

Aus der Klinik für HNO-Heilkunde im Unfallkrankenhaus Berlin
Lehrkrankenhaus der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zelltodvorgänge in cochleären Strukturen infolge von Lärm

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tanyo Manchev

Datum der Promotion:23.03.2024.....

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	4
1 Abstract english	6
2 Abstrakt deutsch	7
3 Einleitung	9
3.1 Anatomie und Physiologie.....	9
3.1.1 Allgemeiner Aufbau des auditorischen Systems	9
3.1.2. Spezielle Struktur und Funktion des peripheren Hörsystems.....	10
3.2 Pathophysiologie des Hörsystems	14
3.2.2 Einfluss von Lärm auf die Hörschwelle.....	14
3.2.3 Einfluss von Lärm auf die zentrale Hörbahn.....	14
3.2.4 Einfluss von Lärm auf die Haarzellen	15
3.2.5 Einfluss von Lärm auf die Spiralganglienneurone	17
4 Methodik	20
4.1 Lärmexposition.....	20
4.2 Messung des frequenzspezifischen Hörverlustes	21
4.3 Histologische Bestimmung der Zelltodmechanismen	22
4.3.1 Präparation der Cochlea.....	22
4.3.2 Erstellen der Cochlea-Schnitte	23
4.3.3 TUNEL Färbung	23
4.3.4 Analyse der TUNEL- und DAPI-Färbung.....	26
4.3.5 Hämalaun-Eosin-Färbung	33
4.3.6 Bestimmung der Zelldichte.....	34
4.4 Statistik.....	36
5 Ergebnisse	37
5.1 Lärminduzierter Hörverlust.....	37
5.2 Die Spiralganglionneuronendichte	39
5.2.1 Gesamtübersicht der Spiralganglionneurone	39
5.2.2 Vergleich der Spiralganglionneuronendichte in basalen und apikalen Bereichen der Cochlea	40
5.2.3 Vergleich der Spiralganglionneuronendichte zwischen einmaliger und doppelter Lärmexposition	41
5.3 Ergebnisse der TUNEL-Auswertung	42
5.3.1 Zelltodrate.....	42
5.3.2 TUNEL-positive Zelldichtenvergleich nach basal und apikal sortiert.....	43
5.3.3 Vergleich der Dichte TUNEL-positiver Zellen nach einmaliger und doppelter Lärmexposition	44
6 Diskussion	45
6.1 Spiralganglienzelldichte im zeitlichen Verlauf nach einem Lärmtrauma.....	45

6.2 Zeitlicher Verlauf von Zelltodvorgängen nach einer Lärmbeschallung	49
6.3 Spiralganglienzelldichte nach wiederholtem Lärmtrauma	50
7 Literatur.....	53
8 Eidesstattliche Versicherung	62
9 Lebenslauf	63
10 Danksagung.....	63

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Typ I und Typ II Spiralganglienneuronen.....	12
Abb. 2: Schematische Darstellung der Spiralganglienneurone und ihrer zentralen und peripheren Endungen (nach Brown et al. 1988).....	13
Abb. 3: Aufnahmen des Spiral Ganglions (DAPI-Färbung links und TUNEL-Färbung rechts) zusammengestapelt in Carl-Zeiss-Image-Stack Format.....	26
Abb. 4: Das DAPI-Bild des Composite-Stacks.....	27
Abb. 5: Das TUNEL-Bild des Composite-Stacks.....	27
Abb. 6: Anfangsdialog zur Parameterspezifikation.....	28
Abb. 7: Zustand nach automatisierter Zellkernsegmentierung.....	29
Abb. 8: Zustand nach manueller Nachkontrolle.....	30
Abb. 9: Kopien der Bilder mit ausgewerteten und farblich gekennzeichneten ROIs (DAPI-Bild links und TUNEL-Bild rechts).....	31
Abb. 10: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der TUNEL-Auswertung für ein Bild-Composite.....	32
Abb. 11: HE-Bild mit umkreister Zielfläche.....	34
Abb. 12: HE-Bild nach manueller Zellzählung.....	34
Abb. 13: Übersichtsaufnahme der Cochlea mit markierten Rosenthalkanälen (Rosenthal's Canal RC).....	35

Abb. 14: Hörverlust (Mittelwert \pm Standardfehler) der einfach beschallten Gruppen ermittelt mithilfe der Hirnstammaudiometrie (BERA-Brainstem evoked response audiometry) in verschiedenen Frequenzen.....	38
Abb. 15: Hörverlust (Mittelwert \pm Standardfehler) der doppelt und einfach beschallten Gruppen (14 Tagen nach Erstbeschallung) ermittelt mithilfe der Hirnstammaudiometrie (BERA-Brainstem evoked response audiometry) in verschiedenen Frequenzen.....	38
Abb. 16: Mittlere Spiralganglionneuronendichte pro 0,1 mm ² (\pm Standardfehler SE) innerhalb der gesamten Cochlea für alle Versuchsgruppen.....	39
Abb. 17: Mittlere Spiralganglionneuronendichte pro 0,1 mm ² (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea.....	40
Abb. 18: Spiralganglionneuronendichte pro 0,1 mm ² (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea 14 Tage nach einmaliger (Einfachtrauma) oder doppelter (Doppeltrauma) Lärmexposition. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet.....	41
Abb. 19: Mittelwert der TUNEL-positiven Spiralganglienneurone pro 0,1 mm ² (\pm Standardfehler SE) innerhalb der gesamten Cochlea. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet.....	42
Abb. 20: Mittelwert der TUNEL-positiven Spiralganglienneurone pro 0,1 mm ² (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea der unbehandelten Kontrolle (CON) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Akut, 6 h, 24 h und 7d) nach einer einmaligen Lärmexposition.....	43
Abb. 21: Mittelwert der TUNEL-positiven Spiralganglienneurone pro 0,1 mm ² (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea 14 Tage nach einmaliger (Einfachtrauma) oder doppelter (Doppeltrauma) Lärmexposition.....	44

Abb. 22: Vereinfachte schematische Darstellung der extrinsischen Apoptose- und regulierten Nekroptosesignalwege.....49

Tabelle 1: Das Vorgehen der TUNEL Färbung schematisch und chronologisch.....25

Tabelle 2: Das Vorgehen der Hämalaun-Eosin-Färbung schematisch und chronologisch.....33

1 Abstract english

Previous studies of our group described a very early noise-induced neuron loss in combination with apoptotic changes in different structures of the central auditory pathway. The present study aims to determine, the histological effects of noise exposure on the peripheral auditory pathway within this timeframe (0 - 14 days after noise exposure). Examinations were concentrated on cochlear structures (spiral ganglion) since observed changes of the central auditory pathway may have their origin in the peripheral auditory pathway. Since noise exposure could induce both immediate and long-term effects on spiral ganglion cells, plastic changes can occur directly within the first post-traumatic hours. Therefore, acute effects shall be determined as immediate as possible. The main purpose of this study was to evaluate, whether the exposure to a defined noise paradigm effects the density of Type-1 spiral ganglion neurons (SGN - density) in the cochlea and if the possible change is related to cell death processes. The present work used adult mice of both sexes from the NMRI (Naval Medical Research Institute) strain. The mice were examined after a noise exposure (3h, 115 dB SPL, 5 - 20 kHz) in the following intervals: directly after exposure (acute group), after 6 hours (6h group), after 24 hours (24h group), after 7 days (7d group), after 14 days (14d group) as well as 7 days after a second noise exposure, which was applied 7 days after the first exposure (Double 14d group). A histologic determination of cell density was made using HE – staining (Hemalaun-Eosin). An immunohistochemical TUNEL-assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) was used for additional cell death examination. Altogether, the groups examined directly, 6 hours and 24 hours after noise exposure showed a significant decrease of SGN-density in comparison to the control group (without noise exposure, anaesthesia only). This continuous decrease of cell density during the first 24 hours remains

unchanged until the end of the examination period on day 14. The early onset and entire time course of SGN - loss indicates the contribution of excitotoxicity to the present results. This assumption is verified by the increase of cell death mechanisms during the first 24 hours post-exposure. A second noise exposure after 7 days additionally decreased SGN density. This holds true only in the previously less affected basal area of the cochlea. The results of the present work clearly indicate that a very early therapeutical intervention would be necessary to prevent noise induced cell loss in the spiral ganglion.

2 Abstrakt deutsch

In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde ein sehr frühzeitiger lärminduzierter Neuronenverlust in Kombination mit apoptotischen Veränderungen in verschiedenen Strukturen der zentralen Hörbahn beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollen die histologischen Auswirkungen einer Lärmexposition auf die periphere Hörbahn in diesem Zeitfenster (0 h bis 14 Tage nach der Lärmexposition) ermittelt werden. Die Untersuchungen dazu fanden in cochleären Strukturen (Spiralganglion) statt, da die beobachteten Veränderungen im zentralen Hörsystem ihren Ursprung im peripheren Hörsystem haben können. Es wird zwischen unmittelbaren und langfristigen Auswirkungen auf die Spiralganglienzellen nach einer Beschallung unterschieden. Plastische Veränderungen können bereits in den ersten posttraumatischen Stunden eintreten. Aus diesem Grund sollten akute Effekte so unverzüglich wie möglich bestimmt werden. Insgesamt sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Beschallung mit einem definierten Lärmparadigma Einfluss auf die Typ 1 - Spiralganglienneuronendichte (SGN-Dichte) in der Cochlea hat und ob die mögliche Veränderung in Bezug zu bekannten Zelltodvorgängen steht.

Für die vorliegende Arbeit wurden adulte Mäuse beiderlei Geschlechts des NMRI (Naval Medical Research Institute) Stamms verwendet. Die Tiere wurden nach der Beschallung (3h, 115 dB SPL, 5 - 20 kHz) in folgenden Abständen untersucht: direkt nach der Beschallung (Akut Gruppe), nach sechs Stunden (6h Gruppe), nach 24 Stunden (24h Gruppe), nach sieben Tagen (7d Gruppe), nach 14 Tagen (14d Gruppe) sowie 7 Tage nach einer Zweitbeschallung, die eine Woche nach der Erstbeschallung durchgeführt wurde (Double 14d). Für die Untersuchung der neurodegenerativen Prozesse wurde für die vorliegende Arbeit eine histologische Bestimmung von

Zelldichten mithilfe der HE-Färbung (Hämalaun-Eosin) durchgeführt. Zum zusätzlichen Nachweis von Zelltodmechanismen wurde die immunhistochemische TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) eingesetzt.

Insgesamt zeigen die Versuchsgruppen, welche jeweils direkt nach dem Lärmtrauma, nach sechs Stunden und 24 Stunden nach dem Lärmtrauma untersucht wurden, eine signifikante Abnahme der Zelldichte der SGN im Vergleich zur Kontrollgruppe (ohne Lärmbeschallung, nur Narkose). Diese kontinuierliche Abnahme der Zelldichte innerhalb der ersten 24 Stunden bleibt danach über den gesamten Untersuchungszeitraum (bis zum 14. Tag) unverändert. Der zeitliche Verlauf des SGN-Verlusts deutet darauf hin, dass die Zelldegeneration wahrscheinlich direkt auf die Überstimulation zurückzuführen ist. Diese Annahme wird auch durch den Anstieg von Zelltodmechanismen innerhalb der ersten 24 h nach dem Lärmtrauma bestätigt. Eine zusätzliche Beschallung nach einer Woche reduzierte die Dichte der SGN weiterhin, jedoch nur im zuvor weniger betroffenen basalen Bereich der Cochlea.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit deutlich, dass sehr frühzeitige therapeutische Interventionen notwendig sind, um einen lärminduzierten Zellverlust im Ganglion spirale zu verhindern.

3 Einleitung

3.1 Anatomie und Physiologie

3.1.1 Allgemeiner Aufbau des auditorischen Systems

Die Aufgabe des auditorischen Systems besteht aus einer peripheren Verstärkung und Umwandlung akustischer Signale in elektrische Potentiale und deren zentralen Verarbeitung. Akustische Signale gelangen hauptsächlich über das Außen- und Mittelohr zur Cochlea, wo die Signaltransduktion stattfindet. Das Außenohr wird zum Mittelohr hin durch das Tympanum (Trommelfell), begrenzt, welches dadurch auch vor direkter äußerer Beschädigung abgeschirmt ist. Auf der Innenseite setzen am Tympanum die drei Gehörknöchelchen Malleus (Hammer), Incus (Amboss) und Stapes (Steigbügel) in dieser Reihenfolge an. Die Gehörknöchelchen bilden die Signalübertragungskette vom Trommelfell zur Vorhofmembran am ovalen Fenster der Cochlea und stehen über Gelenke miteinander in Verbindung (1). Das in sich bewegliche System von Tympanum, Gehörknöchelchen und Vorhofmembran sowie der große Flächenunterschied der beiden Membranen wandelt niedrige Kräfte mit hoher Auslenkung am Trommelfell in hohe Kräfte mit niedriger Auslenkung am ovalen Fenster um. Dieser Mechanismus dient dadurch der Impedanzanpassung, wodurch die auftretenden Schalldrücke nahezu vollständig an die Perilymphe im Innenohr übertragen werden können. Durch dieses System wird erst eine Verarbeitung von Schalldrücken mit geringer Intensität ermöglicht (2). Die Schallinformation wird durch die afferenten Hörnervfasern bis in die höheren zentralnervösen Strukturen weitergegeben. Der Nucleus cochlearis (CN) stellt die erste Schaltstelle dar, dort findet die Verschaltung auf das zweite Neuron des Hörnervs entweder im ventralen oder dorsalen Anteil statt. Da 90% der afferenten Hörnervfasern nur durch eine Haarzelle innerviert werden, wird die Schallfrequenz als Tonotopie im CN wiedergegeben. Vom ventralen Nucleus cochlearis (VCN), der sich zusätzlich in eine anteroventrale (AVCN) und posteroventrale (PVCN) Substruktur unterteilen lässt, gehen die teilweise kreuzenden Bahnen des zweiten Neurons aus. Ein Teil umgeht dabei die obere Olive (SOC) ohne Verschaltung, ein anderer Teil zieht zur Verschaltung zur oberen Olive (SOC). Die Fasern des Nucleus lemniscus lateralis stammen vorwiegend aus dem kontralateralen Nucleus cochlearis dorsalis (DCN). Vom DCN zieht ein Großteil der Fasern weiter zum ipsilateralen Colliculus inferior (IC). Der Colliculus inferior lässt sich funktionell und histologisch in Substrukturen aufteilen. Der tonotopisch organisierte

zentrale Anteil (ICC) ist von entscheidender Bedeutung für das frequenzspezifische Hören. Weitere Verschaltungen, wie die Corpus geniculatum mediale (MGB), finden im ICC statt. Final ziehen die Fasern in den primären auditorischen Cortex. Die Funktionen des absteigenden Teils der Hörbahn sind weitestgehend unbekannt. Es wird einerseits vom olivo-cochleären System und andererseits vom kortifugalen System gesprochen. Es gibt bisher den gesicherten Nachweis, dass die äußeren Haarzellen vom absteigenden Teil der Hörbahn efferent innerviert werden. Zudem gibt es in den meisten Kerngebieten Wechselwirkungen zwischen ab- und aufsteigenden Bahnen (3).

3.1.2. Spezielle Struktur und Funktion des peripheren Hörsystems

Das sensorische Hörorgan, welches die mechanischen in elektrische Signale umwandelt, befindet sich in der Cochlea. Sie beinhaltet drei flüssigkeitsgefüllte Kanäle: die Scala vestibuli, die Scala tympani und die Scala media. Die Scala media ist mit Endolymphe gefüllt, welche dem kaliumreichen und natriumarmen Cytosol ähnelt, während die Scala vestibuli und die Scala tympani mit Perilymphe gefüllt sind. Diese ist natriumreich und arm an Kalium und ähnelt der Extrazellulärlösung. Eine kleine Öffnung am apikalen Ende der Cochlea (Helicotrema) stellt eine direkte Verbindung zwischen Scala vestibuli und Scala tympani her (1). Die Basilarmembran formt den Boden der Scala media. An der Basis der Cochlea ist die Basilarmembran schmaler und steifer als im apikalen Bereich. Durch diese morphologischen Eigenschaften induziert der eintreffende Schall eine Welle, die von der Basis zum Apex wandert und auf der Membran frequenzspezifisch an einer bestimmten Position ein Auslenkungsmaximum erzeugt. Die entstehenden Bewegungen bilden die Grundlage für eine frequenzspezifische Trennung des Signals, bevor die Aktivierung der sensorischen Zellen (Haarzellen) entlang der Basilarmembran stattfindet. Die Frequenzkodierung des akustischen Signals ist abhängig vom Ort der Aktivierung der Sinneszellen in der Cochlea und wird als Tonotopie beschrieben. Die Tonotopie wird auch im Hörnerv und in der aufsteigenden zentralen Hörbahn bis zum primären auditorischen Kortex beibehalten. Die Schallintensität wird in den Hörnervenfasern über die Frequenz der generierten Aktionspotentiale kodiert, die bei einer Erhöhung der Amplitude zunimmt. Darüber hinaus wird die Basilarmembran bei höheren Schalldrücken stärker um das Erregungszentrum herum ausgelenkt, so dass sich die Anzahl der aktivierten Spiralganglienzellen erhöht. Bei gleichbleibender Amplitude

stellt sich eine tonische Entladungsrate im Hörnerv ein. Variieren die Amplituden, so reagieren die Nervenfasern mit sehr kurzen phasischen Veränderungen der Aktionspotentialfrequenz. Die Haarzellen, benannt nach den actinhaltigen Stereocilien auf ihrer Oberseite, befinden sich innerhalb des Corti-Organs auf der Basilarmembran. Die Zellkörper sind von Perilymphe umgeben, während sich ihre Stereocilien im endolymphatischen Raum befinden und durch die Lamina reticularis zur Perilymphe hin abgegrenzt sind (4). Es werden zwei Zelltypen unterschieden: die inneren (Inner Hair Cell - IHC) und äußeren Haarzellen (Outer Hair Cell - OHC). Die zylindrischen äußeren Haarzellen befinden sich in mehreren Reihen entlang der Basilarmembran (beim Menschen: 12000 OHCs in 3-5 Reihen, bei der Maus: 2000-2500 OHCs in 3 Reihen). Sie besitzen 50-150 Stereocilien, die in 3-4 Reihen in W- oder V-Form angeordnet sind (1, 5). Die längsten Stereocilien betten die OHCs in die darüber liegende Tektorialmembran ein. OHC's werden hauptsächlich efferent innerviert. Sie können aufgrund ihrer Kontraktilität die Erregungsstärke der IHC's maßgeblich beeinflussen. Die flaschenförmigen IHC's (beim Menschen: 3500, bei der Maus: 700) werden hauptsächlich afferent innerviert und besitzen durchschnittlich 60 Stereocilien, die U-förmig angeordnet sind. Zwischen den IHCs und den OHCs liegt der Corti-Tunnel, der durch die inneren und äußeren Pillar-Zellen begrenzt ist. Weitere Zelltypen innerhalb der Cochlea sind die Stützzellen des Corti-Organs. Dazu gehören vor allem die Deiter's-Zellen, die Hensen-Zellen und die Phalangeal-Zellen (1). Die Haarzellen, vor allem die äußeren, besitzen darüber hinaus Eingänge von absteigenden Bahnen des auditorischen Systems, dem olivo-cochleären Bündel. Diese efferenten Fasern haben ihre Zellkörper im superioren Olivenkomplex (SOC) des Hirnstamms. Hier unterscheidet man zwei Arten von Fasern. Einerseits große, myelinisierte Fasern, die ihren Ursprung im medialen SOC (MSO) der contra-lateralen Hemisphäre haben und die OHC's innervieren. Andererseits kleine, nicht myelinisierte Fasern, die ipsilateral aus dem lateralen SOC (LSO) stammen und auf afferente Typ I-Fasern der IHC's enden. Zudem werden mehrere Typ I-Zellen von einer efferenten Faser innerviert. Die OHC's erhalten Eingänge von vielen efferenten Fasern und jede dieser Fasern hält Kontakte zu mehreren OHC's. Die unterschiedliche Innervierung der Haarzellen ist für die Signaltransduktion von Bedeutung. Die OHC's erhalten einen direkten Input und werden somit direkt in ihren Potentialeigenschaften beeinflusst, während bei den IHC's nur die afferenten Nervenfasern efferente Terminalien erhalten wodurch die Erregungsfortleitung beeinflusst werden kann (6, 7).

