

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
des Unfallkrankenhauses Berlins
Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss wiederholter Lärmexposition auf die Auslösung von
Zelltodmechanismen in der zentralen Hörbahn

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Aslan Fröhlich

aus Mannheim

Gutachter Hr. PD Dr. D. Basta
 Fr. Prof. Dr. B. Mazurek
 Hr. Prof Dr. M. Walger

Datum der Promotion: 27. Februar 2015

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	III
VERZEICHNIS DER DIAGRAMME UND TABELLEN	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 ABSTRACT ENGLISH	1
2 ABSTRAKT DEUTSCH	2
3 EINLEITUNG	4
3.1. Physiologie und Anatomie des Hörens	5
3.1.1. Nucleus Cochlearis	8
3.1.2. Nucleus Olivaris Superior und Lateraler Lemniscus	9
3.1.3. Colliculus Inferior	9
3.1.4. Corpus Geniculatum Mediale	10
3.1.5. Auditorischer Cortex	12
3.2. Pathophysiologie des Hörsystems und Schwerhörigkeit	13
3.2.1. Einfluss von Lärm auf das Hörsystem	13
3.2.1.1. Einfluss auf die Hörschwelle	14
3.2.1.2. Temporary Threshold Shift	14
3.2.1.3. Einfluss auf die Haarzellen	15
3.2.1.4. Einfluss auf die zentralen Strukturen des Hörens	18
3.2.1.5. Einfluss auf die Apoptose	19
3.3. Fragestellung	20
4 METHODIK	22
4.1. Lärmexposition	22
4.2. Messung des frequenzspezifischen Hörverlustes	23
4.2.1. Versuchsaufbau	23
4.2.2. Errechnen des Hörverlustes	24
4.3. Histologische Bestimmung der Zelltodmechanismen	25
4.3.1. Präparation der Gehirne	25
4.3.2. Erstellen der Gehirnschnitte	26
4.3.3. TUNEL Färbung	26
4.3.4. Analyse der Färbung	29
4.3.5. Statistik	33

INHALTSVERZEICHNIS

5	ERGEBNISSE	34
5.1.	ABR-Aufzeichnungen	34
5.2.	Nucleus Cochlearis	35
5.3.	Colliculus Inferior	37
5.4.	Corpus Geniculatum Mediale	38
5.4.1.	Dorsale Substruktur des MGB	38
5.4.2.	Mediale Substruktur des MGB	39
5.4.3.	Ventrale Substruktur des MGB	41
5.5.	Primärer Auditorischer Cortex	42
5.5.1.	Schicht I des Primären Auditorischen Cortex	42
5.5.2.	Schicht II des Primären Auditorischen Cortex	43
5.5.3.	Schicht III des Primären Auditorischen Cortex	44
5.5.4.	Schicht IV des Primären Auditorischen Cortex	45
5.5.5.	Schicht V des Primären Auditorischen Cortex	46
5.5.6.	Schicht VI des Primären Auditorischen Cortex	47
6	DISKUSSION	48
6.1.	Die Bestimmung der frequenzspezifischen Hörschwelle	48
6.2.	Untersuchung der Apoptoseraten nach einer Lärmexposition	52
6.2.1.	Basale Strukturen	52
6.2.1.1.	Ventraler Nucleus Cochlearis	53
6.2.1.2.	Dorsaler Nucleus Cochlearis	57
6.2.1.3.	Zentraler Colliculus Inferior	60
6.2.2.	Corpus Geniculatum Mediale	63
6.2.3.	Primärer Auditorischer Cortex	69
6.3.	Fazit	74
7	LITERATURVERZEICHNIS	78
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	89
	LEBENS LAUF	90
	KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE	92
	DANKSAGUNG	93

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1 – schematische Darstellung der aufsteigenden Hörbahn	7
Abbildung 2 – schematische vereinfachte Darstellung der Efferenzen und Afferenzen von MGB und AI	12
Abbildung 3 – Beschallungsmuster der Versuchsgruppen	22
Abbildung 4 - Ausschnitte eines linken Nucleus Cochlearis	30
Abbildung 5 – linker und rechter IC mit ICC Ausschnitten	31
Abbildung 6 – Ausschnitte eines rechten MGB	31
Abbildung 7 – Ausschnitte der sechs Schichten eines linken primären auditorischen Cortex	32
Abbildung 8 – zwei TUNEL positive Zellen	32

Verzeichnis der Diagramme und Tabellen

Diagramm 1 - Hörverlust der doppel- gegenüber der einfachbeschallten Gruppe	34
Diagramm 2 - TUNEL-Zelldichten des VCN	35
Diagramm 3 – TUNEL-Zelldichten des DCN	36
Diagramm 4 – TUNEL-Zelldichten des ICC	37
Diagramm 5 – TUNEL-Zelldichten des dorsalen MGB	39
Diagramm 6 – TUNEL-Zelldichten des medialen MGB	40
Diagramm 7 – TUNEL-Zelldichten des ventralen MGB	41
Diagramm 8 – TUNEL-Zelldichten der Schicht I des AI	42
Diagramm 9 – TUNEL-Zelldichten der Schicht II des AI	43
Diagramm 10 – TUNEL-Zelldichten der Schicht III des AI	44
Diagramm 11 – TUNEL-Zelldichten der Schicht IV des AI	45
Diagramm 12 – TUNEL-Zelldichten der Schicht V des AI	46
Diagramm 13 – TUNEL-Zelldichten der Schicht VI des AI	47
Tabelle 1 – Das Vorgehen der TUNEL Färbung schematisch und chronologisch	28
Tabelle 2 – Überblick der Ergebnisse verschiedener Studien	66

Abkürzungsverzeichnis

ABR	<i>Hirnstammaudiometrie / Auditory Brainstem Responses / Synonym für →BERA</i>
AI	<i>primärer auditorischer Cortex / primary auditory cortex</i>
All	<i>sekundärer auditorischer Cortex / secondary auditory cortex</i>
AVCN	<i>anteroventraler Teil des →CN</i>
BERA	<i>Hirnstammaudiometrie / Brainstem Evoked Response Audiometry / Synonym →ABR</i>
CN	<i>Nucleus Cochlearis / Cochlear Nucleus</i>
DAB	<i>3,3'- Diaminobenzidin</i>
DCN	<i>dorsaler Nucleus Cochlearis / dorsal cochlear nucleus</i>
dMGB	<i>dorsale Substruktur des →MGB</i>
IC	<i>Colliculus Inferior / Inferior Colliculus</i>
ICC	<i>zentraler Kern des →IC</i>
ICP	<i>Nucleus Pericentralis / perizentraler Kern des →IC</i>
ICX	<i>externer Kern des →IC</i>
KG	<i>Körpergewicht</i>
kHz	<i>Kilohertz</i>
LL	<i>lateral Lemniscus / lemniscus lateralis</i>
MEMRI	<i>mangense-enhanced magnetic resonance imaging</i>
MGB	<i>medialer Kniehöcker / Corpus Geniculatum Mediale / Medial Geniculate Body</i>
mMGB	<i>mediale Substruktur des →MGB</i>
MRT	<i>Magnetresonanztomographie</i>
NIHL	<i>Noise-induced Hearing Loss / lärminduzierter Hörverlust</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institut</i>
PBS	<i>phosphatgepufferte Salzlösung / phosphate buffered saline</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PTS	<i>permanente Hörschwellenverschiebung / permanent threshold shift</i>
PVCN	<i>posteroventraler Teil des →CN</i>
ROS	<i>Reaktive Oxygen Species / Reaktive Sauerstoffspezies</i>
SOC	<i>obere Olive / superior olivary complex / Nucleus olivaris superior</i>
SPL	<i>Schalldruckpegel / Soundpressure Level</i>
TTS	<i>temporäre Hörschwellenverschiebung / temporary threshold shift</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end-labeling</i>
UKB	<i>Unfallkrankenhaus Berlin</i>
VCN	<i>ventraler Nucleus Cochlearis / ventral cochlear nucleus</i>
vMGB	<i>ventrale Substruktur des →MGB</i>

1 Abstract English

Noise exposure leads to pathophysiological changes within the cochlear and the central components of hearing. Deafness acquired via acoustic overstimulation is often treated with hearing aids that amplify up to 115 dB SPL. The aim of this investigation was to answer the following question: what effects do high sound pressure levels have on a central auditory pathway that had been exposed to a single noise trauma before? Our group discovered recently that a single noise trauma leads to a significant cell loss in the entire central auditory pathway. Apoptosis may play an important role as one of the underlying mechanisms. Little is known about how a second noise trauma influences apoptosis in the key structures of hearing. Mice were sound exposed (5-20 kHz, 115 dB SPL for 3h) under anesthesia and investigated two weeks after the first trauma. One group was exposed to the same trauma a second time (7 days after the first trauma) and was compared to the single noise trauma group. Auditory Brainstem Recordings (ABR) were performed to measure the hearing loss. A significant threshold shift was found at 8 kHz, 12 kHz and 20 kHz, while the differences at 4 kHz and 16 kHz were not significant. Apoptosis was detected by Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL staining). The staining was captured with a digital camera under a light microscope. TUNEL positive cells were counted manually in standardized grids in the ventral and dorsal cochlear nucleus (VCN and DCN), in the central part of the Inferior Colliculus (ICC), in the dorsal, ventral and medial subdivisions of the medial geniculate body (dMGB, vMGB and mMGB), as well as in the 6 histological layers of the primary auditory Cortex (AI). There was no significant difference of TUNEL positive cells between the single-trauma and double-trauma group in the basal structures (VCN, DCN and ICC). Significantly more TUNEL-positive cells were counted in all subdivisions of the MGB (dMGB, vMGB and mMGB), as well as in layers I and III of the AI. No significant differences were found in the other layers of the AI. These results show for the first time the influence of noise exposure on apoptosis in the central auditory pathway of animals that had suffered from noise-induced hearing loss before. On the basis of these findings the treatment with hearing aids in patients with noise-induced hearing loss should be reevaluated.

Keywords: Noise-induced Hearing Loss, Central Auditory Pathway, Apoptosis, TUNEL staining

2 Abstrakt Deutsch

Bisher gibt es keine kurative Lösung bei an Taubheit grenzender Schwerhörigkeit. Mittel der Wahl sind stark verstärkende Hörgeräte, die die Klanginformation bis auf 115 dB SPL verstärken. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von hochverstärkenden Hörgeräten auf die durch Lärm vorgeschädigte Hörbahn zu prüfen. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich pathophysiologische Veränderungen der Hörbahn nach Schalltraumen zeigen: eine singuläre Beschallung mit hohen Schalldrücken führt zu einem signifikanten Zellverlust in Schlüsselstrukturen der Hörbahn. Offensichtlich scheint diesem Zellverlust programmierter Zelltod als Mechanismus zu Grunde zu liegen. Inwieweit ein zweites Lärmtrauma die Apoptose der zentralen Schaltstellen der Hörbahn beeinflusst, ist dagegen unbekannt. Um eine Antwort auf diese Frage zu finden, wurden Mäuse (NMRI Stamm) für 3 Stunden mit 115 dB SPL Breitbandrauschen (5-20 kHz) in einer Kammer unter Anästhesie beschallt. Beide Versuchsgruppen wurden 14 Tage nach der Erstexposition untersucht. Eine einfachbeschallte Gruppe wurde dabei mit einer doppelbeschallten Gruppe (die Zweitbeschallung erfolgte 7 Tage nach der Erstexposition) verglichen. Der Hörverlust wurde mittels BERA (brainstem evoked response audiometry) gemessen. Es fand sich ein Hörverlust über alle gemessenen Frequenzen (4 kHz, 8 kHz, 12 kHz, 16 kHz und 20 kHz), der bei 8 kHz, 12 kHz und 20 kHz signifikant war. Apoptotische Zellen wurden mittels Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL) gefärbt, unter einem Lichtmikroskop abfotografiert und manuell ausgezählt. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurde im ventralen und dorsalen Nucleus Cochlearis (VCN und DCN), im zentralen Colliculus Inferior (ICC), im medialen, ventralen und dorsalen Corpus Geniculatum Mediale (mMGB, vMGB und dMGB) sowie in den histologischen Schichten I bis VI des primären auditorischen Cortex (AI I-VI) verglichen. In den basalen Strukturen (VCN, DCN und ICC) kam es zu keinem signifikanten Unterschied der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen zwischen der doppelbeschallten und einfachbeschallten Gruppe. Im medialen Kniehöcker fand sich dagegen in allen drei Substrukturen der doppelbeschallten Gruppe eine signifikante Erhöhung TUNEL-positiver Zellen. Im AI war die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen der doppelbeschallten Tiere in der Schicht I und III signifikant erhöht, während sich in den anderen Schichten kein signifikanter Unterschied finden ließ. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen hohen Schalldrücken und

ABSTRAKT DEUTSCH

Zelltodmechanismen in der durch Lärm vorgeschädigten Hörbahn. Vor dem Hintergrund dieser neuen Ergebnisse sollten die bisherigen Therapieoptionen mit apparativen Hörhilfen bei lärminduzierter Taubheit neu eruiert werden.

Schlagworte: lärminduzierter Hörverlust, zentrales auditorisches System, Zelltodmechanismen, TUNEL Färbung

3 Einleitung

„Wie bitte?“ antwortet der Gesprächspartner, obwohl man ihn doch in ganz normaler Lautstärke gefragt hatte.

Schwerhörigkeit, ein Phänomen, was im ersten Moment mit älteren Leuten assoziiert wird, betrifft alle Altersschichten. Physiologisch ist Schwerhörigkeit als Abnahme der Hörschwelle definiert. Dies bedeutet, dass ein Klang lauter sein muss, damit man ihn wahrnehmen kann. „Etwa ein Drittel der über 65-jährigen Deutschen (50% der Männer und 25% der Frauen) zeigen einen relevanten Hörverlust von durchschnittlich 35% oder mehr im Tonaudiogramm“ ^[1]. Andere sprechen von 14 Millionen Schwerhörigen in Deutschland von denen 50% eine apparative Versorgung benötigen. Die World Health Organization geht von 360 Millionen Personen weltweit mit eingeschränktem Hörvermögen aus ^[2].

Gleichzeitig darf aber auch von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen werden, denn meist dauert es, bis ein progredienter Hörverlust diagnostiziert und letztlich therapiert wird.

Die Folgen von Schwerhörigkeit sind weitreichend und betreffen Person und Gesellschaft. Das Spektrum reicht von Arbeitsunfähigkeit über sozialen Rückzug bis zu psychosomatischen Phänomenen wie Angst oder Depression ^[3]. Eine Heilung ist also nicht nur im Sinne der Betroffenen, sondern auch von gesellschaftlicher Relevanz.

Aus diesem Grund hat der Staat ein Interesse an der Prävention von Hörverlust. In Deutschland gibt es eine Vielzahl an Gesetzen, die Bürger vor Lärm schützen sollen. Es gibt beispielsweise Tempolimits und Lärmschutzwalle an Autobahnen. Es gibt geregelte Tageszeiten für die Benützung von lärmintensiven Geräten und Gesetze, die das Tragen eines Gehörschutzes ab gewissen Lautstärken am Arbeitsplatz regeln.

Diese Arbeit widmet sich einer besonderen Form der Schwerhörigkeit: untersucht werden soll die Schwerhörigkeit, die durch hohe Lautstärken provoziert wird. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die Veränderung der zentralen Strukturen gesetzt.

Um Schwerhörigkeit verstehen zu können, ist es wichtig, sich mit dem gesamten auditiven System auseinander zu setzen. Aus diesem Grund werden im Folgenden zuerst die am Hören beteiligten Strukturen erklärt. Dann folgt eine kurze Zusammenfassung des aktuellen Forschungsstandes zur Schwerhörigkeit durch Lärm und die genaue Fragestellung dieser Arbeit.

3.1. Physiologie und Anatomie des Hörens

Schall ist, unter physikalischem Gesichtspunkt, eine mechanische Welle, die sich durch Ausbreitungsgeschwindigkeit, Frequenz (also die Tonhöhe) und Wellenlänge definiert. Über die Ohrmuschel und den äußeren Gehörgang trifft diese Welle auf das Trommelfell. Dort leitet das Mittelohr - mit seinen Gehörknöchelchen - die Schallinformationen an das Innenohr weiter. Der Hammer sitzt dem Trommelfell an und leitet die Vibrationen über Amboss und Steigbügel auf das ovale Fenster. Die sich anschließende Perilymphe der Scala Vestibuli ist inkompressibel und bringt Scala Tympani, Scala Media und damit auch das Corti-Organ in Bewegung. Das Corti-Organ spielt nun eine entscheidende Rolle. Frequenzspezifisch werden die Haarzellen gereizt. Der apikale Anteil wird durch hohe Töne, der basale Anteil durch tiefe Töne gereizt. Hier beginnt die tonotopische Organisation, die sich in allen weiteren Abschnitten der klassischen Hörbahn in verschiedenen Formen wiederfinden lässt. Die inneren Haarzellen zeichnen sich für die Transformation verantwortlich. Das bedeutet, dass sie mechanische Signale in elektrische umwandeln. Die inneren Haarzellen stimulieren den afferenten Teil des Nervus Cochlearis, der die Verbindung zum Hirnstamm bildet. Dort beginnt die zentrale Verarbeitung der Soundinformation.

Das ganze zentrale auditorische System lässt sich aufteilen in einen aufsteigenden und absteigenden Teil. Der aufsteigende Teil wird ferner unterteilt in den „classical pathway“ und den „non-classical pathway“, der auch extra-lemniscuales-, diffuses- oder polysensorisches System genannt wird. Der „classical Pathway“ wird von manchen Autoren lemniscuales System genannt. Diese Reizverschaltung zeichnet sich dadurch aus, dass die tonotopische Ordnung der Cochlea beibehalten wird. Dem aufsteigenden System kommt die Aufgabe zu, die Reizweiterleitung bis in den Cortex zu verschalten und zu bearbeiten. Verschiedene Kerngebiete spielen in diesen Systemen eine Rolle. Der Schwerpunkt dieser Arbeit soll auf dem am Besten erforschten, dem klassischen, also tonotopisch organisierten, aufsteigenden System liegen. Aus diesem Grund werden an dieser Stelle vor allem die Kernstrukturen dieser Reizweiterleitung besprochen. Seinen Anfang findet dieses System im Nervus Cochlearis.

Der Nervus Cochlearis ist Teil des Nervus Vestibulocochlearis, dem achten der zwölf Hirnnerven. Er besteht aus bipolaren Zellen, deren Zellkörper in den Spiralganglienzellen des Modiolus der Cochlea liegen. Er hat beim Menschen schätzungsweise 30'000 Fasern, wobei 2 Fasertypen unterschieden werden. Typ I Fasern werden synaptisch von den inneren Haarzellen innerviert, während die Typ II

Fasern vor allem mit den äußeren Haarzellen verbunden sind. Typ II Fasern sind, im Gegensatz zu den Typ I Fasern, von keiner Myelinschicht umgeben. Sie machen ungefähr 1% des Nervus Cochlearis aus, wobei es große individuelle Unterschiede gibt^[4]. Ihre genaue Funktion ist bisher unbekannt. Es wird vermutet, dass sie eine Steuerfunktion der Sensitivität der äußeren Haarzellen übernehmen. Vor allem die Typ I Fasern geben nun die Schallinformation bis in die höheren Strukturen weiter.

Erste Schaltstelle ist der Nucleus Cochlearis, das Kerngebiet, welches direkt vom Hörnerv stimuliert wird. Dort wird der Hörnerv entweder im ventralen oder dorsalen Anteil auf das zweite Neuron verschaltet. 90% der afferenten Hörnervfasern werden nur durch eine Haarzelle gereizt. Dadurch wird die Schallfrequenz als Tonotopie im CN wiedergegeben. Die zweiten Neuronen, die vom ventralen Nucleus Cochlearis (VCN) ausgehen, der sich ferner in eine anteroventrale (AVCN) und posteroventrale (PVCN) Substruktur einteilen lässt, kreuzen teilweise die Seite. Ein Teil zieht zur Verschaltung zur oberen Olive (SOC), ein anderer Teil umgeht die obere Olive ohne Verschaltung. Der Nucleus Leminisci lateralis erhält seine Fasern dagegen vorwiegend aus dem kontralateralem Nucleus Cochlearis dorsalis (DCN). Ein Großteil der Fasern zieht von dort weiter zum gleichseitig gelegenen Colliculus Inferior (IC), der sich histologisch und funktionell in Substrukturen aufteilen lässt. Von entscheidender Funktion für das Hören ist dabei der zentrale Anteil (ICC), der auch tonotopisch organisiert ist. Dort finden weitere Verschaltungen statt, die zum medialen Kniehöcker, dem Corpus Geniculatum Mediale (MGB), ziehen. Schließlich enden die Neuronen, nach weiterer Verschaltung, im primären auditorischen Cortex, der sich beim Menschen im Temporallappen befindet. Es folgen weitere Verschaltungen in andere kortikale Strukturen. Abbildung 1 auf Seite 7 gibt einen schematischen Überblick über die Verschaltungen der Hörbahn.

Welche Funktionen der absteigende Teil der Hörbahn übernimmt ist weitestgehend unbekannt. Einerseits spricht man vom kortikofugalen System, andererseits vom olviocochlearen System. Es gibt Hinweise darauf, dass der absteigende Teil der Hörbahn efferent die äußeren Haarzellen innerviert. Auch ist davon auszugehen, dass es Wechselwirkungen zwischen auf- und absteigenden Fasern in den meisten Kerngebieten gibt. Manche Autoren gehen davon aus, dass der absteigende Teil vor allem als reziproker Weg der aufsteigenden Hörbahn fungiert. Die genauen Mechanismen und Funktionen sind aber bisher ungeklärt^[5].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der aufsteigenden Hörbahn. Das Augenmerk wurde auf den Nucleus Cochlearis, den Colliculus Inferior, den medialen Kniehöcker und den

EINLEITUNG

primären auditorischen Cortex gelegt. Sie sollen im Folgenden etwas genauer beschrieben werden.

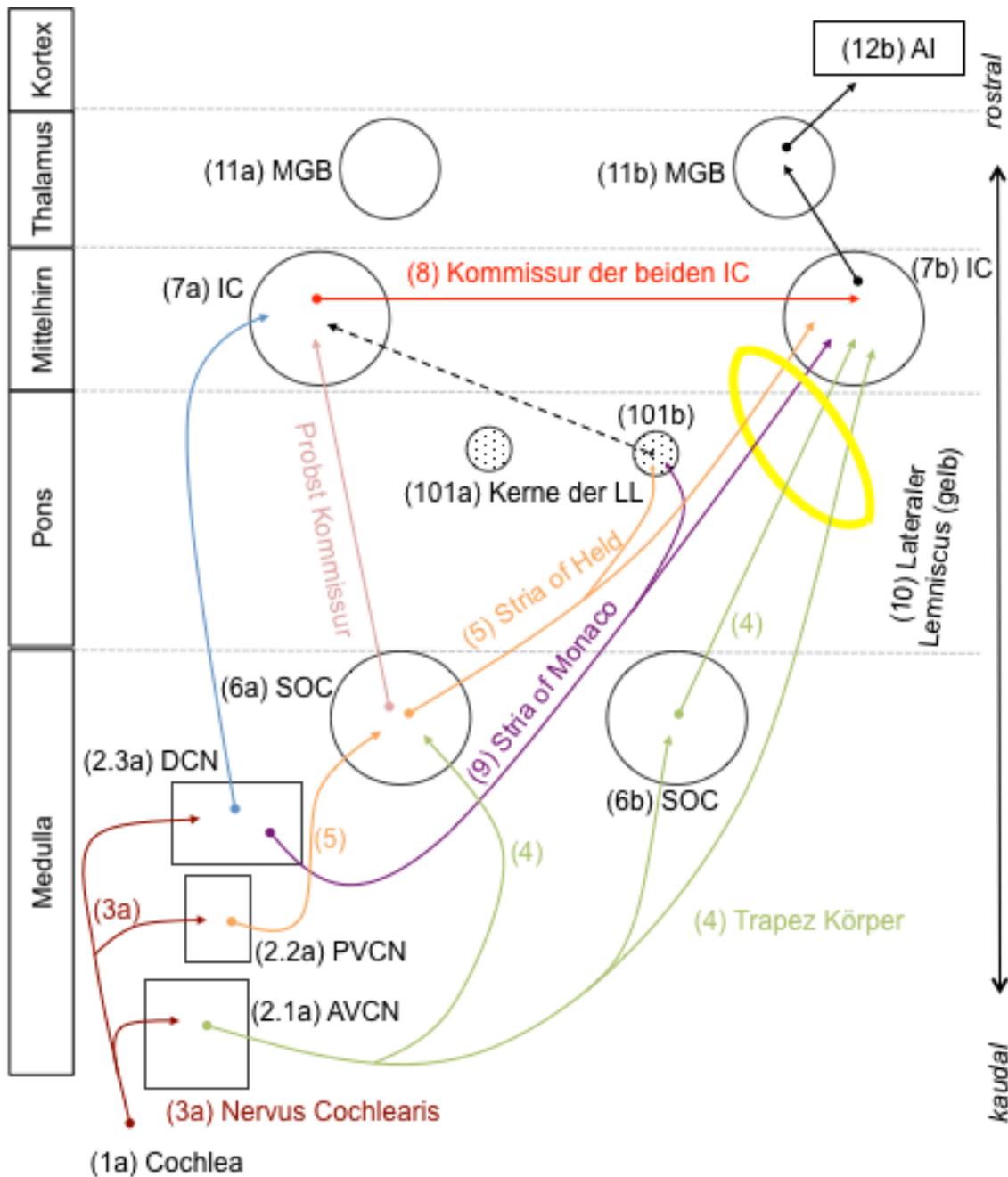


Abbildung 1 – schematische Darstellung der aufsteigenden Hörbahn

Dargestellt werden die zentralen Strukturen der aufsteigenden Hörbahn. Strukturen, die ipsilateral zur Cochlea liegen wurden mit „a“, kontralaterale Strukturen mit „b“ bezeichnet. Der Nervus Cochlearis (3) verbindet die Cochlea (1) mit den Substrukturen des ipsilateralen AVCN (2.1a), PVCN (2.2a) und DCN (2.3a). Die Weiterleitung erfolgt über den Trapezkörper (4), die Stria of Held (5) und die Stria of Monaco (9), die zusammen den Lateralen Lemniscus (10) bilden. Die Weitererschaltung auf das nächste Neuron erfolgt in der ipsi- und kontralateralen oberen Olive (6a & 6b), in den

Kernen der Lateralen Lemniscen (101a & 101b) und in beiden Colliculi Inferiores (7a & 7b). Über die Kommissur (8) erreichen die ipsilateral verschalteten Neuronen den kontralateralen IC (7b). Der kontralaterale ICC stellt Verbindungen zu den drei Substrukturen des MGB (11b) der selben Seite her. Von hier aus ziehen Fasern ohne die Seite zu wechseln zum primären auditorischen Cortex (12b). Weitere Erklärungen folgen im Text. Für eine detaillierter Darstellung der thalamischen Strukturen siehe Abbildung 2 auf Seite 12

3.1.1. Nucleus Cochlearis

Der Nucleus Cochlearis (CN) lässt sich lichtmikroskopisch in drei Teile gliedern: einen anteroventralen (AVCN) und posteroventralen (PVCN) Teil, die zusammen den ventralen CN bilden, und schließlich den dorsalen Teil. Die Hörnerveneingänge, die zum CN ziehen, stammen ausschließlich vom ipsilateralen Ohr. Allerdings ist der CN auch mit anderen Strukturen verschaltet und erhält auch Input aus dem kontralateralen CN. Die Hörnervenfaser, unabhängig ob sie von basal oder apikal gelegenen Haarzellen kommen, erreichen alle drei Substrukturen des CN. Der Fasertrakt teilt sich ein erstes Mal auf. Der eine Teil zieht zum AVCN, der andere Teil spaltet sich ein zweites Mal und erreicht PVCN und DCN (vergleiche Strukturen 1, 2.1, 2.2, 2.3 & 3 in Abbildung 1) ^[6 7]. Generell kann man sagen, dass die Fasertrakte aus den basalen Cochlea Regionen in die ventralen Teile aller drei Substrukturen ziehen. Mittlere Cochlea Regionen sind mit den zentralen Anteilen der drei Substrukturen verbunden und apikale gelegene Haarzellen werden in den dorsalen Regionen des AVCN, PVCN und DCN verarbeitet. Folglich spiegelt sich die Tonotopie der Cochlea im CN wider. Hochfrequente Töne werden in den dorsal gelegenen Regionen prozessiert, Töne niederer Frequenzen in den ventralen Abschnitten ^{s. 243-244 in [8]}.

Schon bei leichter Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop lassen sich ventraler und dorsaler Anteil histologisch unterscheiden. Sowohl Zelltypen als auch Zelldichten sind verschieden. Der dorsale Anteil ist, im Gegensatz zum ventralen, laminar geschichtet. Man unterscheidet die außenliegende, fast zellfreie Molekularschicht (auch Layer I genannt), der die fusiforme Schicht (Layer II) angelagert ist. Hier herrschen, daher auch der Name, fusiforme Zellen, die auch Pyramidalzellen genannt werden, vor. Am meisten medio-ventral liegt die polymorphe Schicht. Eine Schicht, die aus diversen Zellen besteht ^[8 9].

