Prof. Dr. med. Birgit Mazurek**, Direktorin des Tinnituszentrums der Charité, bedanken, insbesondere für die Einladungen zum jährlich stattfindenden Tinnitus-Symposium und zahlreichen spannenden, fachlichen Gesprächen. **Herrn Dr. Jörg Rösner** aus dem neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité CCO danke ich für die Einführung in die Konfokalmikroskopie.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlichst bei allen **Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der HNO-Klinik der Charité** für die warmherzige und familiäre Aufnahme in die Arbeitsgruppe und sehr angenehme, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Frau Dr. rer. nat. Uta Reich danke ich für die enorme Unterstützung und kritischen Anmerkungen hinsichtlich der Anfertigung des Manuskripts und für die stetige wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich bei **Frau Dipl.-Chemikerin Julia Fuchs, Frau Dipl.-Biologin Olga Hegend, Frau Christiane Kölske** und **Frau Rebeca Kirstein** für die exzellente Einführung in die Praxis des wissenschaftlichen Arbeitens und technische Einweisung in die experimentelle Laborarbeit anhand von Protokollen der Arbeitsgruppe, was wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat. Danke für die schöne Zeit, die wir zusammen erlebt haben.

Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



Dr. Ulrich Gauger
Buchholzer Straße 18 • 10437 Berlin
Fon 030/4459882 • Mobil 0160/97936812
ulrich.gauger@gmail.com

Dr. Ulrich Gauger • Buchholzer Straße 18 • 10437 Berlin

statistikhilfe.de
medizin-statistik.de

19. April 2022

Bestätigung für Tatyana Dudnik, geb. [REDACTED] in Taschkent

Hiermit bestätige ich, dass die verwendeten statistischen Verfahren in der mir vorgelegten Dissertation (in der Fassung vom 13. April 2022) mit dem Titel:

„Identifizierung und Charakterisierung von Immunzellen des Innenohres“

korrekt angewendet wurden.

Dr. Ulrich Gauger