Die Cochlea wird von drei Typen von Nervenfasern innerviert: den afferenten auditorischen Fasern, den efferenten Fasern (olivo-cochleäres Bündel) und den autonomen (adrenergen) Fasern. Die afferenten auditorischen Nervenfasern sind Bipolarzellen, deren Zellkörper sich im Spiralganglion des knöchernen Rosenthalkanals im medialen Teil der Cochlea befinden und sich in zwei Zelltypen unterscheiden lassen (8, 9). Man unterscheidet eine Typ I von einer Typ II-Zelle (Abb.1) (10). Typ I-Zellen bilden Synapsen mit den IHCs, sind myelinisiert und mit großen Zellkörpern ausgestattet. Sie machen circa 95 % der afferenten Fasern aus, während es sich bei den übrigen 5 % um Typ II-Zellen handelt. Typ II-Zellen bilden synaptische Verknüpfungen mit den OHCs, sind pseudounipolar und nicht myelinisiert (11). Während viele (durchschnittlich 20) Typ I-Zellen auf einer IHC enden (12), besitzen einzelne Typ II-Zellen Kontakte zu vielen OHC's (Abb.2) (13).

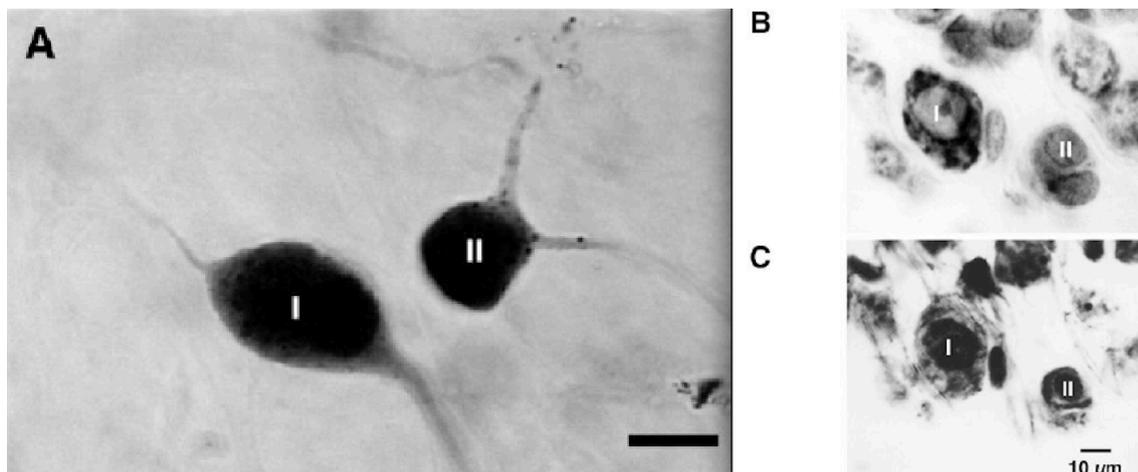


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Typ I und Typ II Spiralganglienneuronen. (A) Meerrettich-Peroxidase gefärbte Neuronen der Katze, welche zentrale und periphere Axone aufweisen. Bei der bipolaren Typ I Zelle ist das periphere Axon (links) sehr dünn ($<0,5 \mu\text{m}$) im Vergleich zum zentralen Axon (rechts). Dagegen sind die Axone der pseudounipolaren Typ II Zelle von ungefähr gleicher Größe. Der Maßstabbalken entspricht $10 \mu\text{m}$ (14). (B) Typ I und II (Ratte) gefärbt mit Cresylviolet-Färbung. Die Typ I Zelle weist ein prominentes und fleckiges Zytoplasma mit blassem Nukleus auf. Im Vergleich dazu ist das Zytoplasma der Typ II Zelle blasser. (C) Silberproteinat-Färbung der Zellen von Bild B nachdem die Cresylviolet-Färbung ausgewaschen wurde. Das Zytoplasma der Typ II Zellen ist deutlich reicher an Neurofilamenten im Vergleich zum Zytoplasma der Typ I Zellen (15, 16).

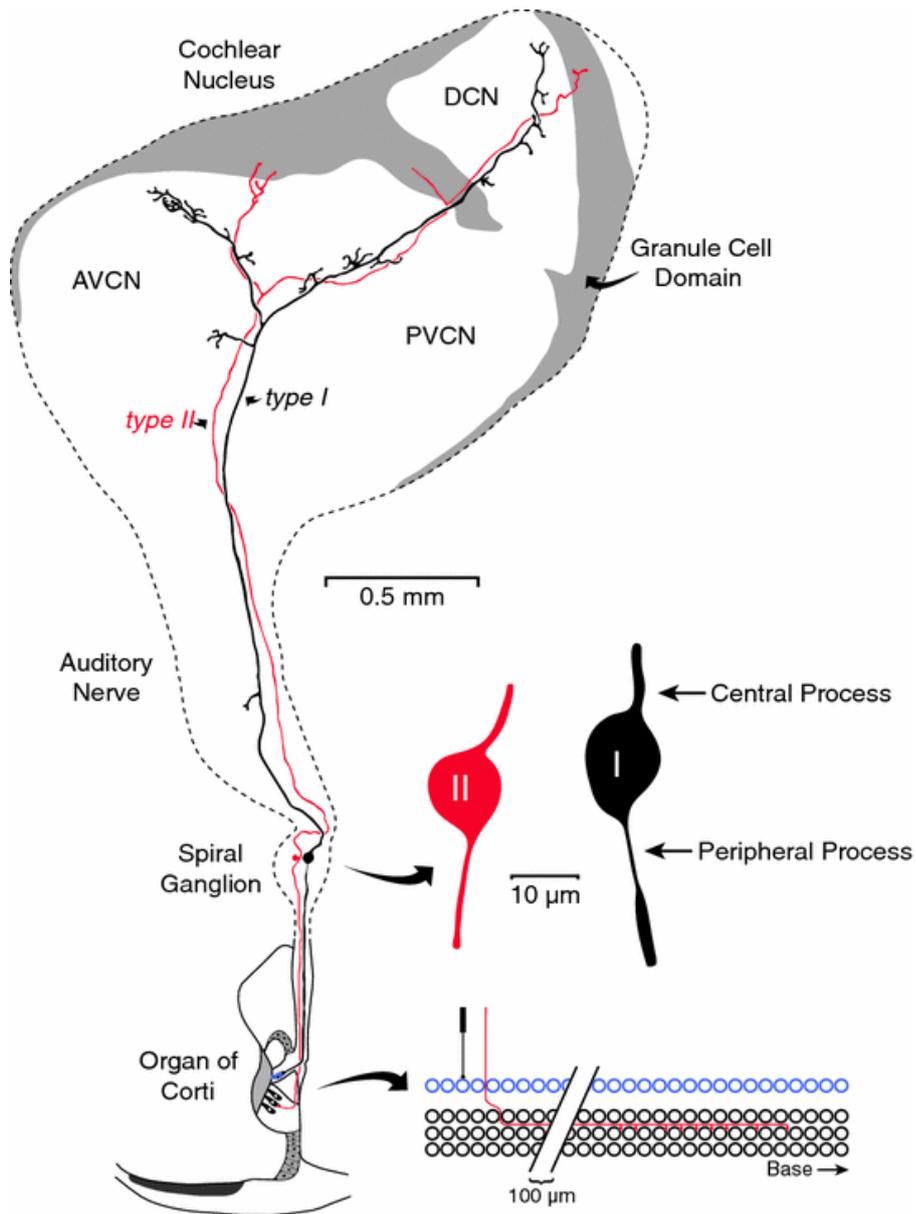


Abb. 2: Schematische Darstellung der Spiralganglienneurone und ihrer zentralen und peripheren Endungen (nach Brown et al. 1988 (17)). Die Typ I Zelle (schwarz) innerviert eine innere Haarzelle (blau) und hat eine topographische Projektion in den Nucleus cochlearis. Die Nervenfasern, welche die basalen Haarzellen innervieren, projizieren in den dorsalen Teil des Nucleus cochlearis (DCN) und die Nervenfasern, welche Haarzellen weiter apikal innervieren, projizieren in den ventralen Teil des DCN. Die Typ II Zellen (rot) bilden synaptische Verknüpfungen mit mehreren äußeren Haarzellen (schwarz) und haben ähnlichen Projektionsmuster im zentralen Nervensystem und zusätzliche Endungen in den Körnerzellen-Schichten (Granule Cell Domain) (15, 17).

3.2 Pathophysiologie des Hörsystems

Hörverlust kann durch verschiedene Pathologien verursacht werden. Die häufigste Ursache beim Menschen ist jedoch der lärminduzierte Hörverlust (18). Lärminduzierter Hörverlust gehört zu den häufigsten Berufskrankheiten in den Industrieländern. Zu den meistbetroffenen Berufsgruppen gehören unter anderem Bauarbeiter, Bergwerksarbeiter, Orchestermusiker und Bedienungspersonal in Nachtclubs (19-23). Obwohl berufsbedingte Lärmexpositionen bei bestimmten Berufsgruppen das größte Risiko für einen Hörverlust darstellen, können auch Freizeitrisikofaktoren, wie zum Beispiel laute Musik, eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Hörschäden spielen (24, 25).

3.2.2 Einfluss von Lärm auf die Hörschwelle

Ein Lärmtrauma kann individuell unterschiedlich schwere Folgen haben. Dabei scheint die genetische Prädisposition, neben anderen Faktoren, bedeutsam zu sein (26). Allgemein erhöht sich die Hörschwelle kurz nach oder schon während einer Lärmexposition deutlich. Dieser Hörverlust kann temporär mit vollständiger Erholung sein oder sich permanent auf das Hörvermögen auswirken. Die Intensität, Art und Dauer der Beschallung beeinflussen die Verschiebung und Regeneration der Hörschwelle. Damit ist einerseits das Frequenzspektrum des Lärms gemeint, aber auch die Amplitude des Schalls in Dezibel (SPL) und die Expositionszeit. In der Literatur wird eine Hörschwellenverschiebung als „temporary threshold shift“ (TTS) bezeichnet, wenn sie während und unmittelbar nach einer Beschallung auftritt. Wenn eine Wiederherstellung des Ausgangszustandes nicht erfolgt, wird der bleibende Hörverlust als „permanent threshold shift“ (PTS) bezeichnet. Eine dauerhaft erhöhte Hörschwelle beim Menschen nach Lärmexposition ist vor allem zunächst im Bereich von 4 kHz typisch.

3.2.3 Einfluss von Lärm auf die zentrale Hörbahn

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden pathophysiologische Veränderungen in Strukturen der zentralen Hörbahn in Folge von Lärm gezeigt. Basta et al., 2005 haben eine Korrelation zwischen einer Lärmbeschallung und dem Zellverlust in zentralen Strukturen, wie dem Corpus geniculatum mediale (MGB medial

geniculate body) und dem primären auditorische Kortex (primary auditory cortex AI), gezeigt (27). Auch im auditorischen Hirnstamm wurde ein deutlicher Verlust der Neuronendichte nach einem Lärmtrauma festgestellt (56). Um die zugrundeliegenden Mechanismen zu charakterisieren, wurden mögliche Zelltodmechanismen im zeitlichen Zusammenhang untersucht. In der Arbeit von Coordes et al., 2012 konnten Zelltodmechanismen nach akustischer Überstimulation (3h, 5-20 kHz bei 115 dB SPL) im ventralen und dorsalen *Nucleus cochlearis* (ventral cochlear nucleus VCN; dorsal cochlear nucleus DCN), sowie im zentralen Nukleus des *Colliculus inferior* (central nucleus of the inferior colliculus ICC) 6h, 24h und 7 Tage nach einem Lärmtrauma nachgewiesen werden (28). In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der Einfluss eines wiederholten Lärmtraumas (7d nach Erstbeschallung) auf Zelltodmechanismen im VCN, DCN und ICC untersucht. Sieben Tagen nach einer Erstbeschallung (3h, 5-20 kHz bei 115 dB SPL) wurden Mäuse erneut beschallt und entweder direkt danach oder nach sieben Tagen untersucht. Unabhängig von der wiederholten akustischen Überstimulation war die Zelltodrate bei beiden Gruppen, welche nach vierzehn Tagen untersucht wurden, größer als bei den Gruppen, welche nach sieben Tagen untersucht wurden (29). Bei der Untersuchung von Strukturen des MGB und AI, nach einer akustischen Überstimulation (3h, 5-20 kHz bei 115 dB SPL) haben Fröhlich et al. (2017) einen signifikanten Unterschied in der Zelltodrate im dorsalen Teil des MGB (dorsal medial geniculate body, dMGB) 24 Stunden nach Beschallung festgestellt (30, 31). Die beschriebenen pathologischen Veränderungen im zentralen Hörsystems wurden wahrscheinlich zum großen Teil von einer veränderten peripheren Innervation induziert. Basierend auf den Erkenntnissen aus den beschriebenen vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hat die vorliegende Arbeit das Ziel, die Effekte einer akustischen Überstimulation auf periphere Strukturen der Hörbahn zu untersuchen.

3.2.4 Einfluss von Lärm auf die Haarzellen

Die Schädigung der Haarzellen durch Lärm ist seit langem als eine der wichtigsten Mechanismen bei einem lärminduzierten Hörverlust (engl. „noise induced hearing loss“, NIHL) bekannt (32). Bei einer lärminduzierten Schädigung werden die OHCs häufig am meisten betroffen, wobei sich der Haarzellenuntergang mit der Intensität und dem Beschallungsmuster verändert (33). Absoluter Verlust der äußeren Haarzellen führt zu einer Hörschwellenverschiebung zwischen 40-60 dB (34). Andererseits sind

Beeinträchtigungen der Zellen nicht ausgeschlossen, wenn kein Haarzellverlust vorliegt. Die Verschiebung der Hörschwelle kann größer sein, als nur durch die Zahl der verlorenen Haarzellen prognostiziert, weil viele IHCs und OHCs noch mit beschädigten Stereozilien und somit beeinträchtigter Funktion überleben können (35). So lange die verbliebenen Haarzellen den Verlust ausgleichen können, kann ein Haarzellverlust auch ohne Verschiebung der Hörschwelle auftreten. Von großer Bedeutung für den Funktionsausgleich ist die cochleäre Amplifikation durch die Längenänderung der äußeren Haarzellen, auch Zellelektromotilität genannt. Chen et al. haben gezeigt, dass die ersten 40 dB der lärminduzierten Hörschwellenverschiebung hauptsächlich aus dem cochleären Amplifikationsverlust resultieren (36-38). In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde Styrol verwendet, um den Zusammenhang zwischen dem Verlust der äußeren Haarzellen und der Schwellenwertverschiebung des Summenaktionspotentials (Compound Action Potential – CAP) herzustellen. Styrol ist ein ototoxischer Wirkstoff, der OHCs beginnend von der dritten bis zur ersten Reihe, abhängig von der applizierten Menge, vernichtet. IHCs sind im Gegensatz zu OHCs, gegenüber dieser Belastung durch Styrol, relativ unempfindlich. Anhand der Daten wird eine trimodale Relation zwischen OHC-Verlust und cochleärer Amplifikation angenommen. Unter der Annahme, dass alle überlebenden OHCs idealerweise funktionieren, ist die cochleäre Amplifikation erst betroffen, wenn 33% der OHCs fehlen. Danach kommt es zu einer, zum Verlust der OHCs proportionalen, Amplifikationsabnahme und letztendlich zum kompletten Ausfall wenn mehr als 67% der OHCs verloren gegangen sind (39). Eine andere Arbeitsgruppe hat bei Chinchillas die linke und die rechte Cochlea vom selben Tier in einem vierzehntägigen Abstand untersucht, um den Haarzellenuntergang zeitlich genauer verfolgen zu können. Die linke Cochlea wurde unmittelbar nach einer 75-minütigen Beschallung mit 108 dB SPL untersucht und die rechte Cochlea am 14. Tag posttraumatisch; beziehungsweise auf der linken Seite 14 Tage und auf der verbleibenden rechten Seite 28 Tage nach der Beschallung (40). Es wurde eine gute Korrelation zwischen dem histopathologischen Ausprägungsschweregrad, der Beschallungsfrequenz und dem Untersuchungszeitpunkt festgestellt. Die Haarzellen variierten von unversehrt bis geschwollen und letztlich degeneriert. Am Anfang waren lediglich die OHCs der basalen Windungen betroffen. Eine Ausbreitung der Schädigung auf die IHCs, die Stützzellen und Nervenzellen der basalen Windung, wurde nach 14 Tagen festgestellt. Zur gleichen Zeit wurden fehlende OHCs

nachgewiesen. Darüber hinaus hatte die Degeneration nun auch apikal liegende OHCs betroffen. Nach 28 Tagen waren jedoch keine weiteren degenerativen Effekte vorhanden (40). Yang et al. haben zwei verschiedene Wege des Haarzelluntergangs, abhängig von der Intensität der Beschallung (104 dB SPL und 108 dB SPL jeweils für eine Stunde) verglichen. Bei einer Beschallung mit 108 dB SPL wurden nach 1 und 4 Tagen posttraumatisch signifikant mehr apoptotische als nekrotische OHCs gefunden. Am 30. posttraumatischen Tag wurden trotz andauernden Pathologien keine signifikanten Quantitätsunterschiede zwischen den zwei Arten des Zelltodes festgestellt. Am ersten posttraumatischen Tag nach einer Beschallung mit 104 dB SPL unterschieden sich die Zahlen der apoptotischen und nekrotischen Zellen signifikant, während der Unterschied bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt ausgeglichen wurde. Es hat sich bei der Betrachtung der Ergebnisse gezeigt, dass die anfängliche Erweiterung der cochleären Läsion hauptsächlich der Apoptose zugeschrieben werden kann. Spätere Stadien der lärminduzierten Läsion hingegen resultieren wahrscheinlich aus einer gleichwertigen Beteiligung von Apoptose und Nekrose (41).

3.2.5 Einfluss von Lärm auf die Spiralganglienneurone

Es wird aktuell davon ausgegangen, dass der Verlust der Spiralganglienneurone erst sekundär nach einem Verlust ihrer peripheren Synapsen entsteht (42). Eine andere Veränderung in Folge von Lärm stellt das Anschwellen der afferenten dendritischen Fasern des Hörnervs dar. Dieses Phänomen ist deswegen interessant, weil es suggeriert, dass es eine signifikante postsynaptische Komponente für NIHL geben könnte (43, 44). Eine Ruptur der Zellmembran und ein zytoplasmatischer Inhaltsverlust begleiten oft das Anschwellen. Ferner scheint es eine Art von Glutamatexzitotoxizität zu geben, weil das Anschwellen durch cochleäre Perfusion mit Glutamatagonisten nachgeahmt und mit Glutamatantagonisten teilweise blockiert werden kann (45, 46). Obwohl es mit der Wiederherstellung des Ausgangszustandes verschwand, wurde das Anschwellen auch während einer TTS beobachtet. Diese Wiederherstellung der Hörschwelle führte zu der Hypothese, dass sich neuronale Verbindungen nach einer Lärmschädigung erholen oder regenerieren können, solange die Haarzellen überleben (47, 48).

Kujawa et. al. (2006) hat in einer Studie die Interaktion zwischen lärminduziertem und altersbedingtem Hörverlust untersucht. Tiere, die im jungen Alter als Folge eines Lärmtraumas einen moderaten bleibenden Hörverlust (ca. 40dB) aufwiesen, zeigten

im hohen Alter einen drastischen Verlust der cochleären Innervation. Obwohl nach zwei Jahren kein signifikanter Haarzellenverlust bestand, lag der Spiralganglienzellenverlust der beschallten Gruppen bei ~50% im Vergleich zu <5% in Kontrollgruppen desselben Alters (49, 50).

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der cochleären Innervation spielt der Neurotrophin-Signalweg, der durch eine Schädigung oder den Verlust der Innervation unterbrochen werden kann (51-53). Wan et al. haben in einer Studie die Funktionen von Neurotrophin-3(Ntf3) bei der Regeneration untersucht. Eine Überexpression von Ntf3 kann die Regeneration der synaptischen Kontakte zwischen den cochleären Nervenendungen und den IHCs nach einer Lärmschädigung auslösen (54). Diese ist auch mit einer korrespondierenden funktionellen Erholung gekoppelt (55). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Wiederherstellung der Innervation von Haarzellen nach einem Lärmtrauma möglich wäre, wenn der Spiralganglienzellenverlust moderat ist (50).