Vom CN ziehen die meisten Fasern zum kontralateralen Colliculus Inferior. Dabei gibt es drei Haupttrouten: den dorsalen Fasertrakt („Stria of Monaco“, vergleiche Struktur 9 in Abbildung 1), der seinen Ursprung im DCN hat; die Stria Intermedialis („Stria of Held“,

vergleiche Struktur 5 in Abbildung 1), der die Fasern aus dem PVCN führt und die Stria medialis, auch bekannt als Trapezkörper (vergleiche Struktur 4 in Abbildung 1), deren Ursprung im AVCN liegt. Diese drei Fasertrakte bilden den Lemniscus Lateralis (LL, vergleiche Struktur 10 in Abbildung 1), der im zentralen Colliculus Inferior (vergleiche Struktur 7 in Abbildung 1) endet.

An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass es auch einige wenige Fasern gibt, die sich am ipsilateralen LL beteiligen und durch diesen zum IC derselben Seite ziehen.

3.1.2. Nucleus Olivaris Superior und Lateraler Lemniscus

Nicht alle Fasern aus dem CN bilden sofort den lateralen Lemniscus (LL). Manche werden vorher im oberen Oliven Komplex (SOC, vergleiche Struktur 6 in Abbildung 1) verschaltet. Der SOC ist die erste Struktur, die Fasern aus den Nuclei Cochleares beider Seiten enthält. Diese Struktur spielt eine nicht unwichtige Rolle im Richtungshören. Dies wird errechnet aus Laufzeit- und Intensitätsunterschieden der einkommenden Klanginformation der beiden Seiten.

Der LL bildet sich zwar vor allem aus den zweiten Axonen, die aus dem CN kommen, führt aber auch die verschalteten Fasern aus dem SOC. Als Fasertrakt wechselt er nun die Seite und zieht zum kontralateralen zentralen Colliculus Inferior.

3.1.3. Colliculus Inferior

Der Colliculus Inferior befindet sich im Mittelhirn und ist schon makroskopisch zu erkennen. Er setzt sich aus drei Teilen zusammen, dem externen (auch lateralen) Kern, dem perizentralen Kern und dem zentralen Kern. In der aufsteigenden Hörbahn ist der zentrale Colliculus Inferior (ICC) von elementarer Bedeutung, der auch anatomisch den größten Teil der Struktur stellt. Der ICC ist auch tonotopisch organisiert, aber, im Vergleich zum CN, dreht sich die Anordnung. Hohe Frequenzen werden dorsal prozessiert.

Die anderen Substrukturen des IC, namentlich der externe (ICX) und der perizentrale Nucleus (ICP), sind auch in den Hörprozess involviert. Sie sind Teil des „non-classical pathways“ und scheinen auch Input aus anderen sensorischen Systemen zu bekommen. Die genauen Schaltkreise sind bisher ungeklärt. Auch sie verlassen den IC zum Corpus Geniculatum mediale. Beide Colliculi Inferiores kommunizieren über Querverbindungen ^[8 10-12].

Bekannt ist, dass die verschiedenen Substrukturen des IC bevorzugt auf verschiedene Stimuli reagieren. Aitkin et al. maßen die Impulsraten von Neuronen verschiedener Substrukturen des IC der Katze auf Lärm, Töne und katzenartige Geräusche. Es wurde festgestellt, dass kein Reizmuster exklusiv eine Substruktur reizte, es ließen sich aber Tendenzen finden. Lärm schädigte dabei alle Substrukturen nachhaltig ^[13].

Die meisten Fasern verlassen als Brachium colliculi inferiores den IC in alle drei Unterstrukturen des ipsilateralen Corpus Geniculatum mediale (vergleiche Struktur 11 in Abbildung 1 und Abbildung 2).

3.1.4. Corpus Geniculatum Mediale

Auf Höhe des Thalamus befindet sich die nächste Schaltstelle der zentralen aufsteigenden Hörbahn: der mediale Kniehöcker (Corpus Geniculatum mediale, MGB). Er wird unterteilt in drei Substrukturen, den dorsalen (dMGB, vergleiche Struktur 11.1 in Abbildung 2), den ventralen (vMGB, vergleiche Struktur 11.2 in Abbildung 2) und den medialen MGB (mMGB, vergleiche 11.3 in Abbildung 2). Diese Unterteilung wurde 1964 postuliert, nach einer Anfärbung des MGB von Katzen mit der Golgi Methode ^[14]. Es stellte sich heraus, dass es nicht nur histologische Unterschiede gibt, sondern auch funktionelle. Die Substrukturen geben beispielsweise verschiedene Reizantworten auf denselben Klangstimulus. Kvašňák et al. maßen verschiedene Reizantworten der Neuronen. Auf eine Stimulation mit einem Reinton fanden sich vorwiegend „onset“ Reizantworten im vMGB, während im dMGB „chopper“ Reizantworten vorherrschten ^[15]. Der Großteil der Fasern aus dem ICC terminiert im vMGB, der prominentesten Struktur in der Maus ^[16]. Sie macht den größten Teil des Volumens aus und behält, als einzige der drei Substrukturen, die tonotopische Ordnung bei. Die Neuronen aus ICP und ICX werden dagegen eher im mMGB und dMGB verschaltet. Der dMGB, auch eine große Struktur, ist sehr komplex. Verschiedensten Zelltypen kommen verschiedene Aufgaben zu. Er schickt auch Fasern zurück zum ipsilateralen ICX. Der mMGB empfängt zusätzlich auch Fasern aus dem somatosensorischen System. Im Gegensatz zum IC bilden linker und rechter MGB keine Verbindung. Untereinander sind ventraler, dorsaler und medialer Teil allerdings verbunden. Von allen drei Substrukturen des MGB ziehen die Fasern weiter zum ipsilateralen auditorischen Cortex. Viele Verbindungen bestehen zwischen dem vMGB und den Schichten III und IV, und über Kollaterale auch zu Schicht I des primären auditorischen Cortex. Der dorsale Anteil sendet Axone dagegen eher in den sekundären auditorischen Cortex (vergleiche Abbildung 2) ^[5 8 17-19].

EINLEITUNG

Der MGB ist die Schaltstation zwischen dem IC und dem Cortex. Er agiert als wichtige Relay-Schaltstelle. Dabei kommt dem MGB mehr als eine reine Filterfunktion für die aufsteigende Hörbahn zu. Gerade in der Verarbeitung komplexer Klänge, wie beispielsweise Sprache, spielt der MGB eine wichtige Rolle. Der MGB bearbeitet Soundinformationen und moduliert sie. Der vMGB besitzt die feinste Frequenzabstimmung des MGB. Bei Fledermäusen ist diese Frequenzdiskriminierung im MGB sogar feiner und genauer als im Hörnerv selbst ^[20]. Der Frequenzdiskriminierung wird eine Schlüsselrolle im Sprachverständnis zugeschrieben ^[21 22]. Gleichzeitig übernimmt der MGB eine Schlüsselfunktion für Feedbackschleifen mit dem auditorischen Cortex oder IC. Alle diese Funktionen werden durch Substrukturen übernommen, denen verschiedene Aufgaben in der Soundinterpretation zukommen. Die mediale Substruktur scheint sich vor allem für Lernprozesse verantwortlich zu zeigen, wie dem Erkennen von bekannten Klängen ^[20]. Fest zu halten bleibt, dass das lemniscale System zwischen ICC und primären auditorischen Cortex vor allem in der ventralen Substruktur des MGB verschaltet wird ^[23].

auditorischen Cortex aufteilen soll. Es gibt histologische Unterscheidungen, die sich ausschließlich an den vorhandenen Zelltypen orientieren, und funktionale Einteilungen [24 25]. Zu den funktionalen Einteilungen zählt der primäre und sekundäre auditorische Cortex. In dieser Arbeit wurde der primäre auditorische Cortex (AI) untersucht. Durch eine Zellfärbung lassen sich histologisch die für den Cortex typischen sechs Schichten erkennen. Per Definition liegt die Schicht VI am weitesten medial, Schicht I ist zur Kalotte am nächsten gelegen. Schicht I ist dünn und zellarm. Schicht II und Schicht III bestehen vor allem aus kleinen Pyramidenzellen, wobei die Zelldichte in Schicht II etwas höher ist. Schicht IV besteht aus dichtgepackten Körnerzellen. Diese Schicht ist im auditorischen Cortex im Vergleich zum motorischen Cortex stark ausgeprägt. Schicht V besteht aus großen Pyramidenzellen. In Schicht VI befinden sich verschiedene Zelltypen und Interneuronen. Der primäre auditorische Cortex ist tonotopisch aufgebaut. Vor allem der vMGB sendet Axone zum AI, die größtenteils in Schicht IV verschaltet werden. Die Schichten sind untereinander verknüpft und haben sowohl inhibitorische, als auch exzitatorische Funktion. Über das Corpus Callosum sind die beiden Hirnhälften auch miteinander verschaltet. Vom AI ziehen Fasern in viele andere Regionen. Der größte Output kommt aus den Schichten IV und V, die vor allem zum IC und MGB zurückziehen (vergleiche Abbildung 2 auf Seite 12).

Während der primäre auditorische Cortex vor allem auf Klang reagiert, sind die anderen Strukturen [z.B.: sekundärer auditorischer Cortex (AII)] auch mit anderen sensorischen Systemen verschaltet. Hier findet dann keine rein akustische Verarbeitung mehr statt [5 8 18 24-28].

3.2. Pathophysiologie des Hörsystems und Schwerhörigkeit

Diverse Pathologien sind bekannt, die zu einem Hörverlust führen. Auf den folgenden Seiten ist der Schwerpunkt auf Veränderungen durch Lärm gesetzt. Besprochen werden soll der Einfluss auf das Innenohr und die Hörbahn.

3.2.1. Einfluss von Lärm auf das Hörsystem

Der Zusammenhang von Hörverlust und Schalltrauma ist gut beschrieben und wird, abgeleitet aus dem Englischen, als „Noise-induced Hearing Loss“ (NIHL) bezeichnet. In der deutschsprachigen Literatur wird dagegen vom lärminduzierten Hörverlust gesprochen. Dies stellt die häufigste Form der erworbenen Schallempfindungsstörung dar. Ein Phänomen, das schon seit Jahrzehnten beforscht wird. Das Hauptaugenmerk

lag dabei bisher vor allem auf Veränderungen der peripheren Strukturen, der Cochlea und den Haarzellen.

3.2.1.1. Einfluss auf die Hörschwelle

Eine Lärmexposition führt zu einer Abnahme der Hörschwelle. Diese Abnahme setzt normalerweise während oder kurz nach der Exposition ein. Sie kann temporär sein und sich vollständig erholen. Unter Umständen kommt es aber zu keiner vollständigen Wiederherstellung des ursprünglichen Hörvermögens. Diese Verschiebung und Regeneration ist abhängig von der Art, Dauer und Intensität der Beschallung. Damit ist einerseits die Amplitude des Schalls in Dezibel (SPL) und Expositionszeit gemeint, aber auch das Frequenzspektrums des Lärms. Natürlich spielt auch die persönliche Konstitution eine Rolle für die Genese. Die Folgen eines Schalltraumas sind von Individuum zu Individuum unterschiedlich. Verschiedene Faktoren scheinen dabei eine Rolle zu spielen, unter anderem auch die Genetik ^[29]. Die Hörschwellenverschiebung, die während und unmittelbar nach einer Beschallung auftritt, wird in der Literatur als temporary threshold shift (TTS) bezeichnet. Wenn es zu einem bleibenden Hörverlust kommt, das heißt, dass der Ausgangszustand nicht wiederhergestellt wird, nennt man dies permanent threshold shift (PTS).

Nach einem Lärmtrauma findet sich beim Menschen ein typisches Audiogramm mit der sogenannten C5 Senke. Eine Abnahme der Hörschwelle vor allem im Bereich von 4 kHz. Sowohl auf den höheren als auch auf den tieferen Frequenzen ist die Hörschwelle weniger verschoben. Darin liegt ein entscheidender Unterschied zur Presbyakusis, wo sich, je höher die Frequenz, ein größerer Hörverlust findet.

Trotz des unterschiedlichen Tonaudiogrammes ähnelt das klinische Bild des lärminduzierten Hörverlustes dem einer Presbyakusis. Das Sprachverständnis ist kaum eingeschränkt, so lange der Hörverlust moderat bleibt und sich auf den Frequenzbereich von 4 kHz beschränkt. Auch pathologisch gibt es einige Gemeinsamkeiten, zum Beispiel den Funktionsverlust von Haarzellen ^[30 31].

3.2.1.2. Temporary Threshold Shift

Einem PTS als Folge von Lärm geht immer eine temporäre Verschiebung der Hörschwelle (TTS) voraus. Dieses TTS teilweise begleitet von Tinnitus, zum Beispiel nach Besuch eines lauten Konzertes, zieht normalerweise keine anhaltenden Veränderung der peripheren Strukturen oder der Haarzellen nach sich. Nach 24 bis 48 Stunden hat sich die Hörschwelle oft wieder normalisiert. Mehrere, teilweise

reversible Vorgänge wurden beobachtet. Es wurden Veränderungen von Stereozilien der äußeren und inneren Haarzellen, beziehungsweise der Haarzellhöhe beschrieben [32-35]. Die Haarzellen wurden verletzt, starben jedoch nicht ab, sondern konnten sich teilweise wieder regenerieren. In anderen Studien wurde das Anschwellen des Hörnervs beobachtet [36]. Es gibt Hinweise auf mikrovasale Veränderungen nach einem Lärmtrauma: die Gabe von Pentoxifyllin, eine Substanz, die den Blutfluss unterstützt, konnte zu einer Abnahme des TTS führen [37]. Darüberhinaus wurde die Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet. Woher diese ROS stammen ist derzeit unklar [38]. ROS reagieren selbst als freie Radikale oder reagieren mit anderen Molekülen zu freien Radikalen. Sie können Zelltodmechanismen initiieren, die wiederum dauerhafte Schäden einleiten könnten. Weiterhin wurde das temporäre Anschwellen der Stria Vascularis beobachtet. Die Schwellung erreichte zirka 24 Stunden nach dem Schalltrauma ein Maximum und klang innerhalb von 7 Tagen wieder ab [39]. Offensichtlich kann das Anschwellen für einen irreversiblen Zellschaden sorgen, so dass es nach dem Abschwollen bei einem Funktionsverlust blieb. Es wurde die Hypothese formuliert, dass die Veränderungen eines TTS durch Manifestation zu einem PTS führen. Es darf bezweifelt werden, dass es sich um einen simplen monokausalen Zusammenhang handelt. Eine Verschiebung des endocochleären Potentials nach einem Lärmtrauma scheint keinen Beitrag zu einem TTS zu leisten, sondern eher eine Rolle bei der Entwicklung eines PTS zu spielen [40].

3.2.1.3. Einfluss auf die Haarzellen

Damit die zentralen Schaltstellen des Hörens normal funktionieren können, muss gewährleistet sein, dass der Rezeptor, der Cochlea und Hörnerv verbindet, einwandfrei funktioniert. Beim Ohr übernehmen die Haarzellen diese Aufgabe.

Intensiv hat man sich mit den Veränderungen der Cochlea nach einem Schalltrauma auseinander gesetzt. Eine der frühesten Entdeckungen war das Absterben der äußeren Haarzellen nach einem Schalltrauma. Die äußeren Haarzellen werden von lärminduzierten Schädigungen am Meisten betroffen. Je nach Beschallungsmuster und Intensität verändert sich der Haarzellenuntergang [41]. Hamernik et al. stellten an Chinchillas eine gute Korrelation zwischen Haarzellverlust und Hörverlust her [42]. Sie beschrieben, dass ein PTS bis 30 dB vor allem mit einem Verlust der äußeren Haarzellen einhergeht, erst danach fanden sie zerstörte innere Haarzellen. Dieser Zusammenhang konnte aber nicht in allen Studien bestätigt werden. In einer anderen

Studie wurde zwar ein Verlust der Haarzellen beschrieben, dieser korrelierte aber nur mit moderatem Hörverlust ^[43]. Offensichtlich ist es nicht, wie lange vermutet, nur der Haarzellverlust, der zum Hörverlust führt. Es gibt Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Haarzellen und dem Hörverlust bei Ratten herzustellen versuchten ^[44]. Es wurde die Hypothese postuliert, dass Haarzellen des niederfrequenten Bereichs ein Lärmtrauma überleben, aber ihre auditorische Funktion einbüßen. Die Haarzellen des hochfrequenten Bereichs neigen dagegen eher zum Zelltod. Offensichtlich kann ein Haarzellverlust auch ohne Verschiebung der Hörschwelle auftreten, so lange die verbleibenden Haarzellen den Verlust ausgleichen können ^[45]. Die genauen Mechanismen, die zum Haarzellenschwund und Funktionsverlust führen, bleiben dagegen unklar. Bisher wurden sowohl nekrotische als apoptotische Vorgänge beschrieben ^[46].

Die Zusammenhänge von irreversiblen Haarzelluntergang und Hörverlust sind Erklärungshypothesen für einen anhaltenden Hörverlust. Nach einer einmonatigen Beschallung von 10 Stunden täglich mit einer Intensität von 105 dB SPL fand sich kein signifikanter Haarzellverlust, obwohl die Hörschwelle zwischen 25-40 dB verschoben war. Nach 3 Monaten Beschallung wurde in derselben Studie ein moderater Verlust von inneren und äußeren Haarzellen beschrieben. Erst nach 7 Monaten Beschallung fand die Forschungsgruppe eine gute Korrelation von Haarzellverlust und Hörverlust. Nach 15 monatiger Beschallung überstieg der Haarzellverlust den Hörverlust ^[43]. Offensichtlich stellt sich der Haarzellverlust erst Tage bis Wochen nach Traumbeginn ein, und bildet sich abhängig von der Beschallungsintensität, Beschallungsdauer und posttraumatischen Überlebenszeit aus.

Andere Forschungsgruppen versuchten das Absterben der Haarzellen genauer zu terminieren. Sie beschallten Chinchillas mit 108 dB SPL für 75 Minuten und untersuchten vom selben Tier die linke und rechte Cochlea in einem Abstand von vierzehn Tagen: links unmittelbar nach dem Trauma und rechts am 14. Tag posttraumatisch; beziehungsweise auf der linken Seite 14 Tage nach der Beschallung und auf der verbleibenden rechten Seite am 28. Tag nach dem Trauma. Man fand, dass der Schweregrad der histopathologischen Ausprägung gut mit der Beschallungsfrequenz und dem Untersuchungszeitpunkt korrelierte. Das Spektrum umfasste unversehrte, geschwollene und degenerierte Haarzellen. Es wurde folgender Progress beobachtet: zu Beginn waren ausschließlich die äußeren Haarzellen in den basalen Windungen betroffen. Nach 14 Tagen hatte sich der Schaden auf die inneren

Haarzellen, die Stützzellen und Nervenzellen derselben Windung ausgebreitet, gleichzeitig fanden sich Lücken anstelle der betroffenen äußeren Haarzellen. Außerdem waren nun benachbarte, vor allem apikal liegende, äußere Haarzellen von der Degeneration betroffen. Nach 28 Tagen wurden zu der nach 14 Tagen untersuchten Gruppe keine elementaren Unterschiede mehr gefunden ^[47]. Andere Gruppen fanden, dass 5 Minuten nach einem 75 Sekunden dauernden Impulstrauma mit 155 dB SPL, etwa 5% der Haarzellen morphologische Änderungen zeigten. 30 Minuten nach dem Trauma hatte sich diese Zahl bereits auf 20% erhöht ^[48]. Wieder andere Gruppen fanden verschiedene Mechanismen als Grundlage des Haarzelluntergangs, je nach Intensität der Beschallung. Bei einer Beschallung mit 104 dB SPL war die Summe aus akut nekrotischen, apoptotischen und bereits gestorbenen Zellen immer gleich. Dieses Phänomen wurde bis zum spätesten Untersuchungszeitpunkt (30 Tage nach dem Trauma) beobachtet. Bei einer Beschallung mit 108 dB SPL nahm die Summe aus akut nekrotischen, apoptotischen und abgestorbenen Zellen mit der Zeit zu. Es fanden sich am ersten posttraumatischen Tag nur 50 Zellen, die entweder tot oder im Begriff zu sterben waren. Am 30. posttraumatischen Tag war diese Summe auf 5000 gestiegen ^[49]. Andere lichtmikroskopische Analysen fanden auch Hinweise darauf, dass der Degenerationsprozess 4 Wochen nach dem Trauma noch anhalten könnte ^[50]. Elektronenmikroskopische Analysen bestätigten diese Annahme ^[51].

Die genannten Mechanismen könnten als Erklärung für eine permanente Hörschwellenverschiebung dienen. Eine temporäre Hörschwellenverschiebung lässt sich damit allerdings nicht erklären. Die zu Grunde liegenden Mechanismen für eine temporäre Hörschwellenabnahme sind also an anderer Stelle und nicht im Haarzellenuntergang zu suchen.

Laute Beschallungen scheinen zu einer Minderdurchblutung der Cochlea zu führen. Die Malperfusion hat ihren Ursprung in Vasokonstriktionen, vor allem der Kapillaren der Basilarmembran und der Spiralganglienzellen ^[52]. Die verminderte Perfusion resultiert in oxidativem Stress und Bildung freier Radikale ^[53]. Vor allem die energieverbrauchenden Strukturen sind anfällig für die toxische Wirkung der freien Radikale. Der Energiebedarf der bewegungsfähigen äußeren Haarzellen ist vergleichsweise groß. Dies könnte eine Erklärung sein, weshalb sie durch hohen Schalldruck besonders angegriffen werden ^[54]. Andere Untersuchungen zeigten, dass der Haarzellenuntergang durch eine reine Ischämie, provoziert durch ein temporäres Kappen der zuführenden Blutgefäße, einen anderen zeitlichen Verlauf nahm. Bis zum vierten postischämischen Tag fanden sich

keine morphologischen Veränderungen. Gleichzeitig schienen, im Gegensatz zum Lärmtrauma, vor allem die inneren Haarzellen sehr sensibel auf Sauerstoffmangel zu reagieren ^[55].

Weitere Fragen konnten bisher nicht schlüssig beantwortet werden. Für lärmassoziierte Phänomene wie Hyperakusis, Tinnitus und Recruitment gibt es nach wie vor nur Erklärungshypothesen. Klar wird, dass die lange geglaubte Annahme, lärminduzierte Schwerhörigkeit sei Folge des Absterbens der Haarzellen der Cochlea, als Erklärung für psychoakustische Phänomene nicht ausreicht. Erst Recht nicht, wenn sie temporärer Natur sind. Die fortlaufende Forschung stellt fest, dass sich weitaus komplexere Veränderungen, vor allem in den zentralen Strukturen, einstellen.

3.2.1.4. Einfluss auf die zentralen Strukturen des Hörens

Es ist bekannt, dass ein veränderter Input zu Veränderungen in den sensorischen Systemen führt. Besonders groß scheint dieser Effekt in Wachstums- und Entwicklungsphasen zu sein. Von anderen Sinnessystemen weiß man, dass Deprivation zu Veränderungen zentraler Strukturen führt. Hubel und Wiesel fanden beispielsweise Veränderungen der Zellantworten im visuellen Cortex und der Sehbahn nach einseitiger Erblindung von jungen Kätzchen ^[56].

Tatsache ist, dass sich die Haarzellen nach einem Schalltrauma verändern. Damit verändert sich auch die Reizweiterleitung; im Falle von zerstörten Haarzellen fällt diese aus.

Ältere Studien haben gezeigt, dass Vertäubung zu morphologischen Veränderungen der Hörbahn führt. Diese Veränderungen sind umso eindrücklicher, wenn sie während der frühen Entwicklung entstehen. Im Mausversuch fanden sich verkleinerte Zellen im VCN und im medialen Kerngebiet des Lateralen Lemniscus bei fehlender akustischer Stimulation nach der Geburt ^[57]. Mehrfach wurden auch die zentralen Veränderungen nach Cochlea Ablation beschrieben, wie die Abnahmen von Zellzahl und Zelldichte ^[58-60]. Die Veränderungen der Morphologie fanden sich auch in den klinischen Untersuchungen wieder. Es konnte eine starke Korrelation zwischen Anzahl der Spiralganglienzellen des Nervus Cochlearis und der Amplitudenhöhe der Welle I der Hirnstammaudiometrie nach Vergiftung der Cochlea mit Neomycin gezeigt werden ^[61].

Die Auswirkungen akustischer Überstimulation auf die Haarzellen wurden bereits angesprochen. Akustische Überstimulation und Haarzellverlust wirkt sich auch auf die zentralen Strukturen des Hörens aus: es fand sich eine Korrelation zwischen

Haarzellverlust und Veränderungen im Nucleus Cochlearis nach Beschallung mit hohen Schalldrücken ^[62]. Akustische Überstimulation führte zu einem Hörnervenfaserverlust, der, genauso wie der Untergang der inneren Haarzellen, gut mit der Degeneration im ventralen Nucleus Cochlearis korrelierte. In derselben Studie wurden auch Degenerationen in tieffrequenten Bereichen des CN, im SOC und im IC gezeigt. Dabei handelt es sich um Bereiche, die von unbeschädigten Haarzellen innerviert wurden ^[63]. Nicht alle Regionen des CN reagieren gleich auf ein Schalltrauma. Obwohl Feng et al. beobachtet hatten, dass nach einer Woche alle äußeren Haarzellen verschwunden waren, fanden sie im PVCN erst acht Wochen nach dem Schalltrauma eine signifikante Volumenabnahme. In derselben Struktur konnten sie zum selben Zeitpunkt auch einen signifikanten Verlust der Nervenfasern nachweisen ^[64]. Weiter wurde gefunden, dass sich der auditorische Cortex bei chronischer moderater Schallexposition neu organisiert, sogar wenn es zu keinem messbaren Hörverlust kommt ^[65 66].

Es gibt Hinweise darauf, dass nicht nur der Haarzellenuntergang zu Veränderungen in den Schaltstellen der Hörbahn führt. Unmittelbar nach einer einmaligen Schallexposition wurde schon ein signifikanter Zellverlust im VCN beobachtet ^[67].

Die Methode der mechanischen Kompression im Kleinhirnbrückenwinkel lässt die Haarzellen intakt und affektiert nicht die Blutversorgung der Cochlea. Fünf Wochen nach der Kompression konnten physiologische und morphologische Veränderungen des CN festgestellt werden. Die Neuronenanzahl im DCN und PVCN hatte statistisch signifikant abgenommen, im AVCN war sie gleich geblieben ^[68]. Der Einfluss von defekten Haarzellen auf diesen Prozess konnte weitestgehend gering gehalten werden, da diese Wochen nach der Kompression noch funktionsfähig waren ^[69]. Interessanterweise fand sich ausgerechnet im AVCN, also in der Struktur, die von der mechanischen Vertäubung nicht betroffen gewesen war, nach intensiver Beschallung ein Neuronenverlust ^[70].

Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass die neuronale Degeneration der Cochlea auch von zentralen Strukturen ausgehen kann. Diese Erkenntnis beruht auf der Abnahme von Spiralganglienzellen, nachdem der Hörnerv im Kleinhirnbrückenwinkel Tage bis Wochen zuvor verletzt worden war ^[71].

3.2.1.5. Einfluss auf die Apoptose

Apoptose, beziehungsweise programmierter Zelltod, ist eine aktive und physiologische Form des Zelluntergangs. Eine erhöhte Apoptose ist vor allem in Wachstums- und

Entwicklungsphasen festzustellen. Sie spielt aber auch eine Rolle nach Insulten, nach Ischämien, nach Hypoxie oder Exposition von Noxen und Strahlung. Eine apoptotische Zelle hat klassischerweise morphologische und biochemische Charakteristika, die man beim Nachweis ausnutzt ^[72]. Die unphysiologische Form des Zelluntergangs, die der Apoptose gegenübersteht, ist die Nekrose ^[73].

Die Veränderungen der Schlüsselstrukturen der Hörbahn durch Deprivation wurde schon mehrmals erwähnt. Hiermit hat man auch den Axonenuntergang und die Zelldichtenabnahme Wochen nach einem akustischen Trauma erklärt. Von anderen Sinnessystemen weiß man, dass programmierter Zelltod einen Beitrag zu diesem Verlust leisten kann. Sowohl in der Riechbahn als auch in der Sehbahn konnte ein Zusammenhang zwischen Zelltodkaskaden und Deprivation gezeigt werden. Das chirurgische Zunähen eines Nasenflügels sorgte mit der Zeit für einen konstanten Anstieg der Apoptoseraten ^[74]. Ganz spezifisch fanden sich Apoptosemechanismen in der Riechbahn nach Entfernung des olfaktorischen Bulbus ^[75]. In Ratten fanden sich in der Sehbahn nach einseitiger Erblindung signifikant mehr apoptotische Zellen, die sich nicht nur durch Deprivation erklären ließen ^[76]. Dass Apoptose auch in der Hörbahn nach Schalltraumata eine Rolle spielt, wurde bereits gezeigt ^[77 78].

Die meisten Studien haben sich mit Veränderungen durch Lärm nach Wochen bis Monaten beschäftigt. Zeitpunkte, zu denen der Haarzellverlust strukturelle Konsequenzen nach sich gezogen haben könnte. Unsere Gruppe fand Hinweise, dass Deprivation aufgrund von Haarzellverlust nicht der einzige Mechanismus sein kann, der zu einem Zellverlust führt. Unmittelbar nach Beschallung fand sich im ventralen Nucleus Cochlearis, der ersten Schaltstelle der Hörbahn, ein signifikanter Zelldichtenverlust gegenüber der unbeschallten Kontrolle ^[67]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass diesem Zellverlust Apoptose als Mechanismus zu Grunde liegen könnte ^[77].

3.3. Fragestellung

Für die meisten Formen der Schwerhörigkeit steht keine kurative Therapie zur Verfügung. Eine Therapie der Wahl bei lärminduzierter- oder Altersschwerhörigkeit bleiben apparative Hörhilfen. Oft verwendet man stark verstärkende Modelle, die mehr als 115 dB SPL amplifizieren. Dadurch wird die Hörschwelle häufig wieder erreicht. Die Belastung des Hörsystems infolge des hohen Schalldruckpegels ist jedoch möglicherweise bedenklich. Die psychoakustischen Defizite, beispielsweise schlechteres Sprachverstehen im Störgeräusch, werden durch diese Therapie oftmals

EINLEITUNG

nicht behoben. Dies ist einer der Gründe, warum man eine Beteiligung zentraler Strukturen am Krankheitsbild der lärminduzierten Schwerhörigkeit vermutet. Deshalb werden in der vorliegenden Arbeit Veränderungen in zentralen Schaltstellen der Hörbahn (VCN, DCN, ICC, mMGB, dMGB, vMGB und AI) infolge von Lärmeinflüssen untersucht.

Durch die vorliegende Untersuchung sollen Antworten und Diskussionsansätze für folgende Fragen gegeben werden:

1. Inwieweit verschlechtert ein Lärmtrauma die Hörschwelle bei bereits durch Lärm vorgeschädigten Individuen?
2. Welchen Einfluss hat ein Lärmtrauma auf die neuronale Apoptose in zentralen Schaltstellen einer durch Lärm vorgeschädigten Hörbahn?
3. Welche Rückschlüsse sind aus den Ergebnissen auf die Therapie mit stark verstärkenden Hörgeräten bei lärminduzierter Schwerhörigkeit zu ziehen?

4 Methodik

4.1. Lärmexposition

23 adulte Mäuse im Alter von 6 bis 15 Wochen beider Geschlechter des NMRI (Naval Medical Research Institut) Stamms mit voll ausgereiftem Hörsystem wurden für die Experimente verwendet. Die behördliche Genehmigung für die Tierversuche (G 0416/10) erfolgte am 24.03.2011. Dabei wurden 12 Tiere für die histologischen Untersuchungen verwendet und 11 Tiere auf ihre Normalhörfähigkeit getestet. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, um Schmerz und Unbehagen der Tiere so gering wie möglich zu halten.

Der Test auf Normalhörfähigkeit erfolgte mittels BERA (Brainstem Evoked Response Audiometry). Zwei annähernd gleich starke Versuchsgruppen wurden zufällig gebildet und lärmexponiert. Die Tiere wurden entweder einmal beschallt und 14 Tage nach der Erstbeschallung untersucht („Einfachtrauma“) ($n_{\text{Histologie}} = 6$ und $n_{\text{BERA}} = 5$), oder 7 Tage nach Erstexposition demselben Schallmuster ein zweites Mal ausgesetzt und weitere 7 Tage später untersucht („Doppeltrauma“) ($n_{\text{Histologie}} = 6$ und $n_{\text{BERA}} = 6$) (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3 – Beschallungsmuster der Versuchsgruppen

Das Schallmuster war für alle Versuche gleich. Für den Versuch wurden die 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. Reagierte die Maus nicht auf das leichte Kneifen in den Fuß konnte mit der Beschallung begonnen werden. Anderenfalls wurden 20% der Anfangsdosis nachinjiziert und die Wirkung wurde erneut getestet. Die Körpertemperatur wurde während des ganzen Versuches durch ein Heizkissen (Thermolux CM 15 W, Acculux, Murrhardt, Deutschland), auf welchem die Mäuse

während der Versuchsdurchführung lagen, aufrecht gehalten. In einer für diesen Zweck konstruierten lärm-dämmenden (frequenzspezifisch mindestens 60 dB SPL Abschwächung) Kammer (80 cm x 80 cm x 80 cm) wurde in einem Abstand von etwa 10 cm oberhalb der Tiere 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 über einen 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 Leuchtstoffröhre konstant zwischen 36 und 37 °C.

4.2. Messung des frequenzspezifischen Hörverlustes

Der frequenzspezifische Hörverlust wurde mittels Hirnstammpotentialen früher Latenz, also bis 10 Millisekunden nach Stimulusgabe, gemessen. Diese Technik wird als Auditory Brainstem Responses (ABR) bezeichnet. Synonym verwendet man Brain Evoked Response Audiometry (BERA).

4.2.1. Versuchsaufbau

Vor der ersten Lärmexposition und am Tag der Untersuchung, also zwei Wochen nach der ersten Beschallung, wurde die Hörschwelle definiert. Für diesen Zweck wurde unter der oben beschriebenen Narkose eine frequenzspezifische (4, 8, 12, 16 und 20 kHz) Hirnstammaudiometrie (BERA) der Tiere vorgenommen. Dazu wurde derselbe Versuchsaufbau wie für die Beschallung verwandt: die Tiere befanden sich in derselben Kammer auf einem Heizkissen unterhalb eines Lautsprechers. Der Klangstimulus (200 ms Pulslänge, 2,5 Hz Pulsfrequenz) wurde mittels eines Sinuswellen-Generators (Modell SSU2, Werk für Fernmeldewesen, Berlin, Deutschland) bei verschiedenen Lautstärken auf beide Ohren appliziert. Die dargebotenen Frequenzen wurden parallel kontrolliert (Fluke 1941A Digital Counter, Scarborough, Ontario, Canada) und gegebenenfalls angepasst. Die Elektroden wurden mit Nadeln subdermal am Vertex (Messelektrode), am Mastoidknochen (Referenzelektrode) und an einem Fuß (Erdung)

befestigt. Die reizkorrelierten Hirnstammpotentiale wurden mit einem Viking IV[®] Measurement System (Viasys Healthcare, Conshohocken, Pennsylvania, USA) aufgezeichnet und ausgewertet. Das intraoperative Viking Messsystem maß die Hirnstammantworten während der ersten 10 Millisekunden nach der Reizung und verstärkte (um den Faktor 100'000), filterte (Bandbreite 0,15 – 3 kHz) und mittelte aus 300 Wiederholungen die Ergebnisse. Für jede einzelne Frequenz wurden Messungen bei vier verschiedenen Lautstärken durchgeführt. Die reproduzierbaren Reizantworten waren intensitätsabhängig und ergaben ein evoziertes Summenpotential.

Typischerweise findet man bei Welle V die größte Amplitude. Das Auftreten dieser Welle V korrespondiert mit der Hörschwelle, die gleichzusetzen ist mit dem leisesten Ton, der noch ein Potential provoziert. Für die Berechnung der Hörschwelle wurden ausschließlich Intensitäten verwendet, die dem linearen Arbeitsbereich der beteiligten Strukturen zugeordnet werden konnten.

4.2.2. Errechnen des Hörverlustes

Zur Berechnung der Amplituden-Wachstumsfunktion wurde die größte Differenz der y-Werte zwischen dem Minimum des Komplexes der Wellen IV / V und dem Maximum des Wellenkomplexes IV / V herangezogen. Sofern diese Wellen nicht zu trennen waren, wurden sie gemeinsam betrachtet. Diese Differenz änderte sich mit der Schallintensität, denn die Wellenamplitude nahm mit der Lautstärke zu. Eine frequenzspezifische Amplituden-Wachstumsfunktion (Input-Output-Funktion) wurde aus den generierten Daten errechnet und eine Regressionsgerade wurde in den linearen Teil der Funktion eingefügt. Die frequenzspezifische Hörschwelle konnte errechnet werden, indem die Steigungsgerade über den linearen Teil der Wachstumsfunktion hinaus bis zum y-Achsenabschnitt extrapoliert wurde. Die y-Achse stellte dabei die Lautstärke dar und die x-Achse repräsentierte die Amplitudendifferenz. Im Anschluss wurden die Mittelwerte der Hörschwellendifferenzen der Versuchsgruppen für jede Frequenz ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen den relativen Hörverlust der doppelbeschallten Tiere zur einfachbeschallten Gruppe.

Die Datenverteilung wurde mittels des Kolmogoroff-Smirnow-Tests auf dem Niveau $p \leq 0,05$ bestimmt. Bei vorliegender Normalverteilung wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben zur Signifikanzbestimmung durchgeführt. Auch dabei betrug der Fehler erster Art $p \leq 0,05$. Für alle statistischen Berechnungen wurde das Programm SPSS (Version 10.0, SPSS Inc., Chicago Illinois, USA) verwendet.

4.3. Histologische Bestimmung der Zelltodmechanismen

Um die Hauptfragestellung dieser Arbeit zu beantworten wurden histologische Schnittpräparate der Gehirne aller Versuchsgruppen angefertigt und die Zelldichten der sich in Zelltodmechanismen befindlichen Neuronen darin bestimmt.

4.3.1. Präparation der Gehirne

Die 12 Tiere, die für die histologischen Untersuchungen ausgewählt worden waren, wurden am Tag der Untersuchung mit der doppelt bis dreifachen Initialdosis der oben beschriebenen Narkose anästhesiert. Dies erfolgte um ein Aufwachen zu verhindern. Die Wirksamkeit der Anästhesie wurde nach demselben Schema, nämlich durch die Reaktion auf Kneifen in den Fuß, getestet. Sobald die Wirksamkeit festgestellt worden war, wurden die Tiere durch Klebestreifen an den Vorderbeinen in Rückenlage in einer Kunststoffwanne fixiert. Mit Beendigung der Schnappatmung wurde der Bauchraum eröffnet. Mit einer Schere wurde nun, unterhalb des Brustbeines entlang des Rippenbogens, die Haut und das darunter liegende Gewebe durchtrennt. Rostral des Schnittes präsentierte sich das Zwerchfell, außerdem zeigten sich auf Schnitthöhe die Leber und etwas kaudaler der Darm. Als nächstes wurde das Zwerchfell durchtrennt. Der Brustkorb wurde entfernt um das schlagenden Herz und die Hohlvenen darzustellen. Die linke Herzkammer wurde am Apex zur Perfusion mit einer Kanüle angestochen, die vorgeschoben und in der richtigen Position fixiert wurde. Mittels Überdruckpumpe (0,1 bar) wurden nun 20 ml isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) pro Minute appliziert. Gleichzeitig wurde ein künstlicher Ausgang herznah am Übergang von Vena Cava und Herzbeutel geschaffen, damit das Blut abfließen konnte. Es wurde so lange mit Kochsalzlösung gespült, bis sich die Leber deutlich hell präsentierte und die austretende Flüssigkeit klar war. Es folgte die Applizierung der Fixierungslösung (4% Paraformaldehyd in PBS 0,2 M) durch dieselbe Apparatur. Aufgrund der eintretenden Starre, die sich besonders deutlich an den Extremitäten zeigte, konnte eine gleichmäßige Fixierung festgestellt werden. Als nächstes wurde das Tier mittels Schere dekapitiert, die Haut des Kopfes wurde auf der Schädeldecke entfernt und die Kalotte vorsichtig gespalten. Es präsentierte sich makroskopisch der IC, der als Orientierung verwendet wurde. Die Gehirne wurden vorsichtig aus dem Schädel herauspräpariert und anschließend zum Transport und zur Aufbewahrung in der Fixierungslösung bis zur Einbettung aufbewahrt. Zur weiteren histologischen Aufbereitung erfolgte die Einbettung des Gehirns in Paraffin in einem Einbettautomaten

(Leica EG 1160 Histoemmbedder, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Dies erfolgte extern im Institut für Pathologie des Unfallkrankenhauses Berlin (UKB, Deutschland).

4.3.2. Erstellen der Gehirnschnitte

Die geblockten Gehirne wurden mit einem Mikrotom (Euromex Präzisions Minot Rotationsmikrotom MT.5505, Holland) in der Transversalebene in 10 µm dicke Slices geschnitten. Immer zwei aufeinanderfolgende Slices wurden abwechselnd auf jeweils einen Objektträger aufgetragen. Pro Objektträger wurden zwischen 6 und 10 Slices 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. Die Objektträger wurden vor der Benutzung jeweils eine Minute in 100% Ethanol und anschließend zwei Mal in Aqua bi-distilliert (Aqua bi-dest) entfettet und gereinigt. Nach nächtlicher Trocknung folgte eine Beschichtung mit 1% Gelatine Lösung. Für diesen Zweck wurden 2,5 gr Gelatine (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 0,25 gr Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 250 ml Aqua bi-dest unter ständigem Rühren bei 60° Celsius gelöst. Die gereinigten Objektträger wurden kurz in diese Lösung eingetaucht und anschließend mindestens 24 Stunden zum Trocknen gelagert, bevor sie verwendet wurden.

4.3.3. TUNEL Färbung

Für die Färbungen wurden nie aufeinanderfolgende Slices verwendet, um das doppelte Auftauchen derselben Zelle in verschiedenen Schnitten zu verhindern. Zum Apoptose-Nachweis 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 der Apoptose typischerweise durch Endonukleasen entsteht ^[79].

Die Schnitte wurde zur Enparaffinierung jeweils zwei Mal 10 Minuten in Rotihistol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) getaucht und anschließend je 5 Minuten in einer absteigenden Ethanolreihe (90% und 70%) und destilliertem Wasser rehydriert. Mit einem Lackstift (Roti-Liquid Barrier Marker, red, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die zu färbenden Schnitte umrandet, um eine Flüssigkeitsbarriere zu schaffen. Es folgte für 10 Minuten eine Vorbehandlung ^[80] mit Proteinase K (20,5 µg/ml in 10 mM Tris-HCL, pH 7.5, 100 µl pro Schnitt) um die Zellmembranen zu permeabilisieren. Die

METHODIK

Positivkontrolle wurde dann 10 Minuten mit 70 µl DNase I recombinant (100 U/ml; Roche, Mannheim, Deutschland) inkubiert um DNA-Strangbrüche zu provozieren. Die anderen Schnitte wurden derweil mit 50 µl PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) beträufelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dreimaligen Tauchen in PBS wurden zur Reduzierung von falsch-positiven Ergebnissen die endogenen Nukleasen mit 3% H₂O₂ (gelöst in Methanol) geblockt. Dazu wurde jeder Schnitt für 5 Minuten mit 50 µl der Lösung beträufelt. 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) gelöst in einem Reaktionsgemisch (200 mM Kalium Diamethylarsin, 25 mM Tris-HCl, 1 mM CoCl₂, 0.25 mg/ml Rinderserumalbumin, pH 6.6). Diese Label Solution war vor dem Auftragen 1:2 mit PBS verdünnt worden. Die anderen Schnitte, inklusive der Positivkontrolle, wurden mit 50 µl TUNEL reaction mixture (Roche, Mannheim, Deutschland) bedeckt. Diese reaction mixture entstand durch Vermengung von 1350 µl der 1:2 verdünnten Label Solution mit 50 µl der 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 in folgendem Reaktionsgemisch geliefert: 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 mit dem Lack eine wasserundurchlässige Barriere schloss, 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 Inkubierung in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Um eine lichtmikroskopische Analyse zu ermöglichen, wurden die Schnitte nach dreimaligen Waschen in PBS in derselben Kammer unter neu zugeschnittenen Laborfilm für 30 Minuten mit 50 µl Converter POD (Roche, Mannheim, Deutschland) inkubiert. Dieser Anti-Flourescein Antikörper ist mit Meerrettich Peroxidase konjugiert und bindet an die Zellen, an denen sich die TUNEL-Reaktion abgespielt hat. Nach erneutem dreimaligen Eintauchen in PBS wurden für 10 Minuten

METHODIK

pro Schnitt 50 µl 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Roche, Mannheim, Deutschland) als Substrat für die Meerrettich Peroxidase aufgetragen. Die TUNEL-positiven Zellen erschienen nun in einem bräunlichen Farbton. Die Schnitte wurden ein letztes Mal nach derselben Prozedur in PBS gewaschen, kurz in destilliertes Wasser getaucht, und für jeweils 1 Minuten einer aufsteigenden Alkohol Serie (70%, 90% und 100%-Isopropanol) zur Dehydrierung ausgesetzt. Nach 1 Minute in Rotihistol war der Barrierelack abgewaschen und die Schnitte wurden bis zum Eindeckeln mit Roti-Histokitt® (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in Rotihistol gelagert.

Tabelle 1 – Das Vorgehen der TUNEL Färbung schematisch und chronologisch

1. RotiHistol® (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	10 min
2. RotiHistol® (Carl Roth, Karlsruhe, Germany)	10 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. 100 µl Proteinase K pro Schnitt	10 min
8. Spülen mit PBS	
9. Positivkontrolle: 70 µl DNAse Rekombinant (Roche Mannheim, Germany)	
Restliche Schnitte mit PBS beträufeln	10 min
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. 50µl Converter POD pro Schnitt	in feuchter Kammer für 30 min
16. Spülen mit PBS	
17. 50µl DAB Substrat	10 min
18. Spülen mit PBS	
19. Spülen mit Aqua dest.	
20. Ethanol 70%	1 min

METHODIK

- | | |
|---|------------------------|
| 21. Ethanol 90% | 1 min |
| 22. Isopropanol 100% | 1 min |
| 23. RotiHisto [®] (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) | 1 min |
| 24. RotiHisto [®] (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) | zum Lagern, max 15 min |
| 25. Eindeckeln in Roti HistoKitt [®] (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) und trocknen lassen | |

4.3.4. Analyse der Färbung

Die Schnitte wurden 24 Stunden nach der Färbung lichtmikroskopisch betrachtet (Carl Zeiss, Axiovert 25C, Deutschland) und unter 250-facher Vergrößerung mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Canon Eos D20, Japan) farbig abfotografiert. TUNEL-positive Zellen ^[81] wurden im VCN, in der fusiformen Zellschicht des DCN, im ICC, im medialen-, ventralen- und dorsalen MGB (vMGB, mMGB und dMGB), sowie in Zellschichten I-VI des primären auditorischen Cortex (AI I-VI) analysiert. Für alle Bildbearbeitungen wurde Adobe Photoshop (Adobe Photoshop CS3 Extended, Version 10.0, 2007, USA) verwendet. Aus den Bildern wurden definierte Ausschnittgrößen (VCN: 0,22 mm x 0,17 mm; DCN: 0,16 mm x 0,1 mm; ICC: 0,45 mm x 0,33 mm; vMGB: 0,21 mm x 0,39 mm, dMGB: 0,21 mm x 0,2 mm; mMGB: 0,1 mm x 0,39 mm; AI: 0,05 mm x 0,39 mm) ausgeschnitten. Die Cortex- und MGB-Strukturen waren aus mehreren Einzelbildern zusammengefügt worden, bevor die Ausschnitte herausgeschnitten wurden. Alle Ausschnitte wurden mittels „Autokontrast“ kalibriert (siehe Abbildung 4, Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7 auf den Seiten 30 - 32) und anschließend an einem 22“ Monitor (p2210, DELL, Texas, USA) in Farbe manuell ausgezählt.

Eine TUNEL-positive Zelle war definiert durch eine klare Kontrastabhebung gegenüber der Umgebung, umrandet von einem helleren Saum (siehe Abbildung 8 auf Seite 32). Es wurden ausschließlich Zellen gezählt, die komplett im Ausschnitt sichtbar waren. Pro Struktur und Tier wurden zwischen 2 und 12 Schnitte ausgewertet. Insgesamt wurden pro Gruppe und pro Struktur zwischen 22 und 40 Schnitte in die statistische Auswertung einbezogen.

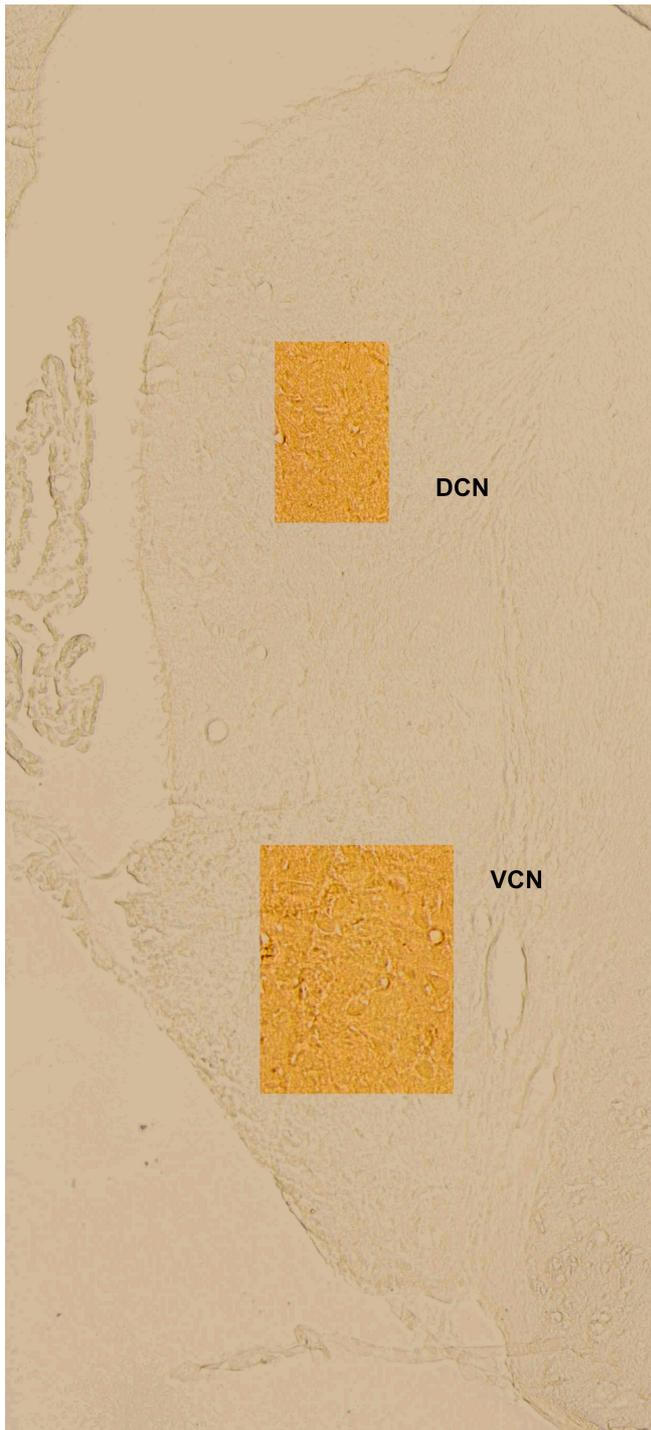


Abbildung 4 - Ausschnitte eines linken Nucleus Cochlearis

Zu sehen ist ein TUNEL-gefärbter linker Nucleus Cochlearis eines Tieres der Doppeltrauma-Gruppe. Die Ausschnitte des VCN (0,22 mm x 0,17 mm) und DCN (0,16 mm x 0,1 mm) wurden mittels Autokontrast hervorgehoben.



Abbildung 5 – linker und rechter IC mit ICC Ausschnitten

Zu sehen sind der linke und rechte Colliculus Inferior einer TUNEL-gefärbten Maus der zwei Wochen nach Einfachexposition untersuchten Gruppe. Die auszuwertenden Ausschnitte (0,45 mm x 0,33 mm) wurden mittig in den ICC positioniert und mittels Autokontrast hervorgehoben.

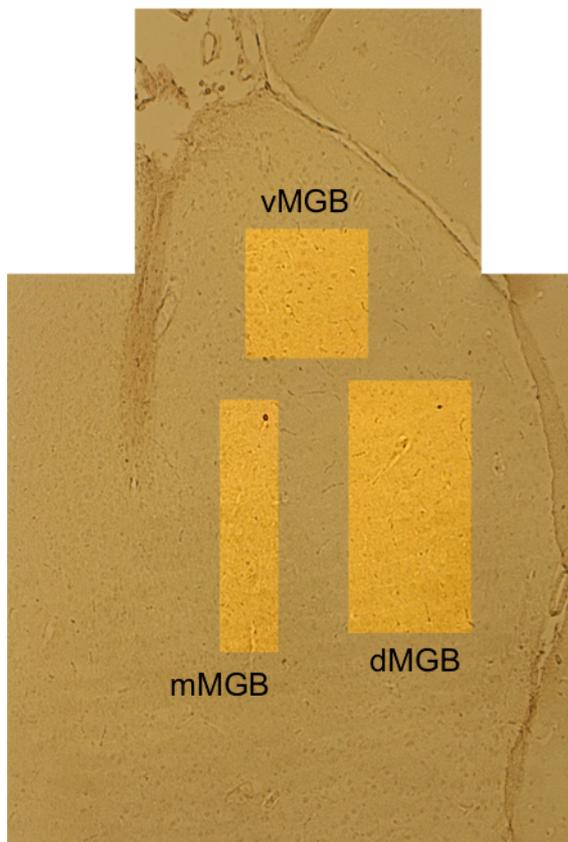


Abbildung 6 – Ausschnitte eines rechten MGB

Zu sehen ist ein rechter medialer Kniehöcker eines Tieres der Doppeltrauma-Gruppe. Die Ausschnitte des dorsalen (0,21 mm x 0,2 mm), des medialen (0,1 mm x 0,39 mm) und des ventralen MGB (0,21 mm x 0,39 mm) wurde mittels Autokontrast hervorgehoben.

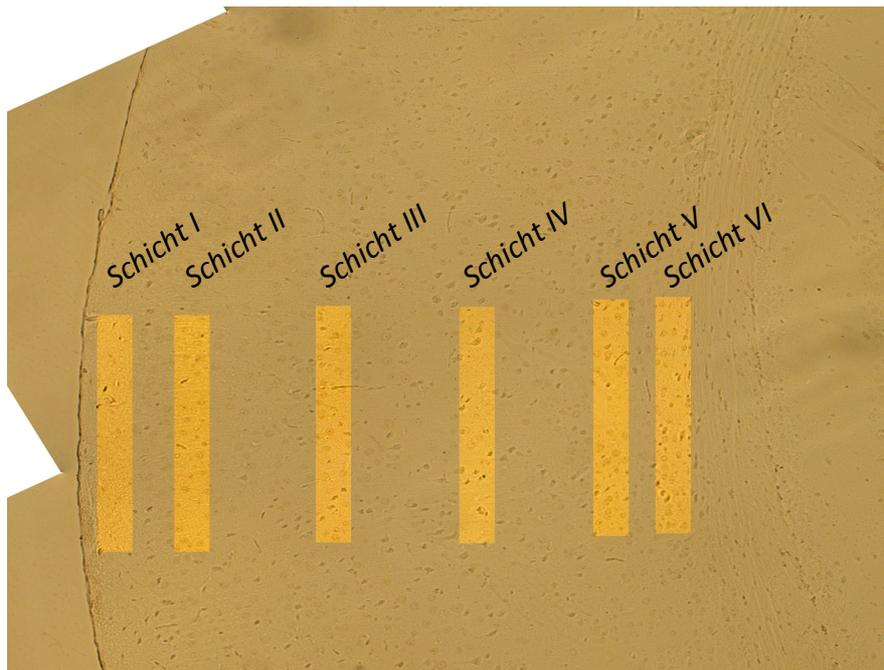


Abbildung 7 – Ausschnitte der sechs Schichten eines linken primären auditorischen Cortex

Abgebildet ist der linke primäre auditorische Cortex eines Tieres der Doppeltrauma-Gruppe. In jede der sechs Schichten wurde mittig ein gleich großer Ausschnitt (0,05 mm x 0,39 mm) gelegt und mittels Autokontrast hervorgehoben.

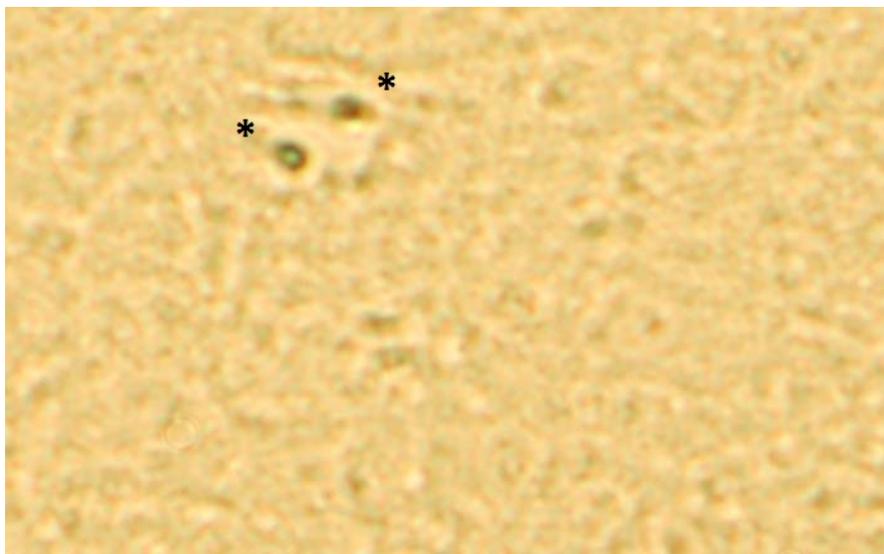


Abbildung 8 – zwei TUNEL positive Zellen

Zu sehen ist ein Ausschnitt eines DCN einer Maus der Doppeltrauma-Gruppe. Der Ausschnitt wurde mittels Autokontrast bearbeitet. Die beiden TUNEL-positiven Zellen wurden jeweils mit einem Sternchen markiert.