Wie oben beschrieben hat unsere Arbeitsgruppe in vorherigen Studien einen signifikanten Neuronenverlust sowie lärminduzierte apoptotische Veränderungen innerhalb verschiedener Stationen der zentralen Hörbahn beschrieben (27, 28, 30, 31, 56). Unklar ist, inwiefern diese Modifikationen auf Veränderungen des peripheren Inputs beruhen. Gerade sehr kurzfristige Zelltodvorgänge können bisher nicht ausschließlich durch fehlende Haarzell-Afferenzen erklärt werden. Möglicherweise kommt es jedoch infolge einer akuten Überstimulation zu einer Übererregung neuronaler Strukturen. Diese müsste in der ersten Station der aufsteigenden Hörbahn, dem Spiralganglion, sichtbar werden. In der vorliegenden Arbeit sollen deshalb die akuten und langfristigen Auswirkungen einer breitbandigen Lärmexposition auf die Spiralganglionneurone der Maus untersucht werden. Ein reduzierter Input vom Spiralganglion würde auch einen Teil des langfristigen Zellverlusts in zentralen auditorischen Strukturen durch sensorische Deprivation erklären.

Allgemein soll zwischen unmittelbaren und langfristigen Auswirkungen auf die Spiralganglienzellen nach einer Beschallung unterschieden werden. Plastische Veränderungen können bereits in den ersten posttraumatischen Stunden eintreten, aus diesem Grund sollen akute Effekte so unverzüglich wie möglich bestimmt werden. Zur Darstellung der neurodegenerativen Prozesse wird eine histologische Bestimmung von Zelldichten durchgeführt. Zusätzlich werden immunhistochemische

Färbungen verwendet um Zelltodprozesse nachzuweisen. Durch die vorliegende Untersuchung sollen Antworten und Diskussionsansätze für folgende Fragen ermittelt werden:

1. Führt das angewendete Lärmtrauma zu einem Verlust von Spiralganglienzellen?
2. Wie ist der Zeitverlauf des lärminduzierten Zellverlusts?
3. Welchen Einfluss hat ein Lärmtrauma auf die Spiralganglienzellen bei einer Vorschädigung durch Lärm?
4. Korreliert der Spiralganglienzellverlust mit Zelltodvorgängen?

4 Methodik

Die Untersuchung der vorliegenden Arbeit greift auf Hörschwellen und Gewebeproben (Cochleaschnitte) zurück, welche unsere Arbeitsgruppe bereits in vorherigen Studien gewonnen hat (28, 30, 31, 56, 57).

Die neuerbrachte Leistung der vorliegenden Arbeit besteht in der Durchführung der Färbungen (licht- und fluoreszenzmikroskopisch), der mikroskopischen Auswertung der Cochlea-Schnitte aus den verschiedenen Versuchsgruppen und der anschließenden Analyse.

Zum besseren Verständnis werden in den folgenden Abschnitten sämtliche Behandlungen und Analysemethoden beschrieben. In den Untersuchungen wurden alle Anstrengungen unternommen, um Schmerz und Unbehagen der Tiere so gering wie möglich zu halten (behördliche Genehmigung durch das LaGeSo erfolgte unter G0416/10).

4.1 Lärmexposition

Für die Experimente mit den Gruppen Akut, 6h, 24h und 7d wurden 21 adulte Mäuse im Alter von 4 bis 6 Wochen beider Geschlechter des NMRI (Naval Medical Research Institute) Stamms mit voll ausgereiftem Hörsystem verwendet. Dabei wurden 16 Tiere für die histologischen Untersuchungen verwendet und 5 Tiere auf ihre Normalhörfähigkeit getestet. Es wurden vier Versuchsgruppen zufällig gebildet und mit gleichem Schallmuster lärmexponiert. Drei Mäuse wurden direkt nach der Beschallung untersucht (Akut Gruppe). Weitere drei Tiere wurden jeweils 6 und 24 Stunden nach der Beschallung untersucht (6h und 24h Gruppe). Für die 7d Gruppe wurden sieben Tiere 7 Tage nach der Beschallung analysiert (28).

Für die Experimente mit den Gruppen 14d und 14d Doppelt wurden 12 adulte Mäuse im Alter von 6 bis 15 Wochen beider Geschlechter des NMRI-Stamms verwendet. Zwei gleichgroße Versuchsgruppen wurden zufällig gebildet und lärmexponiert. Die Tiere wurden entweder einmal beschallt und 14 Tage nach der Erstbeschallung untersucht („Einfachtrauma“) (n = 6), oder 7 Tage nach Erstexposition demselben Schallmuster ein zweites Mal ausgesetzt und weitere 7 Tage später untersucht („Doppeltrauma“) (n = 6). Das Schallmuster war für alle Versuche gleich (30, 31).

Während der Lärmbeschallungen wurden alle Tiere mit Ketamin [5%, 60 mg/kg KG (Körpergewicht) (DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland)] und Xylazin [2%, 6 mg/kg KG

(Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland)] narkotisiert. 5 Minuten nach der Injektion wurden die Wirkung der Narkose durch eine Reaktion auf einen taktilen Reiz getestet. Die Körpertemperatur wurde während des ganzen Versuches durch ein geregeltes Heizkissen (Thermolux CM 15 W, Acculux, Murrhardt, Deutschland), auf dem die Mäuse während der Versuchsdurchführung lagen, aufrechterhalten. Die Tiere befanden sich während der Lärmbeschallung in einer für diesen Zweck konstruierten lärmdämmenden (frequenzspezifisch mindestens 60 dB SPL-Abschwächung) Kammer (80 cm x 80 cm x 80 cm). In einem Abstand von etwa 10 cm oberhalb der Tiere war ein Lautsprecher (HTC 11.19, Visaton, Haan, Deutschland) befestigt. Die Kammer war von innen beleuchtet. Mit einer Videokamera wurde die Narkosetiefe überwacht. Bei Bedarf wurden 50% der Initialdosis zur Aufrechterhaltung der Narkose nachinjiziert. Ein Audioverstärker (Tangent AMP-50; Aulum, Dänemark) war an den Lautsprecher angeschlossen und beschallte die Tiere für 3 Stunden mit 115 dB SPL. Es wurde ein, auf DVD gebranntes, weißes Breitbandrauschen mit einem Frequenzband von 5 - 20 kHz über einen DVD-Spieler präsentiert. Die Lautstärke wurde durch ein Sound Level Meter (Voltcraft 329; Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland) kalibriert. Die Temperatur in der Kammer betrug durch die Heizstrahlung des Kissens, der Videokamera und der Beleuchtung konstant zwischen 36 und 37 °C (30, 31, 58).

4.2 Messung des frequenzspezifischen Hörverlustes

Diese Untersuchungen sind bereits in einer früheren Studie durchgeführt worden (57). Dabei wurde bei der „Akut“, „7d“, „14d“ und „14d doppelt“ Gruppe die Hörschwelle vor der ersten Lärmexposition und am Tag der Untersuchung (Perfusionsfixierung) ermittelt. Die BERA-Messung der „Akut“ Gruppe wurde in der fortgesetzten Narkose direkt nach der Lärmbeschallung durchgeführt. Da eine erneute Narkose nach nur wenigen Stunden die Tiere zu stark belasten würde, wurde auf eine Hörschwellenbestimmung in der „6h“ und „24h“ Gruppe verzichtet.

Eine frequenzspezifische (4,8,12,16 und 20 kHz) Hirnstammaudiometrie (BERA) der Tiere wurde unter der oben beschriebenen Narkose vorgenommen. Die Tiere befanden sich wie bei dem Beschallungsversuch in der schallgeschützten Kammer auf einem Heizkissen unterhalb eines Lautsprechers. Mithilfe eines Sinuswellen-Generators (Modell SSU2, Werk für Fernmeldewesen, Berlin, Deutschland) wurde ein Klangstimulus (200 ms Pulslänge, 2,5 Hz Pulsfrequenz) bei verschiedenen

Lautstärken auf beide Ohren appliziert. Dabei wurden die Frequenzen kontrolliert (Fluke 1941A Digital Counter, Scarborough, Ontario, Canada) und bei Bedarf angepasst. Mit Nadeln wurden die Elektroden subdermal am Vertex (Messelektrode), am Mastoid (Referenzelektrode) und an einem Fuß (Erdung) appliziert. Zur Aufzeichnung und Auswertung der reizkorrelierten Hirnstammpotentiale wurde das Viking IV® Messsystem (Viasys Healthcare, Conshohocken, Pennsylvania, USA) verwendet. Mit dem Viking Messsystem wurden die Hirnstammantworten während der ersten 10 Millisekunden nach der Reizung abgeleitet, verstärkt (um den Faktor 100'000) und gefiltert (Bandbreite 0,15 – 3 kHz). Anschließend wurden die Ergebnisse aus 300 Wiederholungen gemittelt. Es wurden Messungen bei mindestens vier verschiedenen Lautstärken für jede einzelne Frequenz durchgeführt. Ein evoziertes Summenpotential ergab sich aus reproduzierbaren und intensitätsabhängigen Reizantworten. Die größte Amplitude zeigte sich typischerweise bei Welle V der auditorischen Hirnstammantwort. Der leiseste Ton, der noch ein Potential provozierte, wurde als Hörschwelle registriert (58).

4.3 Histologische Bestimmung der Zelltodmechanismen

4.3.1 Präparation der Cochlea

Zur Vorbereitung der histologischen Untersuchungen wurde der Bauchraum der Tiere in tiefer finaler Narkose eröffnet. Die Durchtrennung der Haut und des darunter liegenden Gewebes wurde mit einer Schere, unterhalb des Brustbeines entlang des Rippenbogens durchgeführt. Darauf folgend wurden das Zwerchfell rostral des Schnittes, die Leber auf Schnitthöhe und kaudal der Darm dargestellt, gefolgt von einer Durchtrennung des Zwerchfells. Mit Entfernung des Brustkorbs wurden das schlagende Herz und die Hohlvenen dargestellt. Mittels einer Kanüle wurde die linke Herzkammer am Apex perfundiert. Anschließend wurden 20ml isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) pro Minute mit einer Überdruckpumpe (0,1 bar) appliziert. Ein künstlicher Ausgang wurde zeitgleich am Übergang von Herzbeutel und *Vena cava* geschaffen, um den Blutabfluss zu ermöglichen. Die Durchspülung mit Kochsalzlösung wurde so lange durchgeführt, bis die austretende Flüssigkeit klar war und die Leber deutlich hell erschien. Nachfolgend wurde durch die gleiche Apparatur eine Fixierlösung (4% Paraformaldehyd in PBS 0,2 M) appliziert. Eine gleichmäßige Fixierung konnte durch die eintretende Starre festgestellt werden. Nach der Dekapitation des Tieres mittels einer Schere wurde die Haut des Kopfes entfernt.

Die Cochleae wurden vorsichtig aus dem Schädel herauspräpariert, in EDTA dekalzifiziert und anschließend zum Transport und zur Aufbewahrung in der Fixierlösung bis zur Einbettung aufbewahrt. Um die Cochleae weiter histologisch aufbereiten zu können, wurden sie als nächstes in Paraffin in einem Einbettautomaten (Leica EG 1160 Histoembedder, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) eingebettet.

4.3.2 Erstellen der Cochlea-Schnitte

Von den eingebetteten Cochleae wurden mit einem Mikrotom (Euromex Präzisions Minot Rotationsmikrotom MT.5505, Holland) 6µm dicke Schnitte angefertigt. Auf jeweils einen Objektträger wurden immer zwei aufeinanderfolgende Schnitte abwechselnd aufgetragen. Pro Objektträger wurden zwischen 8 und 10 Schnitten platziert. Auf einem Objektträger befanden sich alternierend die Schnitte 1-2, 5-6, 9-10, etc. beziehungsweise die Schnitte 3-4, 7-8, 11-12, etc. Vor der Benutzung wurden die Objektträger jeweils eine Minute in 100% Ethanol und anschließend zweimal in Aqua bi-dest. entfettet und gereinigt. Die Objektträger wurden nach nächtlicher Trocknung mit 1% Gelatinelösung beschichtet. Für die Herstellung der Gelatinelösung wurden 0,25 gr Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 2,5 gr. Gelatine (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 250 ml Aqua bi-dest unter ständigem Rühren bei 60°C gelöst. Nach kurzem Eintauchen in diese Lösung wurden die Objektträger mindestens 24 Stunden zum Trocknen gelagert, bevor sie verwendet wurden. (58)

4.3.3 TUNEL Färbung

Für den Nachweis von Zelltodmechanismen wurde eine TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling; In Situ Cell Detection Kit-POD, Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Diese Färbung markiert ein 3'-OH Ende des Desoxyribonukleinsäure-Stranges, wie es bei Zelltodmechanismen typischerweise durch Endonukleasen entsteht (59). Um das mehrfache registrieren der gleichen Zelle in verschiedenen Schnitten zu verhindern, wurden nie direkt aufeinanderfolgende Schnitte für die Färbungen verwendet.

Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte jeweils zweimal 5 Minuten in Rotihistol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und anschließend je 5 Minuten in einer absteigenden Ethanolreihe (90% und 70%) sowie in destilliertem Wasser rehydriert.

Darauffolgend wurden die zu färbenden Schnitte mit einem Lackstift (Roti-Liquid Barrier Marker, red, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) umrandet, um eine Flüssigkeitsbarriere zu schaffen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurde für 20 Minuten eine Vorbehandlung mit Proteinase K (20,5 µg/ml in 10 mM Tris-HCL, pH 7.5, 100 µl pro Schnitt) durchgeführt (60). Nach Spülung mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) wurde die Positivkontrolle 10 Minuten mit 50µl rekombinanter DNase I inkubiert (100 U/ml; Roche, Mannheim, Deutschland) um DNA-Strangbrüche zu provozieren. Die anderen Schnitte wurden mit 50µl PBS beträufelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Darauffolgend wurden die endogenen Nukleasen, nach einer PBS-Spülung, mit 3% H₂O₂ (gelöst in Methanol) geblockt, um falsch-positiven Ergebnisse zu reduzieren. Hierfür wurde jeder Schnitt für 5 Minuten mit 50 µl der Lösung benetzt. Nach erneutem Tauchen in PBS (3-mal) wurde die Negativkontrolle mit 50 µl Label Solution (Roche, Mannheim, Deutschland), einem Nukleotidgemisch, beträufelt. Dieses Nukleotidgemisch funktioniert als Aktivator für das TUNEL Enzym, welches für die Negativkontrolle nicht beigemischt wird. Die Label-Solution enthält Flourescein-dUTP (deoxyuridin-triphosphatase) und ungebundenes dNTP (deoxyribonukleotid) welches in einem Reaktionsgemisch (200 mM Kalium Diamethylarsin, 25 mM Tris-HCl, 1 mM CoCl₂, 0.25 mg/ml Rinderserumalbumin, pH 6.6) gelöst ist. Diese Label-Solution wurde vor dem Auftragen im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Die anderen Schnitte, inklusive der Positivkontrolle, wurden mit 50 µl TUNEL-reaction mixture (Roche, Mannheim, Deutschland) bedeckt. Diese TUNNEL-reaction mixture entstand durch die Mischung von 1350 µl der 1:2 verdünnten Label Solution mit 50 µl einer Enzym-Solution. Die Enzym-Solution enthält das eigentliche TUNEL-Enzym. Die terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), die Substanz die an das zerschnittene 3'-OH der DNA-Ende bindet, wird durch das folgende Reaktionsgemisch bereitgestellt: 60 mM Kaliumphosphat (pH 7.2 bei 4 °C), 150 mM Kaliumchlorid, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 0,5% Triton X-100 und 50% Glycerol. Die Schnitte wurden mit passend zugeschnittenem Laborfilm („Parafilm“), der zusammen mit dem Lack eine wasserundurchlässige Barriere bildet, bedeckt. Maximal acht Objektträger wurden zur selben Zeit bei 37 °C in einer dunklen feuchten Kammer für 60 Minuten inkubiert. Die Kammer bestand aus einer kleinen Plastikbox, die mit in destilliertem Wasser getränktem Filterpapier ausgelegt wurde. Auf einer trockenen Erhöhung wurden die Objektträger gelagert. Die Box wurde verschlossen und für die Dauer der Inkubation in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Um eine zusätzliche

Orientierung bei der späteren fluoreszenzmikroskopischen Analyse zu ermöglichen, wurden die Schnitte nach dreimaliger PBS-Spülung unter Verwendung von DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) mit einem Deckglas verschlossen und anschließend mindestens 24 Stunden zum Trocknen gelagert.

Tabelle 1 – Das Vorgehen der TUNEL Färbung schematisch und chronologisch

1. RotiHistol® (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	5 min
2. RotiHistol® (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	5 min
3. Ethanol 90%	5 min
4. Ethanol 70%	5 min
5. Aqua dest.	5 min
6. Schnitte markieren mit Rotilack® (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	
7. 50 µl Proteinase K pro Schnitt	20 min
8. Spülen mit PBS	
9. Positivkontrolle: 50 µl DNase Rekombinant (Roche Mannheim, Germany)	
Restliche Schnitte mit PBS beträufeln	15min
10. Spülen mit PBS	
11. 50 µl H ₂ O ₂ – Methanol pro Schnitt	5 min
12. Spülen mit PBS	
13. Zusammen in feuchter Kammer:	60 min
Negativkontrollen 50 µl Label Solution 1:2 pro Schnitt	
Restliche Schnitte 50 µl TUNEL reaction mix pro Schnitt	
14. Spülen mit PBS	
15. Eindeckeln mit DAPI (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) und trocknen lassen	

4.3.4 Analyse der TUNEL- und DAPI-Färbung

Die Schnitte wurden frühestens 24 Stunden nach der Färbung mittels Fluoreszenzmikroskopie (Axio Lab.A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) betrachtet und unter 40-facher Vergrößerung mit einer digitalen Kamera (AxioCam ICc 1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) und der Software „ZEN lite 2.3“ (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) farbig abfotografiert. Es konnten zwischen 2 und 4 Anschnitte des Rosenthal-Kanals abfotografiert werden. Für jede Projektion wurden jeweils 2 identische Bilder mit unterschiedlichen Filtern angefertigt. Um die TUNEL-Färbung und das entsprechenden Fluorophor (Fluorescein) aufnehmen zu können, wurde das Fluoreszenz-Filter (Filtersatz 09 shift free (F) EX BP 450-490, BS FT 510, EM LP 515, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) verwendet. Für das Abfotografieren der DAPI-Färbung wurde ein DAPI-Filter (Filtersatz 01 shift free (F) EX BP 365/12, BS FT 395, EM LP 397, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany) verwendet. Zum Anfertigen und Einspeichern der Bilder wurde, wie schon beschrieben die Software „ZEN lite 2.3“ verwendet. Es wurde für jedes Bild eine CZI-Datei (Carl Zeiss Image) erzeugt, welche alle Aufnahmeinformationen als Meta-Daten enthält. Um einen Informationsverlust zu vermeiden, wurden immer die zwei zueinander passenden TUNEL und DAPI-Bilder im Graustufen-Modus (16 Bit) gespeichert und anschließend für eine einfachere Auswertung in Composite-Stacks zusammen gepaart (Abb.3).

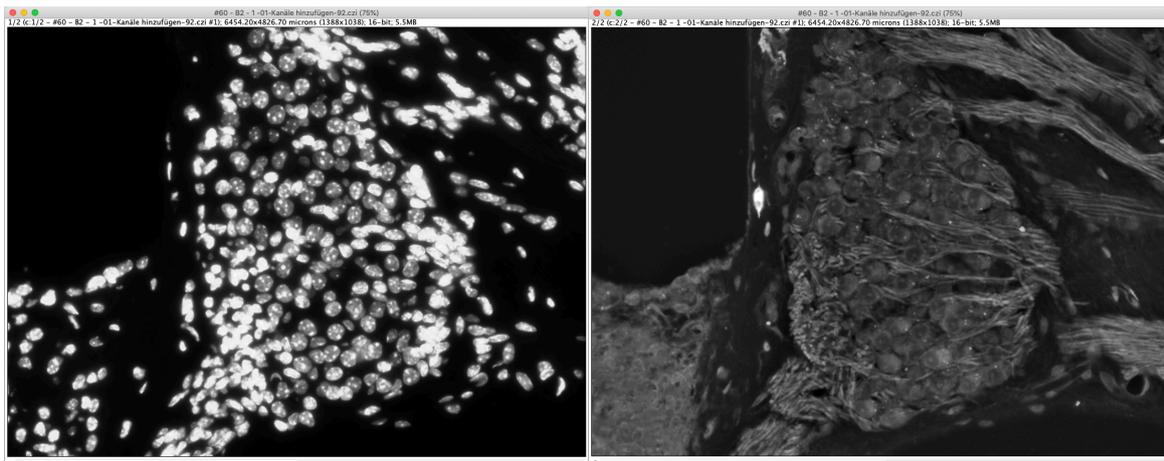


Abb. 3: Aufnahmen des Spiral Ganglions (DAPI-Färbung links und TUNEL-Färbung rechts) zusammengestapelt im Carl-Zeiss-Image-Stack Format. Die Bilder der beiden Färbungen wurden in Graustufen-Modus (16 Bit) eingespeichert um Informationsverlust zu vermeiden. Das DAPI-Bild (links) ermöglicht eine zuverlässige Zellerkennung, welche für die spätere Auswertung des TUNEL-Bildes (rechts) benötigt wird.