4.3.5. Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit den ausgezählten Werten vorgenommen, erst danach wurden die Mittelwerte der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen aller Ausschnitte auf mm^2 normiert. Die Ergebnisse aller Strukturen wurden mittels Boxplot auf Ausreißer geprüft. Werte, die sich außerhalb der 1,5 fachen und innerhalb der 3 fachen Whiskerlänge befanden, wurden einzeln geprüft. Die Beibehaltung oder Eliminierung dieser Werte hatte keine Auswirkung auf die Signifikanzen der Ergebnisse. Werte, die sich außerhalb der dreifachen Whiskerlänge befanden, wurden als Extremwert betrachtet, ebenfalls einzeln geprüft und flossen nicht in die statistische Berechnung ein, sofern sie als falsch-positiv gewertet wurden.

Die Datenverteilung des CN und IC wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf Poisson- und Normalverteilung geprüft. Die Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurden bei Normalverteilung mittels t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Entsprachen die Daten weder einer Poisson- noch einer Normalverteilung, wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) angewendet. Dabei wurden jeweils die Ergebnisse der Doppeltrauma- mit denen der Einzeltrauma-Gruppe verglichen. Der Fehler erster Art sollte zur Ablehnung der Nullhypothese $p < 0,05$ betragen, was dem gewählten Signifikanzniveau entspricht. Zur Berechnung des Kolmogorow-Smirnow-Tests, des t-Tests und des Mann-Whitney-Tests wurde das Programm SPSS (SPSS 10.0; SOSS Inc. Chicago, IL, USA) benutzt. Auf Grund der Datenverteilung im CN und IC wurden die Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen auf signifikante Unterschiede mittels t-Test oder U-Test geprüft. Die im MGB und Cortex erhobenen Daten zeigten eine Poisson-Verteilung und der p-Wert wurde mithilfe der Software „R“ (R-project, R Development Core Team, GNU Gereal Public License) über den Binomial-Test berechnet ^[82]. Zur Berechnung wurde der Befehl „binom.test(x_1 , x_2 , x_3/x_4)“ des Programmes R herangezogen. x_1 war dabei die Summe aller TUNEL-positiven Zellen einer Gruppe einer Struktur; x_2 die Summe der TUNEL-positiven Zellen beider Gruppen derselben Struktur; x_3 war die Anzahl der Schnitte, aus denen x_1 ausgezählt worden war; x_4 war die Gesamtanzahl der ausgezählten Ausschnitte beider Gruppen der jeweiligen Struktur.

5 Ergebnisse

5.1. ABR-Aufzeichnungen

5 Mäuse der einfachbeschallten Gruppe wurden zur Höruntersuchung herangezogen, 6 doppelbeschallte Tiere wurden untersucht. In Diagramm 1 wurde der Hörverlust in dB der doppelbeschallten Tiere im Vergleich mit der einfachbeschallten Gruppe für die getesteten Frequenzen aufgetragen. Es fand sich ein Hörverlust, der auf dem Niveau $p < 0,05$ bei 8 kHz, 12 kHz und 20 kHz signifikant war. Signifikante Unterschiede wurden im Diagramm 1 mit einem Sternchen markiert.

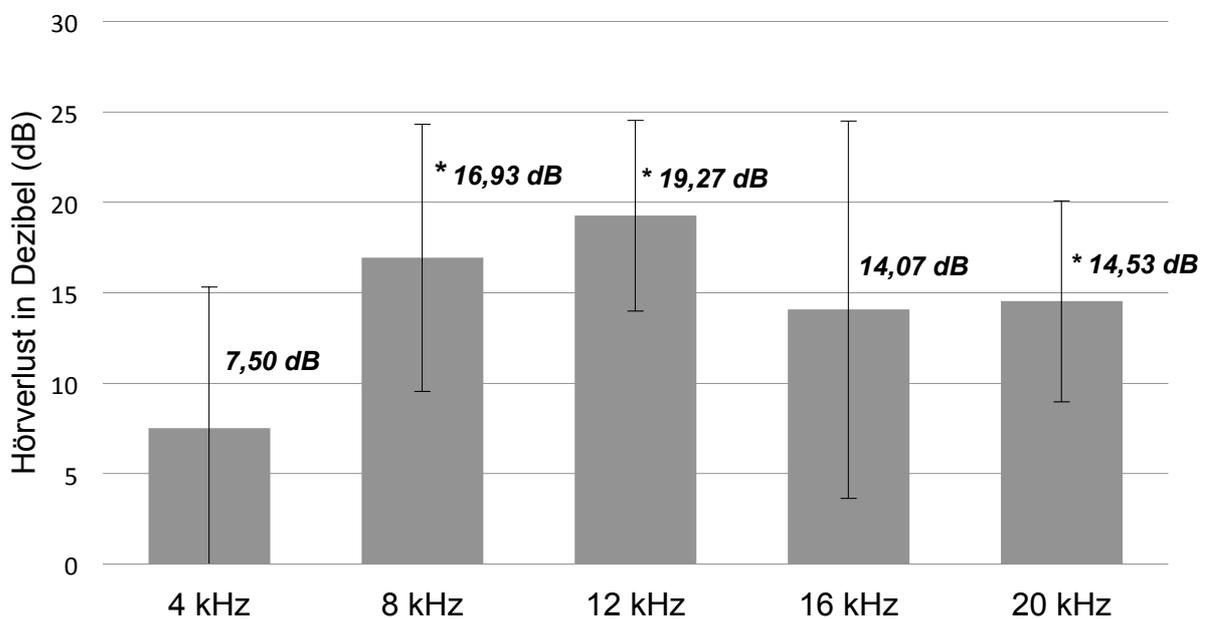


Diagramm 1 - Hörverlust der doppel- gegenüber der einfachbeschallten Gruppe

Aufgetragen wurde der Hörverlust (in Dezibel SPL) und Standardfehler für die gemessenen Frequenzen (4, 8, 12, 16 und 20 kHz) der Doppeltrauma-Gruppe (graue Balken) gegenüber der Einfachtraumagruppe (Referenzlinie 0 dB). Signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen markiert. Die BERA Messung wurde am Tag der Sakrifizierung, also 7 Tage nach Zweittrauma beziehungsweise 14 Tage nach Ersttrauma durchgeführt.

Bei einer Tonhöhe von 4 kHz betrug der gemittelte Hörverlust der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der Einfachtrauma-Gruppe 7,50 dB (Standardfehler 7,83 dB). Dies war nicht signifikant ($p=0,429$). Im selben Versuch mit 8 kHz fand sich ein durchschnittlicher Hörverlust von 16,93 dB mit einem Standardfehler von 7,39 dB. Im t-Test errechnete sich $p=0,045$ und damit ein statistisch signifikanter Hörverlust. Noch deutlicher war der Hörverlust bei 12 kHz, er betrug 19,27 dB (Standardfehler 5,28 dB).

ERGEBNISSE

Dies war signifikant ($p=0,013$). Im Bereich von 16 kHz wurde ein durchschnittlicher Hörverlust von 14,07 dB gemessen mit einem Standardfehler von 10,44 dB. Im t-Test errechnete sich kein signifikanter Hörverlust ($p=0,195$). In der höchsten getesteten Frequenz, also 20 kHz, wurde ein mittlerer Hörverlust von 14,53 dB (Standardfehler 5,57 dB) gemessen, der mit $p=0,04$ einen signifikanten Unterschied darstellt. Diese Ergebnisse wurden, im Vergleich mit einer weiteren Versuchsgruppe, bereits veröffentlicht ^[83].

5.2. Nucleus Cochlearis

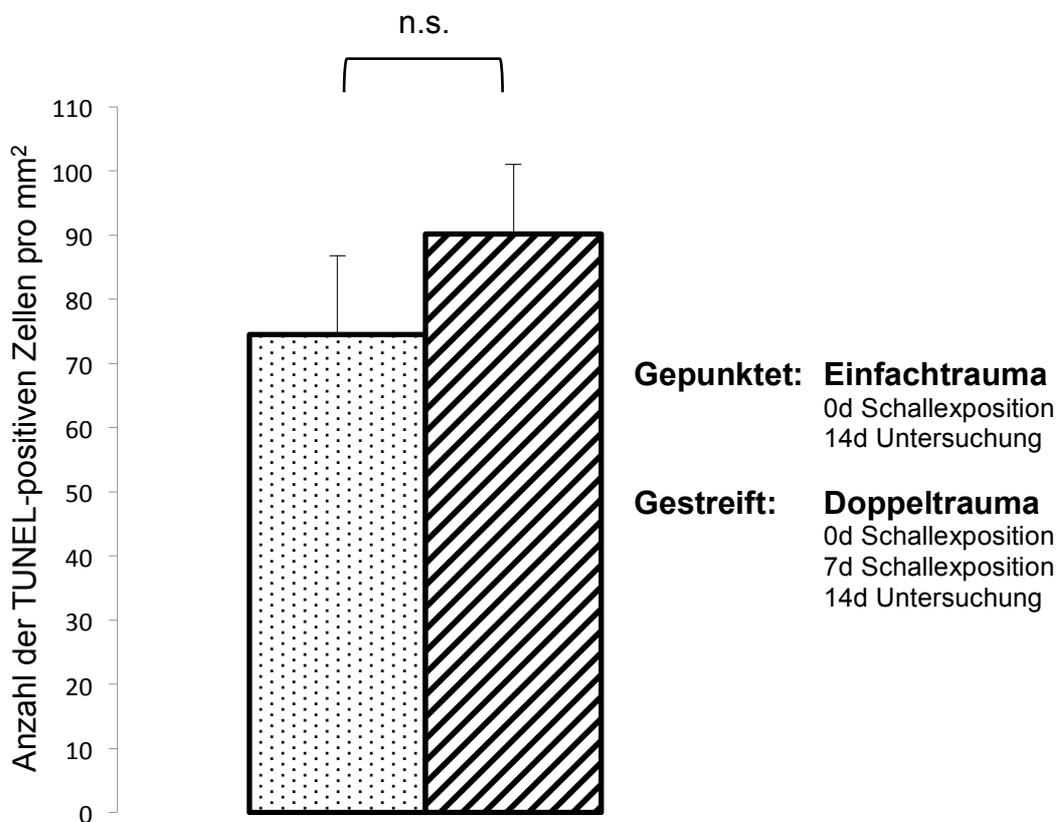


Diagramm 2 - TUNEL-Zelldichten des VCN

Mittelwert der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche der beiden untersuchten Gruppen mit Standardfehler. Es fand sich kein signifikanter Unterschied auf dem Niveau $p<0,05$.

28 Ausschnitte ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) des VCN der Doppeltrauma-Gruppe wurden ausgezählt, danach wurde ein Wert als Extremwert eliminiert. Durchschnittlich fanden sich 3,37 TUNEL-positive Zellen pro Ausschnitt (Standardabweichung $\pm 2,11$ Zellen/Ausschnitt). In derselben Struktur wurden in der Einfachtrauma-Gruppe zwei Werte als Ausreißer identifiziert, wodurch sich die Anzahl der Ausschnitte auf 28 reduzierte ($n_{\text{Einfachtrauma}}=4$).

ERGEBNISSE

Hier wurden etwas weniger, durchschnittlich 2,79 Zellen gezählt (Standardabweichung $\pm 2,43$ Zellen/Ausschnitt). Mittels Kolmogorow-Smirnow-Test wurde die Datenverteilung errechnet. Im anschließenden t-Test errechnete sich $p=0,347$ für den VCN. Dieses Ergebnis ist auf dem Niveau $p<0,05$ nicht signifikant.

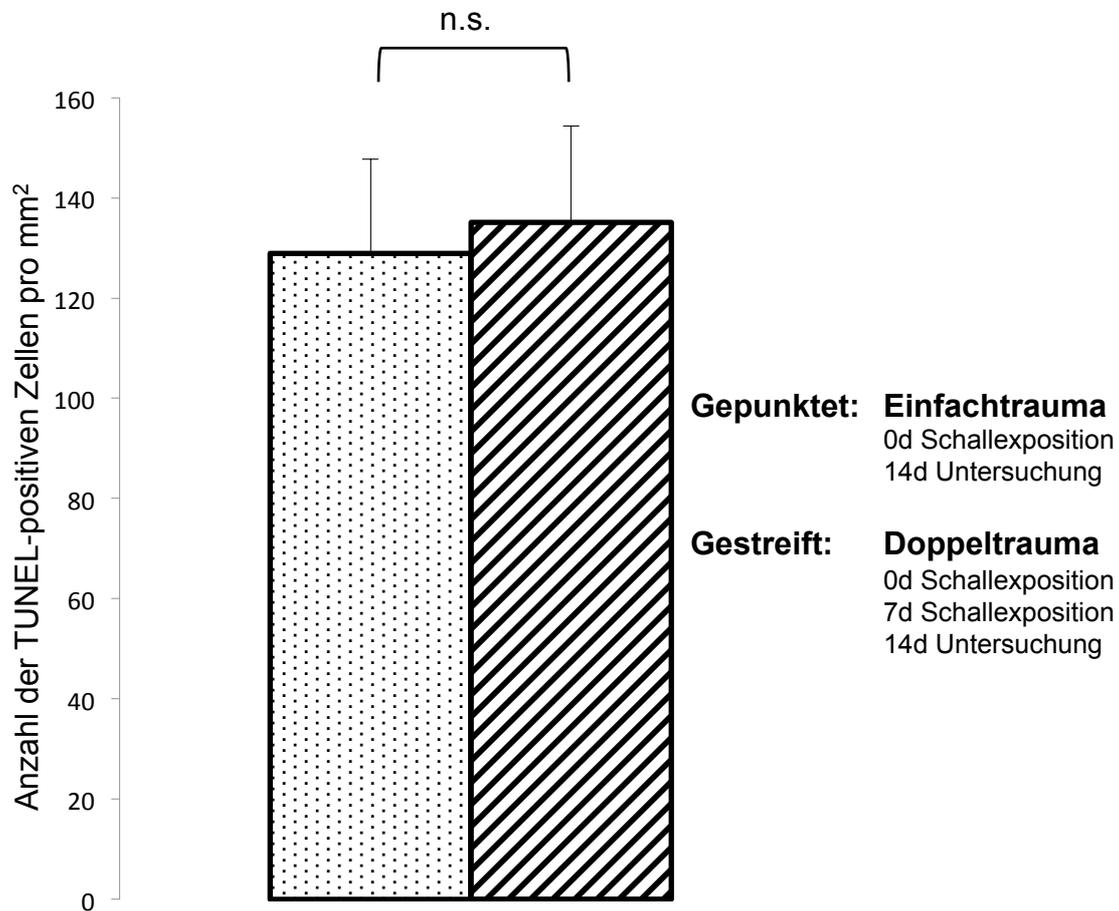


Diagramm 3 – TUNEL-Zelldichten des DCN

Mittelwert der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche der beiden untersuchten Gruppen mit Standardfehler. Es fand sich kein signifikanter Unterschied auf dem Niveau $p<0,05$.

In den DCN Ausschnitten der Doppeltrauma-Gruppe wurden in 31 Ausschnitten ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) durchschnittlich 2,16 TUNEL-positive Zellen gezählt (Standardabweichung $\pm 1,71$). In denselben Ausschnitten der Einfachtrauma-Gruppe fanden sich in 32 Schnitten ($n_{\text{Einfachtrauma}}=4$) durchschnittlich 2,06 Zellen, bei einer Standardabweichung von $\pm 1,70$. Aufgrund der Normalverteilung (Kolmogorow-Smirnow-Test) wurde der t-Test zur Signifikanzbestimmung herangezogen. Es errechnete sich $p=0,819$.

Sowohl im ventralen als auch im dorsalen Nucleus Cochlearis fand sich also keine signifikante Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen der doppelbeschallten Gruppe

ERGEBNISSE

gegenüber der 2 Wochen nach Einfachtrauma untersuchten Gruppe. In Diagramm 2 und Diagramm 3 wurden die Ergebnisse als Balkendiagramm visualisiert, dazu wurde der Mittelwert der TUNEL-positiven Zellen und der Standardfehler pro mm^2 errechnet und aufgetragen. Im VCN betrug die Zelldichte der TUNEL-positiven Zellen in der Doppeltrauma-Gruppe $90,11 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$ (Standardfehler $\pm 10,88 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$) in der Einzeltraumagruppe $74,48 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$ (Standardfehler $\pm 12,33 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$). Im DCN errechnete sich $135,08 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$ (Standardfehler $\pm 19,25 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$) für die Doppeltrauma-Gruppe und $128,90 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$ (Standardfehler $\pm 18,81 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$) für die Einzeltrauma-Gruppe.

5.3. Colliculus Inferior

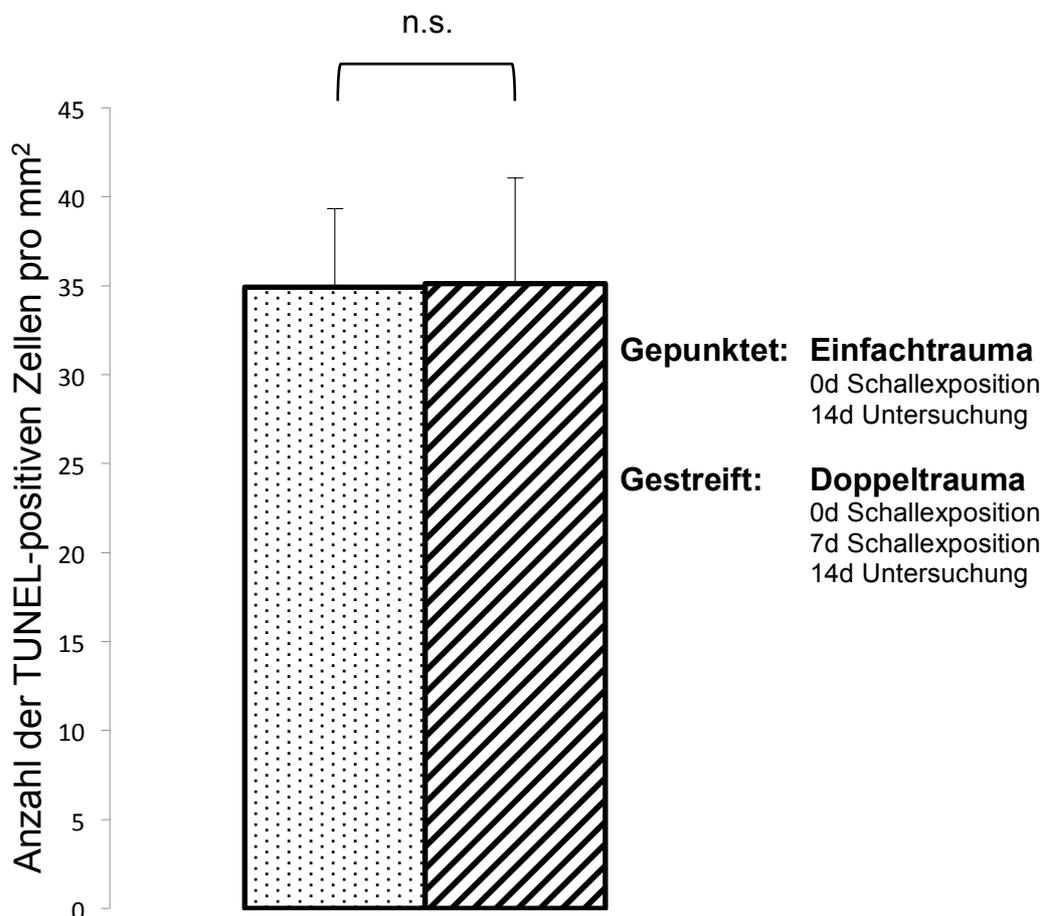


Diagramm 4 – TUNEL-Zelldichten des ICC

Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche der beiden untersuchten Gruppen mit Standardfehler. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede auf dem Niveau $p < 0,05$.

28 Schnitte ($n=4$) der Doppeltrauma-Gruppe wurden ausgewertet. Durchschnittlich

wurden 5,21 Zellen/Ausschnitt gezählt. In den 38 Ausschnitten (n=4) der Einfachtrauma-Gruppe fanden sich im Mittel 5,18 TUNEL-positive Zellen (Standardabweichung $\pm 4,04$ Zellen/Ausschnitt). Es wurden keine Extremwerte eliminiert. Die normalverteilten Daten (Kolmogorow-Smirnow-Test) wurden mittels t-Test auf signifikante Unterschiede auf dem Niveau $p < 0,05$ getestet. Es errechnete sich $p = 0,978$. Eine Zweitbeschallung verändert die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen im ICC also nicht signifikant. In Diagramm 4 wurden die Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro mm^2 graphisch dargestellt. Die TUNEL-Zelldichte der Einfachtrauma-Gruppe betrug $34,91 \text{ Zellen/mm}^2$, die der Doppeltrauma-Gruppe $35,11 \text{ Zellen/mm}^2$. Zusätzlich wurde für beide Gruppen der Standardfehler eingezeichnet, der in der Einfachtrauma-Gruppe $\pm 4,41 \text{ Zellen/mm}^2$ und in der Doppeltrauma-Gruppe $\pm 5,95 \text{ Zellen/mm}^2$ betrug.

5.4. Corpus Geniculatum Mediale

Aufgrund der Poisson-Verteilung (Kolmogorow-Smirnow-Test) der Daten im Corpus Geniculatum Mediale wurden die Unterschiede der Mittelwerte der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen mit der Binomial Formel auf Signifikanz geprüft ^[82].

5.4.1. Dorsale Substruktur des MGB

Die durchschnittliche Anzahl der TUNEL-positiven Zellen der Doppeltrauma-Gruppe ist gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe im dorsalen Anteil des medialen Kniehöckers signifikant erhöht ($p = 0,0067$). Errechnet wurde dieser Wert aus 31 Schnitten der Doppeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Doppeltrauma}} = 4$) und 33 Schnitten der 2 Wochen nach Einfachtrauma untersuchten Gruppe ($n_{\text{Einfachtrauma}} = 5$). In jeder Gruppe war ein Extremwert eliminiert worden, was die Aussage nicht veränderte. In der Doppeltrauma-Gruppe waren durchschnittlich pro Ausschnitt 1,10 TUNEL-positive Zellen (Standardabweichung $\pm 1,14$ Zellen) gezählt worden. In der Einfachtrauma-Gruppe lag dieser Wert bei 0,48 Zellen pro Ausschnitt (Standardabweichung $\pm 0,67$ Zellen/Ausschnitt). Für Diagramm 5 wurden diese Ergebnisse auf mm^2 hochgerechnet und graphisch dargestellt. Die mittlere Zelldichte der TUNEL-positiven Zellen der Doppeltrauma-Gruppe betrug $26,11 \text{ Zellen/mm}^2$. Der Standardfehler von $\pm 4,86 \text{ Zellen/mm}^2$ wurde eingezeichnet. Für die Einfachtrauma-Gruppe errechnete sich eine Zelldichte von $11,54 \text{ Zellen/mm}^2$ (Standardfehler $\pm 2,77 \text{ Zellen/mm}^2$).

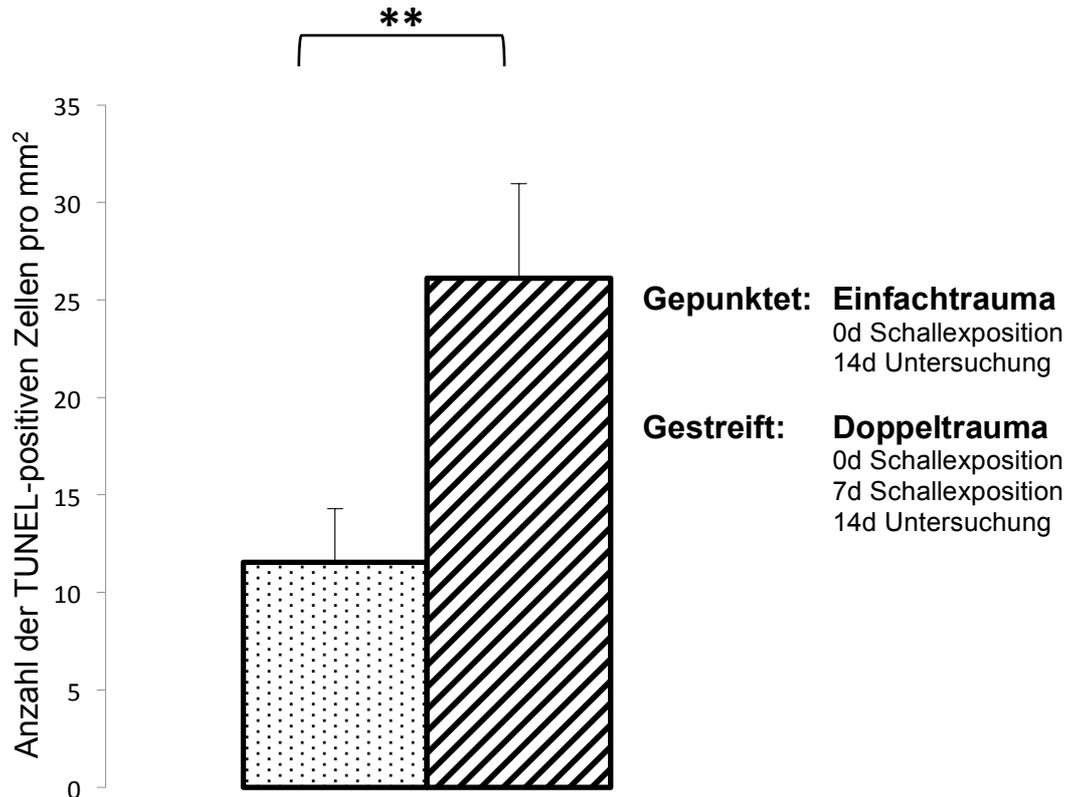


Diagramm 5 – TUNEL-Zelldichten des dorsalen MGB

Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche der beiden untersuchten Gruppen mit Standardfehler. Es fand sich ein signifikanter Unterschied auf dem Niveau $0,001 \leq p < 0,01$ ($p=0,0067$). Dies wurde mit zwei Sternchen markiert.

5.4.2. Mediale Substruktur des MGB

In der medialen Substruktur des MGB fand sich eine signifikante Erhöhung der mittleren Anzahl der TUNEL-positiven Zellen der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der 2 Wochen nach Einfachtrauma untersuchten Gruppe ($p=0,0008$). Ausgezählt und für die Statistik verwendet wurden 30 Ausschnitte der Doppeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) sowie 38 Ausschnitte der Einfachtrauma-Gruppe ($n_{\text{Einfachtrauma}}=4$). 4 Werte der Doppeltrauma-Gruppe und 2 Werte der Einfachtrauma-Gruppe wurden als Extremwerte bewertet und für die statistische Analyse nicht verwendet. Die Eliminierung dieser Werte hatte keinen Einfluss auf die Signifikanz des Ergebnisses. Es fanden sich pro Ausschnitt im Mittel, nach Eliminierung der Extremwerte, 0,42 TUNEL-positive Zellen (Standardabweichung $\pm 0,64$ Zellen/Ausschnitt) in der Einfachtrauma-Gruppe und 1,13 TUNEL-positive Zellen (Standardabweichung $\pm 0,86$ Zellen/Ausschnitt) in der Doppelgruppe. In Diagramm 6 wurden die Ergebnisse des medialen MGB

ERGEBNISSE

veranschaulicht. Dazu wurden die Zelldichten auf mm^2 umgerechnet und der Standardfehler eingezeichnet. Für die Doppeltrauma-Gruppe errechneten sich 29,06 Zellen/ mm^2 und ein Standardfehler von $\pm 4,03$ Zellen/ mm^2 . Die TUNEL-Zelldichte der Einfachtrauma-Gruppe betrug 10,80 Zellen/ mm^2 bei einem Standardfehler von $\pm 2,67$ Zellen/ mm^2 .

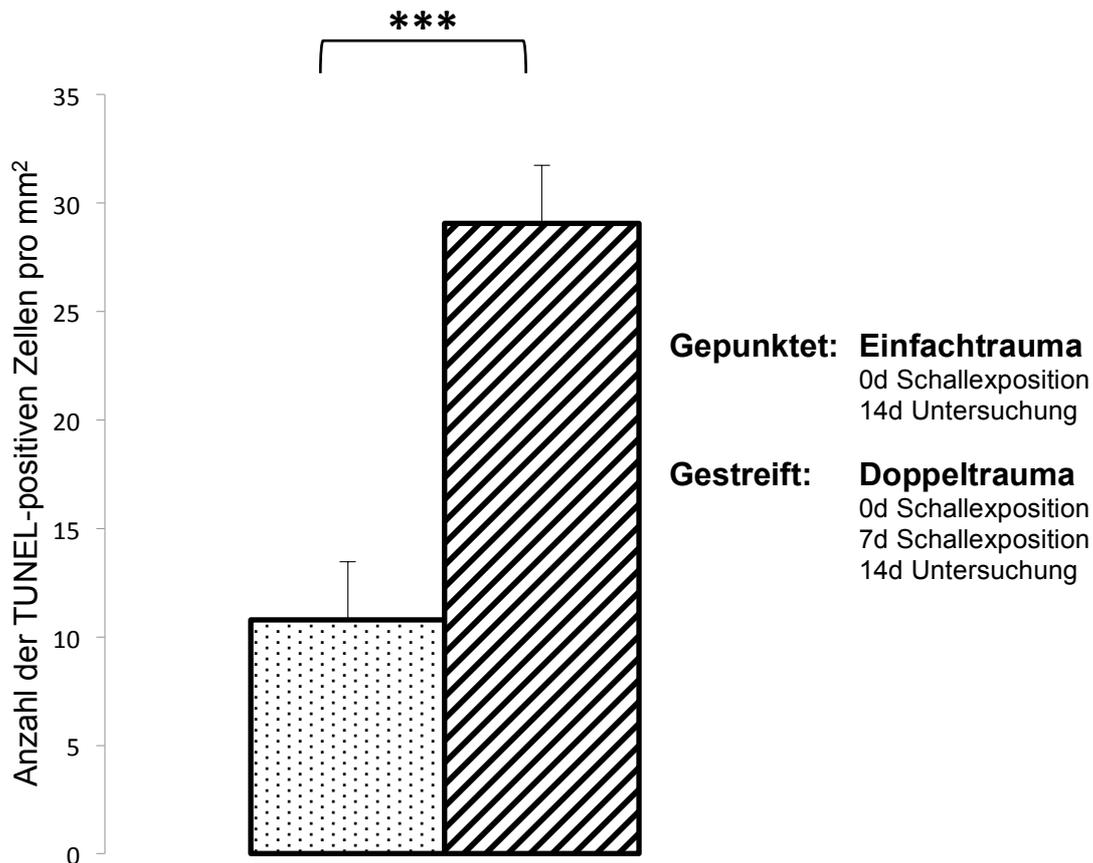


Diagramm 6 – TUNEL-Zelldichten des medialen MGB

Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche mit Standardfehler der untersuchten Gruppen. Der Unterschied war auf dem Niveau $p < 0,001$ signifikant und wurde mit drei Sternchen gekennzeichnet ($p = 0,0008$).