Die Auswertung wurde mithilfe eines speziell, anhand eigener Vorgaben, entwickelten Macros "Nuclear_TUNEL_Measurement-v12.ijm" (BioVoxxel, Dr.Jan Brocher, Ludwigshafen, Germany) für die Prozessierungssoftware „Fiji“ (ImageJ, Version: 2.1.0/1.53c, Build:5f23140693, Open source image processing software Copyright 2010-2021) durchgeführt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Auswahl der Zielfläche – manuelles Umkreisen des Rosenthal-Kanals (Abb.4 und Abb.5)

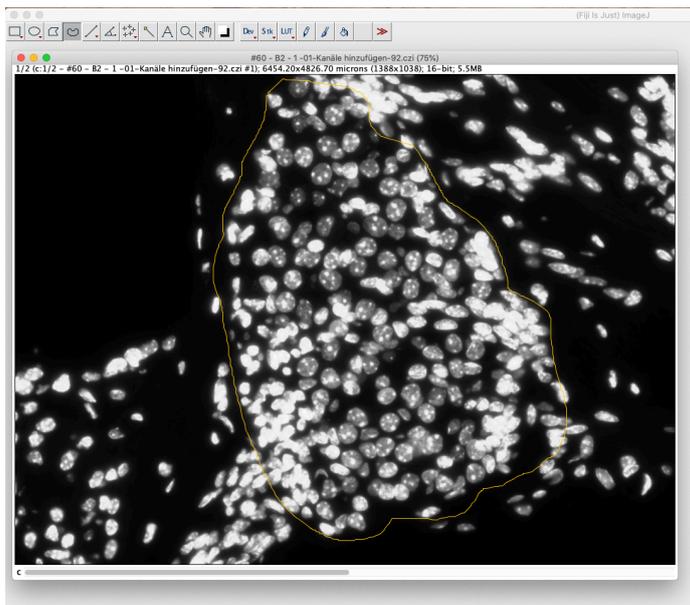


Abb. 4: Das DAPI-Bild des Composite-Stacks mit umkreister ROI (Region of Interest)

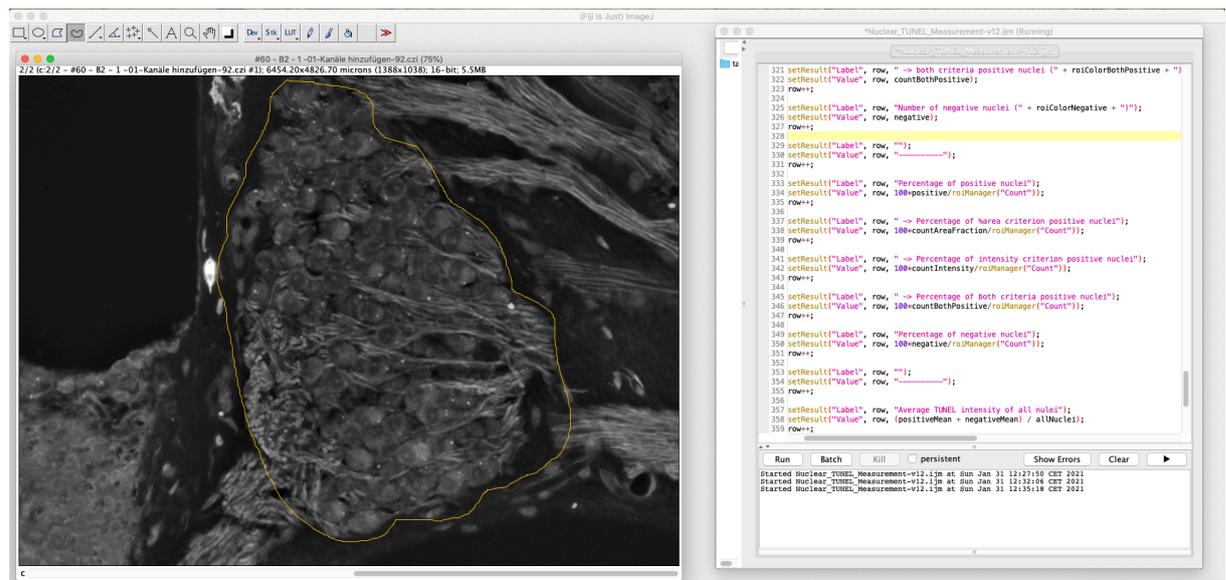


Abb. 5: Das TUNEL-Bild des Composite-Stacks (links) erlaubt eine zusätzliche Kontrolle der ROI-Auswahl, danach wird das TUNEL-Macro (rechts) mit der "Run"-Taste gestartet

2. Vor der TUNEL-Auswertung werden die folgenden Parameter in einen Anfangsdialog eingegeben (Abb.6):

- **Intensity threshold (TUNEL intensity) - Intensitätsgrenzwert** – Zellkerne mit einer durchschnittlichen Pixelintensität größer als diesen Wert werden als TUNEL-positiv bewertet und alle Pixel mit einer Intensität größer als dieser Wert werden als positive Bereiche bewertet. Unter Pixelintensität ist in diesem Fall die Helligkeitsstufe jeder Pixel zu verstehen. Für 16 Bit Bilder, welche im Graustufen-Modus gespeichert wurden, sind pro Pixel 65536 Graustufen vorhanden. Bei einem Graustufenwert von 0 ist der Pixel schwarz und bei maximalem Graustufenwert weiß. Für die Ermittlung des TUNEL-Intensität Schwellenwertes wurde eine Reihe von Versuchsmessungen durchgeführt. Dazu wurden alle Bilder aus der Positivkontrolle und der Negativkontrolle mit dem TUNEL-Macro und diversen Probeparametern vermessen. Danach wurde ein Intensitätsgrenzwert ausgewählt bei dem die Bilder der Positivkontrolle als positiv und die der Negativkontrolle als negativ ausgewertet werden. Nach dem gleichen Prinzip wurden die nächsten beiden Parameter ermittelt.

- **Intensity threshold (area fraction) - Intensitätsgrenzwert für Flächenextraktion** – TUNEL-gefärbte Bereiche (Pixel) mit einer durchschnittlichen TUNEL-Intensität größer als dieser Wert werden zur Flächenanteilmessung extrahiert.

- **%Area cut-off-Flächenminimum** – Der geringsten Prozentsatz TUNEL-positiver Fläche innerhalb eines Zellkerns. Kerne mit größeren Flächenanteilen werden als positiv bewertet, unabhängig von deren durchschnittlichen TUNEL-Intensität.

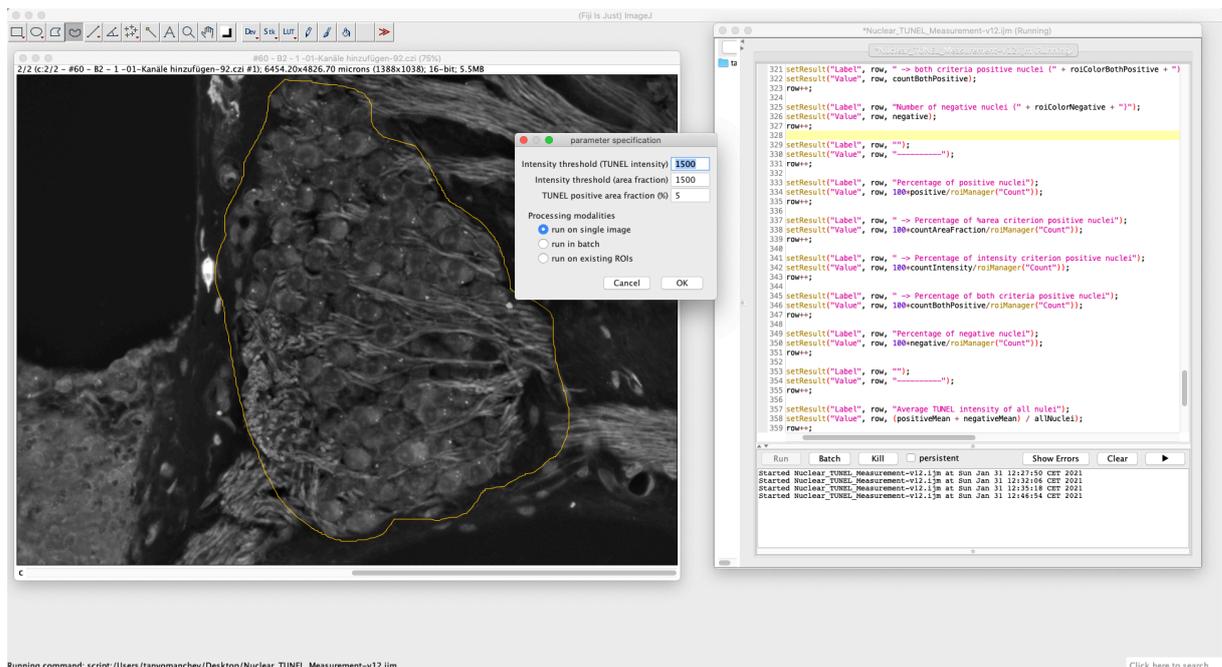


Abb. 6: Anfangsdialog zur Parameterspezifikation - Intensity threshold (TUNEL intensity) - Intensitätsgrenzwert – Zellkerne mit einer durchschnittlichen Pixelintensität größer als diesen Wert werden als TUNEL-positiv bewertet und alle

Pixel mit einer Intensität größer als dieser Wert werden als positive Bereiche bewertet. **Intensity threshold (area fraction)- Intensitätsgrenzwert für Flächenextraktion** – TUNEL- gefärbte Bereiche (Pixel) mit einer durchschnittlichen TUNEL Intensität größer als dieser Wert werden zur Flächenanteilmessung extrahiert. **%Area cutoff- Flächenminimum** – Der geringste Prozentsatz TUNEL- positiver Fläche innerhalb eines Zellkerns. Kerne mit größeren Flächenanteilen werden als positiv bewertet, unabhängig von deren durchschnittlichen TUNEL-Intensität.

3. Für das Macro wurden als Zielstrukturen oder ROIs (aus dem Englischen Regions of Interest) die Zellkerne im Rosenthal-Kanal definiert, welche aus jedem DAPI-Bild automatisiert erkannt wurden. (Abb.7).

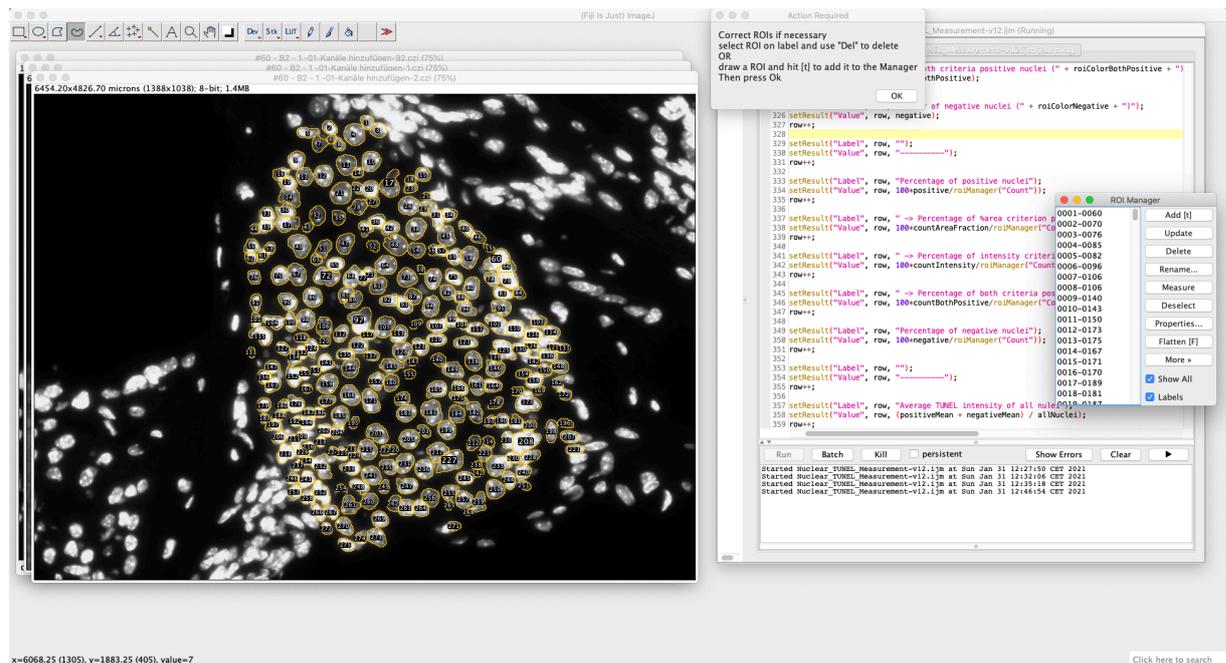


Abb. 7: Zustand nach automatisierter Zellkernsegmentierung. Bei der automatischen Zellkernsegmentierung werden große Unterschiede in den Pixelintensitäten zwischen jeweils zwei benachbarten Pixeln genutzt um Zellen vom umliegenden Gewebe zu trennen. Die markierten Pixel (gelb) sollen nach der automatischen Segmentierung die Grenzen der Zellkerne darstellen. An bestimmten Stellen, an denen mehrere Zellkerne überlagert vorliegen und somit kein Hintergrund dazwischen vorhanden ist, wird eine Kontrolle und gegebenenfalls eine manuelle Zellkernsegmentierung benötigt.

4. Eine zusätzliche manuelle Nachkontrolle wurde bei jedem Vorgang durchgeführt, sodass Fehler bei der Zellkernerkennung korrigiert werden konnten (Abb. 8).

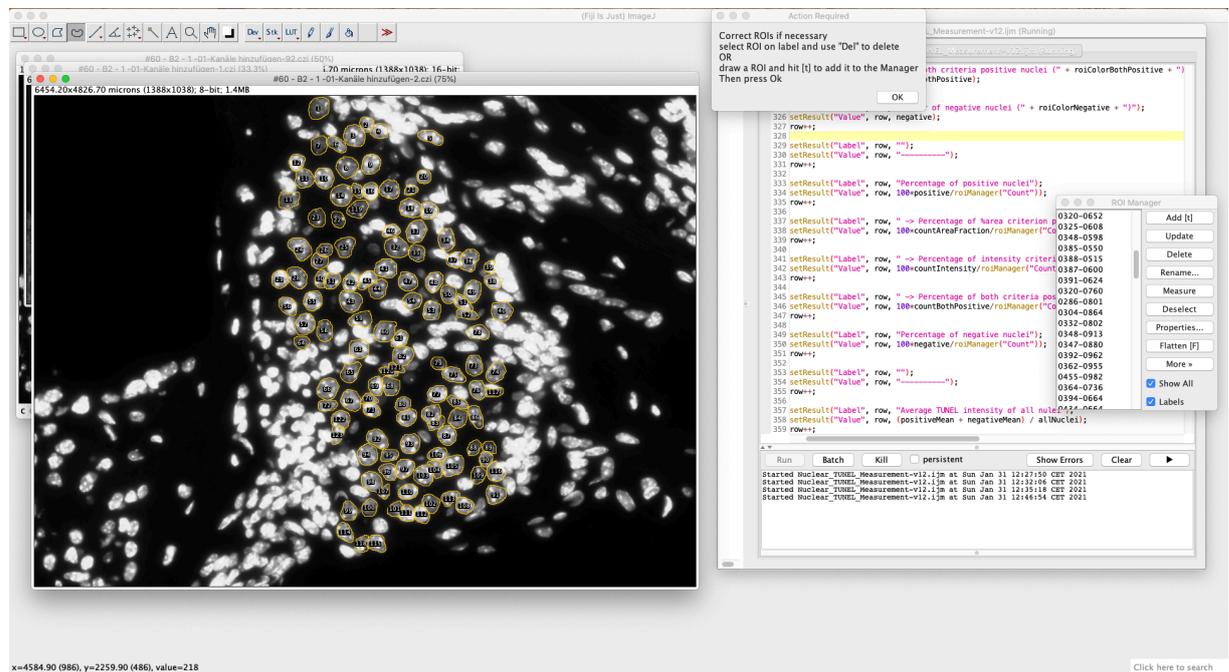


Abb. 8: Zustand nach manueller Nachkontrolle – Es wurden nur ROIs ausgewertet, die markierten Zellkerne von Typ 1 Spiralganglienneuronen enthalten.

5. Das TUNEL-Macro korrigierte die ROI-Schablone aus dem DAPI-Bild des Composite-Stacks und wertet damit das TUNEL-Bild aus. Zuerst wird die mittlere TUNEL-Fluoreszenzmessung für jeden Zellkern vorgenommen und mit den Schwellenwerten verglichen. Liegt dieser Messwert oberhalb der definierten Schwelle, so wird die Zelle als TUNEL-positiv definiert und entsprechend gezählt. Zusätzlich wird die mittlere optische Dichte der TUNEL-Färbung über alle in der Struktur definierten Zellkerne gemessen und somit einen Mittelwert für die gesamte Struktur erhalten. Nachdem die Auswertung des TUNEL-Bildes abgeschlossen war, wurden zu Dokumentationszwecken alle finalen ROIs in eine Kopie des DAPI-Kanals eingebrannt und in Farbe auch noch einmal über das TUNEL-Bild gelegt und in das Bild integriert (Abb. 9).

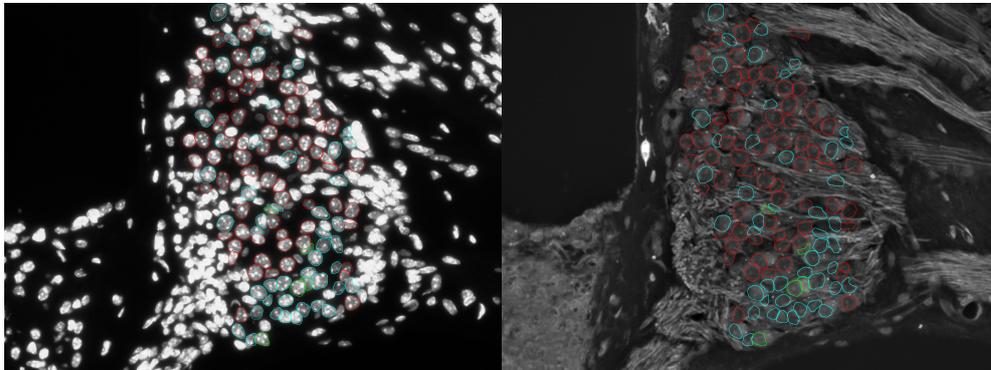


Abb. 9: Kopien der Bilder mit ausgewerteten und farblich gekennzeichneten ROIs (DAPI-Bild links und TUNEL-Bild rechts). Zellkerne, welche als negativ ausgewertet wurden, werden rot markiert. Für die positiv-ausgewerteten Zellen werden die Farben zyan, gelb und grün verwendet. Zyan-markierte Zellkerne haben ein Prozentsatz TUNEL-positiver Fläche, welcher größer als der vordefinierte geringste Prozentsatz ist und werden unabhängig von deren durchschnittlichen TUNEL-Intensität als positiv gewertet. Gelb-markierte Zellkerne haben eine höhere TUNEL-Pixelintensität als der Schwellenwert und werden unabhängig von dem Prozentsatz TUNEL-positiver Fläche als positiv gewertet. Die Zellkerne, welche beide Schwellenwerte (TUNEL-Pixelintensität und Prozentsatz TUNEL positiver Fläche) überschreiten, werden grün gekennzeichnet.

6. Es wurde eine Ergebnistabelle mit allen Einzelwerten sowie eine kleine Zusammenfassung als Tabelle abgespeichert (Abb.10). Es gibt 4 Entscheidungskriterien Kombinationen mit dem entsprechenden Eintrag in der letzten Ergebnistabellenspalte:

1. < Intensitätsgrenzwert & >= Flächenminimum --> "% area" --> wird als **positiv** gewertet (Abb. 10 – N8)
2. >= Intensitätsgrenzwert & < Flächenminimum --> "intensity" --> wird als **positiv** gewertet (Abb.10 – N9)
3. >= Intensitätsgrenzwert & >= Flächenminimum --> "both positive" --> wird als **positiv** gewertet (Abb.10 – N10)
4. < Intensitätsgrenzwert & < Flächenminimum --> "both negative" --> wird als **negativ** gewertet (Abb.10 – N11)

Label	Value
1 Intensity threshold (TUNEL intensity)	1500.000
2 Intensity threshold (area fraction)	1500.000
3 %Area cutoff	5.000
4	-----
5 Initially selected area in microns^2	10638313.245
6 Number of all detected nuclei	123.000
7 Number of positive nuclei	52.000
8 -> %area criterion positive nuclei (cyan)	47.000
9 -> intensity criterion positive nuclei (yellow)	0.000
10 -> both criteria positive nuclei (green)	5.000
11 Number of negative nuclei (red)	71.000
12	-----
13 Percentage of positive nuclei	42.276
14 -> Percentage of %area criterion positive nuclei	38.211
15 -> Percentage of intensity criterion positive nuclei	0.000
16 -> Percentage of both criteria positive nuclei	4.065
17 Percentage of negative nuclei	57.724
18	-----
19 Average TUNEL intensity of all nuclei	1225.987
20 Average TUNEL intensity of all positive nuclei	1342.217
21 Average TUNEL intensity of all negative nuclei	1140.861
22	-----
23 Average TUNEL %area of all positive nuclei	22.982
24 Average TUNEL %area of all negative nuclei	1.759

Abb. 10: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der TUNEL-Auswertung für ein Bild-Composite.
 Nummer (N) N1, N2 und N3 zeigen die Schwellenwerten, welche bei der jeweiligen Auswertung verwendet wurden.
 N5 - Die ausgewählte Fläche in Quadratmikrons. N6 – Die Summe aller ausgewählten Zellkernen. N7 – Die Summe aller positiv ausgewerteten Zellkernen. N8, N9 und N10 – Anzahl an positiven Zellkernen nach den jeweiligen Kriterien. N11 -Die Summe aller negativ ausgewerteten Zellkernen. Die Nummern 13-17 beschreiben in prozentuale Angaben die Ergebnisse zu den Nummern 7-11. N19 – Durchschnittsintensität aller Zellkernen. N20 – Durchschnittsintensität aller positiven Zellkernen. N21 – Durchschnittsintensität aller negativen Zellkernen.

4.3.5 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Ermittlung der SGN-Dichte wurde eine Hämalaun-Eosin Färbung (HE) durchgeführt. Dazu wurden weitere Cochlea-Schnitte auf Objektträgern aus den alternierenden Schnittserien verwendet. Der Ablauf der Färbung ist in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2 – Vorgehensweise bei der Hämalaun-Eosin-Färbung

1) Rotihistol®(Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	5 min.
2) Rotihistol®(Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	5 min.
3) 90% Ethanol	5 min.
4) 70% Ethanol	5 min.
5) Aqua dest.	5 min.
6) Hämalaun-Lösung (nach Mayer)	5 min.
7) Aqua dest.	15 sek.
8) Spülen in fließendem Leitungswasser (Farbumschlag von rot zu blau)	10 min.
9) 0,1% Eosin (leicht überfärben)	
(0,25 g in 250 ml Aqua dest. + 0,5 ml Eisessig)	ca. 40 sek.
10) Aqua dest.	15 sek.
11) 70% Ethanol (Differenzieren mit Kontrolle unterm Färbemikroskop)	ca. 30 sek.
12) 80% Ethanol	15 sek.
13) 90% Ethanol	15 sek.
14) 100% Isopropanol	15 sek.
15) Rotihistol®(Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	15 sek.
16) Rotihistol®(Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	1 min. oder länger
17) Eindeckeln mit Roti®-Histokit(Carl Roth, Karlsruhe, Germany) und trocknen lassen	

4.3.6 Bestimmung der Zelldichte

Die SGN-Dichte wurde in folgenden Schritten ermittelt:

1. Auswahl der Zielfläche – manuelles Umkreisen des Rosenthal-Kanals (Abb.11)

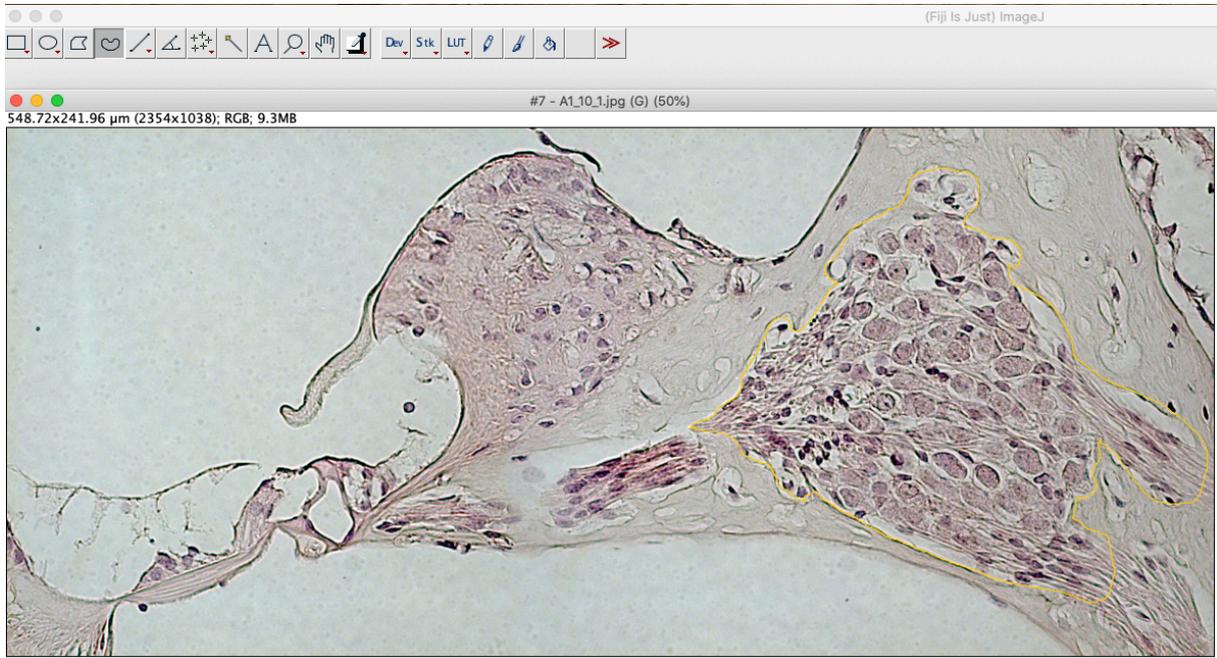


Abb. 11: HE-Bild mit umkreister Zielfläche

1. Manuelle Auswahl und Zählung der Zellen innerhalb der Zielfläche (Abb.12)

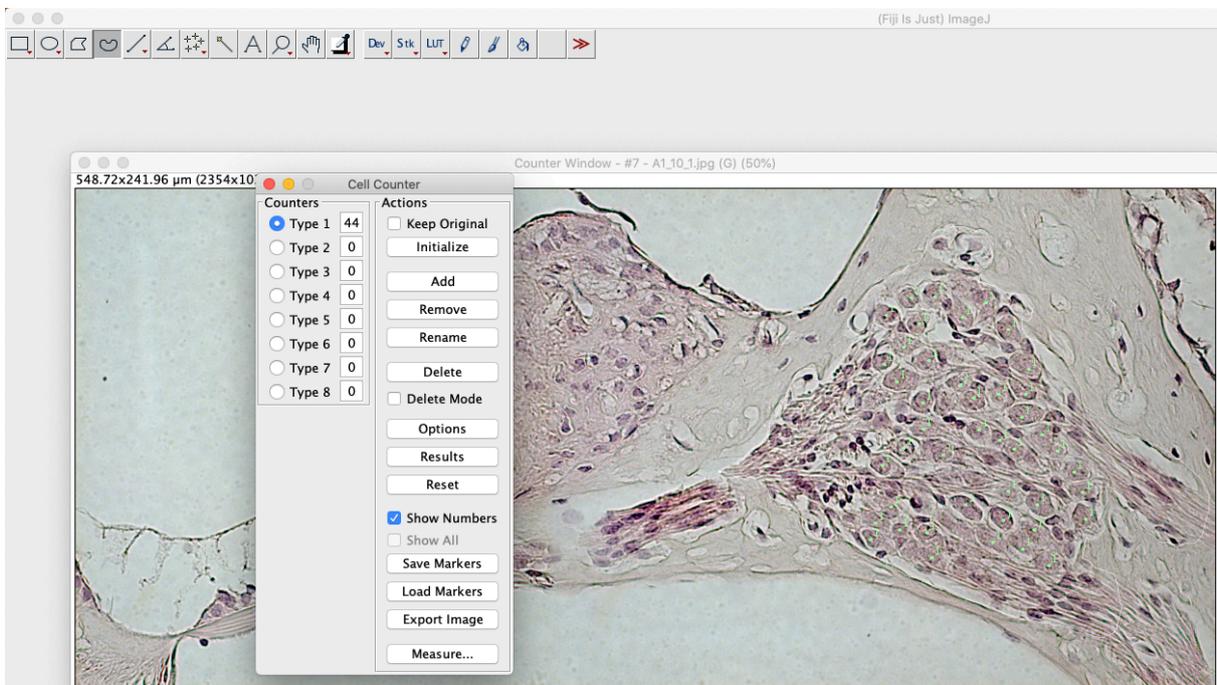


Abb. 12: HE-Bild nach manueller Zellzählung. Auf der rechten Seite sind die einzelnen, zur Zählung ausgewählten, Zellkerne (grün) zu sehen.

2. Nach der Zellzählung werden die Ergebnisse (Fläche und Zellanzahl) in einer Exceltabelle gespeichert. Gleichzeitig wird eine zusätzliche Kopie des Bildes nach erfolgter Auswertung exportiert und zur Kontrolle abgespeichert.
3. Es wurde die SGN-Dichte für jede Zählung errechnet. Zur Normierung ist die Fläche aller Rosenthalkanäle gemittelt worden (I). Da auch der Unterschied zwischen basalen und apikalen Bereichen analysiert werden sollte, wurde jeweils ein Flächenmittelwert für die basalen (RC1+RC2, Formel II als Beispiel) und apikalen (RC3+RC4) Rosenthalkanäle (Abb.13) zur Normierung gebildet. Die Ergebnisse wurden abschließend auf SGN/0,1 mm² genormt (III). Die Berechnungen erfolgten nach folgenden Formeln:

I: $\text{SGN-Dichte}_{\text{gesamt}} = (\text{Zellzahl}/\text{Fläche Rosenthalkanal in } \mu\text{m}^2) * \text{Flächenmittelwert von allen Rosenthalkanälen};$

II $\text{SGN-Dichte}_{\text{basal}} = (\text{Zellzahl}/\text{Fläche Rosenthalkanal in } \mu\text{m}^2) * \text{Flächenmittelwert der basalen Kanäle (RC1+RC2);}$

III $\text{SGN}/0,1 \text{ mm}^2 = (\text{Zellzahl}/\text{Fläche Rosenthalkanal in } \mu\text{m}^2) * 10000$

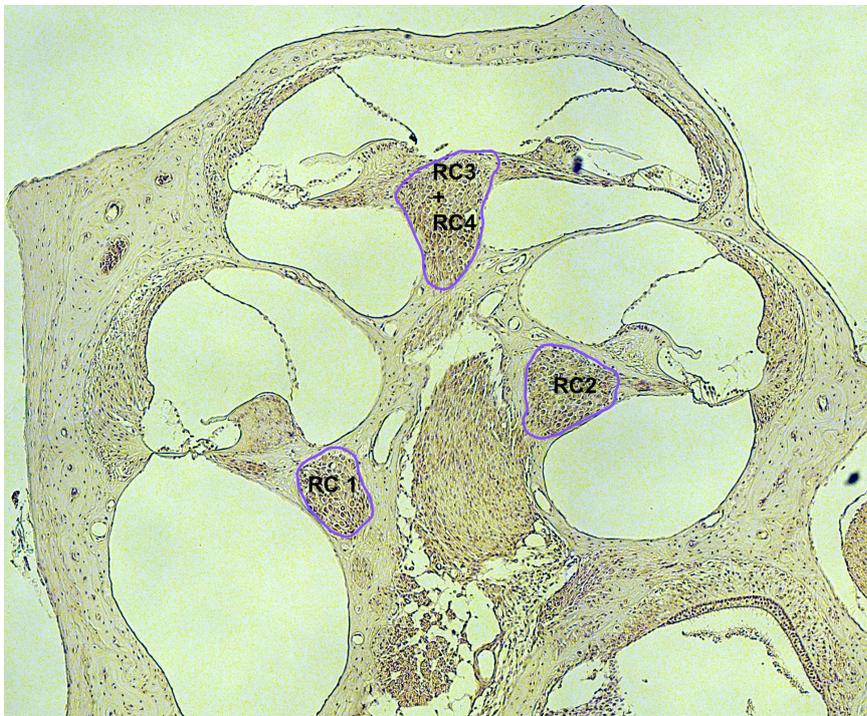


Abb. 13: Übersichtsaufnahme der Cochlea mit markierten Rosenthalkanälen (Rosenthal's Canal RC). RC1 liegt am weitesten basal, gefolgt von RC2. RC3 liegt noch weiter apikal und RC4 ist am nächsten zum Apex. RC3 und RC4 erscheinen oft vereinigt im histologischen Schnitt.

4.4 Statistik

Die Daten wurden mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung getestet. Waren die Daten normalverteilt, wurde der t-Test für unabhängige Daten für die Signifikanztestung genutzt. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Da die Gruppen Akut, 6 h, 24 h und 7 d alle gegen die Kontrollgruppe (CON) getestet wurden, musste eine Bonferroni - Korrektur für Mehrfachvergleiche einbezogen werden. Somit ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei $p < 0,0125$.

Für alle statistischen Berechnungen wurde das Programm SPSS (SPSS-Version 10.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Lärminduzierter Hörverlust

Im Folgenden werden zur besseren Einordnung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bereits publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe (57) zum Hörverlust beim verwendeten Lärmtrauma beschrieben.

Bei allen untersuchten Gruppen lag nach dem Lärmtrauma eine signifikante Erhöhung der, mithilfe der BERA-Methode gemessenen Hörschwellen vor. Das trifft sowohl auf die „Akut“ Gruppe ($n= 5$, $p<0.001$ für alle getesteten Frequenzen und für den Gesamtvergleich mittels multivariater Prüfung (MANOVA)) als auch auf die „7d“ und „14d“ Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n= 7$) zu ($n= 6$ für jede Gruppe, $p<0.001$ für alle getestete Frequenzen bei allen Gruppen und für den Gesamtvergleich mittels multivariater Prüfung (MANOVA)). Die Hörschwellenverschiebung variierte innerhalb der getesteten Frequenzen zwischen 52 und 69 dB SPL in der „Akut“ Gruppe, zwischen 33 und 42 dB SPL in der „7d“ Gruppe und zwischen 26 und 44 dB SPL in der „14d“ Gruppe (Abb.14) Die Erholung der Hörschwelle zwischen der „Akut“ Gruppe und der „7d“ Gruppe war statistisch signifikant mit Ausnahme des 4 kHz Bereichs (Abb.14; p-Wert: MANOVA (Gesamtdifferenzen): <0.001 ; 4 kHz: 0.177, 8 kHz: <0.001 , 12 kHz: 0.003, 16kHz: <0.001 , 20 kHz 0.015). In allen getesteten Frequenzen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der „7d“ und der „14d“ Gruppe. Nach der zweiten Beschallung (Abb.15) konnte eine signifikante Erhöhung der Hörschwelle nur im 12 kHz Bereich festgestellt werden ($p= 0,013$, MANOVA).

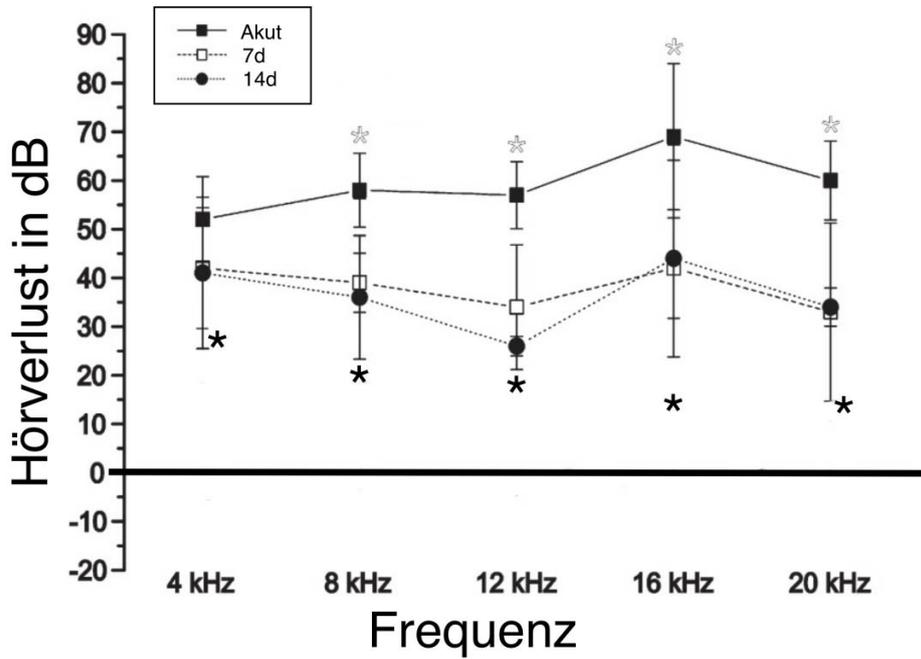


Abb. 14: Hörverlust (Mittelwert \pm Standardfehler) der einfach beschallten Gruppen ermittelt mithilfe der Hirnstammaudiometrie (BERA-Brainstem evoked response audiometry) in verschiedenen Frequenzen (aus 57). Gefüllte Sternchen markieren die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe. Die offenen Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen der „Akut“ Gruppe und der „7d“ Gruppe.