5.4.3. Ventrale Substruktur des MGB

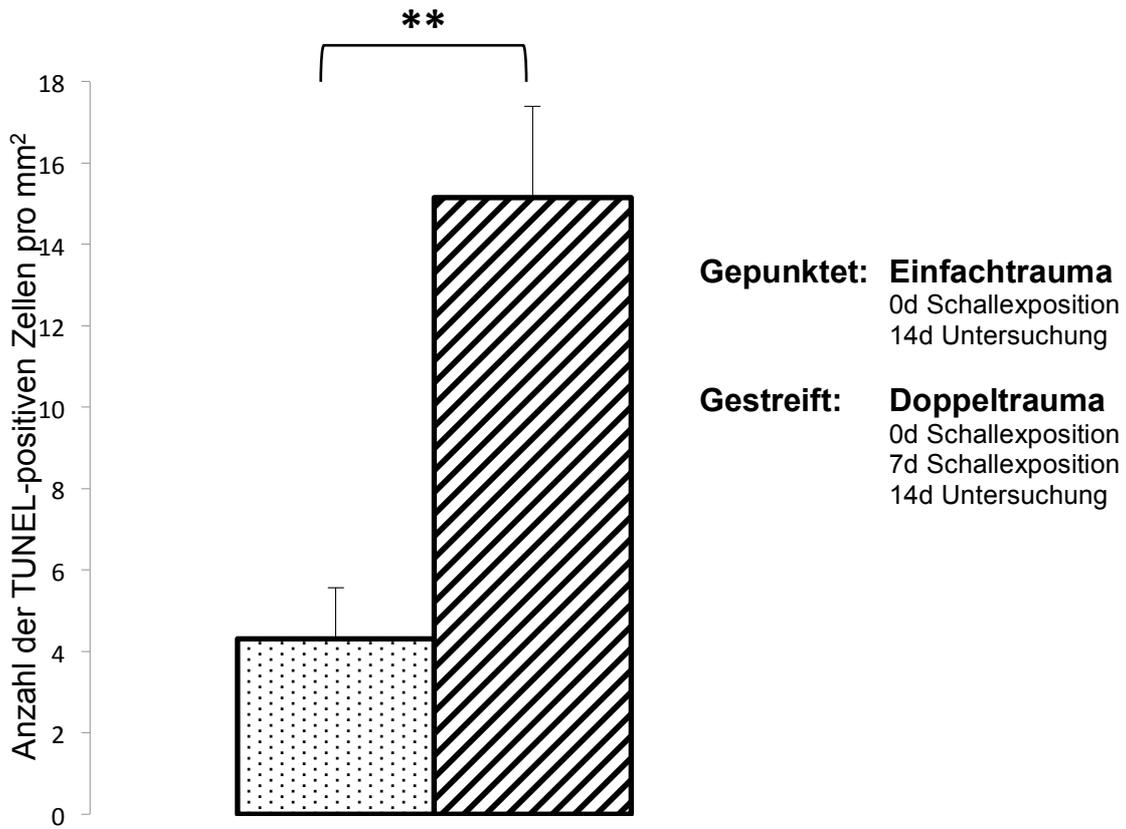


Diagramm 7 – TUNEL-Zelldichten des ventralen MGB

Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro mm² mit Standardfehler der beiden untersuchten Gruppen. Der signifikante Unterschied ($p=0,001$) auf dem Niveau $0,001 \leq p < 0,01$ ist mit zwei Sternchen gekennzeichnet.

In der Pars Ventralis des MGB errechnete sich aus 29 Ausschnitten (1 Extremwert ist eliminiert worden) der Doppeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) und 34 Ausschnitten (2 Extremwerte sind eliminiert worden) der Einzeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Einzeltrauma}}=5$) ein signifikanter Unterschied der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen pro Fläche ($p=0,001$). Die Eliminierung der Extremwerte wirkte sich nicht auf die Aussage des Ergebnisses aus. Die signifikante Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der 2 Wochen nach Einzeltrauma untersuchten Tiere wird in Diagramm 7 dargestellt. Pro Ausschnitt fanden sich in der Doppeltrauma-Gruppe im Mittel 1,24 Zellen, was 15,15 Zellen/mm² entspricht. Die Standardabweichung betrug $\pm 0,99$ Zellen pro Ausschnitt, im Diagramm 7 wurde der Standardfehler von $\pm 2,24$ Zellen/mm² dargestellt. In der Einzeltrauma-Gruppe wurden durchschnittlich 0,35 Zellen pro Ausschnitt gezählt (Standardabweichung $\pm 0,60$ Zellen/Ausschnitt), was

einer Zelldichte von 4,30 Zellen/mm² und einem Standardfehler von ±1,25 Zellen/mm² entspricht.

5.5. Primärer Auditorischer Cortex

Genau wie im MGB zeigte sich im primären auditorischen Cortex eine Poisson Verteilung (Kolmogorow-Smirnow-Test) der Daten. Die Signifikanzen wurden hier wie im MGB über die Binomial Formel berechnet ^[82]. Es wurde ein Boxplot Test zur Feststellung der Extremwerte durchgeführt. Nach Prüfung konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um falsch-positive Werte handelte. Keiner der Extremwerte wurde für die statistischen Berechnungen herausgenommen.

5.5.1. Schicht I des Primären Auditorischen Cortex

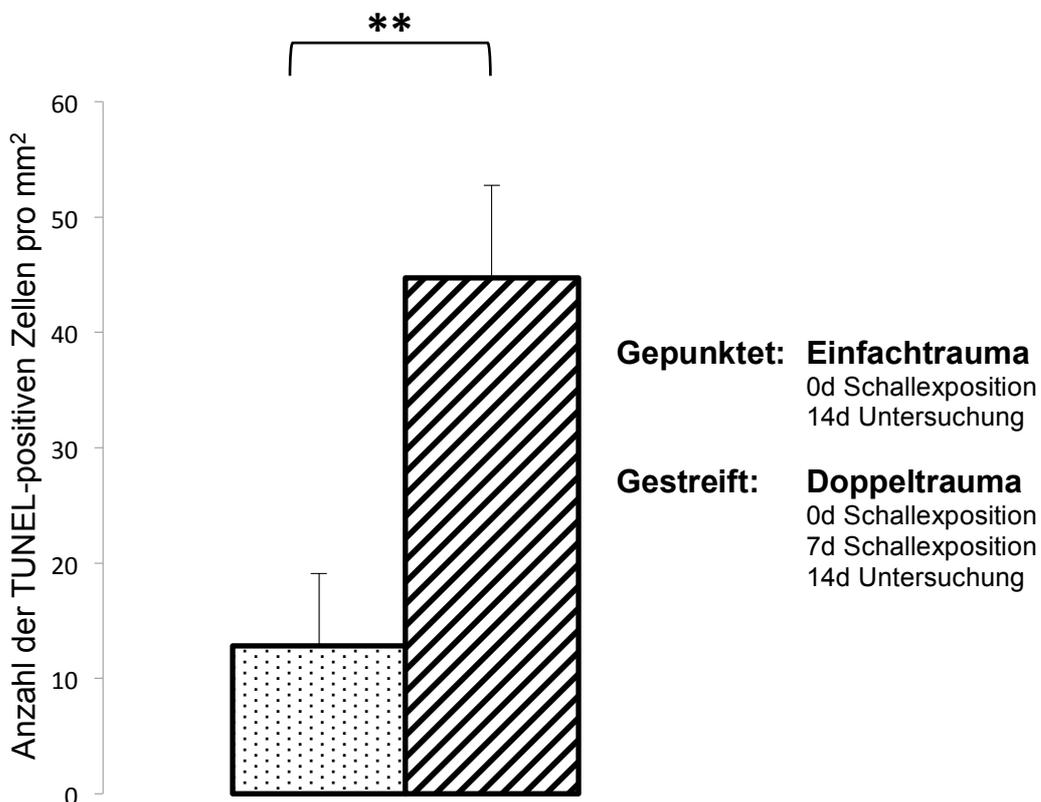


Diagramm 8 – TUNEL-Zelldichten der Schicht I des AI

Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche mit Standardfehler der untersuchten Gruppen. Der Unterschied war auf dem Niveau $0,001 \leq p < 0,01$ signifikant und wurde mit zwei Sternchen markiert ($p=0,001$).

39 Schnitte ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) der Doppeltrauma-Gruppe und 28 Schnitte ($n_{\text{Einfachtrauma}}=4$) der Einzeltrauma-Gruppe wurden in Schicht I des AI ausgewertet. Extremwerte waren

ERGEBNISSE

keine eliminiert worden. Durchschnittlich fanden sich 0,87 TUNEL-positive Zellen (Standardfehler $\pm 0,157$ Zellen/Ausschnitt) in den Ausschnitten der Doppeltrauma-Gruppe und 0,25 TUNEL-positive Zellen (Standardfehler $\pm 0,122$ Zellen/Ausschnitt) in der Einzeltrauma-Gruppe. Der Mittelwert der TUNEL-positiven Zellen der Doppeltrauma-Gruppe war gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe signifikant erhöht ($p=0,001$). Für Diagramm 8 wurden die Ergebnisse auf mm^2 umgerechnet. Die veranschaulichten Werte betragen $44,71 \text{ Zellen/mm}^2$ ($\pm 8,032 \text{ Zellen/mm}^2$) in der Doppeltrauma-Gruppe und $12,82 \text{ Zellen/mm}^2$ ($\pm 6,256 \text{ Zellen/mm}^2$) in der Einzeltrauma-Gruppe

5.5.2. Schicht II des Primären Auditorischen Cortex

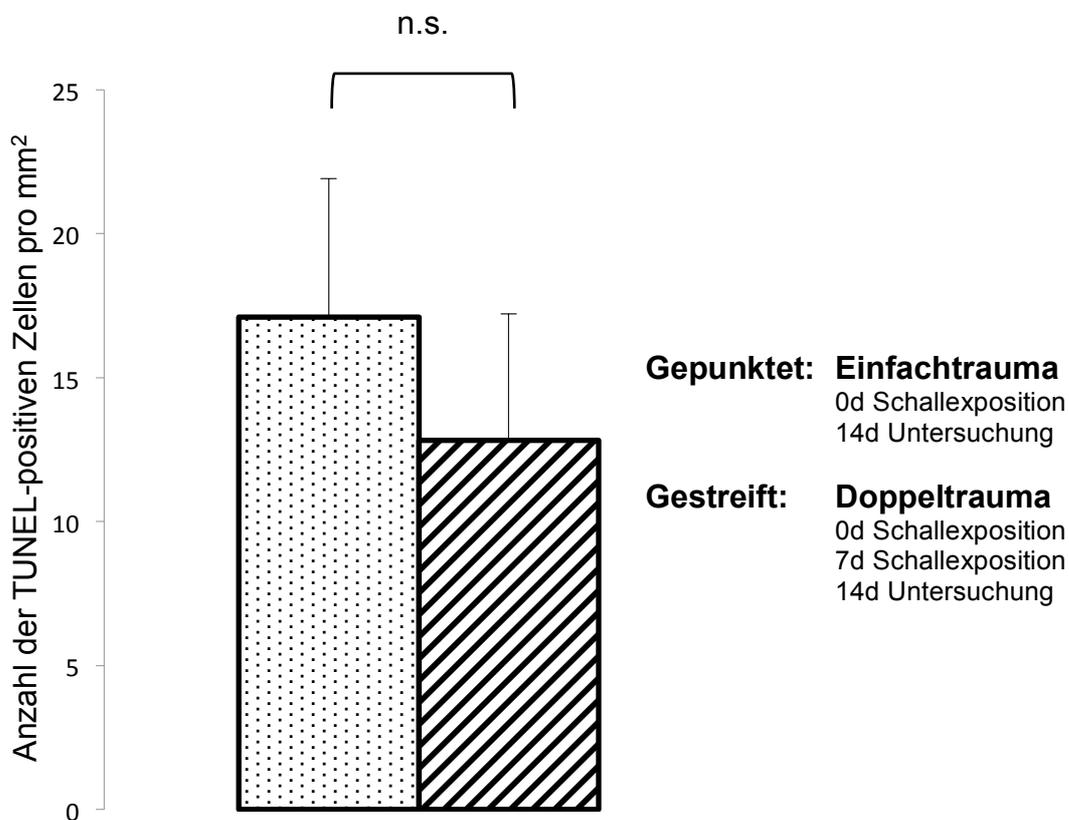


Diagramm 9 – TUNEL-Zelldichten der Schicht II des AI

Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche der beiden untersuchten Gruppen mit Standardfehler. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede auf dem Niveau $p < 0,05$.

Kein signifikanter Unterschied fand sich im Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der Schicht II des AI ($p=0,5198$). Untersucht wurden 33 Schnitte der Einfachtrauma-Gruppe, die von 5 verschiedenen Tieren stammten, mit

ERGEBNISSE

40 Schnitten der Doppeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$). Pro Ausschnitt fanden sich durchschnittlich 0,33 Zellen (Standardfehler $\pm 0,094$ Zellen/Ausschnitt) in der Einfachtrauma-Gruppe und 0,25 Zellen (Standardfehler $\pm 0,086$ Zellen/Ausschnitt) in der Doppeltrauma-Gruppe. Die Ergebnisse wurden auf mm^2 umgerechnet und in Diagramm 9 veranschaulicht. $12,82 \text{ Zellen/mm}^2$ ($\pm 4,403 \text{ Zellen/mm}^2$) errechneten sich in der Doppeltrauma-Gruppe, $17,09 \text{ Zellen/mm}^2$ ($\pm 4,821 \text{ Zellen/mm}^2$) betrug die errechnete Zelldichte der Einfachtrauma-Gruppe.

5.5.3. Schicht III des Primären Auditorischen Cortex

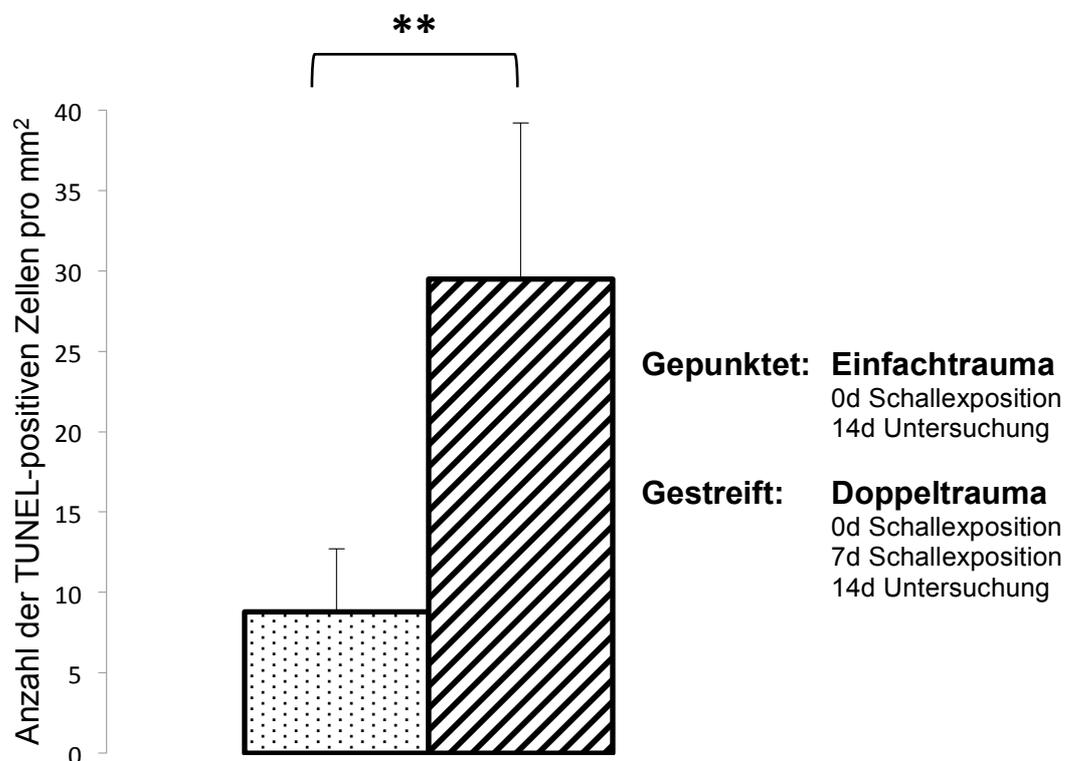


Diagramm 10 – TUNEL-Zelldichten der Schicht III des AI

Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche der untersuchten Gruppen mit Standardfehler. Der Unterschied war auf dem Niveau $0,001 \leq p < 0,01$ signifikant und wurde mit zwei Sternchen markiert ($p=0,005$).

Durchschnittlich 0,574 TUNEL-positive Zellen (Standardfehler $\pm 0,189$ Zellen/Ausschnitt) wurden in den 40 Ausschnitten der Doppeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) gezählt. Dies war signifikant mehr ($p=0.005$) als in der Einzeltrauma-Gruppe, wo sich im Mittel 0,171 Zellen (Standardfehler $\pm 0,077$ Zellen/Ausschnitt) pro Ausschnitt fanden. Das Ergebnis der Einfachtrauma-Gruppe wurde aus den Daten von 35 Ausschnitten aus 5 Tieren ausgewertet. Die Ergebnisse der Schicht III wurden in Diagramm 10

ERGEBNISSE

visualisiert. Dazu wurden die Zelldichten und der Standardfehler auf mm^2 umgerechnet: Die Zelldichte der Doppelgruppe betrug 29,49 TUNEL-positive Zellen/ mm^2 ($\pm 9,700$ Zellen/ mm^2). In der Einzeltrauma-Gruppe errechnete sich ein Wert von 8,791 Zellen/ mm^2 ($\pm 3,925$ Zellen/ mm^2).

5.5.4. Schicht IV des Primären Auditorischen Cortex

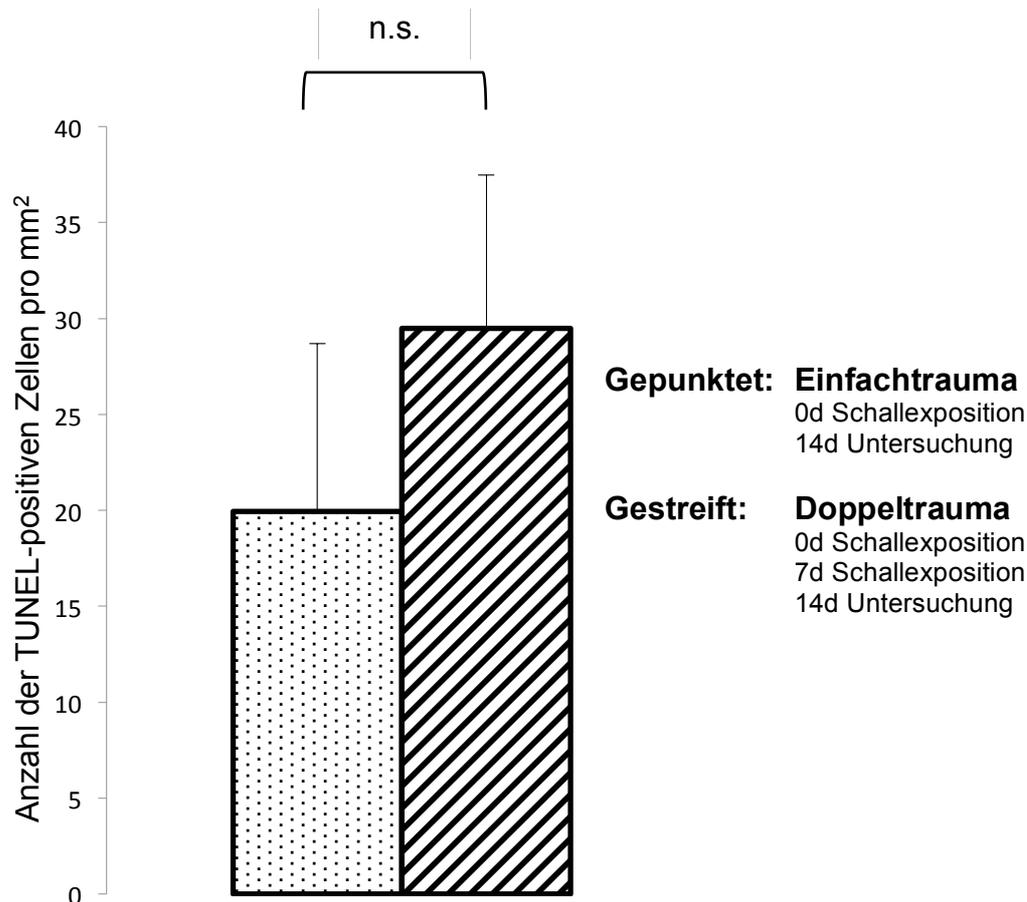


Diagramm 11 – TUNEL-Zelldichten der Schicht IV des AI

Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche mit Standardfehler der Versuchsgruppen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede auf dem Niveau $p < 0,05$.

40 Ausschnitte der Schicht IV der Doppeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) des AI wurden ausgewertet und mit den Ergebnissen aus 36 Ausschnitten der Einzeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Einzeltrauma}}=5$) verglichen. Durchschnittlich fanden sich 0,575 Zellen/Ausschnitt (Standardfehler $\pm 0,156$ Zellen/Ausschnitt) in der Doppeltrauma-Gruppe, was 29,49 Zellen/ mm^2 (Standardfehler $\pm 7,98$ Zellen/ mm^2) entspricht. Damit gab es keinen signifikanten Unterschied ($p=0,251$) zur Einzeltrauma-Gruppe, bei der sich im Mittel 0,389 Zellen/Ausschnitt (Standardfehler $\pm 0,170$ Zellen/Ausschnitt) fanden, was einer

ERGEBNISSE

durchschnittlichen Anzahl von 19,94 TUNEL-positiven Zellen/mm² (Standardfehler $\pm 8,735$ Zellen/mm²) entspricht. Diese Ergebnisse wurden in Diagramm 11 veranschaulicht.

5.5.5. Schicht V des Primären Auditorischen Cortex

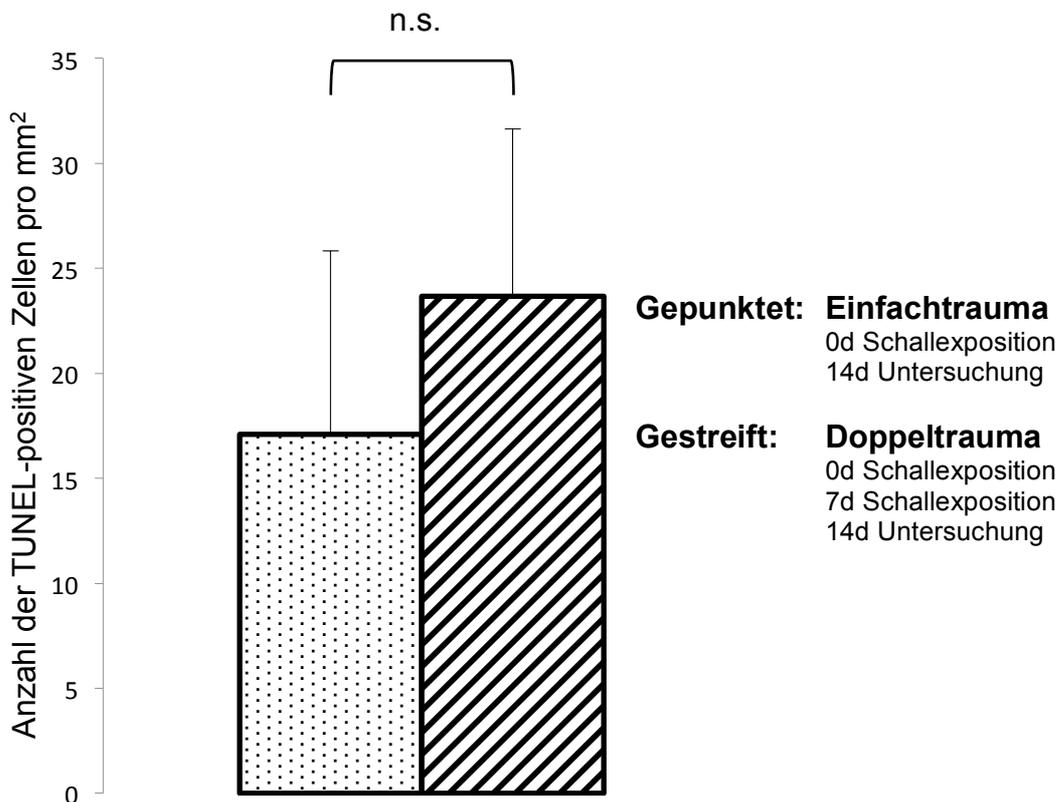


Diagramm 12 – TUNEL-Zelldichten der Schicht V des AI

Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche mit Standardfehler der Versuchsgruppen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede auf dem Niveau $p < 0,05$.

Es wurden jeweils 39 Ausschnitte der beiden Gruppen ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$, $n_{\text{Einzeltrauma}}=5$) ausgewertet. Durchschnittlich fanden sich 0,462 TUNEL-positive Zellen/Ausschnitt (Standardfehler $\pm 0,142$ Zellen/Ausschnitt) in der Doppeltrauma-Gruppe. Umgerechnet auf mm² entspricht dies 23,67 Zellen/mm² (Standardfehler $\pm 7,259$ Zellen/mm²). In der Einzeltrauma-Gruppe wurden in Mittel 0,333 TUNEL-positive Zellen pro Ausschnitt gezählt (Standardfehler $\pm 0,099$ Zellen/Ausschnitt). Für die Darstellung in Diagramm 12 wurde dieser Wert auf die Fläche in mm² umgerechnet, was 17,09 Zellen/mm² (Standardfehler $\pm 5,102$ Zellen/mm²) entspricht. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppe war nicht signifikant ($p=0,4731$).

5.5.6. Schicht VI des Primären Auditorischen Cortex

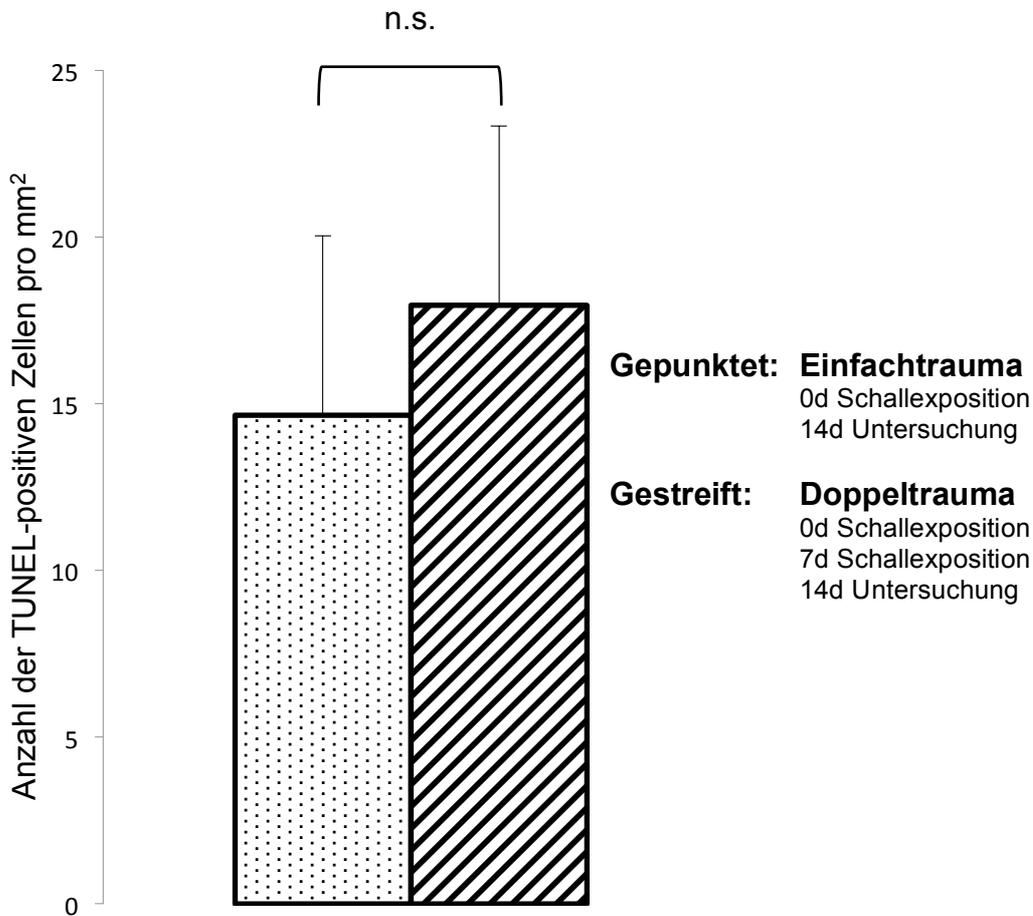


Diagramm 13 – TUNEL-Zelldichten der Schicht VI des AI

Vergleich der Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche mit Standardfehler der Versuchsgruppen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede auf dem Niveau $p < 0,05$.