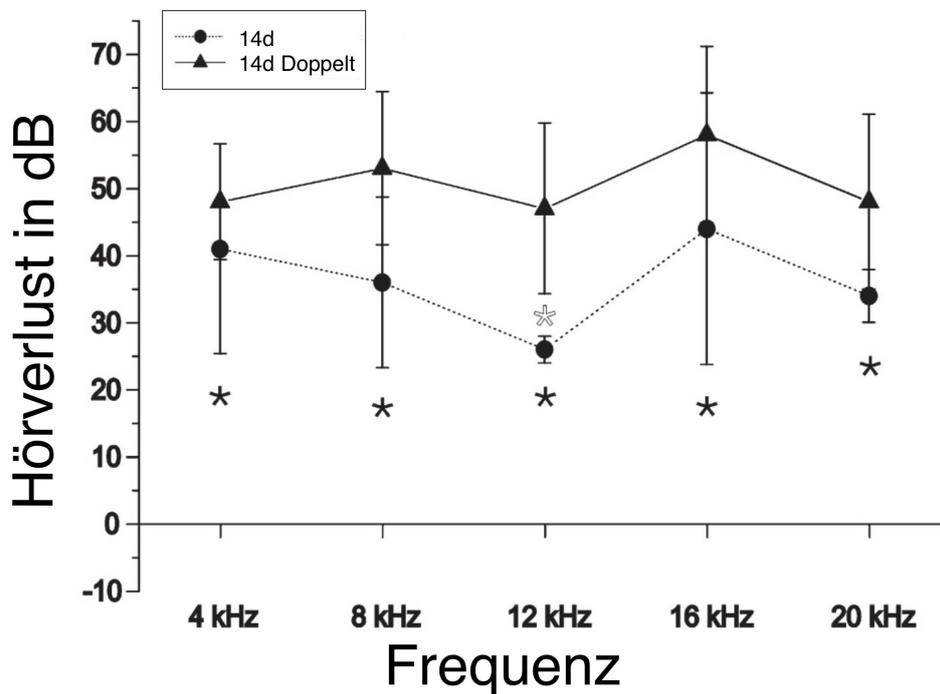


Abb. 15: Hörverlust (Mittelwert \pm Standardfehler) der doppelt und einfach beschallten Gruppen (14 Tagen nach Erstbeschallung) ermittelt mithilfe der Hirnstammaudiometrie (BERA-Brainstem evoked response audiometry) in verschiedenen Frequenzen (aus 57). Die gefüllten Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen und der Kontrollgruppe. Die offenen Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

5.2 Die Spiralganglionneuronendichte

5.2.1 Gesamtübersicht der Spiralganglionneurone

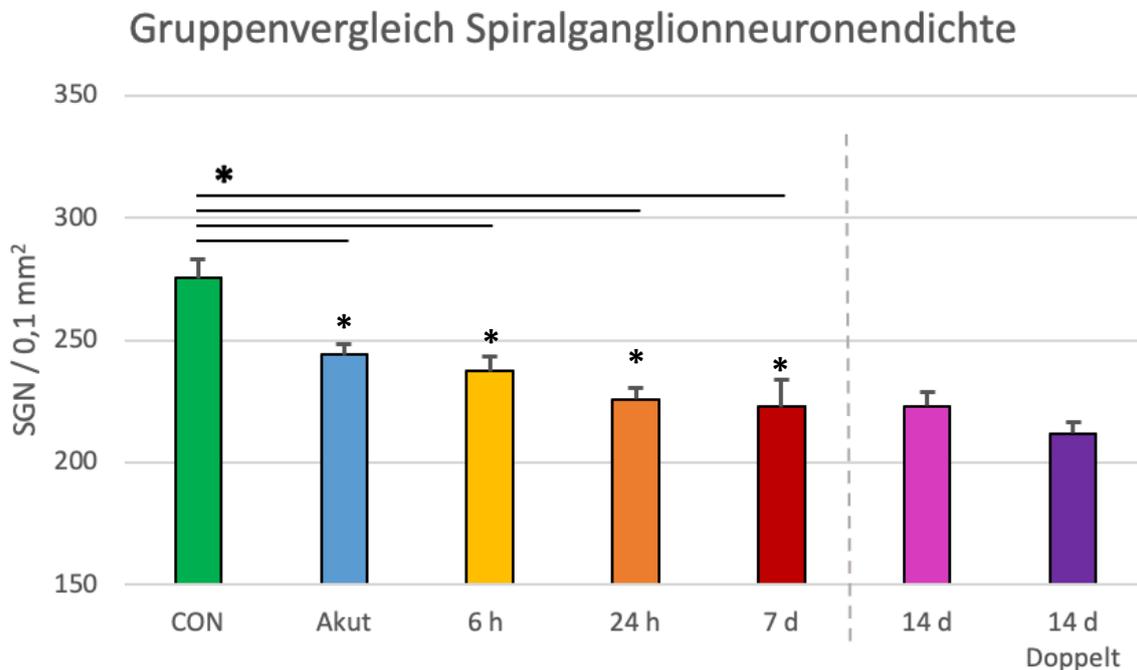


Abb. 16: Mittlere Spiralganglionneuronendichte pro 0,1 mm² (\pm Standardfehler SE) innerhalb der gesamten Cochlea für alle Versuchsgruppen. Die Gruppen Akut, 6h, 24h und 7d wurden mit der Kontrollgruppe (CON) verglichen und zeigten signifikante Unterschiede (*) zur Kontrolle; die Gruppen 14d (Einfachtrauma) und 14d Doppelt (Doppeltrauma) wurden miteinander verglichen und wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. SGN = Spiralganglionneurone

Wie in Abbildung 16 dargestellt, zeigen die Ergebnisse der Zelldichtenmessung mittels HE-Färbung eine allmähliche Abnahme der Zelldichte innerhalb des Untersuchungszeitraums. Für alle Abschnitte des Rosenthalkanals zeigt die Kontrollgruppe "CON" eine durchschnittliche Zelldichte von 82,23 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 17,83). Die Versuchsgruppe "Akut" zeigte eine durchschnittliche Zelldichte von 74,03 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 11,61) ($p = 0,005$). Für die Tiere der "6h" Gruppe, welche 6 Stunden nach der Beschallung untersucht wurden, lag die durchschnittliche Zelldichte bei 72,67 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 11,37) ($p = 0,001$) und für die "24h" Gruppe bei 67,67 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 12,26) ($p = 8,88 \cdot 10^{-8}$). Die "7d" Gruppe zeigte eine durchschnittliche Zelldichte von 67,03 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 21,59) ($p = 0,000353$). Für die "14d" Gruppe entspricht die durchschnittliche Zelldichte 65,90 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 12,65) und für die "14d Doppelt" Gruppe 64,65 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 11,52) die Gruppen „14d“ (Einfachtrauma) und „14d Doppelt“ (Doppeltrauma) wurden miteinander verglichen und wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

5.2.2 Vergleich der Spiralganglionneuronendichte in basalen und apikalen Bereichen der Cochlea

Spiralganglionneuronendichte zu verschiedenen Zeitpunkten nach einmaliger Lärmexposition

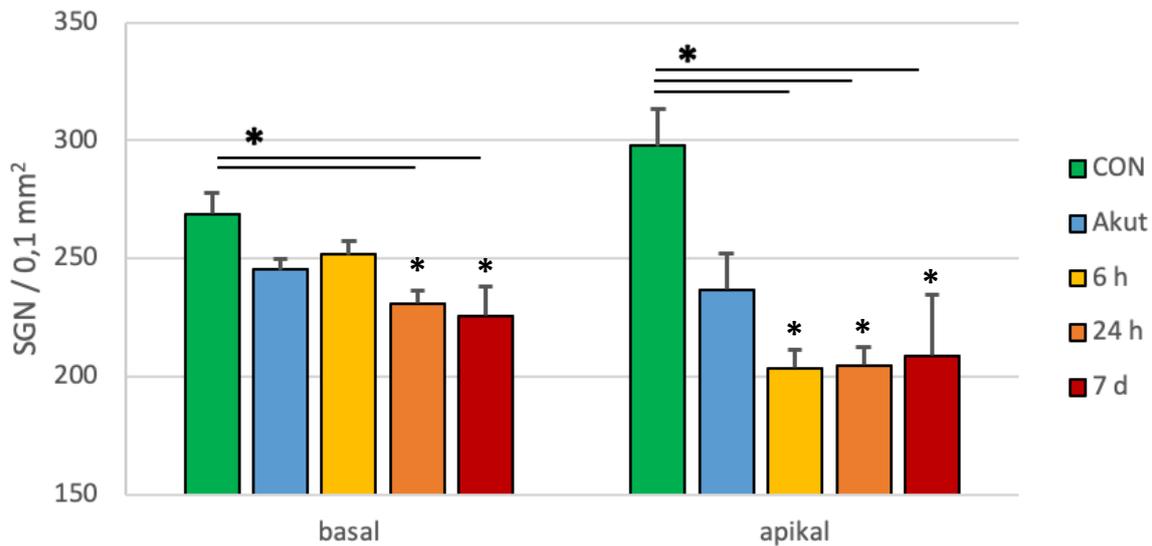


Abb. 17: Mittlere Spiralganglionneuronendichte pro 0,1 mm² (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea bei der unbehandelten Kontrolle (CON) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Akut, 6 h, 24 h und 7d) nach einer einmaligen Lärmexposition. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet. SGN = Spiralganglionneurone

In Abbildung 17 wird die durchschnittliche Zelldichte pro 0,1 mm² für den basalen (RC1 + RC2) und apikalen (RC3 + RC4) Bereich der Cochlea zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Akut, 6h, 24h, 7d) nach der einmaligen Lärmexposition und der Kontrollgruppe (CON) dargestellt. Für die basale Abschnitte des Rosenthalkanals zeigt die Kontrollgruppe "CON" eine durchschnittliche Zelldichte von 268,94 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 8,63) und für die apikale Abschnitte eine durchschnittliche Zelldichte von 297,84 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 15,62). Die Versuchsgruppe "Akut" zeigte basal eine durchschnittliche Zelldichte von 245,23 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 4,39) und 236,96 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 14,98) im apikalen Bereich, wobei es in beiden Bereichen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe gibt. Für die Tiere der "6h" Gruppe, welche 6 Stunden nach der Beschallung untersucht wurden, lag die durchschnittliche Zelldichte im basalen Bereich bei 251,8 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 5,7) ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe und im apikalen Bereich verringerte sich die Zelldichte signifikant auf 203,5 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 7,93) ($p = 0,000253$). Im basalen Bereich zeigt die "24h" Gruppe eine durchschnittliche Zelldichte von 231,17 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 5,28) ($p = 0,000282$) und im apikalen Bereich von 204,89 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 7,58) ($p = 0,000286$). Die "7d" Gruppe zeigte basal eine durchschnittliche Zelldichte von 225,69 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/-

12,37) und apikal 208,85 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 26,09) (p = 0,009 für beide Bereiche).

5.2.3 Vergleich der Spiralganglionneuronendichte zwischen einmaliger und doppelter Lärmexposition

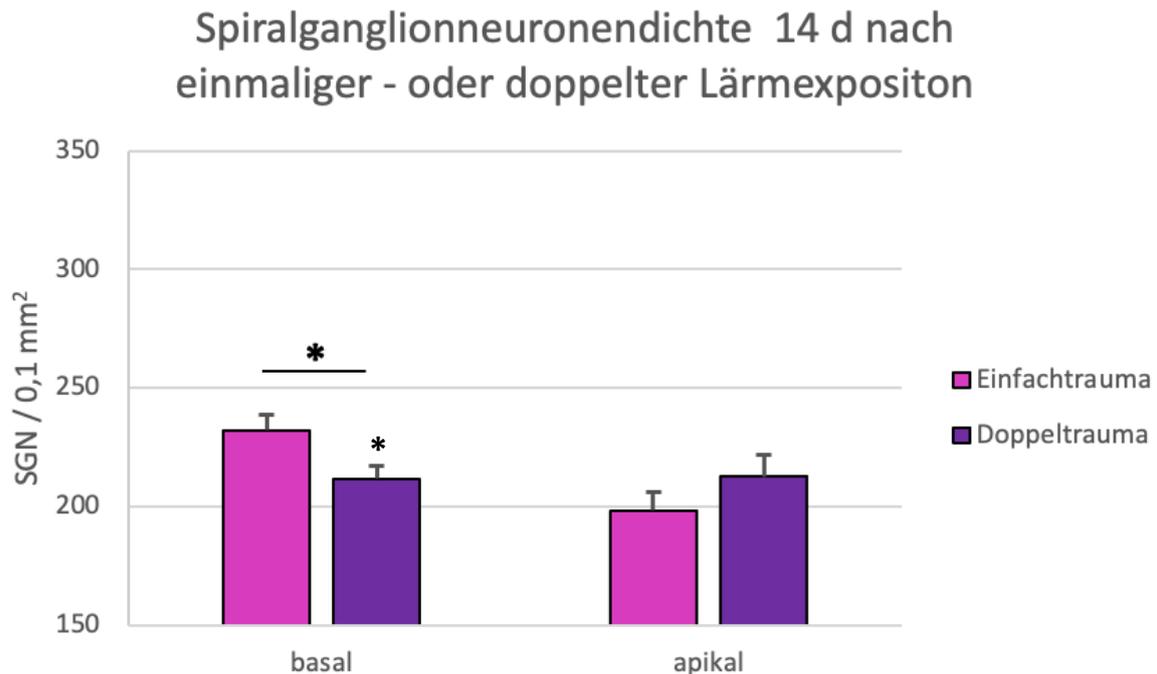


Abb. 18: Spiralganglionneuronendichte pro 0,1 mm² (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea 14 Tage nach einmaliger (Einfachtrauma) oder doppelter (Doppeltrauma) Lärmexposition. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet. SGN = Spiralganglionneurone

In Abbildung 18 wird die Spiralganglionneuronendichte pro 0,1 mm² für den basalen (RC1 + RC2) und apikalen (RC3 + RC4) Bereich der Maus-Cochlea 14 Tage nach einmaliger (Einfachtrauma) oder doppelter (Doppeltrauma) Lärmexposition dargestellt. Für die basalen Abschnitte des Rosenthalkanals (RC1 + RC2) zeigt die Einfachtrauma-Gruppe "14d" eine durchschnittliche Zelldichte von 232,1 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 6,79) und für die apikale Abschnitte (RC3 + RC4) 198,49 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 7,83). Die Doppeltrauma-Gruppe "14d Doppelt" zeigte basal (RC1 + RC2) eine durchschnittliche Zelldichte von 211,65 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 5,63), was eine signifikante Verringerung im Vergleich zum basalen Bereich der "14d" Gruppe darstellt (p = 0,022). Im apikalen Bereich (RC3 + RC4) zeigte die "14d Doppelt" Gruppe eine durchschnittliche Zelldichte von 212,78 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 9,14). Der Unterschied zum apikalen Bereich der "14d" Gruppe war nicht signifikant.

5.3 Ergebnisse der TUNEL-Auswertung

5.3.1 Zelltodrate

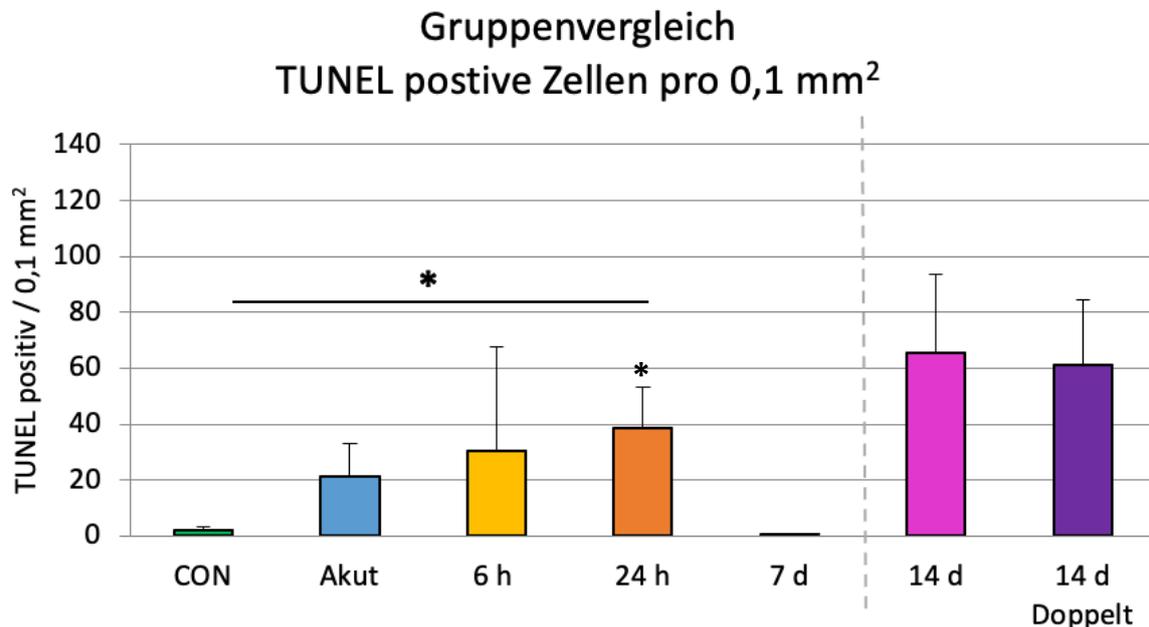


Abb. 19: Mittelwert der TUNEL-positiven Spiralganglienneurone pro 0,1 mm² (\pm Standardfehler SE) innerhalb der gesamten Cochlea. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern gekennzeichnet.

In Abbildung 19 wird der Gruppenvergleich aller Versuchsgruppen anhand ihrer TUNEL-positiven Zellen dargestellt. Die Kontrollgruppe "CON" weist eine durchschnittliche Zelldichte von 2,28 TUNEL-positive Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 1,20). Die Versuchsgruppe "Akut" zeigte eine durchschnittliche Dichte von 21,21 TUNEL-positive Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 11,83) ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Für die Tiere der "6h" Gruppe, welche 6 Stunden nach der Beschallung untersucht wurden, lag die durchschnittliche Zelldichte bei 30,55 TUNEL-positive Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 16,75) ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Die "24h" Gruppe unterscheidet sich mit 38,67 TUNEL-positive Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 14,61) signifikant von der Kontrollgruppe ($p = 0,01$). Die "7d" Gruppe zeigte eine durchschnittliche Zelldichte von 0,85 TUNEL-positiven Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 0,32) ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Für die "14d" Gruppe betrug die durchschnittliche Zelldichte 65,36 TUNEL-positive Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 28,37) und für die "14d Doppelt" Gruppe 61,34 TUNEL-positive Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 23,16). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant.

5.3.2 TUNEL-positive Zelldichtenvergleich nach basal und apikal sortiert

TUNEL positive Zelldichten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Lärmexposition

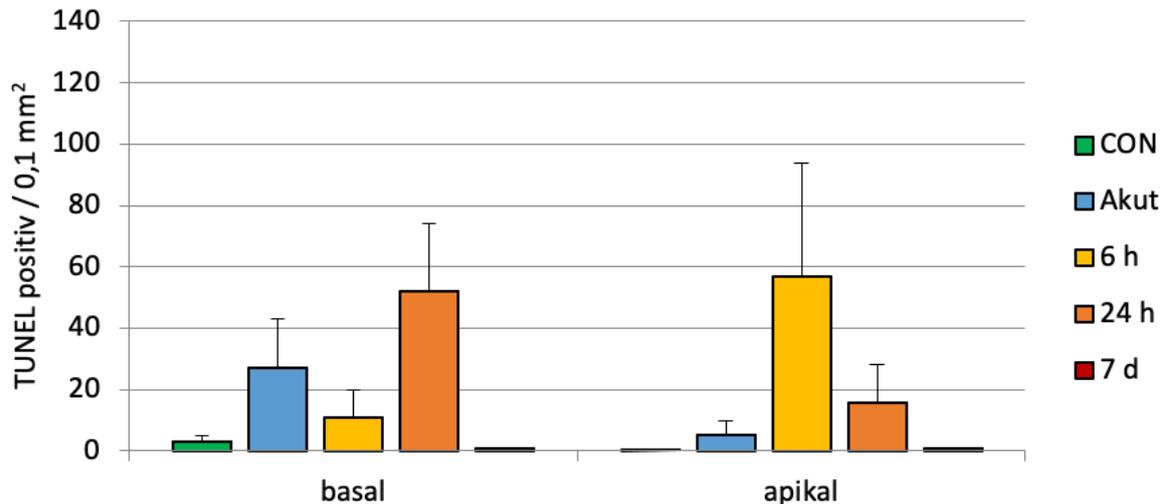


Abb. 20: Mittelwert der TUNEL-positiven Spiralganglienneurone pro 0,1 mm² (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea der unbehandelten Kontrolle (CON) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Akut, 6 h, 24 h und 7d) nach einer einmaligen Lärmexposition.

In Abbildung 20 wird die durchschnittliche Dichte an TUNEL-positiven Zellen pro 0,1 mm² für den basalen (RC1 + RC2) und apikalen (RC3 + RC4) Bereich der Cochlea zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Akut, 6h, 24h, 7d) nach einer einmaligen Lärmexposition und der Kontrolle (CON) dargestellt. Es gab keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe. Für die basalen Abschnitte des Rosenthalkanals zeigt die Kontrollgruppe "CON" eine durchschnittliche Zelldichte von 3,17 TUNEL-positiven Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 1,73) und für die apikalen Abschnitte des Rosenthalkanals eine durchschnittliche TUNEL-positiven Zelldichte von 0,33 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 0,33). Die Versuchsgruppe "Akut" zeigte eine durchschnittliche TUNEL-positiven Zelldichte von 27,08 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 16,04) im basalen Bereich und 5,14 TUNEL-positiven Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 4,41) im apikalen Bereich. Für die Tiere der "6h" Gruppe, welche 6 Stunden nach der Beschallung untersucht wurden, lag die durchschnittliche Dichte der TUNEL-positiven Zellen im basalen Bereich bei 10,76 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 8,90) und im apikalen Bereich bei 56,93 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 37,02). Im basalen Bereich zeigt die "24h" Gruppe eine durchschnittliche TUNEL-positiven Zelldichte von 52,12 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 21,89) und im apikalen Bereich von 15,69 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 12,51). Die "7d" Gruppe zeigte basal eine durchschnittliche TUNEL-positiven Zelldichte von 0,85 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 0,41) und apikal von 0,86 Zellen pro 0,1 mm² (SE +/- 0,51).