In Diagramm 13 sind die Mittelwerte der Anzahl TUNEL-positiver Zellen aus 40 Schnitten der Doppeltrauma-Gruppe ($n_{\text{Doppeltrauma}}=4$) und 35 Schnitten der Einfachtrauma-Gruppe ($n_{\text{Einzeltrauma}}=5$) aufgetragen. Es wurden durchschnittlich 0,350 Zellen pro Ausschnitt in der zweifach beschallten Gruppe (Standardfehler $\pm 0,105$ Zellen/Ausschnitt) gezählt und 0,286 Zellen pro Ausschnitt in der 2 Wochen nach Einfachtrauma untersuchten Gruppe (Standardfehler $\pm 0,105$ Zellen/Ausschnitt). Umgerechnet auf mm^2 entsprechen diesen Werten 17,95 Zellen/ mm^2 ($\pm 5,369$ Zellen/ mm^2 , Doppeltrauma-Gruppe) und 14,65 Zellen/ mm^2 ($\pm 5,389$ Zellen/ mm^2 , Einzeltrauma-Gruppe). Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p=0,686$).

6 Diskussion

6.1. Die Bestimmung der frequenzspezifischen Hörschwelle

Zur Bearbeitung dieser Aufgabenstellung wurde die Schwelle der frühen akustisch evozierten Potentiale ermittelt. Die Antwort besteht aus fünf Wellen, die römisch nummeriert werden. Jede Welle wird als Reizantwort einer anatomischen Struktur interpretiert ^[84]. Analysiert werden die Amplituden und Latenzzeiten der Wellen. Dieses objektive Verfahren ist nichtinvasiv und wird durch Drogen oder Medikamente, zum Beispiel durch eine Anästhesie, nicht beeinflusst. Welle I und Welle II spiegeln beim Menschen ausschließlich die Reizantwort des Nervus Cochlearis wider. Welle I stellt den peripheren Anteil, also Haarzellennah, Welle II den mittleren Anteil des Nervens dar. Die Wellen III bis V sind die vermischten Reizantworten mehrerer anatomischer Strukturen, trotzdem geht der Großteil immer nur von einer Struktur aus. Welle III repräsentiert die Reaktion des Nucleus Cochlearis. Der Welle IV wird die Antwort der kontralateralen Oberen Olive zugeschrieben. Welle V soll die Reaktion des Lateralen Lemniscus genau am Übergang zum kontralateralen Colliculus Inferiores darstellen. Dies ist eine geläufige Interpretation der Wellen für den Menschen. Aufgrund der unterschiedlichen Anatomie beim Tier ändert sich die Interpretation der BERA Messung. Bei Katzen zum Beispiel ist der auditorische Nerv kürzer. Bei ihnen wird nur Welle I durch den achten Hirnnerv generiert. Welle II entspricht dann bereits der Reizantwort des Nucleus Cochlearis ^[5 85]. Das Verfahren eignet sich somit zur sicheren Berechnung einer frequenzspezifischen Hörschwellenverschiebung. Eine genauere Lokalisation einer Pathologie in der Maus wird dadurch jedoch erschwert.

Bei der Betrachtung der frequenzspezifischen Hörschwelle der Untersuchungsgruppen konnte ein Hörverlust der doppelbeschallten Gruppe gegenüber einfachbeschallten Tieren in allen getesteten Frequenzen festgestellt werden. Dieser Hörverlust war bei den Frequenzen 8 kHz, 12 kHz und 20 kHz statistisch signifikant.

Eine singuläre Beschallungen mit einem 10 kHz Ton der Intensität 115 dB SPL führte bei 3 Stunden Beschallung in einer anderen Untersuchung zu einem permanenten Hörverlust gegenüber einer unbeschallten, normalhörenden Kontrollgruppe ^[86 87]. In einer weiteren Studie wurden ABR Messungen von Mäusen direkt und eine Woche nach einem 3 stündigen Breitbandrauschen (5-20 kHz) mit 115 dB SPL durchgeführt und mit den prätraumatischen Ergebnissen verglichen. Die Tiere, die unmittelbar nach dem Trauma gemessen wurden, hörten auf allen gemessenen Frequenzen signifikant

DISKUSSION

schlechter. Es hatte sich ein temporärer Hörverlust eingestellt. Nach einer Woche Regeneration hatte sich der Hörverlust gegenüber der akut gemessenen Gruppe signifikant verbessert. Die prätraumatische Hörschwelle wurde jedoch nicht mehr erreicht, es hatte sich ein PTS ausgebildet. Je nach Frequenz bezifferte sich der gemessene Hörverlust, der eine Woche nach dem Trauma gemessenen Tiere, auf Werte zwischen 33 dB und 42 dB im Vergleich zur unbeschallten Kontrollgruppe ^[83]. Eine weitere Gruppe wurde, genau wie in dieser Arbeit, zwei Wochen nach einem Einzeltrauma gemessen. Im Vergleich zur unbeschallten Kontrolle hatte sich die Hörschwelle je nach Frequenz zwischen 26 dB und 44 dB verschoben. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zur Gruppe, die eine Woche nach dem Lärmtrauma gemessen wurde ^[83]. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, die in BERA Messungen Hörschwellenverschiebungen von 60 dB eine Woche und zwei Wochen nach einem 4 Stunden anhaltenden singulären Lärmtrauma mit 120 dB SPL fanden ^[88].

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur der Hörverlust einer Zweitbeschallung gegenüber einer Einzelbeschallung getestet. Der Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren wurde nicht durchgeführt. In den Ergebnissen ist zu erkennen, dass sich 7 Tage nach der Zweitbeschallung ein Hörverlust messen ließ. Die Unterschiede der Hörschwellen sind aber moderat und nur auf 3 getesteten Frequenzen signifikant. In absoluten Zahlen fand sich in der hier vorliegenden Arbeit ein Hörverlust zwischen 7,5 dB und 19,27 dB.

In der bereits zitierten Studie untersuchten Gröschel und Kollegen zusätzlich den Einfluss einer Zweitbeschallung auf die Verschiebung der Hörschwelle von normalhörenden Tieren. Es wurden die Daten, die auch für diese Arbeit verwendet wurden, zusätzlich in Bezug zu einer unbeschallten normalhörenden Kontrollgruppe gesetzt. Um den Fehler erster Art bei mehr als einem Test bei $p < 0,05$ zu halten, verschiebt sich das Signifikanzniveau. Dies erklärt mathematisch, weshalb nur bei 12 kHz ein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber einer Einzelbeschallung nachgewiesen wurde, obwohl es sich in absoluten Zahlen exakt um dieselben Werte wie in der vorliegenden Arbeit handelte ^[83].

Die dem dauerhaften Hörverlust zu Grunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen werden seit langem erforscht. Verschiedene Veränderungen wurden beobachtet aus denen zahlreiche Theorien und Hypothesen abgeleitet wurden.

DISKUSSION

Einerseits führen Schalldrücke hoher Intensität zu einer großen mechanischen Belastung, woraus eine direkte Schädigung folgt. Dazu zählen Risse des Trommelfells oder Dislokationen der Gehörknöchelchen ^[89 90]. Außerdem kommt es zu ultrastrukturellen Veränderungen: einige Forschungsgruppen beschrieben stark veränderte Stereozilien und konnten einen engen Zusammenhang zwischen der aufrechten Position der inneren Haarzellen und der neuronalen Erregungsschwelle feststellen ^[33]. Diese Effekte werden oft als eine der Erklärungen für einen TTS herangezogen. Ein weiteres Phänomen ist oxidativer Stress auf Grund einer Malperfusion in Folge eines Lärmtraumas ^[53]. Die Folge ist ein Hörverlust, der unter verschiedenen Bedingungen persistieren kann ^[38 91 92]. Denkbar wäre, dass eine Minderdurchblutung bestehen bleibt oder dass die resultierende Hypoxie irreversible Zelltodprozesse initiiert ^[93 94]. Es wurde bereits gezeigt, dass ein Schalltrauma die Apoptose und Nekrose der Haarzellen stimuliert, was eine Degeneration nach sich zieht. Gleichzeitig fand sich auch eine veränderte Expression der Gene, die sich für die Stimulation und Unterdrückung von Apoptose verantwortlich zeigen ^[48 95]. Diese Prozesse halten Tage an und führen zu einem Absterben der Haarzellen. Defekte Haarzellen verändern die Reizweiterleitung an zentrale Strukturen, was wiederum neurodegenerative Prozesse auslösen kann. Es kommt zu einer Reorganisation der auditorischen Strukturen, was auch zu Verschiebungen der Hörschwelle führen kann. Es ist davon auszugehen, dass diese Prozesse zum Zeitpunkt der Messung noch nicht abgeschlossen waren. Andere Gruppen fanden bis zu 21 Tage nach einer Lärmexposition noch veränderte Genexpressionen ^[96].

Außerdem sollte bei der Interpretation beachtet werden, dass eine BERA Messung Summenpotentiale basaler Strukturen aufzeichnet. Dazu zählen auch Strukturen, an denen Veränderungen beschrieben wurden, die an der Entstehung eines TTS beteiligt sind. Andererseits werden die Veränderungen der Reizantworten von MGB und AI gar nicht erfasst. Hypothetisch wäre denkbar, dass es auch in diesen nicht-erfassten Strukturen zu pathophysiologischen Veränderungen nach Lärm kommt. Zudem konnte bisher noch nicht gezeigt werden, welchen Einfluss veränderte Genexpressionen und Apoptoseraten auf die gemessenen Summenpotentiale, und damit auf das Ergebnis einer BERA Messung haben.

Bekannt ist jedoch, dass ein einzelnes Schalltrauma in Abhängigkeit von der Intensität und vom zeitlichen Abstand der Messung zum Trauma verschieden große Veränderungen der gemessenen Summenpotentiale verursachen kann ^[67 95 97]. In einer

DISKUSSION

anderen Studie wurden Ratten für nur 1 Stunde mit 118 dB SPL beschallt. Die Ergebnisse der BERA Messung entsprachen 30 Tage posttraumatisch wieder den prätraumatischen Werten. Nach 3 Wochen folgte eine zweite einstündige Beschallung mit 122 dB SPL, die zu einem drastischen Hörverlust einen Tag nach dem Trauma gegenüber der einfach beschallten Gruppe führte und auch noch 30 Tage später persistierte ^[97]. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Bei der Interpretation muss bedacht werden, dass der von Popelar und Kollegen gewählte Versuchsaufbau sich grundsätzlich vom Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit unterscheidet: im einen Fall wird das zweite Schalltrauma bei Tieren appliziert, bei denen sich zeitweise ein TTS fand, deren BERA Messergebnisse zum Zeitpunkt der zweiten Beschallung allerdings wieder das prätraumatische Niveau erreicht hatten. Außerdem war die Lautstärke des zweiten Traumas lauter gewählt als die des ersten ^[97]. Im anderen, für diese vorliegende Arbeit geltenden Fall, handelt es sich um ein zweites Schalltrauma, das auf Tiere trifft, deren Gehör bereits einen permanenten Hörverlust aufweist. Dies macht die Ergebnisse der beiden Untersuchungen nur bedingt vergleichbar. Ein weiterer Unterschied ist die gewählte Beschallungsdauer, die sich in den beiden Versuchsaufbauten unterschied. In einer anderen Untersuchung wurden Ratten 1 Stunde verschiedenen Schallmustern, unter anderem auch einem Breitbandrauschen, bei verschiedenen Schallintensitäten ausgesetzt. Es wurde geschlussfolgert, dass eine einstündige Beschallung der Intensitäten 105 – 120 dB SPL bei Ratten einen TTS provozieren, der ungefähr 2 Wochen anhält. Die Höhe des TTS hing dabei maßgeblich von der Beschallungsintensität ab ^[98]. Man weiß, dass neben der Intensität auch die Beschallungsdauer einen wichtigen Beitrag zur Verschiebung der Hörschwelle leistet. Die für die vorliegende Arbeit verwendete 3 stündige Beschallung mit 115 dB SPL führt wahrscheinlich zu einem PTS. In der zitierten Arbeit von Popelar et al. führte eine höhere Beschallungsintensität mit 118 dB SPL vermutlich auf Grund der geringeren Beschallungsdauer von 1h zu einem TTS, das sich zum Zeitpunkt der Zweitbeschallung möglicherweise vollständig regeneriert hatte ^[67 97].

In der vorliegenden Arbeit war der Effekt eines zweiten Schalltraumas auf die BERA Schwellen nicht sehr groß. Der Hörverlust der zweifach beschallten Tiere im Vergleich zu den einfach beschallten Tieren fällt in absoluten Zahlen kleiner aus als der Vergleich zwischen prätraumatischem Niveau und Tieren, die nach einem singulären Schalltrauma gemessen wurden ^[67 83]. Eine Erklärungshypothese könnte sein, dass die

durch das erste Schalltrauma irreversibel zerstörten Strukturen, die sich für einen PTS verantwortlich zeigen, nicht mehr oder zumindest weniger auf ein Zweittrauma ansprechen. Die basalen Strukturen sind nach einem regenerierten TTS eventuell weniger vorgeschädigt als bei einem PTS und könnten dadurch sensibler auf ein Zweittrauma reagieren.

Auch andere Umstände haben einen Einfluss auf die Wirkung eines Lärmtraumas. Es gibt Untersuchungen, die gezeigt haben, dass sich die Regenerationsfähigkeit des Ohres verändert. Mäuse, denen im Alter von 6 Wochen einseitig das Innenohr operativ zerstört wurde, entwickelten einen PTS, während sich die beidseits hörenden Kontrollgruppe nach demselben Lärmtrauma wieder vollständig regenerierte. Eine Erklärungshypothese sind veränderte neuronale Strukturen ^[99].

6.2. Untersuchung der Apoptoseraten nach einer Lärmexposition

Es wurde bereits erwähnt, dass hohe Lautstärken zu einer Hypoxie in der Cochlea führen. Hypoxie, beziehungsweise der oxidative Stress, gelten als Initiator für Zelltodmechanismen. Es wurden Zelltodmechanismen der Haarzellen nach Traumata nachgewiesen. In Ratten wurde der zeitliche Verlauf der Apoptose der Haarzellen nach einem Lärmtrauma beschrieben. Nach 7 Tagen hatte sich die Anzahl der apoptotischen Haarzellen wieder auf das physiologische Niveau der unbeschallten Kontrolle begeben. Nach 7 Tagen waren die untersuchten pro- und antiapoptotischen Gene auch wieder auf dem prätraumatischen Niveau ^[100]. Ein früher Apoptosebeginn der Haarzellen fand sich auch in anderen Studien ^[49]. In einer Untersuchung an Chinchillas fand sich nach einem Lärmtrauma an dem Teil der Cochlea, der maximal stimuliert wurde, auch die meisten apoptotischen äußeren Haarzellen. Im Laufe der Zeit verschoben sich die apoptotischen Prozesse in Richtung des basalen Endes der Cochlea. Die Abnahme der äußeren Haarzellen setzte sich sowohl in basaler als auch in apikaler Richtung der Ausgangsläsion fort ^[101]. Diese oder ähnliche Prozesse könnten sich auch in der zentralen Hörbahn manifestieren und wiederfinden lassen.

6.2.1. Basale Strukturen

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Fläche in den basalen Strukturen. Im VCN, DCN und ICC fanden sich zwar 7 Tage nach dem Zweittrauma etwas mehr TUNEL-positive Zellen als 14 Tage nach einem Einzeltrauma, dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

DISKUSSION

In einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe beschallten Coordes et al. Mäuse nach demselben Schema wie in dieser vorliegenden Arbeit. Es wurden die apoptotischen Vorgänge jedoch zu anderen Zeitpunkten (unmittelbar, 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach dem Trauma) und nur im CN und IC bestimmt ^[77].

6.2.1.1. Ventraler Nucleus Cochlearis

Coordes et al. fanden, dass im VCN die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen schon unmittelbar nach einem Einzeltrauma gegenüber der unbeschallten Kontrolle erhöht war. Die Apoptose erreichte nach ungefähr 6 Stunden das gemessene Maximum und hatte 7 Tage nach dem Einzeltrauma wieder das prätraumatische Niveau angenommen ^[77].

In der hier vorliegenden Arbeit fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der zwei Wochen nach Einzelbeschallung und der eine Woche nach Zweitbeschallung untersuchten Gruppe.

Offensichtlich beginnen die Zelltodmechanismen im VCN nach einer singulären Beschallung unmittelbar nach dem Trauma und enden vor dem siebten posttraumatischen Tag. Auf Grund früherer Arbeiten können wir davon ausgehen, dass in der für diese vorliegende Arbeit untersuchten Einzeltrauma-Gruppe die Apoptose bereits abgeschlossen war ^[77]. Wenn durch eine zweite Beschallung Zelltodmechanismen initiiert werden, scheinen diese auch vor dem siebten Tag nach dem zweiten Trauma abgeschlossen zu sein. Diese Hypothese könnte erklären, weshalb sich zwischen der für diese vorliegende Arbeit untersuchten Einzeltrauma- und Doppeltrauma-Gruppe keine signifikanten Unterschiede finden ließen.

Apoptosevorgänge könnten die Grundlage für Zellverluste im Bereich der Hörbahn sein, die nach Lärmtrauma beschrieben wurden. Es fand sich beispielsweise im VCN unmittelbar nach einem singulären Schalltrauma eine signifikant erniedrigte Neuronendichte im Vergleich zum prätraumatischen Niveau. Die Neuronendichte nahm in derselben Struktur im posttraumatischen Verlauf noch weiter ab. Eine Woche nach einem singulären Schalltrauma war die Neuronenzahl pro ausgewerteten Ausschnitt noch weiter gesunken ^[67]. Der Zellverlust könnte das morphologische Korrelat der Apoptose darstellen. Die Apoptose scheint eine Woche nach einem singulären Schalltrauma im Vergleich zum prätraumatischen Niveau nicht mehr signifikant erhöht zu sein. Interessant wäre die Bestimmung der Neuronendichte zu späteren Zeitpunkten

DISKUSSION

als eine Woche nach einem singulären Schalltrauma sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem zweiten Lärmtrauma.

Mit einer solchen Untersuchung könnte herausgefunden werden, inwieweit sich BERA Messungen, Zelltodmechanismen und Zellverlust bei bestehendem PTS korrelieren lassen. Setzt man voraus, dass der Zellverlust das morphologische Korrelat der Apoptose ist, könnte dies auch Aufschluss darüber geben, ob eine Woche nach der Zweitbeschallung die Apoptose durch das zweite Lärmtrauma bereits abgeschlossen ist. Die Ergebnisse der Zelltodmechanismen in Kombination mit den Ergebnissen der BERA Messung nach einem zweiten Lärmtrauma, werfen die Frage auf, inwieweit Apoptose durch ein zweites Lärmtrauma im Bereich des VCN überhaupt stimuliert wird. Eine alternative Überlegung wäre, dass es nach dem ersten Trauma kaum noch lärmsensible Strukturen im VCN gibt. Ein zweites Trauma hätte folglich wenig bis keinen Effekt auf die Zelltodmechanismen. Diese Hypothese könnte auch erklären, warum sich die gemessenen Zelltodmechanismen der vorliegenden Arbeit in der Einfachtrauma- und Doppeltrauma-Gruppe nicht signifikant unterscheiden.

Immer wieder wird Deprivation als Grund für die Veränderungen der Hörbahn nach einem Lärmtrauma diskutiert ^[102]. Nach einer vollständigen unilateralen auditorischen Deprivation durch Entfernen der Cochlea konnte nachgewiesen werden, dass der Einfluss auf die Neuronendichte im AVCN stark mit dem Alter des Tieres zum Zeitpunkt der OP zusammenhängt. Untersucht wurden die Tiere zwei Wochen nach der Operation. Bei jungen Tieren fanden sich nach zwei Wochen hochsignifikante Verluste. Bei Tieren mit einem zum Operationstermin ausgereiften Hörsystem fand sich zwischen ipsi- und kontralateraler Seite kein signifikanter Unterschied ^[103]. Offensichtlich setzen die Effekte der Deprivation beim Erwachsenen später oder gar nicht ein. Eine weitere Erkenntnis der zitierten Arbeit war, dass Zelltodmechanismen dem Zelluntergang durch Deprivation zu Grunde liegen. Mostafapour et al. fanden Apoptose nur bei den Tieren, die auch einen Zellverlust infolge der Deprivation zeigten. Der zeitliche Verlauf der Apoptose passte dabei gut zum Zellverlust ^[103]. Es fand sich, dass sich bei ausgereiftem Hörsystem die Deprivation zwei Wochen nach Cochlea-Entfernung noch nicht in einem Neuronenverlust manifestiert hatte ^[103]. Diese Untersuchungen stützen die These, dass der Effekt der Deprivation zu den untersuchten Zeitpunkten dieser vorliegenden Arbeit, wenig bis keinen Einfluss auf die Apoptoseraten genommen hatte. In anderen Studien fand sich ein Einfluss der Deprivation auf die zentralen Strukturen auch bei adulten Tieren. 5 Wochen nach einer mechanischen Kompression des

DISKUSSION

Hörnervs, der die Haarzellen intakt ließ, fand sich ein signifikanter Zellverlust im PVCN und DCN bei Ratten ^[68 70]. Auch in anderen Arbeiten fanden sich Folgen von Deprivation bei adulten Tieren. 8 Wochen nach einer Vergiftung des Innenohres mit Neomycin fand sich im AVCN eine Zellreduktion von 22% ^[104]. Offensichtlich kann die operative oder pharmakologische Vertäubung durch Zerstörung der Cochlea genauso wie ein akustisches Trauma einen Zellverlust provozieren. Es gibt weitere Unterschiede und Gemeinsamkeiten. Man fand, dass ein akustisches Trauma die Proteinexpression der Hörbahn verändert. Eine Studie untersuchte die ipsi- und kontralaterale Expression von Proteine im DCN, IC und AC bis zu 32 Tage nach einem einstündig monoaural applizierten Lärmtrauma (115 dB SPL, 16 kHz) bei jungen adulten Ratten. Das Trauma provozierte einen PTS und es fanden sich deutliche Veränderungen der Expression von Proteinen, die im Zusammenhang mit Exzitation und Inhibition von Neurotransmittern sowie Neuronenplastizität stehen. Die Expression des calciumbindenden Proteins Calb1 nahm unmittelbar nach dem Lärmtrauma ab und erreichte erst am 32. posttraumatischen Tag wieder das prätraumatische Niveau. Calb1 wird eine neuroprotektive Funktion gegen Neuronenschäden als Folge von Exzitotoxizität zugeschrieben. Es wurde geschlussfolgert, dass die signifikante Abnahme von Proteinen, die inhibitorisch auf die Neurotransmission wirken, zu einer Gesamtzunahme der Neuronenexzitation führt ^[105]. Diese Verschiebung des Verhältnisses aus Exzitation und Inhibition könnte zur Exzitotoxizität führen. Veränderte neuronale Aktivität nach einem Lärmtrauma wurde von verschiedenen Forschungsgruppen beschrieben. Bei Katzen fand sich nach einem einstündigen Lärmtrauma mit der Intensität 115-120 dB SPL eine Veränderung der Spontanaktivität im AC ^[106]. Bei Meerschweinchen fand sich 2 und 4 Wochen nach einem einseitig applizierten einstündigen Lärmtrauma (124 dB SPL, 10 kHz Reinton) eine signifikante Zunahme der Spontanaktivitäten des ipsi- und kontralateralen IC. Diese resultierende Hyperaktivität wird im Zusammenhang mit der Entstehung von Tinnitus diskutiert ^[107]. In einer anderen Untersuchung setzte sich dieselbe Forschungsgruppe mit der Spontanaktivität des IC bei Meerschweinchen 1 Woche nach einer einseitigen mechanischen Ertäubung auseinander. Ähnlich wie nach einem akustischen Trauma fand man eine Zunahme der Spontanaktivität im IC. Gleichzeitig wurde eine Abnahme von Expression von Genen, die inhibitorisch auf die Neurotransmission wirken, im CN und IC festgestellt ^[108].

Obwohl ein Lärmtrauma, Cochlea Ablation beziehungsweise die mechanische Zerstörung der Cochlea alle zu einer Taubheit führen, ist das eigentliche Trauma sehr

DISKUSSION

verschieden. Es scheint gut möglich, dass die verschiedenen Traumahergänge verschiedene Plastizitätsmechanismen provozieren. Eine akustische Überstimulation hat direkten Einfluss auf die Reizweiterleitung und die Erregung der Neurone. Eine mechanische Zerstörung des Innenohres provoziert im ersten Moment keinen direkten Stimulus. Dong und seine Kollegen beschrieben sowohl nach einer mechanischen Vertäubung als auch nach einem akustischen Trauma ähnliche Auswirkungen auf die Spontanaktivitäten der Neuronen des IC und auf die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Exzitation und Inhibition. Gleichzeitig stellten sie signifikante Unterschiede in der Genexpression fest ^[107 108]. Die verschiedenen Traumahergänge stimulierten offensichtlich verschiedene Gene, welche zu einem ähnlichen Resultat führten. Die beiden Studien sind allerdings nur bedingt vergleichbar, weil sich der posttraumatische Untersuchungszeitpunkt unterschied. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Folgen von Deprivation und akustischer Überstimulation auf den ersten Blick ähnlich erscheinen. Es kommt zu einem Zellverlust, die Genexpression verändert sich und die Spontanaktivität nimmt zu. Obwohl die Symptome und pathophysiologischen Veränderungen in eine ähnliche Richtung gehen, ist es möglich, dass den Veränderungen verschiedene pathophysiologische Mechanismen zu Grunde liegen. Je nach Trauma wird der eine oder andere Mechanismus mehr provoziert. Die Resultate könnten letztlich trotzdem ähnlich sein. Möglich wäre, dass sie zu einem anderen Zeitpunkt auftreten. Für diese Hypothese spricht auch der unmittelbar nach einem Lärmtrauma nachgewiesene Zellverlust im VCN ^[67], der sich nach einer Cochlea Ablation erst zu späteren Zeitpunkten finden ließ ^[103]. Ein anderes Beispiel wäre die Zunahme der Spontanaktivität, die bei einer Cochlea Ablation oder akustischen Überstimulation mit der Aktivierung verschiedener Gene einhergeht ^[107 108]. Der Einfluss der Deprivation auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist, auf Grund der teilweise widersprüchlichen Studienlage zur Cochlea Ablation, schwer einzuschätzen. Nur weil die Anzahl TUNEL-positiver Zellen im VCN nach 7 Tagen wieder das prätraumatische Niveau erreicht hatte ^[77], muss nicht gesagt sein, dass dies nach 14 Tagen noch immer so ist. Durch den mangelnden Input einer zerstörten Cochlea könnte, auf Grund der Folgen von Deprivation, die Apoptose auch zu einem späteren Zeitpunkt wieder ansteigen. Eine Analyse der Zelldichten beziehungsweise des Zellverlustes der Gruppen der vorliegenden Arbeit könnte bei der Beantwortung dieser Fragen hilfreich sein.

DISKUSSION

Eine weitere Überlegung ist, inwieweit sich eine Korrelation zwischen neuronaler Aktivität und Apoptose herstellen lässt. Mittels MEMRI-Technik (manganese-enhanced magnetic resonance imaging) lassen sich Ca^{2+} -abhängige Aktivitäten messen. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem Schalltrauma, das dem für diese vorliegende Arbeit verwendeten gleich ist, wurde den Versuchstieren Mangan appliziert. 24 Stunden nach der Applizierung wurde eine Aufnahme des Gehirns mittels MRT (Magnetresonanztomographie) vorgenommen. Sieben Tage nach einer Zweitbeschallung fand sich ein, gegenüber der zwei Wochen nach Ersttrauma untersuchten Gruppe, signifikant erhöhtes Signal. Die gemessene Erhöhung lag bei 8,3%. Die eine Woche nach Ersttrauma untersuchte Gruppe war gegenüber einer unbeschallten Kontrolle dagegen nicht signifikant erhöht. Es wurde geschlussfolgert, dass die Erhöhung des Signals nicht nur neuronale Hyperaktivität widerspiegelt. Es wurde die Annahme formuliert, dass der Anstieg von Calcium auch mit neuroprotektiven Mechanismen einhergehen könnte ^[83].

Die Hypothese, dass eine Erhöhung der calciumabhängigen Aktivität einen protektiven Mechanismus darstellt, passt zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Eine Woche nach Zweittrauma fand sich keine signifikante Veränderung der TUNEL-positiven Zellen.