5.3.3 Vergleich der Dichte TUNEL-positiver Zellen nach einmaliger und doppelter Lärmexposition

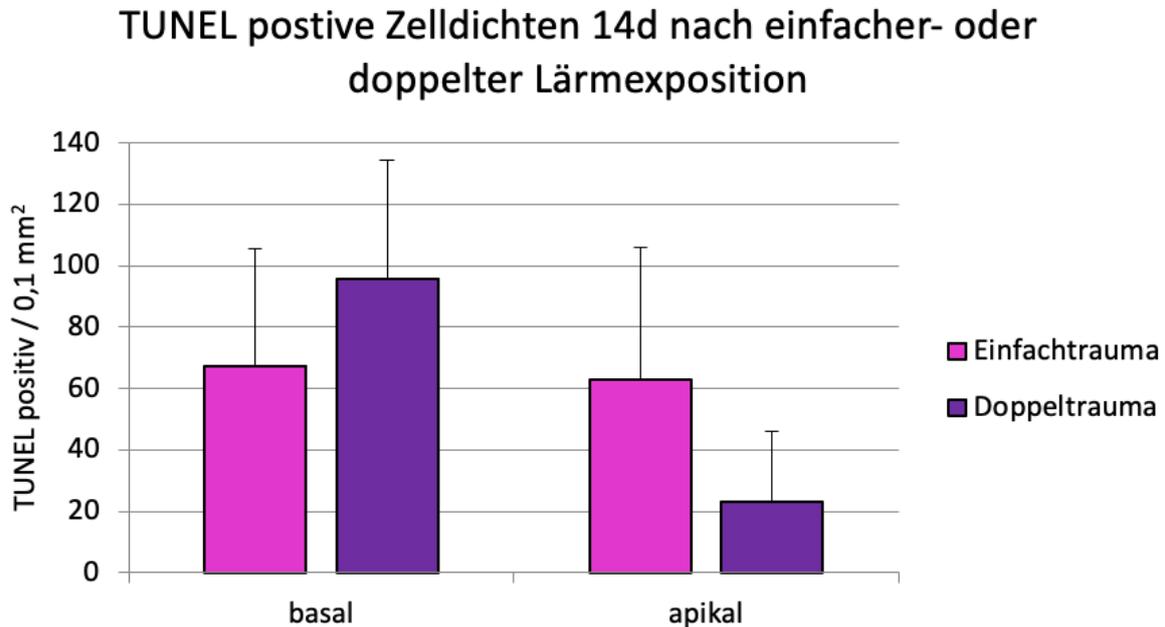


Abb. 21: Mittelwert der TUNEL-positiven Spiralganglienneurone pro $0,1 \text{ mm}^2$ (\pm Standardfehler SE) für den basalen (RC1+RC2) und apikalen (RC3+RC4) Bereich der Maus-Cochlea 14 Tage nach einmaliger (Einfachtrauma) oder doppelter (Doppeltrauma) Lärmexposition.

In Abbildung 21 wird die TUNEL-positive Zelldichte pro $0,1 \text{ mm}^2$ für den basalen (RC1 + RC2) und apikalen (RC3 + RC4) Bereich der Maus-Cochlea 14 Tage nach einmaliger (Einfachtrauma) oder doppelter (Doppeltrauma) Lärmexposition dargestellt. Die Mittelwerte der Gruppen unterschieden sich signifikant. Für die basalen Abschnitte des Rosenthalkanals (RC1 + RC2) zeigte die Einfachtrauma-Gruppe "14d" eine durchschnittliche Dichte an TUNEL-positiver Zellen von $67,39$ pro $0,1 \text{ mm}^2$ (SE $\pm 38,11$) und für die apikale Abschnitte (RC3 + RC4) $63,10$ pro $0,1 \text{ mm}^2$ (SE $\pm 42,81$). Die Doppeltrauma-Gruppe "14d Doppelt" zeigte basal (RC1 + RC2) eine durchschnittliche TUNEL-positive Zelldichte von $95,72$ Zellen pro $0,1 \text{ mm}^2$ (SE $\pm 38,58$). Im apikalen Bereich (RC3 + RC4) der "14d Doppelt" Gruppe betrug die durchschnittliche Dichte der TUNEL-positiven Zellen $23,3$ Zellen pro $0,1 \text{ mm}^2$ (SE $\pm 22,82$).

6 Diskussion

6.1 Spiralganglienzelldichte im zeitlichen Verlauf nach einem Lärmtrauma

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass ein einmaliges aber schweres Lärmtrauma die Dichte der Spiralganglienneurone schon innerhalb der ersten 24 h signifikant permanent reduzieren kann. Nach diesen ersten 24 h bleibt der Zellverlust im Beobachtungszeitraum weitestgehend stabil. Dabei konnte in den apikalen Bereichen des Rosenthalkanals der größte Zellverlust festgestellt werden. Dieser Befund korreliert jedoch nicht mit dem Effekt der Lärmexposition auf die frequenzspezifischen Hörschwellen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass ein lärminduzierter Hörverlust zu einem signifikanten Spiralganglienzellverlust an allen Untersuchungszeitpunkten führt. Diese Ergebnisse korrelieren auch gut mit der Zunahme TUNEL-positiver Zellen. Der Zeitverlauf des Hörverlusts korreliert jedoch nicht mit der Spiralganglienzelldichte an den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Die Diskrepanz zwischen einem abnehmendem Hörverlust innerhalb der ersten Woche nach dem Lärmtrauma bei gleichzeitiger Reduzierung der Spiralganglienzelldichte kann durch die Erholung der cochleären Haarzellen in diesem Zeitraum erklärt werden. Die Erholungsprozesse der cochleären Haarzellen nach einem Lärmtrauma sind bereits länger bekannt und werden für die Erklärung des Unterschieds zwischen einem höheren temporärem und einem vergleichsweise geringerem permanenten Hörverlust verwendet (40, 41). Während dieser Erholungsprozesse kann es gerade beim lärminduziertem Hörverlust zu deutlichen strukturellen Veränderungen im Spiralganglion kommen. Die Übererregung infolge des Lärms schädigt scheinbar nachgeschaltete Strukturen direkt und zunächst unabhängig vom Haarzellinput (61).

Es gibt aktuell wenige Studien, die Veränderungsprozesse bei Spiralganglienneuronen kurz nach einem Lärmtrauma beschreiben. In den vorhandenen Studien anderer Arbeitsgruppen (49, 50, 62, 63), wurde die Degeneration der Spiralganglienneuronen frühestens nach drei Tagen posttraumatisch untersucht. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die primäre neuronale Degeneration einen sehr wichtigen Kofaktor für die Wahrnehmungsstörung beim sensorineuralen Hörverlust darstellt und zudem zu weiteren Wahrnehmungsstörungen wie Tinnitus beitragen könnte (62). Außerdem wurde aufgezeigt, dass die Synapsen der Spiralganglienneurone die meistgefährdeten Elemente sind und selbst dann zerstört werden können, wenn die Haarzellen überleben. Daraus wurde abgeleitet, dass die Unterbrechung der

Kommunikation zwischen den IHC und den Neuronen eine Neurodegeneration verursachen kann (50).

Der in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Zeitverlauf des Spiralganglienzellverlusts deutet darauf hin, dass dieser auf eine akute Überstimulation zurückzuführen ist. Dieser Effekt ist auch in den zentralen Strukturen der Hörbahn beobachtet worden (30, 56, 58). Insbesondere wurde für den ventralen Cochleariskern (VCN) eine signifikante Abnahme der Neuronendichte im gleichen Zeitfenster nach einer Lärmexposition nachgewiesen. In der Arbeit von Gröschel et al. (2010) wurden Mäuse beschallt (3 h, 5-20kHz bei 115dB SPL) und entweder direkt nach der Beschallung (TTS-Gruppe) oder nach einer Woche (PTS-Gruppe) untersucht. Die Zelldichte wurde in verschiedenen Regionen (DCN, VCN, ICC, MGBd, MGBv, MGBm und AI) der zentralen Strukturen der Hörbahn untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Abnahme in der Zelldichte im VCN der TTS Gruppe (ca. 10%), die PTS Gruppe zeigte zudem einen signifikanten Zellverlust in allen untersuchten Regionen außer (VCN: -30% ; DCN: -30% und -39% ; ICC: -31%; MGBd: -31%; MGBm: -28%; MGBv: -31%; AI: -10 bis -14% ja nach Schicht) (56). Bei so frühen Zelltodprozessen direkt nach dem Lärmtrauma geht man davon aus, dass die Excitotoxizität eine entscheidende Rolle spielt. Dabei wird infolge der Glutamatausschüttung an der Postsynapse ein starker Calciumeinstrom initiiert der durch Veränderungen der ionischen Homöostase (64, 65) zur Apoptose oder Nekrose führen kann (66, 67). Zudem kann übermäßige neuronale Erregung Ischämie zur Folge haben. Dies führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und freien Radikalen sowie mitochondrialen Dysfunktionen (68). Es wurde gezeigt, dass diese Mechanismen Apoptose und Nekrose in peripheren auditorischen Strukturen bei lärminduziertem Hörverlust verursachen und dass diese Prozesse unmittelbar nach der Beschallung einsetzen können (69, 70).

Durch eine Überregung und ein dadurch verursachtes Trauma in den cochleären Strukturen, wäre auch die Auslösung einer Entzündungskaskade denkbar. Die Entzündung ist eine komplexe biologische Reaktion als Antwort auf schädliche Reize wie Infektionen, Toxine und Gewebeschäden. Daher ist zu erwarten, dass die cochleären Schäden nach einem Lärmtrauma auch auf Entzündungsreaktionen zurückzuführen sind. Gewebeschäden aktivieren Schadensassoziierte molekulare Muster (aus dem Englischen für damage-associated molecular patterns; DAMPs). Zu den Zellrezeptoren für DAMPs gehören Toll-like-Rezeptoren, NOD-like-Rezeptoren und DNA-Rezeptoren, welche auch pathogen-assoziiert sind und zum angeborenen

Immunsystem gehören. Die Cochleazellen verfügen über DAMP-Rezeptoren, die nach einer Verbindung mit Zytokinen aus bereits lärmgeschädigten Zellen, Zell-Stress Signalwege auslösen können. Als Folge davon werden proinflammatorische Zytokine, wie TNF alpha (Tumornekrosefaktor) und Interleukin 1 beta und Chemokine, wie CCL2 (Chemokin-Ligand 2) generiert (71). Nach der Verbindung mit den dafür zuständigen Rezeptoren, können TNF alpha und Interleukin 1 beta sowohl eine extrinsisch-aktivierte (mittels Caspase 8) Apoptose als auch eine regulierte Nekroptose einleiten (Abb.22).

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, bezieht sich auf einen aktiven energieabhängigen physiologischen Prozess, welcher durch eine Vielzahl von intra- oder extrazellulären Reizen initiiert werden kann. Bei diesem Prozess nehmen lebende Zellen, auf eine effiziente und organisierte Art, an ihrem eigenen Untergang teil. Die Apoptose hat eine wichtige Aufgabe in den Entwicklungs- und Wachstumsphasen, wo besonders erhöhte Raten festgestellt wurden, aber auch nach schädigenden Vorgängen wie Hypoxie, Ischämie oder Exposition von Strahlung und Noxen. Beim Apoptosenachweis werden die biochemischen und morphologischen Charakteristika einer apoptotischen Zelle ausgenutzt (72). Hu et al. haben in Chinchillas gezeigt, dass die Apoptose den wichtigsten Weg der cochleären Läsionsentwicklung nach einem Lärmtrauma darstellt. Gleichzeitig wurde bewiesen, dass unmittelbar nach einem Lärmtrauma Caspase-3 in apoptotischen Haarzellen aktiviert wird, was die Rolle von Caspase-3 an lärminduzierter Apoptose bestätigt (73). Die Schädigung und die Apoptose der Spiralganglienneurone der Cochlea werden noch von einem anderen komplizierten Signalweg reguliert. Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist ein Flavoprotein, der eine Redoxreaktion in der Elektronentransportkette verursacht und Apoptose nach einer Verletzung induziert. AIF wird zuerst selbst durch Kalpain gespalten und nach dem Verlassen der Mitochondrien und der Umsiedlung in den Zellkern spaltet AIF die DNA in Fragmente und induziert somit die Apoptose (74-76). Kao et al. untersuchten die Signalwege von ERK (*extracellular-signal regulated kinases*), p38 und JNK (C-Jun-N-terminale Kinase) bei einem OPG-Defizit an kultivierten Spiralganglienzellen (77). Diese Signalwege werden im Knochen durch OPG reguliert (78, 79) und stehen im Verdacht einen Hörverlust durch akustische Traumata oder ototoxische Medikamente zu verursachen (80). Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass infolge einer OPG Defizienz, zusätzlich zur Demyelinisierung und

Degeneration des *Nervus cochlearis* in vivo, auch ERK verstärkt aktiviert ist. Dadurch wird die Apoptoserate erhöht (77).

Im Gegensatz zur Apoptose bzw. dem "programmierten Zelltod" wird die Nekrose bei der Einteilung der Zelltodvariationen oft auch als "akzidentieller Zelltod" beschrieben. Die Entdeckung von chemischen Inhibitoren der Nekrose (81-83) und Entwicklung in der Genforschung haben den "akzidentiellen" Charakter der Nekrose widergelegt und die Existenz von multiplen Signalwegen der regulierten Nekrose gezeigt (84-90). Regulierte Nekrose wird als ein genetisch gesteuerter Zelltodprozess definiert. Dieser Prozess führt schließlich zu einem Auslaufen des zellulären Inhaltes und wird morphologisch durch zytoplasmatische Granulation und Zell- oder Organellschwellung („Onkose“) charakterisiert. Es wurden bereits mehrere Formen der Nekrose beschrieben, wie z. B. die Nekroptose, die Ferroptose, die ETose, die NETose, die Parthanatose, die Oxytose, die Pyroptose und die Pyronekrose. Jede Form wird durch einen bestimmten Aspekt des Zelltodes gekennzeichnet. Die Nekroptose ist die bisher meist erforschte Form von nicht-apoptotischem Zelltod. Die Nekroptose beschreibt eine RIKP3-abhängige molekulare Kaskade, welche regulierten Zelltod fördert. Die RIKPs oder Rezeptor-interagierende Proteinkinasen sind wichtige Regulatoren des Weiterlebens und Todes der Zellen, diese Proteinkinasen werden durch TNFR1 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1) aktiviert (Abb.22). Die Nekroptose und Apoptose haben ähnliche upstream-Signalweegelemente, wie FLIP-Inhibitorproteine (Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-like inhibitory proteins) und zelluläre Inhibitoren der apoptotischen Proteine (cIAP1 and cIAP2) (91, 92). Es gibt eine ganze Reihe von Stressoren, welche zelltodfördernd in der Cochlea wirken, die häufigste Ursache im Innenohr ist das Lärmtrauma.

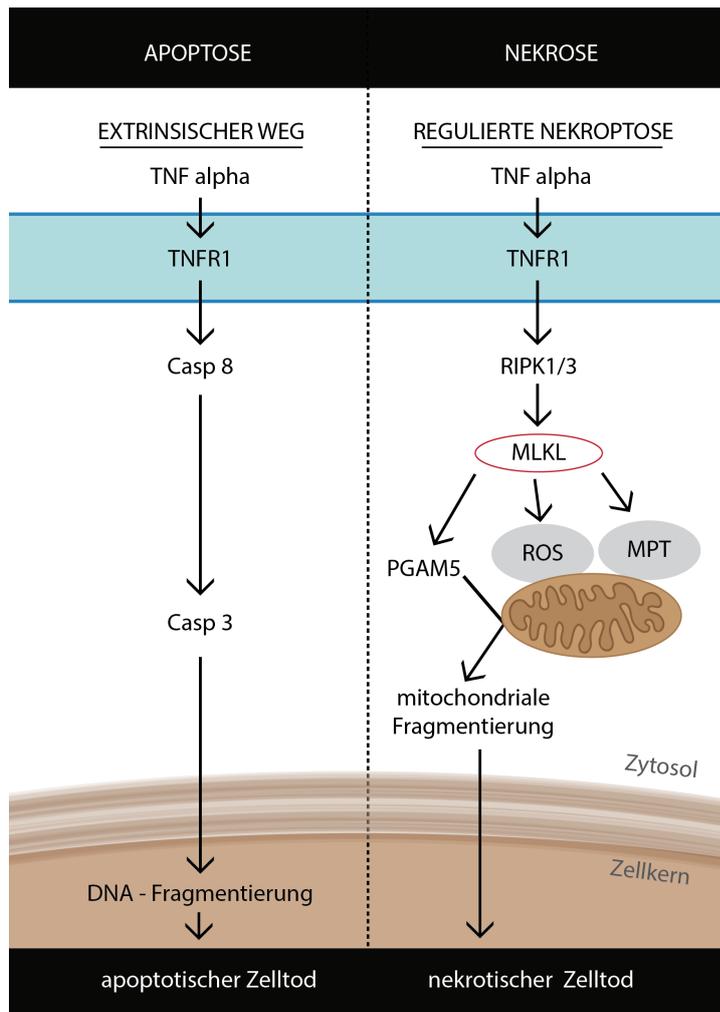


Abb. 22: Vereinfachte schematische Darstellung der extrinsischen Apoptose- und regulierten Nekroptosesignalwege.
 TNF alpha – Tumornekrosefaktor ; TNFR – Tumornekrosefaktor Rezeptor; RIPK - Rezeptor-interagierende Proteinkinasen;
 Casp - Caspase; ROS - Reaktive Sauerstoffspezies; MPT – mitochondriale Permeabilität-Transition; MLKL – mixed lineage
 kinase domain-like protein

6.2 Zeitlicher Verlauf von Zelltodvorgängen nach einer Lärmbeschallung

Die, in der vorliegenden Arbeit beschriebene Steigerung von Zelltodmechanismen nach einem Lärmtrauma korreliert in den ersten 24 h sehr gut mit der graduellen Abnahme von Spiralganglienneurone in diesem Zeitraum. Erstaunlicherweise hat jedoch der Peak der Zelltodaktivität nach 24 h keine weitere Abnahme der Spiralganglienneuronendichte innerhalb des Untersuchungszeitraums zur Folge. Möglicherweise ist die gesteigerte Zelltodaktivität zeitlich sehr begrenzt und hat somit keine signifikanten langfristigen Folgen. Demgegenüber korreliert die geringe Zelltodaktivität an Tag 7 gut mit der weiterhin stabilen Zelldichte der Spiralganglienneurone im Untersuchungszeitraum. Insgesamt ist jedoch die zeitliche Auflösung ein großer Schwachpunkt der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Zelltodanalyse (TUNEL). Sie gibt nur einen zeitlich sehr begrenzten Einblick in die

Zelltodvorgänge und kann somit großen Schwankungen unterliegen. Das zeigt sich auch in der großen Standardabweichung innerhalb der Versuchsgruppen. Trends, wie die drei Messpunkte innerhalb von 24 h, scheinen jedoch trotzdem fundiert interpretierbar zu sein.

Weshalb die Zelltodaktivität 14 Tage nach der Lärmbeschallung wieder ansteigt kann nur postuliert werden, da keine späteren Daten zur Entwicklung der Spiralganglienneuronendichte mehr vorliegen. Längerfristig kann Deprivation der Spiralganglienneurone durch den allmählichen Verlust von Haarzellen zu einem sukzessiven Abbau dieser führen. In einer Arbeit von Bohne et al., (2017) wurden Cochleae von Chinchillas nach einem Lärmtrauma untersucht, um Degenerationsprozesse von OHCs und IHCs zeitlich zu ordnen. Es wurde festgestellt, dass die OHC-Degeneration direkt während der Beschallung beginnt und sich innerhalb eines Monats verlangsamt fortsetzt. Zusätzlich zeigten IHCs eine verzögerte Degeneration, die erst eine bis drei Wochen nach dem Lärmtrauma deutlich wurde. Die beschriebenen Ergebnisse demonstrieren quantitativ, dass sich die Degeneration von Haarzellen und somit die Deprivation der Spiralganglienneurone über mehrere Wochen nach einem Lärmtrauma entwickeln kann (93).