Diese Hypothese lässt sich allerdings nicht für die von Coordes et al. untersuchte Akutgruppe behaupten. Zu diesem Zeitpunkt fanden sich signifikant mehr Zelltodmechanismen ^[77] und signifikant erhöhte calciumabhängige neuronale Aktivitäten gegenüber dem prätraumatischen Niveau ^[83].

6.2.1.2. Dorsaler Nucleus Cochlearis

In früheren Untersuchungen konnten, im Vergleich zum VCN, im DCN erst mit einem größeren zeitlichen Abstand zum Lärmtrauma TUNEL-positive Zellen nachgewiesen werden. Coordes et al. fanden erst 24 Stunden nach einem Schalltrauma einen signifikanten Anstieg TUNEL-positiver Zellen im Vergleich zur prätraumatischen Kontrolle. Im Gegensatz zum VCN war im DCN die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen 7 Tage posttraumatisch noch immer signifikant erhöht ^[77]. In der vorliegenden Arbeit fand sich kein signifikanter Unterschied der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen im DCN der zwei Wochen nach einem Einzeltrauma, im Vergleich zu den eine Woche nach einem Zweittrauma untersuchten Tieren.

Dies kann durch zwei Hypothesen erklärt werden: die Ergebnisse der untersuchten Gruppen unterscheiden sich entweder nicht, weil beide Gruppen einen ähnlich

DISKUSSION

unphysiologisch hohen Zelltod aufweisen, oder weil sich die gemessenen Werte beider Gruppen bereits wieder im physiologischen Bereich bewegen. Es wurde bereits gezeigt, dass sich der zeitliche Verlauf der Apoptose im DCN vom VCN unterscheidet ^[77]. Denkbar wäre, dass die Rate der Zelltodmechanismen nach einem singulären Schalltrauma auf einem erhöhten Niveau persistiert oder nur sehr langsam wieder abnimmt. Die zwei Wochen nach Einzeltrauma untersuchte Gruppe hätte also nach wie vor eine unphysiologisch hohe Zelltodrate. Eine so lange anhaltende Apoptose könnte mit der multisensorischen Innervation des DCN zusammenhängen, die in anderen Studien gezeigt wurde. Offensichtlich innerviert ganz speziell der Nervus Trigemini auch den dorsalen Nucleus Cochlearis. Dieser Input könnte nach einem Schalltrauma mehr Gewicht bekommen ^[88]. Aber auch weitere nicht-auditorische Strukturen, beispielsweise der Locus Coeruleus oder die Formatio Reticularis, beeinflussen den CN ^[109]. Denkbar wäre, dass die primär nicht-auditorischen Strukturen des CN auch durch ein Lärmtrauma absterben. Grundlage für diese Annahme sind Untersuchungen aus anderen Strukturen wie dem limbischen System, die primär nicht dem Hören zugeordnet werden und Veränderungen nach Lärm zeigen ^[110]. Im Hippocampus fanden sich verschiedene Veränderungen nach einem Lärmtrauma: nach einem zweistündigen singulärem Lärmtrauma der Intensität 126 dB SPL wurde eine signifikant reduzierte Neurogenese nachgewiesen ^[111]. Es ist denkbar, dass das Absterben der primär nicht-auditorischen Strukturen nach einem Lärmtrauma einen anderen zeitlichen, nämlich später einsetzenden Verlauf nimmt als der Untergang der lärmsensiblen Strukturen. Diese Annahme unterstellt, dass das Absterben dieser primär nicht-auditorischen Strukturen nicht direkt vom Lärm abhängig, sondern eine Folge der resultierenden Umstrukturierungsmaßnahmen nach einem Lärmtrauma ist. Unter Umständen fiel das Absterben der primär nicht-auditorischen Strukturen im DCN zeitlich in den Untersuchungszeitpunkt der Einzeltrauma-Gruppe und könnte somit eine unphysiologisch hohe Zelltodrate erklären.

Eine andere Hypothese ist, dass ein zweites Lärmtrauma die Zelltodrate weniger stark bis gar nicht stimuliert, da die vorgeschädigte Cochlea durch den Verlust von Afferenzen weniger in der Lage ist, die zentralnervösen Eingänge der Hörbahn durch Überstimulation zu schädigen. Es kommt folglich zu einer geringeren Reizung der zentralen Strukturen und die Folgen der Exzitotoxizität blieben geringer. Zur Bekräftigung beziehungsweise Widerlegung der beiden Thesen wäre ein Vergleich mit einer prätraumatisch untersuchten Gruppe sinnvoll.

DISKUSSION

Auch im DCN fanden sich eine Woche nach einem Schalltrauma signifikant weniger Zellen. Im hochfrequenten Bereich betrug der Verlust etwa 39%, im tieffrequenten Bereich beziffert sich der Verlust auf 30%. Unmittelbar nach einem Schalltrauma wurde im DCN kein Zellverlust beschrieben^[67]. Dieser Zellverlust passt im zeitlichen Verlauf zu den von Coordes und Kollegen beschriebenen Apptoseraten. Man könnte argumentieren, da die Apoptose erst 24 Stunden nach dem Trauma signifikant erhöht war, dass sich der aus der Apoptose resultierende Zellverlust noch nicht in den zitierten Messungen der Neurondendichte niedergeschlagen hatte. Da die Apoptose über den siebten posttraumatischen Tag hinweg erhöht blieb, wäre ein Auszählen der Neuronendichte zu einem späteren Zeitpunkt sehr interessant^[77]. Zur besseren Interpretation der Daten der hier vorliegenden Arbeit, wäre auch der Einfluss einer Zweitbeschallung auf die Dichte der Neuronen von höchstem Interesse.

Zu denselben Zeitpunkten, zu denen für diese Arbeit die Zelltodmechanismen bestimmt wurden, wurde in einer anderen Arbeit die calciumabhängige neuronale Aktivität durch Mangan gemessen. Es fand sich eine signifikante Erhöhung um 7,3% in der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe. Wie im VCN wurden neuroprotektive Mechanismen durch Calcium diskutiert^[83]. Neuroprotektive Mechanismen könnten erklären, warum es keinen signifikanten Unterschied der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen der für diese Arbeit untersuchten Gruppen gab. Im DCN wäre diese These auch in Einklang mit der erhöhten calciumabhängigen neuronalen Aktivität unmittelbar nach Schalltrauma. Die Mangananreicherung hatte unmittelbar nach einem Schalltrauma um 7,2% zugenommen, wobei dieses Ergebnis die Akkumulation über einen Zeitraum von 24 Stunden ab dem Trauma darstellt^[83]. In den zitierten Messung fand sich akut und 6 Stunden posttraumatisch noch keine signifikante Erhöhung der Apptoseraten, sondern erst 24 Stunden nach dem Trauma^[77].

Viele molekulare Mechanismen sind noch nicht verstanden. Verschiedene Ionen und deren Konzentration im Intra- und Extrazellulärraum scheinen in den Signalkaskaden von Apoptose ihren Anteil zu haben. Calcium selbst, sowie spannungs- oder ionengesteuerten Calciumkanälen werden bei der Auslösung von Zelltodkaskaden eine besondere Rolle zugeschrieben^[112]. Je nach Versuchsaufbau und Untersuchung finden sich verschiedene Zusammenhänge. Sowohl erhöhte als auch erniedrigte Calciumkonzentrationen werden mit der Verminderung sowie der Stimulation von Nekrose und Apoptose in Zusammenhang gebracht. In einer Untersuchung zu ischämisch bedingter Apoptose wurde nachgewiesen, dass die künstliche Erhöhung

DISKUSSION

von Calcium die Apoptose vermindern kann ^[113 114]. NMDA-Rezeptor gesteuerte Prozesse und deren Wirkung auf den Calciumhaushalt werden auch in der Verhinderung von Neurodegeneration diskutiert ^[112]. In einer anderen Studie fand sich, dass eine Zunahme der Calciumkonzentration den Wegfall anderer trophischer Faktoren ausgleichen kann. Damit wird ein Zelltod verhindert ^[115]. Ein ähnlicher Zusammenhang könnte auch in der Hörbahn gegeben sein. Calcium würde somit die Strukturen vor dem Zelluntergang bewahren. In einer weiteren Arbeit wurde postuliert, dass der Calciumeinfluss über Kalium-gesteuerte Kanäle eine Neuronendegeneration verhindern kann. Der schützende Effekt wurde unter anderem auch in der Intensität und Dauer des Einstroms gesehen ^[116].

Hohe Schalldrücke zogen einen reduzierten Blutfluss, der ischämische Ausmaße annehmen kann, in der Cochlea nach sich ^[39]. Eine Ischämie ist ein klassischer Zustand, der Apoptose einleitet. Eine erzwungene Ischämie der Cochlea sorgte nicht nur für einen Anstieg der Apoptose der äußeren, sondern auch der inneren Haarzellen ^[84]. Wie bereits erwähnt sorgte eine Ischämie nicht nur für Haarzellverlust sondern auch für einen Zellverlust der Spiralganglienzellen ^[56]. Es ist denkbar, dass das Lärmtrauma eine Ischämie der basalen Strukturen provoziert hat. Interessanterweise kann die Hypoxie-induzierte Apoptose der Haarzellen durch Calpain-Inhibitoren gesenkt werden. Calpain ist eine Protease, der eine Rolle in Zelltodmechanismen zu geschrieben wird, vor allem bei ischämischer Apoptose. Ihre Aktivierung scheint über veränderte Calcium-Konzentrationen statt zu finden ^[54]. Möglicherweise nimmt auch im CN Calcium einen Einfluss auf die Apoptose über Calpain.

6.2.1.3. Zentraler Colliculus Inferior

Im ICC fand sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl von TUNEL-positiven Zellen zwischen den beiden für diese vorliegende Arbeit untersuchten Gruppen, die eine Woche nach einem Zweittrauma, beziehungsweise zwei Wochen nach einem singulären Schalltrauma untersucht wurden.

Obwohl im ICC unmittelbar nach einem singulären Schalltrauma Zelltodmechanismen signifikant häufiger nachgewiesen wurden als prätraumatisch ^[77], hatte dies noch keinen Einfluss auf die Neuronendichte ^[67]. Eine Woche nach dem singulären Schalltrauma betrug der Zellverlust dagegen 31% ^[67], die Apoptoserate hatte zu diesem Zeitpunkt das Maximum überschritten, war aber noch immer signifikant erhöht ^[77].

DISKUSSION

Gröschel et al. fanden in ihrer Untersuchung zum Zellverlust bei den prätraumatischen Tieren im ICC eine normalisierte durchschnittliche Zelldichte von $503,4 \pm 6,2$ Zellen pro Ausschnitt. Im VCN betrug dieser Wert $105,5 \pm 2,1$, in der fusiformen Zellschicht des DCN zählten sich $81,5 \pm 1,4$ Zellen pro Ausschnitt im hochfrequenten Bereich und $84,6 \pm 1,7$ Zellen pro Ausschnitt im niederfrequenten Bereich ^[67]. Rechnet man diese Werte auf eine einheitliche Fläche um findet sich in der dicht gepackten Fusiformschicht des DCN eine zirka doppelt so große Neuronendichte wie im ICC. Die generelle Neuronendichte des ICC kann alleine also nicht erklären, dass im ICC, in absoluten Zahlen, deutlich weniger Zellen pro Fläche als TUNEL-positiv gezählt wurden als im CN ^[117 118]. Coordes et al. stellten bei einer Untersuchung der Apoptose des ICC ähnliches fest. Im VCN wurden drei Mal mehr TUNEL-positive Zellen als im ICC beschrieben ^[77]. Ähnliche Verhältnisse der gezählten Zellen ließen sich in dieser Arbeit zwischen ICC und DCN finden. Apoptose als spezielle Form des Zelluntergangs ist ein natürlicher Prozess und im adulten Organismus unerlässlich. In allen lebenden Geweben findet sich immer auch in einem physiologischen Maß Apoptose, das Ausmaß variiert jedoch von Struktur zu Struktur. Die physiologische Apoptoserate könnte im ICC generell niedriger sein als im CN. Der prozentuale Anstieg der Apoptose im IC könnte nach einem Schalltrauma im Verhältnis zur unbeschallten Kontrolle aber ähnlich hoch sein wie im CN.

Die Hypothese der geringeren Apoptose könnte auch erklären, warum sich die von Coordes et al. beschriebenen Anstiege der Zelltodmechanismen in der Akutgruppe nicht in den von Gröschel et al. durchgeführten histologischen Zelldichtenbestimmungen des ICC zum selben Zeitpunkt nachweisen ließen: der resultierende Neuronenverlust hatte möglicherweise in einer zellichten Struktur wie dem ICC noch kein statistisch relevantes Maß angenommen. Gleichzeitig könnte der durch die Apoptose provozierte akkumulierte Neuronenverlust innerhalb einer Woche ähnlich große Effekte wie im CN haben, weil die Apoptose im ICC länger anzuhalten scheint. Diese Annahme könnte die Tatsache erklären, warum sich der in einer anderen Arbeit gemessene Neuronenverlust eine Woche nach einem singulären Schalltrauma im VCN, DCN und ICC jeweils im Bereich von 30% bewegte ^[67 77].

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Gruppen wurde in einer anderen Studie die calciumabhängige neuronale Aktivität gemessen. Im ICC fand sich eine signifikante Erhöhung des Signals der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe. In derselben Studie zeigte sich auch, dass eine Woche nach

DISKUSSION

einer singulären Beschallung keine erhöhte neuronale Aktivität gegenüber dem prätraumatischen Niveau gefunden wurde. Dies würde zu der formulierten Hypothese der neuroprotektiven Mechanismen durch calciumabhängige Aktivität passen. Diese These wird im IC dadurch gestützt, dass die calciumabhängige neuronale Aktivität weder unmittelbar, noch eine Woche nach einem singulären Schalltrauma erhöht war. Zeitpunkte, an denen sich signifikant mehr TUNEL-positive Zellen finden ließen ^[77 83].

Gerade im ICC wäre die Untersuchung der Zelldichten zu späteren Zeitpunkten als eine Woche nach einem Einzeltrauma sehr interessant. Wie bereits erwähnt zeigte sich, dass 7 Tage posttraumatisch die Apoptose noch signifikant erhöht ^[77], auf der anderen Seite zum selben Zeitpunkt die Zelldichte signifikant erniedrigt war ^[67]. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die anhaltende Apoptose signifikant in den Zelldichten niederschlägt. In den Akutgruppen der zitierten Arbeiten fand sich bei signifikant erhöhter Apoptose kein morphologisches Korrelat in der Neuronendichte. Ein ähnlicher Effekt könnte auch zu Zeitpunkten auftreten, die später als eine Woche nach einem Einzeltrauma gemessen werden. Durch die möglicherweise generell niedrigere physiologische Apoptose, fänden sich möglicherweise noch signifikant mehr, wenn auch in absoluten Zahlen wenige, TUNEL-positive Zellen. Diese wenigen TUNEL-positiven Zellen würden unter Umständen in einer neuronendichten Struktur wie dem ICC keinen signifikanten Zellverlust provozieren.

Gleichzeitig hat diese vorliegende Arbeit gezeigt, dass sich sieben Tage nach einem Zweittrauma keine signifikante Erhöhung der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe fand, die zwei Wochen nach einem singulären Schalltrauma untersucht worden war. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass ein zweites Trauma nicht denselben Einfluss hat wie das erste Trauma. Denkbar wäre auf der einen Seite, dass die Apoptose nach einem Zweittrauma nicht so lange erhöht bleibt und sich zum Zeitpunkt der Messung schon wieder auf ein fast physiologisches Niveau begeben hat. Auf der anderen Seite könnte es auch sein, dass die Apoptose durch ein zweites Trauma gar nicht erst so stark stimuliert wird. Wie möglicherweise im CN auch, wäre es denkbar, dass das erste Trauma schon einen großen Zellschaden hinterlassen hat. Um die Hypothese zu bekräftigen, dass Zelltodmechanismen nach einem Zweittrauma im ICC kürzer anhalten als nach einem Einzeltrauma, müsste man die Zelltodmechanismen zu früheren Zeitpunkten als eine Woche nach dem zweiten Trauma messen. Denkbar wäre eine Messung 24 Stunden nach dem zweiten Trauma, so wie das in anderen Arbeiten nach einem Einzeltrauma geschehen ist. Gleichzeitig

wäre es interessant die Neuronendichte im ICC der Doppeltrauma-Gruppe auszuwerten. Sollte sich die Neuronendichte der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der Einfachtrauma-Gruppe nicht verändert haben, würde dies die These stützen, dass ein zweites Schalltrauma wenige bis keine Zelltodmechanismen stimuliert.

6.2.2. Corpus Geniculatum Mediale

In allen drei Substrukturen des MGB fand sich derselbe Trend: in der Doppeltrauma-Gruppe war die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe signifikant erhöht. Dies unterscheidet den MGB von den basalen Strukturen, wo sich keine signifikanten Unterschiede finden ließen.

Bisher gibt es keine Untersuchungen zu Zelltodmechanismen im MGB nach einem singulären Lärmtrauma mit ähnlichen Intensitäten. Allerdings untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Zelldichten unmittelbar und 7 Tage nach einem singulären Schalltrauma, was dem für diese Arbeit beschriebenen gleich. Es fand sich, dass in allen drei Substrukturen des MGB die Zelldichte eine Woche nach einem Einzeltrauma signifikant gesunken war ^[67]. In einer anderen Arbeit, in der Mäuse für 3 Stunden bei 115 dB SPL mit 10 kHz beschallt wurden, wurden ähnlich signifikante Zellverluste in allen Untereinheiten des MGB eine Woche nach dem Trauma gefunden ^[87]. Eine weitere Untersuchung widmete sich der calciumabhängigen neuronalen Aktivität. Diese wurde zu denselben Zeitpunkten gemessen, wie in dieser vorliegenden Arbeit die Zelltodmechanismen. Zusätzlich zu den Untersuchungen 14 Tage nach einem Einzeltrauma und eine Woche nach einem Zweittrauma, wurden noch Messungen 7 Tage nach einem Einzeltrauma angestellt. Die Doppeltrauma-Gruppe wurde, wie in der vorliegenden Arbeit auch, mit der Einzeltrauma-Gruppe verglichen. Die 7 Tage nach dem Einzeltrauma gemessene Versuchsgruppe wurde ins Verhältnis zum prätraumatischen Niveau gesetzt. Das Schalltrauma gleich dabei dem Trauma, welches für die vorliegende Arbeit verwendet wurde. Es fand sich eine Woche nach einem singulären Schalltrauma eine signifikante Erhöhung gegenüber dem prätraumatischen Niveau. Wie in den basalen Strukturen, wurde auch eine signifikante Erhöhung der calciumabhängigen Aktivität der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der Einfachtrauma-Gruppe beschrieben ^[83].

Für die basalen Strukturen wurde versucht ein Zusammenhang zwischen calciumabhängiger neuronaler Aktivität und Zelltodmechanismen herzustellen. Es wurde postuliert, dass erhöhte calciumabhängige neuronale Aktivität mit

DISKUSSION

neuroprotektiven Mechanismen vergesellschaftet ist. Im MGB lässt sich diese These nicht vorbehaltlos bestätigen. In der Doppeltrauma-Gruppe fanden sich gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe signifikant mehr TUNEL-positive Zellen, gleichzeitig war das Mangansignal signifikant erhöht. Dies gilt auch für die Akutgruppe des VCN sowie die 7 Tage nach einem Einzeltrauma gemessene Gruppe des DCN ^[77 83]. Es ist bekannt, dass Calcium ab bestimmten Konzentrationen toxisch ist und sowohl Nekrose provozieren, als auch Apoptose einleiten kann. Gemäß dem Grundsatz von Paracelsus „Dosis sola venenum facit“ könnte Calcium bei der Überschreitung eines gewissen Schwellenwertes toxische Wirkungen entfalten.

Eine ähnliche Hypothese wurde bereits in anderen Studien postuliert. Man fand, dass sich Zelltod in Abhängigkeit der Calciumkonzentration ausbildete. Eine Zunahme der Calciumkonzentration kann ein Zellsterben verhindern. Wurde die Calciumkonzentration über einen kritischen Wert weiter gesteigert, fanden sich Zelltodmechanismen ^[115]. Dies könnte die postulierte These dieser vorliegenden Arbeit unterstützen: wird der toxische Schwellenwert nicht überschritten, könnte der protektive Charakter der Calciumwirkung überwiegen. Es wäre denkbar, dass die toxische Dosis im MGB erreicht wurde. Hierfür spricht, dass die Zunahme der Mangananreicherung der Doppeltrauma-Gruppe gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe im MGB bei 13,1% lag. Eine so hohe prozentuale Zunahme wurde in keiner anderen Region gefunden ^[83]. Aus anderen Studien weiß man, dass Calpain durch erhöhte Calciumwerte aktiviert wird. Calpain spielt eine Rolle in Zelltodkaskaden. In den Haarzellen konnte die Hypoxie-induzierte Apoptose durch Calpain-Inhibitoren gesenkt werden ^[53]. Das Calcium könnte folglich im MGB nicht protektiv, was im CN und IC unterstellt wurde, sondern, möglicherweise sogar über eine Calpain-Induktion, zerstörend wirken. Um diese These zu stützen, wäre es von besonderem Interesse die Zelltodmechanismen eine Woche nach einem Einzeltrauma im MGB zu messen. Dies wäre zur Unterstützung oder Widerlegung der „Schwellenwerthypothese“ wichtig. Einerseits, weil sich in allen drei Substrukturen des MGB eine Woche posttraumatisch ein massiver Zellverlust finden ließ ^[67]. Andererseits, weil sich im MGB eine Woche nach einem singulären Schalltrauma eine signifikante Erhöhung der calciumabhängigen neuronalen Aktivität fand ^[83]. Es wäre auch interessant zu wissen, welchen Einfluss Calpain-Inhibitoren auf das Zellsterben im MGB nehmen.

Tabelle 2 auf Seite 66 fasst die Ergebnisse der verschiedenen zitierten Studien zusammen, aus denen die „Schwellenwerthypothese“ abgeleitet wird. Es fällt einem

DISKUSSION

folgendes auf: zu Zeitpunkten, an denen sich signifikante Zelltodmechanismen nachweisen ließen, fanden sich entweder Maximalwerte der Mangananreicherung, oder keine signifikante Veränderung der calciumabhängigen Aktivität ^[77 83]. Der Schwellenwert, der Calcium toxisch werden lässt, könnte sich dabei von Struktur zu Struktur unterscheiden. Diese These könnte erklären, warum ein Anstieg des Mangansignals teilweise zu erhöhten Zelltodmechanismen, teilweise zu keiner Veränderung der Zelltodmechanismen führt. Mit dieser These wäre erklärt, warum sich in der Akutgruppe des VCN sowohl ein erhöhtes Mangansignal, als auch Zelltodmechanismen finden ließen. Das Gleiche gilt für die 7 Tage nach Einzeltrauma gemessene Gruppe im DCN. Umgekehrt führt ein Anstieg der Zelltodmechanismen nicht zwangsläufig zu einer Veränderung der calciumabhängigen Aktivität.

Bei dieser These sollte bedacht werden, dass die in der zitierten Arbeit benutzte Methode der Mangananreicherung eine akkumulierte Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden darstellt. Der Akutgruppe wurde innerhalb von 30 Minuten nach dem Schalltrauma Mangan appliziert. Die Anreicherung wurde 24 Stunden später mittels MRT dargestellt ^[83]. Gerade für die Interpretation der DCN Daten muss dies berücksichtigt werden. Dort fanden sich 24 Stunden nach einem Schalltrauma signifikant erhöhte Apoptoseraten ^[77].

Tabelle 2 – Überblick der Ergebnisse verschiedener Studien zur Schwellenwerthypothese

Struktur	VCN		DCN		ICC	
	TUNEL-Zellen	Mangansignal	TUNEL-Zellen	Mangansignal	TUNEL-Zellen	Mangansignal
Akut vs Prätrauma	↑ ⁽¹⁾	+9,3% ⁽²⁾	n.s. ⁽¹⁾	+7,2% ⁽²⁾	↑ ⁽¹⁾	n.s. ⁽²⁾
7d vs Prätrauma	n.s. ⁽¹⁾	n.s. ⁽²⁾	↑ ⁽¹⁾	+9,0% ⁽²⁾	↑ ⁽¹⁾	n.s. ⁽²⁾
Doppeltrauma vs Einfachtrauma	n.s.	+8,3% ⁽²⁾	n.s.	+7,3% ⁽²⁾	n.s.	+7,1% ⁽²⁾

Struktur	vMGB		mMGB		dMGB		Mangansignal ^{*1}
	TUNEL-Zellen	Zell-dichte	TUNEL-Zellen	Zell-dichte	TUNEL-Zellen	Zell-dichte	
Akut vs Prätrauma	n.b.	n.s. ⁽³⁾	n.b.	n.s. ⁽³⁾	n.b.	n.s. ⁽³⁾	n.s. ⁽²⁾
7d vs Prätrauma	n.b.	-28% ⁽³⁾	n.b.	-31% ⁽³⁾	n.b.	-31% ⁽³⁾	+7,5% ⁽²⁾
Doppeltrauma vs Einfachtrauma	↑	n.b.	↑	n.b.	↑	n.b.	+13,1% ⁽²⁾

*Legende: n.b. = nicht bekannt; ↑ = auf dem Niveau $p < 0,05$ signifikant erhöht; n.s. = nicht signifikant; (1) aus^[77]; (2) aus^[83]; (3) aus^[67]; *1 = Mangansignal des MGB wurde in der betrachteten Untersuchung^[83] nicht nach Substrukturen aufgesplittet*

Offensichtlich reagieren die Strukturen verschieden auf ein singuläres Schalltrauma. Das erste Schalltrauma provoziert im CN einen Anstieg des Mangansignals im MRT^[83]. Im VCN könnte der Schwellenwert bereits überschritten sein, es kommt zu Zelltodmechanismen. Im DCN wurde zum selben Zeitpunkt zwar eine Zunahme des Mangansignals beschrieben, der Schwellenwert könnte noch knapp unterschritten sein: unmittelbar nach dem ersten Schalltrauma fand sich kein Anstieg der Zelltodmechanismen, erst 24 Stunden später^[77]. Ein singuläres Schalltrauma scheint im ICC keine calciumabhängigen Aktivitäten zu verändern, Zelltodmechanismen provoziert es dagegen schon^[77 83]. Offensichtlich sind die primär für das Hören zuständigen Strukturen im ICC weniger Calcium gesteuert. Weder bei einer singulären Beschallung mit 90 dB SPL, noch mit singulären Beschallungen, die ein TTS oder PTS provozieren, fand sich eine signifikante Veränderung der calciumabhängigen Aktivitäten^[83]. Das für diese Arbeit verwendete zweite Schalltrauma trifft auf vorgeschädigte Strukturen und stimuliert, wie aus anderen Studien hervorgeht, auch im ICC

DISKUSSION

calciumabhängige Aktivität ^[83]. Es wäre denkbar, dass ein zweites Trauma im ICC Mechanismen stimuliert, die kompensatorisch nach dem ersten Trauma an die Stelle der zu Grunde gegangenen Zellen gerückt sind. Bei den kompensatorischen Mechanismen könnte es sich um calciumabhängige Aktivitäten handeln. Diese These würde erklären, warum dort nach einem singulären Trauma Zelltodmechanismen und Neuronenverluste beschrieben wurden ohne Veränderung der calciumabhängigen Aktivität ^[67 77 83]. Gleichzeitig wäre diese These im Einklang mit der beschriebenen Zunahme der calciumabhängigen Aktivität nach einem zweiten Trauma. Diese Zunahme der calciumabhängigen Aktivität von 7,1% übertrifft wohlmöglich nicht den toxischen Schwellenwert ^[83]. Es wurden zumindest keine signifikanten Veränderungen der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen zwischen der Einfach- und Doppeltrauma-Gruppe gefunden. Hinzu kommt, dass sich eine prozentuale Zunahme von 7,1% in einem Rahmen bewegt, für den im VCN und DCN protektive Mechanismen unterstellt werden.

7 Tage nach einem Einzeltrauma könnten sich im VCN sowohl die Zelltodmechanismen als auch die calciumabhängige Aktivität wieder auf das prätraumatische Niveau begeben haben; beide Werte unterschieden sich nicht signifikant vom prätraumatischen Niveau ^[77 83].