6.3 Spiralganglienzellichte nach wiederholtem Lärmtrauma

Das Zweittrauma nach einer Woche erzeugte innerhalb von 7 Tagen einen zusätzlichen signifikanten Verlust von Spiralganglienneuronen im basalen Bereich der Cochlea. Der fehlende Effekt im apikalen Bereich kann dadurch erklärt werden, dass durch das Ersttrauma dort schon mehr Spiralganglienneurone zerstört wurden die besonders empfindlich für Lärm sind. Tatsächlich war der Verlust an Spiralganglienneuronen nach der ersten Beschallung im apikalen Bereich deutlich höher als im basalen Bereich. Das passt auch zur erhöhten Zelltodaktivität im basalen gegenüber dem apikalen Bereich. Die Doppelbeschallung führte zu einem zusätzlichen Hörverlust bei nur einer getesteten Frequenz. Mögliche Schutzmechanismen von neuronalen Strukturen bei einer Zweitbeschallung beschreibt eine Studie unserer Arbeitsgruppe in denen calciumabhängige Schutzmechanismen als Grundlage für den geringen Hörverlust bei wiederholter Lärmexposition postuliert wurden (57). In der Studie konnte eine erhöhte calciumabhängige neuronale Aktivität als Folge eines Lärmtraumas aufgezeigt werden, welche höhere Strukturen des Hörsystems vor weiteren Schäden schützen

könnte. Als möglicher Schutzmechanismus kommt ein erhöhter Widerstand gegen die Schädigung durch freie Radikale in Frage, welcher von Harris et Al., (2006) beschrieben wurde. Der Schutzmechanismus entsteht dabei durch Veränderungen in der cochleären, antioxidativen Enzymaktivität (94). Ferner stellt eine Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit durch eine vermehrte extrazelluläre Kalziumkonzentration in einer Vorkonditionierungsphase eine wichtige Schutzwirkung gegen einen anoxischen Insult dar (95). Ein weiterer, längerfristiger Mechanismus für einen aktivitätsabhängigen Zellschutz wird durch die Familie der CREB (cAMP response element binding protein) Transkriptionsfaktoren gewährleistet (96). Es gibt eine starke Evidenz dafür, dass die synaptisch-aktivierte Neuroprotektion zum größten Teil dem Kalziumeinstrom durch glutamaterge NMDA (N-methyl-D-aspartat) Rezeptoren geschuldet ist (97). Die neuroprotektive Wirkung könnte lange nach der synaptischen Aktivität erhalten bleiben und ist abhängig von der nukleären Kalziumsignalisierung und der CRE (cAMP response element) - vermittelten Genexpression während der späteren Phase (98). Außerdem spielt die aktivitäts-induzierte Kalziumsignalisierung durch die NMDA-Rezeptoraktivierung eine wichtige Rolle bei der Regulierung weiterer AID (Activity regulated Inhibitor of Death) Gene, welche das neuronale Überleben unterstützen (99). Diese calciumabhängige Neuroprotektion kann bis zu einer Woche nach akustischer Überstimulation anhalten und wird anschließend reduziert (57).

Limitationen

Ein Tiermodell ist stets nicht vollständig auf den Menschen übertragbar. Nicht nur der Hörbereich, sondern auch die Spiralganglienzellzahl und die Anzahl der Hörnervenfasern unterscheiden sich zwischen Menschen und Mäusen signifikant (3, 100, 101). Die Lärmempfindlichkeit könnte beim Menschen auch insgesamt geringer sein als bei der Maus. Dennoch sind prinzipielle Mechanismen der Lärmschädigung qualitativ wahrscheinlich gut vergleichbar.

Auch wenn eine langfristige Betrachtung der Lärmfolgen im Spiralganglion in dieser Arbeit nicht möglich war ist jedoch davon auszugehen, dass ein besonders bedeutsamer Zeitbereich für umfangreiche Veränderungen in dieser Struktur charakterisiert werden konnte.

Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben möglicherweise eine große Bedeutung für den therapeutischen Bereich. Sie verdeutlichen die Notwendigkeit einer frühen Intervention, um nach einer Lärmexposition irreversible Schäden abzuwenden. Zelltodvorgänge und somit der Verlust von Spiralganglienneuronen könnten verringert werden, wenn möglichst schnell mit einer effektiven Intervention begonnen wird. Welche Intervention hier besonders erfolgreich einsetzbar wäre ist aktuell Gegenstand verschiedener Untersuchungen. Kandidaten dafür sind anti-apoptotische Substanzen oder die Anwendung von Licht im Nah-Infrarot Bereich (Basta et al., 2020).

7 Literatur

1. Møller AR. Hearing: Anatomy, Physiology, and Disorders of the Auditory System (Third Edition) ISBN-10: 1597564273 ISBN-13: 9781597564274. 3 ed: Plural Publishing, Inc., San Diego, USA; 2012.
2. Zenner H-P. Hören : Physiologie, Biochemie, Zell- und Neurobiologie ISBN-10: 3131390018 ISBN-13: 9783131131713 Thieme, Stuttgart 1994.
3. Spöndlin H. Anatomy of cochlear innervation. Am J Otolaryngol. 1985;6(6):453-67.
4. Raphael Y. Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration. Br Med Bull. 2002;63:25-38.
5. Ding D, McFadden, S.L., and Salvi, R.J. . Cochlear Hair Cell Densities and Inner-Ear Staining Techniques. In Handbook of Mouse Auditory Research. From Behavior to Molecular Biology, Willott J.F., ed. (Boca Raton, Florida: CRC Press), pp. 189-204. 2001.
6. Guinan JJ, Jr., Warr WB, Norris BE. Differential olivocochlear projections from lateral versus medial zones of the superior olivary complex. J Comp Neurol. 1983;221(3):358-70.
7. Guinan JJ, Jr., Warr WB, Norris BE. Topographic organization of the olivocochlear projections from the lateral and medial zones of the superior olivary complex. J Comp Neurol. 1984;226(1):21-7.
8. Anniko M, Arnold W, Stigbrand T, Strom A. The human spiral ganglion. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 1995;57(2):68-77.
9. Romand R, Sobkowicz H, Emmerling M, Whitlon D, Dahl D. Patterns of neurofilament stain in the spiral ganglion of the developing and adult mouse. Hear Res. 1990;49(1-3):119-25.
10. Ryan AF, Schwartz IR. Preferential amino acid uptake identifies Type II spiral ganglion neurons in the gerbil. Hear Res. 1983;9(2):173-84.
11. Spöndlin H. Innervation densities of the cochlea. Acta Otolaryngol. 1972;73(2):235-48.

12. Eybalin M. Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev.* 1993;73(2):309-73.
13. Simmons DD, Liberman MC. Afferent innervation of outer hair cells in adult cats: I. Light microscopic analysis of fibers labeled with horseradish peroxidase. *J Comp Neurol.* 1988;270(1):132-44.
14. Kiang NY, Rho JM, Northrop CC, Liberman MC, Ryugo DK. Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science.* 1982;217(4555):175-7.
15. Nayagam BA, Muniak MA, Ryugo DK. The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems. *Hear Res.* 2011;278(1-2):2-20.
16. Berglund AM, Ryugo DK. A monoclonal antibody labels type II neurons of the spiral ganglion. *Brain Res.* 1986;383(1-2):327-32.
17. Brown MC, Berglund AM, Kiang NY, Ryugo DK. Central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *J Comp Neurol.* 1988;278(4):581-90.
18. Le TN, Straatman LV, Lea J, Westerberg B. Current insights in noise-induced hearing loss: a literature review of the underlying mechanism, pathophysiology, asymmetry, and management options. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017;46(1):41.
19. Pouryaghoub G, Mehrdad R, Pourhosein S. Noise-Induced hearing loss among professional musicians. *J Occup Health.* 2017;59(1):33-7.
20. Jansen EJ, Helleman HW, Dreschler WA, de Laat JA. Noise induced hearing loss and other hearing complaints among musicians of symphony orchestras. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009;82(2):153-64.
21. Pelegrin AC, Canuet L, Rodriguez AA, Morales MP. Predictive factors of occupational noise-induced hearing loss in Spanish workers: A prospective study. *Noise Health.* 2015;17(78):343-9.
22. Neitzel RL, Fligor BJ. Risk of noise-induced hearing loss due to recreational sound: Review and recommendations. *J Acoust Soc Am.* 2019;146(5):3911.
23. Kanji A, Khoza-Shangase K, Ntlhakana L. Noise-induced hearing loss: what South African mineworkers know. *Int J Occup Saf Ergon.* 2019;25(2):305-10.

24. Ivory R, Kane R, Diaz RC. Noise-induced hearing loss: a recreational noise perspective. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;22(5):394-8.
25. Bogoch, II, House RA, Kudla I. Perceptions about hearing protection and noise-induced hearing loss of attendees of rock concerts. *Can J Public Health.* 2005;96(1):69-72.
26. Davis RR, Kozel P, Erway LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: a review. *Noise Health.* 2003;5(20):19-28.
27. Basta D, Tzschentke B, Ernst A. Noise-induced cell death in the mouse medial geniculate body and primary auditory cortex. *Neurosci Lett.* 2005;381(1-2):199-204.
28. Coordes A, Groschel M, Ernst A, Basta D. Apoptotic cascades in the central auditory pathway after noise exposure. *J Neurotrauma.* 2012;29(6):1249-54.
29. Frohlich F, Groschel M, Strubing I, Ernst A, Basta D. Apoptosis in the cochlear nucleus and inferior colliculus upon repeated noise exposure. *Noise Health.* 2018;20(97):223-31.
30. Frohlich F, Ernst A, Strubing I, Basta D, Groschel M. Apoptotic mechanisms after repeated noise trauma in the mouse medial geniculate body and primary auditory cortex. *Exp Brain Res.* 2017;235(12):3673-82.
31. Frohlich F, Basta D, Strubing I, Ernst A, Groschel M. Time course of cell death due to acoustic overstimulation in the mouse medial geniculate body and primary auditory cortex. *Noise Health.* 2017;19(88):133-9.
32. McGill TJ, Schuknecht HF. Human cochlear changes in noise induced hearing loss. *Laryngoscope.* 1976;86(9):1293-302.
33. Pourbakht A, Yamasoba T. Cochlear damage caused by continuous and intermittent noise exposure. *Hear Res.* 2003;178(1-2):70-8.
34. Dallos P, Harris D. Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol.* 1978;41(2):365-83.
35. Liberman MC, Dodds LW. Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. III. Stereocilia damage and alterations of threshold tuning curves. *Hear Res.* 1984;16(1):55-74.

36. Chen GD, Liu Y. Mechanisms of noise-induced hearing loss potentiation by hypoxia. *Hear Res.* 2005;200(1-2):1-9.
37. Chen GD. Prestin gene expression in the rat cochlea following intense noise exposure. *Hear Res.* 2006;222(1-2):54-61.
38. Chen GD, Zhao HB. Effects of intense noise exposure on the outer hair cell plasma membrane fluidity. *Hear Res.* 2007;226(1-2):14-21.
39. Chen GD, Tanaka C, Henderson D. Relation between outer hair cell loss and hearing loss in rats exposed to styrene. *Hear Res.* 2008;243(1-2):28-34.
40. Bohne BA, Harding GW, Nordmann AS, Tseng CJ, Liang GE, Bahadori RS. Survival-fixation of the cochlea: a technique for following time-dependent degeneration and repair in noise-exposed chinchillas. *Hear Res.* 1999;134(1-2):163-78.
41. Yang WP, Henderson D, Hu BH, Nicotera TM. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear Res.* 2004;196(1-2):69-76.
42. Bohne BA, Harding GW. Degeneration in the cochlea after noise damage: primary versus secondary events. *Am J Otol.* 2000;21(4):505-9.
43. Spöndlin H. Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol.* 1971;71(2):166-76.
44. Robertson D. Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 1983;9(3):263-78.
45. Pujol R, Lenoir M, Robertson D, Eybalin M, Johnstone BM. Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. *Hear Res.* 1985;18(2):145-51.
46. Pujol R, Puel JL, Gervais d'Aldin C, Eybalin M. Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 1993;113(3):330-4.
47. Pujol R, Puel JL. Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;884:249-54.

48. Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies [version 1; peer review: 4 approved]. F1000Research 2017, 6(F1000 Faculty Rev):927 (<https://doi.org/10.12688/f1000research.113101>). 2017.
49. Kujawa SG, Liberman MC. Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci*. 2006;26(7):2115-23.
50. Liberman MC, Kujawa SG. Cochlear synaptopathy in acquired sensorineural hearing loss: Manifestations and mechanisms. *Hear Res*. 2017;349:138-47.
51. Stankovic K, Rio C, Xia A, Sugawara M, Adams JC, Liberman MC, et al. Survival of adult spiral ganglion neurons requires erbB receptor signaling in the inner ear. *J Neurosci*. 2004;24(40):8651-61.
52. Fritsch B, Tessarollo L, Coppola E, Reichardt LF. Neurotrophins in the ear: their roles in sensory neuron survival and fiber guidance. *Prog Brain Res*. 2004;146:265-78.
53. Ramekers D, Versnel H, Grolman W, Klis SF. Neurotrophins and their role in the cochlea. *Hear Res*. 2012;288(1-2):19-33.
54. Wan G, Gomez-Casati ME, Gigliello AR, Liberman MC, Corfas G. Neurotrophin-3 regulates ribbon synapse density in the cochlea and induces synapse regeneration after acoustic trauma. *Elife*. 2014;3.
55. Suzuki J, Corfas G, Liberman MC. Round-window delivery of neurotrophin 3 regenerates cochlear synapses after acoustic overexposure. *Sci Rep*. 2016;6:24907.
56. Groschel M, Gotze R, Ernst A, Basta D. Differential impact of temporary and permanent noise-induced hearing loss on neuronal cell density in the mouse central auditory pathway. *J Neurotrauma*. 2010;27(8):1499-507.
57. Groschel M, Muller S, Gotze R, Ernst A, Basta D. The possible impact of noise-induced Ca²⁺-dependent activity in the central auditory pathway: a manganese-enhanced MRI study. *Neuroimage*. 2011;57(1):190-7.
58. Frohlich F. Einfluss wiederholter Lärmexposition auf die Auslösung von Zelltodmechanismen in der zentralen Hörbahn [DISSERTATION]: Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Unfallkrankenhauses Berlins Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät Charité –Universitätsmedizin Berlin; 2015.

59. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992;119(3):493-501.
60. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother.* 1998;52(6):252-8.
61. Kurioka T, Lee MY, Heeringa AN, Beyer LA, Swiderski DL, Kanicki AC, et al. Selective hair cell ablation and noise exposure lead to different patterns of changes in the cochlea and the cochlear nucleus. *Neuroscience.* 2016;332:242-57.
62. Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. *F1000Res.* 2017;6:927.
63. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci.* 2009;29(45):14077-85.
64. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2003;34(4-5):325-37.
65. Greenwood SM, Connolly CN. Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology.* 2007;53(8):891-8.
66. Hutchins JB, Barger SW. Why neurons die: cell death in the nervous system. *Anat Rec.* 1998;253(3):79-90.
67. Mattson MP. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 2007;6(3):337-50.
68. Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev.* 2004;3(4):431-43.
69. Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* 2006;27(1):1-19.
70. Hoya N, Okamoto Y, Kamiya K, Fujii M, Matsunaga T. A novel animal model of acute cochlear mitochondrial dysfunction. *Neuroreport.* 2004;15(10):1597-600.
71. Frye MD, Ryan AF, Kurabi A. Inflammation associated with noise-induced hearing loss. *J Acoust Soc Am.* 2019;146(5):4020.

72. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* 2007;139(1):143-56.
73. Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear Res.* 2002;166(1-2):62-71.
74. Mizukoshi S, Nakazawa M, Sato K, Ozaki T, Metoki T, Ishiguro S. Activation of mitochondrial calpain and release of apoptosis-inducing factor from mitochondria in RCS rat retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 2010;91(3):353-61.
75. Chen Q, Paillard M, Gomez L, Ross T, Hu Y, Xu A, et al. Activation of mitochondrial mu-calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;415(4):533-8.
76. Zhu C, Wang X, Deinum J, Huang Z, Gao J, Modjtahedi N, et al. Cyclophilin A participates in the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in neurons after cerebral hypoxia-ischemia. *J Exp Med.* 2007;204(8):1741-8.
77. Kao SY, Kempfle JS, Jensen JB, Perez-Fernandez D, Lysaght AC, Edge AS, et al. Loss of osteoprotegerin expression in the inner ear causes degeneration of the cochlear nerve and sensorineural hearing loss. *Neurobiol Dis.* 2013;56:25-33.
78. Lahne M, Gale JE. Damage-induced activation of ERK1/2 in cochlear supporting cells is a hair cell death-promoting signal that depends on extracellular ATP and calcium. *J Neurosci.* 2008;28(19):4918-28.
79. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050-5.
80. Zine A, van de Water TR. The MAPK/JNK signalling pathway offers potential therapeutic targets for the prevention of acquired deafness. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004;3(4):325-32.
81. Teng X, Degterev A, Jagtap P, Xing X, Choi S, Denu R, et al. Structure-activity relationship study of novel necroptosis inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(22):5039-44.
82. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-9.

83. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*. 2012;148(1-2):213-27.
84. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000;1(6):489-95.
85. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(10):700-14.
86. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*. 2009;325(5938):332-6.
87. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009;137(6):1112-23.
88. Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu DE, Hoti N, et al. Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal*. 2007;19(10):2056-67.
89. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α . *Cell*. 2009;137(6):1100-11.
90. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):313-21.
91. McComb S, Cheung HH, Korneluk RG, Wang S, Krishnan L, Sad S. cIAP1 and cIAP2 limit macrophage necroptosis by inhibiting Rip1 and Rip3 activation. *Cell Death Differ*. 2012;19(11):1791-801.
92. Dinh CT, Goncalves S, Bas E, Van De Water TR, Zine A. Molecular regulation of auditory hair cell death and approaches to protect sensory receptor cells and/or stimulate repair following acoustic trauma. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:96.
93. Bohne BA, Kimlinger M, Harding GW. Time course of organ of Corti degeneration after noise exposure. *Hear Res*. 2017;344:158-69.

94. Harris KC, Bielefeld E, Hu BH, Henderson D. Increased resistance to free radical damage induced by low-level sound conditioning. *Hear Res.* 2006;213(1-2):118-29.
95. Perez-Pinzon MA, Born JG, Centeno JM. Calcium and increase excitability promote tolerance against anoxia in hippocampal slices. *Brain Res.* 1999;833(1):20-6.
96. Riccio A, Ahn S, Davenport CM, Blendy JA, Ginty DD. Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons. *Science.* 1999;286(5448):2358-61.
97. Hardingham GE, Bading H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci.* 2003;26(2):81-9.
98. Papadia S, Stevenson P, Hardingham NR, Bading H, Hardingham GE. Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci.* 2005;25(17):4279-87.
99. Dick O, Bading H. Synaptic activity and nuclear calcium signaling protect hippocampal neurons from death signal-associated nuclear translocation of FoxO3a induced by extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem.* 2010;285(25):19354-61.
100. Felix H. Anatomical differences in the peripheral auditory system of mammals and man. A mini review. *Adv Otorhinolaryngol.* 2002;59:1-10.
101. Spoendlin H. Receptoneural and innervation aspects of the inner ear anatomy with respect to cochlear mechanics. *Scand Audiol Suppl.* 1986;25:27-34.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tanyo Manchev, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zelltodvorgänge in cochleären Strukturen infolge von Lärm“ / „Cell death processes in cochlear structures as a result of noise“ 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 15.05.2023

Unterschrift

9 Lebenslauf

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

10 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt allen Personen, die mir beim Erstellen dieser Arbeit geholfen haben. Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn PD Dr. Dietmar Basta bedanken, der mir großes Vertrauen entgegengebracht und mir diese Arbeit ermöglicht hat. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Moritz Gröschel und Herrn Dr. Dr. Felix Fröhlich bedanken, die mir mit viel Geduld und Hilfsbereitschaft immer zur Seite standen. Ein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arne Ernst, der die Durchführung dieser Projekte als Leiter der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Unfallkrankenhauses Berlin ermöglicht hat.