Beim Vergleich von TUNEL-Zellen und Mangananreicherung muss bedacht werden, dass es sich bei der Auswertung der histologischen Daten um eine Momentaufnahme handelt. Gezählt werden die TUNEL-positiven Zellen zu einem gewissen Zeitpunkt. Die Methode der Mangananreicherung ist die Summe aller calciumabhängigen Prozesse der letzten 24 Stunden vor dem Messzeitpunkt. Für die Zunahme der calciumabhängigen Aktivität darf eine Wachstumsfunktion unterstellt werden. Welchen dynamischen Verlauf die Veränderung der calciumabhängigen Aktivität dabei genommen hat, ist nicht ersichtlich. Die Ergebnisse der zitierten Studie spiegeln nur die prozentuale Zunahme der Mangananreicherung über einen Zeitraum von 24 Stunden wider. Am Beispiel des DCN bedeutet dies, dass über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Beenden des ersten Lärmtraumas die calciumabhängige Aktivität durchschnittlich um 7,2% zugenommen hat. Misst man nun am siebten posttraumatischen Tag ein weiteres Mal über einen Zeitraum von 24 Stunden die Mangananreicherung, beträgt die Zunahme durchschnittlich 9% gegenüber einer 24 Stunden Mangananreicherung einer nicht beschallten Kontrollgruppe im DCN. Da der Wert der Manganakkumulation 7 Tage posttraumatisch höher ist als in der Akutgruppe, scheint die calciumabhängige Aktivität

DISKUSSION

nach dem Messzeitpunkt der Akutgruppe, also 24 Stunden nach Beendigung des Lärmtraumas, weiter anzusteigen. Aus mathematischen Gründen, muss es Werte geben, die oberhalb der durchschnittlichen Zunahme von 7,2% der Akutgruppe gegenüber der Kontrollgruppe liegen. Da die mittlere Mangananreicherung gegenüber dem prätraumatischen Niveau 7 Tage nach dem singulären Schalltrauma um 9% erhöht ist (und damit höher als die Zunahme der Akutgruppe), unterstellt man eine Fortsetzung der Zunahme der calciumabhängigen Aktivität über die ersten 24 Stunden hinaus. Anders ausgedrückt liegt der Moment der höchsten calciumabhängigen Aktivität im DCN nicht innerhalb der ersten 24 Stunden posttraumatisch ^[83]. Auf Grund der unterstellten stetigen und kontinuierlichen Zunahme bis zum Erreichen eines Maximums, lagen die überdurchschnittlichen Spitzenwerte der Calcium-Zunahme innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem singulären Schalltrauma im DCN schätzungsweise in den letzten erfassten Stunden. Obwohl die mittlere Zunahme mit 7,2% den toxischen Schwellenwert unter Umständen nicht überschritten hat, traten wahrscheinlich gegen Ende der Messung höhere Spitzenwerte auf. Diese gegen Ende auftretenden Spitzenwerte könnten bereits toxisch sein und die signifikante Zunahme der TUNEL-positiven Zellen im DCN erklären, die 24 Stunden posttraumatisch gefunden wurden ^[77].

Gleichzeitig muss bedacht werden, dass die Ergebnisse verschiedener Studien verschiedene Erklärungen für einen Zusammenhang zwischen Calcium und Neuronentoxizität finden. Es gibt Arbeiten, die behaupten, dass die Neuronentoxizität abhängig vom Calciumeinstrom ist, und nicht von der intrazellulären Calciumkonzentration ^[119 120]. Klar bleibt, dass es Zusammenhänge von Zelltodmechanismen und Calcium gibt. Es darf davon ausgegangen werden, dass diese Zusammenhänge in keiner Weise simpel oder monokausal sind.

Mehrfach wurde erwähnt, dass der MGB nicht in einer BERA Messung erfasst wird. Eine BERA Messung erfasst nur die basalen Strukturen, also die Strukturen, in denen kein Unterschied der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen gefunden wurde. Eine Veränderung der TUNEL-positiven Zellen mit vermutlichem resultierendem Zellverlust schlägt sich nicht in den Summenpotentialen der BERA Messung nieder. In einer Übersichtsarbeit wurde postuliert, dass der MGB mehr sei, als nur die Verbindung zwischen basalen Strukturen und Cortex. Dem MGB wurde eine Schlüsselfunktion für die Prozessierung komplexer Klänge, wie beispielsweise Sprache, zugesprochen ^[20]. Eine zweite traumatisierende Lärmexposition könnte also genau diese Strukturen

zerstören, ohne dass diese Veränderungen audiometrisch besonders auffallen. Diese Annahme könnte zur Erklärung verschiedener Pathologien beitragen, die bei Patienten mit hochverstärkenden Hörgeräten beschrieben wurden.

Es gibt audiometrische Untersuchungen, die das Silben-, Wort- und Sprachverständnis im Störgeräusch analysieren. Unmittelbar nach der Anpassung von Hörgeräten kommt es häufig zu einem besseren Abschneiden in diesen Untersuchungen. Im zeitlichen Verlauf können sich diese Ergebnisse verändern. Es gibt Untersuchungen, die mittelfristig keine Verbesserung des Sprachverständnisses im Störgeräusch fanden ^[121]. In einer anderen Untersuchung wurde das Sprachverständnis von Hörgerätträgern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Hörgeräthanpassung gemessen. Sowohl 6 als auch 12 Monate nach der Anpassung fand sich eine signifikante Verschlechterung in den auditorischen Messung im Vergleich zu den Ergebnissen, die die Patienten einen Monat nach der Anpassung erzielt hatten ^[122].

6.2.3. Primärer Auditorischer Cortex

In dieser Arbeit wurde der primäre auditorische Cortex schichtenweise analysiert. Außer in den Schichten I und III fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass hohe Schalldrücke den primären auditorischen Cortex affektieren. Nach einer 3 stündigen Beschallung mit einer Frequenz von 10 kHz bei 115 dB SPL fand sich eine Woche nach dem singulären Schalltrauma in den Schichten IV bis VI ein signifikanter Zellverlust. Die Zelldichten der Schichten I bis III waren dagegen durch den Lärm nicht signifikant verändert worden ^[87]. Andere Tiere wurden nach demselben Protokoll beschallt wie die Tiere dieser vorliegenden Arbeit und eine Woche nach einer singulären Exposition untersucht. In Schicht II fand sich keine Veränderung der Neuronendichte, während in den Schichten I sowie III bis VI die Zelldichte signifikant abgenommen hatte ^[67]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Schichten des primären auditorischen Cortex verschieden auf eine singuläre Beschallung reagieren. Der gefundene Zellverlust lässt vermuten, dass ein singuläres Schalltrauma Zelltodmechanismen stimuliert. Der Zellverlust, der eine Woche nach einem singulären Schalltrauma derselben Intensität, Frequenz und Dauer wie in dieser vorliegenden Arbeit gemessen wurde, war statistisch signifikant. Der prozentuale Neuronenverlust bewegte sich zwischen 10% bis 18%. Diese Werte waren deutlich geringer als die, die in den basalen Strukturen und im MGB beschrieben

DISKUSSION

wurden^[67]. Die dem primären auditorischen Cortex vorgeschalteten Strukturen könnten eine protektive Funktion übernehmen. Denkbar wäre, dass sie eine Weiterschaltung an den Cortex verhindern. Dies könnte erklären, warum die Zellverluste im AI nach einem singulären Schalltrauma deutlich geringer als im MGB ausfielen. Da die vorgeschalteten Strukturen durch ein singuläres Schalltrauma im Vergleich zum AI stärker in Mitleidenschaft gezogen zu werden scheinen, ist die Analyse der Zelldichten nach einem zweiten Schalltrauma im AI besonders interessant. Interessant wäre auch eine Analyse der Zelltodmechanismen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem singulären Schalltrauma. Denkbar wäre, dass ein erstes Schalltrauma die Zelltodmechanismen im Cortex kaum stimuliert. Dies könnte den vergleichsweise geringen beschriebenen Zellverlust nach dem ersten Trauma erklären^[67]. Für die Auswirkungen eines zweiten Schalltraumas auf den AI müssen folgende Hypothesen bedacht werden. Einerseits wäre denkbar, dass die vorgeschalteten auditorischen Strukturen durch ein singuläres Schalltrauma so geschädigt wurden, dass ein zweites Schalltrauma dort nicht mehr von protektiven Mechanismen kompensiert wird. Die Übererregung würde bei einem zweiten Schalltrauma einen entsprechend großen und direkten Einfluss auf den AI ausüben. Andererseits wäre denkbar, dass der MGB den AI weiterhin vor dem Einfluss eines zweiten Schalltraumas schützen kann, da ein zweites Schalltrauma im MGB signifikant mehr TUNEL-positive Zellen hervorruft. Dies könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass das zweite Schalltrauma im MGB auf intakte Strukturen trifft, die ihre potentielle Schutzfunktion des AI beibehalten könnten. Für die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sind beide Hypothesen als Erklärung denkbar, je nachdem welche Schicht man betrachtet. Schicht I wurde durch ein singuläres Schalltrauma in Bezug auf die Zelldichten im Vergleich mit den anderen Schichten nach einem singulären Schalltrauma am meisten in Mitleidenschaft gezogen^[67]. Offensichtlich war der Einfluss eines ersten Traumas vergleichsweise groß. Nach einem zweiten Trauma fanden sich in derselben Schicht signifikant mehr TUNEL-positive Zellen. Dies kann bedeuten, dass die Schicht I generell wenig vom Schutz der vorgeschalteten Strukturen profitiert. Dies könnte erklären, warum sich eine Woche nach dem zweiten Trauma noch immer aktive Zelltodprozesse nachweisen ließen. In Schicht III ist genau das Gegenteil der Fall. Nach einem singulären Schalltrauma fand sich ein Neuronenverlust von 10%. Dies entspricht im AI, nach Schicht II in der sich keine signifikante Änderung der Neuronendichte finden ließ, dem niedrigsten gezählten Wert^[67]. Die der Schicht III vorgeschalteten Strukturen

DISKUSSION

sind demnach durch das erste Schalltrauma so verändert worden, dass ein zweites Trauma einen großen Einfluss auf die Zelltodmechanismen ausüben konnte.

Auch im AI wurde in einer anderen Studie die calciumabhängige neuronale Aktivität mittels Mangan gemessen. Es fand sich kein signifikanter Unterschied im primären auditorischen Cortex zwischen den prätraumatisch, den unmittelbar und den sieben Tage nach einem singulären Schall-Trauma gemessenen Tieren. Die Mangananreicherung der Doppeltrauma-Gruppe war hingegen gegenüber der Einzeltrauma-Gruppe signifikant erhöht. Wie im MGB auch, wurden die Daten der Manganuntersuchung nicht nach histologischen Unterschichten aufgeteilt ^[83]. Im MGB wurde in der Analyse der TUNEL-positiven Zellen in allen drei Substrukturen ein ähnlicher Trend beobachtet. Dadurch ist es einfacher einen Zusammenhang zu calciumabhängiger Aktivität, die nicht nach Substrukturen aufgeteilt wurde, herzustellen. Im primären auditorischen Cortex ist es schwieriger, die Daten der Manganuntersuchung mit denen der Histologie in Zusammenhang zu bringen. In den histologischen Schichten des AI fand sich nicht für alle Schichten derselbe Trend, es bleibt Spekulation in welcher Schicht und wie genau das erhöhte Calcium und die Zelltodmechanismen in Wechselwirkung stehen.

Dies wirft die Frage auf, welche Mechanismen generell eine Erhöhung der Mangananreicherung provozieren können. Zum gemessenen Zeitpunkt der Bestimmung der calciumabhängigen neuronalen Aktivität, folglich zum gleichen Zeitpunkt der Auswertung der TUNEL-positiven Zellen der hier vorliegenden Arbeit, lag das zweite Schalltrauma schon 7 Tage zurück, das erste sogar schon 2 Wochen. Generell muss gesagt werden, dass die durch Mangan nachgewiesene Calciumanreicherung darauf hinweist, dass calciumabhängige Prozesse stattfinden ^[123]. Es kann keine Aussage darüber gemacht werden, welche Rezeptoren, Zelltypen oder Kanäle betroffen sind. Die Stimulation oder Verminderung von Nekrose und Apoptose in Abhängigkeit des Calciumspiegels wurde bereits diskutiert. Die Rolle von Calcium in Signalkaskaden, sowohl präsynaptisch, postsynaptisch oder als second Messenger scheint auch hier relevant zu sein. Dem Glutamatrezeptor wird bei diesen Prozessen eine Überaktivierung zugeschrieben, die exzitotoxisch sein könnte ^[124]. Der erhöhte Nachweis von Calcium kann sowohl als Aktivitätsnachweis (denkbar wäre die Generierung von Aktionspotentialen) als auch als Nachweis plastischer Prozesse (Neurodegeneration) gedeutet werden. Calcium wird auch immer wieder in Zusammenhang mit ischämischen Prozessen und daraus resultierender Apoptose

DISKUSSION

gebracht ^[113]. Man weiß, dass der Energiemangel, der durch eine Ischämie im Gehirn entsteht, den ATP Vorrat erschöpft und die Natrium-Kalium-ATPase-Ionenpumpe verletzt. Es folgt eine sauerstofffreie Depolarisation durch einen Natriumeinstrom. Als Folge öffnen sich die natriumabhängigen Calciumkanäle und es kommt zu einem Anstieg von Calcium. Auf Grund dieser Zusammenhänge wird die MEMRI-Methode auch diskutiert zur Entdeckung ischämischer Prozesse im Gehirn ^[125]. Der erhöhte Calciumnachweis könnte also auch Ausdruck einer bestehenden Ischämie sein, welcher durch die hohen Schalldrücke provoziert wurde. In der Einleitung wurde bereits angesprochen, dass Schalltraumata Ischämien und oxidativen Stress provozieren ^[53]. Nicht zuletzt kann der erhöhte Nachweis von calciumabhängiger Aktivität auch Ausdruck einer neuronalen Hyperaktivität sein. Es ist bekannt, dass sich die Rate der Spontanaktivitäten nach einem Schalltrauma erhöht. Im DCN wird diese Feststellung auch als eine Hypothese zur Erklärung von Tinnitus diskutiert ^[126]. Die posttraumatische Erhöhung der Spontanaktivität, mit resultierenden erhöhten Aktionspotentialfrequenzen, könnte die Zunahme der calciumabhängigen Aktivitäten als Aktivitätsnachweis erklären. Die Verschiebung des endocochleären Potentials wird mit der Ausbildung eines PTS in Zusammenhang gebracht ^[40]. Viele Calciumkanäle sind spannungsgesteuert und damit abhängig vom endocochleären Potential. Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz für die veränderte calciumabhängige Aktivität nach einem Schalltrauma sein.

Eine andere Arbeitsgruppe setzte sich mit Zelltodmechanismen im Cortex der Katze nach Lärmtrauma auseinander. Die Beschallungsintensität lag dabei deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit, es wurde entweder mit 198 dB SPL oder 202 dB SPL beschallt. Das Beschallungsschema unterschied sich ebenfalls: es wurde Impuls-Lärm verwendet. C-Jun, ein Protein, das Zelltodmechanismen unterdrücken kann, wurde in den Schichten II bis VI des auditorischen Cortex nach dem Lärmtrauma nachgewiesen ^[96]. Die C-Jun N-terminalen Kinasen sind Enzyme, denen in der Transduktion eine besondere Rolle zugeschrieben wird. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Apoptose. Zellstress, wie DNA Schäden oder ROS können die Signalkaskade aktivieren, was mit einer Aktivierung von C-Jun einhergeht. Es kann Apoptose resultieren ^[127]. Interessanterweise scheint erhöhtes freies zytoplasmatisches Calcium eine Rolle bei der Aktivierung von C-Jun zu spielen. Dies stellt einen weiteren Interpretationsansatz der beschriebenen erhöhten calciumabhängigen Aktivität dar: der Einfluss von Calcium auf Zelltodmechanismen über Genregulation ^[83 115]. Der früheste Nachweis von C-Jun gelang 2 Stunden posttraumatisch und hielt bis zum letzten

DISKUSSION

Moment der Untersuchung (21 Tage posttraumatisch) an. In denselben Schichten II bis VI des auditorischen Cortex fanden sich nach dem Lärmtrauma TUNEL-positive Zellen, allerdings nur zwischen 6 Stunden und 7 Tagen posttraumatisch. Nach 3 Wochen fanden sich keine TUNEL-positiven Zellen mehr. Sowohl nach C-Jun als auch nach TUNEL-positiven Zellen wurde auch prätraumatisch gesucht. Es fanden sich keine positiven Resultate. Der Nachweis des Gens wie auch der TUNEL-positiven Zellen war allerdings rein qualitativ. Eine Quantifizierung wurde nicht vorgenommen ^[96]. Den zitierten Daten ist den Daten der hier vorliegenden Arbeit gemein, dass ein Schalltrauma Zelltodmechanismen initiiert.

Möglich wäre, dass sich, zu den Messzeitpunkten dieser vorliegenden Arbeit, die Apoptose in den Schichten II, IV, V und VI wieder auf das physiologische Normalniveau gesenkt hatte. Diese Hypothese ließe sich untermauern durch den beschriebenen Nachweis des c-Jun Gens, welches sich dort nachweisen ließ, wo sich zu frühen Zeitpunkten auch TUNEL-positive Zellen fanden. TUNEL-positive Zellen wurden spätestens noch 7 Tage posttraumatisch gefunden ^[96]. Dies entspricht dem Zeitpunkt, an dem auch die Doppeltrauma-Gruppe dieser vorliegenden Arbeit untersucht wurde: 7 Tage nach dem zweiten Trauma. Grundsätzlich ist denkbar, dass die Apoptose der Doppeltrauma-Gruppe länger als 7 Tage anhält. Grund für diese Annahme könnte das durch das erste Lärmtrauma vorgeschädigte Gewebe sein. In Schicht I stehen die Daten dieser vorliegenden Arbeit im Widerspruch zu denen von Saljö und Kollegen. Weder TUNEL-positive Zellen noch das c-Jun Gen wurde nach einem Schalltrauma in Schicht I beschrieben ^[96]. Die Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen in Schicht I der vorliegenden Arbeit könnte sich durch verschiedene Beschallungsmuster erklären lassen. An einem anderen Beispiel lässt sich der Einfluss des Beschallungsmusters gut zeigen. Nach einer Beschallung mit 10 kHz bei 115 dB SPL ließ sich in den Schichten I bis III kein Zellverlust nachweisen ^[87]. Eine Beschallung mit einem Breitbandrauschen, das in Beschallungsdauer und Intensität identisch war, induzierte dagegen auch einen Zellverlust in den Schichten I und III ^[67].

Zum Verständnis der Wechselwirkung von MGB und Cortex empfiehlt sich ein Blick auf Abbildung 2 auf Seite 12. Es wird deutlich, dass der AI Input aus vielen Strukturen bekommt. Schicht II erhält keinen direkten Input aus dem MGB. Dies könnte erklären, warum sich kein Zellverlust fand ^[67 87]. Dort fand sich auch kein Unterschied der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen zwischen der Einzeltrauma- und Doppeltrauma-Gruppe. Umgekehrt muss gesagt werden, dass sich auch kein Unterschied der Apoptoseraten in

DISKUSSION

Schicht IV fand, obwohl Schicht IV ganz besonders direkt aus dem vMGB stimuliert wird. Ein singuläres Schalltrauma verminderte die Neuronendichte von Schicht IV eine Woche posttraumatisch um 14% ^[67]. Offensichtlich beeinflussen die anhaltenden Zelltodmechanismen der Doppeltrauma-Gruppe im vMGB nicht die Apoptose in Schicht IV des Cortex. Auf Grund des Zellverlustes nach einem singulären Schalltrauma und den nachgewiesenen TUNEL-positiven Zellen des vMGB, wäre eine genauere Betrachtung der Schicht IV sehr spannend. Ein Augenmerk könnte auf die Neuronendichten der Einfach- und Doppeltrauma-Gruppe gesetzt werden, eine andere Untersuchung könnte sich dem zeitlichen Verlauf der Apoptose in Schicht IV nach einem zweiten Schalltrauma widmen. Dies würde weitere Klarheit über die Wechselwirkung von Schalltrauma, MGB und Cortex schaffen.

Der primäre auditorische Cortex ist eine sehr komplizierte und multiple verschaltete Struktur. Dieser Umstand macht die Interpretation der Daten der hier vorliegenden Arbeit sehr schwierig. Aus den zitierten Studien geht hervor, dass ein Schalltrauma einen Einfluss auf den AI hat. Neuronenverluste, die Aktivierung von Genen, die mit Apoptose in Zusammenhang gebracht werden, Zunahme von neuronalen Aktivitäten und TUNEL-positiven Zellen nach einem Schalltrauma wurden beschrieben ^[67 83 87 96]. Die hier vorliegende Arbeit bestätigt den Einfluss eines zweiten Schalltraumas auf den AI. Zur genaueren Interpretation der Daten wären weitere Untersuchungen sinnvoll. Im Vordergrund steht dabei die Bestimmung der Neuronendichten der verschiedenen Schichten nach einem zweiten Trauma. Dies könnte helfen die Folge der erhöhten TUNEL-positiven Zellen der Schichten I und III sowie den Einfluss der gesteigerten calciumabhängigen Aktivität zu deuten.

6.3. Fazit

Offensichtlich verändern hohe Schalldrücke die Hörschwelle einer durch Lärm vorgeschädigten Hörbahn in einem anderen Maße als eine ungeschädigte Hörbahn. Die Hörschwelle verschiebt sich nach einem zweiten Trauma offensichtlich weniger als nach einem ersten Trauma.

Da psychoakustische Phänomene wie Tinnitus oder vermindertes Sprachverständnis im Störgeräusch häufig mit dem Verlust von Zelldichten und Veränderungen der Spontanaktivitäten in Zusammenhang gebracht werden, wäre eine Analyse der selbigen in der für diese vorliegende Arbeit verwendeten Versuchsgruppen sinnvoll. Wie beeinflusst ein zweites Lärmtrauma die Zelldichte der Schlüsselstrukturen der Hörbahn?

DISKUSSION

Zeigt sich ein ähnlich großer Zellverlust wie nach einer Einzelbeschallung? Sowohl die Strukturen in denen kein Unterschied der Anzahl der TUNEL-positiven Zellen gefunden wurde, als auch die Strukturen in denen sich in der Doppeltrauma-Gruppe eine signifikante Erhöhung finden ließ, sind untersuchenswert. Der Zellverlust könnte Aufschluss geben, ob Zelltodmechanismen nach einem zweiten Trauma stattgefunden haben und abgeschlossen sind. Gleichzeitig würde man das Ausmaß des Verlustes beziffern können. Dies wäre gerade für die Hörgerättherapie interessant. Natürlich wäre auch die Untersuchung der Apoptose zu früheren Zeitpunkten nach dem zweiten Lärmtrauma interessant. Kann eine Zweitbeschallung Zelltodmechanismen in ähnlicher Intensität stimulieren, wie das nach einem singulären Schalltrauma gezeigt wurde? Gibt es ein Maximum zu ähnlichen Zeitpunkten wie nach einem ersten Trauma? Die Frage nach dem zeitlichen Verlauf der Apoptose ist gerade in Strukturen wie dem MGB interessant, zu dem bisher keine Zelltoduntersuchungen nach einem singulären Schalltrauma gemacht wurden.

Eine genauere Analyse der Zelltodmechanismen ist aus therapeutischen Gesichtspunkten interessant. Eine klare Differenzierung zwischen Apoptose, der physiologischen Form des Zelltodes, und Nekrose, dem pathologischen unorganisiertem Zelluntergang, könnte von klinischem Interesse sein. Der Nachweis von Zelltodmechanismen erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling (TUNEL). Es handelt sich hierbei um eine Methode, die Mitte der 90er Jahre etabliert wurde. Dabei werden spezielle DNA Strukturen, wie sie typischerweise bei programmiertem Zelltod auftreten, angefärbt ^[79]. Die Methode gilt als eine der spezifischsten und sensitivsten zum Nachweis von Apoptose. Sie steht aber auch in der Kritik, nicht klar zwischen Nekrose und Apoptose unterscheiden zu können ^[128]. Die Methode der Färbung wurde aktuell durch Protokollveränderungen optimiert ^[129]. Um Zelltodmechanismen sicher als Apoptose klassifizieren können, reicht eine einzige Färbung nach wie vor nicht aus ^[72]. Trotzdem ist die TUNEL-Färbung eine gängige und akzeptierte Form des Zelltodnachweises. Aufgrund der mangelnden Sensitivität für Apoptose wird in dieser vorliegenden Arbeit der 2009 vom Komitee für Nomenklatur aufgebrachte Vorschlag des Begriffs der „TUNEL-positiven Zelle“ verwendet ^[81]. Gerade die Frage wann ein erhöhter Calcium-Einstrom Apoptose oder Nekrose stimuliert, wurde nicht beantwortet. Die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose steht für die Beantwortung der Fragestellungen dieser vorliegenden Arbeit nicht im Vordergrund.

DISKUSSION

Medikamente, die auf die Verringerung der Apoptose abzielen, wären bei nekrotischen Vorgängen mit großer Wahrscheinlichkeit weniger wirksam, eventuell sogar wirkungslos. Es wurde bereits gezeigt, dass das Unterdrücken von Calpain, einem Stoff der mit Apoptose in Verbindung gebracht wird, Hypoxie-induzierte Apoptose in den Haarzellen senken kann ^[53]. Der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf Apoptose und Nekrose wurde in anderen Untersuchungen vermutet. Es wurde der Hörverlust nach Gabe endogener Antioxidanten, die ROS eliminieren, gemessen: das Applizieren von Glutathion-Monoethylester führte beispielsweise zu einer größeren Resistenz gegen NIHL ^[130]. In einer anderen Studie fand sich, dass die Gabe von Antioxidanten das Ausmaß des TTS abmilderte, den lärminduzierten Haarzellenverlust in der Cochlea senkte und den Anstieg an c-fos-positiven Zellen der Hörbahn reduzierte ^[131]. Ähnliche therapeutische Ansätze sollten auch für die zentrale Hörbahn in Erwägung gezogen werden. Dazu wäre eine klare Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose notwendig. Eine Untersuchung zur Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose wäre folglich in höchstem Maße spannend. In einer anderen Studie fand man heraus, dass die Apoptose am ersten posttraumatischen Tag gegenüber der Nekrose signifikant erhöht war. Die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen nahm im Verlauf ab. Bei einer Beschallung mit 104 dB SPL fand sich am vierten posttraumatischen Tag kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zelltodmechanismen. Wurden die Tiere dagegen mit 108 dB SPL beschallt, war die Anzahl der apoptotischen gegenüber den nekrotischen Zellen zu diesem Zeitpunkt noch signifikant erhöht ^[50]. Dieses Themenfeld bietet noch viel Platz für zukünftige Forschungsfragen.

Die Schallintensität des Versuchsaufbaus der vorliegenden Arbeit betrug 115 dB SPL und wurde gewählt, weil dies der Intensität von hochverstärkenden Hörgeräten entspricht. Diese werden unter Umständen bei Patienten eingesetzt, deren Hörbahn durch Lärm bereits verletzt wurde. Dieses Szenario sollte durch den Versuchsaufbau in Teilen simuliert werden. Besonders dem Teilergebnis in der vorliegenden Arbeit, dass die TUNEL-positiven Zellen, die im MGB der Doppeltrauma-Gruppe gefunden wurden, im Zusammenhang mit einem schlechteren Sprachverständnis stehen, sollte klinisch Beachtung geschenkt werden. Patienten, die mit hochverstärkenden apparativen Hörhilfen versorgt wurden, könnten ihr Sprachverständnis, vor allem im Störgeräusch mit der Zeit deutlich verschlechtern. Bevor eine Schädigung von zentralen auditorischen Strukturen auftritt, wäre die Versorgung mit alternativer Hörtechnik (z.B. Cochlea-

DISKUSSION

Implantat mit elektro-akustischer Stimulation) zu diskutieren. Bei Patienten, die an einem Hörverlust der hohen Frequenzen litten, konnte mittels elektro-akustischer Stimulation eine signifikante Verbesserung des Sprachverständnisses gezeigt werden ^[132]. Der Einfluss von apparativen Hörhilfen auf die zentralen Strukturen des Hörens ist jedoch insgesamt bisher kaum erforscht. Diese Thematik bietet viel Platz für neue Ideen und Projekte.

7 Literaturverzeichnis

1. Probst R, Grevers G, Iro H. *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde*, 3. Auflage 2008, page: 242, ISB-Number: 978-3-13-119033-8.
2. World Health Organization. Deafness and Hearing Impairment. Fact Shee No. 300. 2004.
3. Garnefski N, Kraaij V. Cognitive coping and goal adjustment are associated with symptoms of depression and anxiety in people with acquired hearing loss. *International journal of audiology* 2012;**51**(7):545-50.
4. Ota CY, Kimura RS. Ultrastructural study of the human spiral ganglion. *Acta otolaryngologica* 1980;**89**(1-2):53-62.
5. Møller AR. *Hearing - Anatomy, Physiology and Disorders of the auditory System*. second Edition ed, 2000, page: ISB-Number: 978-0123725196.
6. Landau ME, Barner KC. Vestibulocochlear nerve. *Seminars in neurology* 2009;**29**(1):66-73.
7. Pillsbury HC, 3rd. Lorente de No's "Anatomy of the eighth nerve. I. The central projection of the nerve endings of the internal ear; III. General plan of structure of the primary cochlear nuclei." (*Laryngoscope*. 1933;43:1-38 & 327-350). *The Laryngoscope* 1996;**106**(5 Pt 1):533-4.
8. Willott PDJF. *Handbook of Mouse Auditory Research From Behavior to Molecular Biology*, 2001, page: ISB-Number: 0-8493-2328-2.
9. Ryugo DK, Parks TN. Primary innervation of the avian and mammalian cochlear nucleus. *Brain research bulletin* 2003;**60**(5-6):435-56.
10. Reetz G, Ehret G. Inputs from three brainstem sources to identified neurons of the mouse inferior colliculus slice. *Brain research* 1999;**816**(2):527-43.
11. Ryugo DK, Willard FH, Fekete DM. Differential afferent projections to the inferior colliculus from the cochlear nucleus in the albino mouse. *Brain research* 1981;**210**(1-2):342-9.
12. Oliver DL. Dorsal cochlear nucleus projections to the inferior colliculus in the cat: a light and electron microscopic study. *The Journal of comparative neurology* 1984;**224**(2):155-72.
13. Aitkin L, Tran L, Syka J. The responses of neurons in subdivisions of the inferior colliculus of cats to tonal, noise and vocal stimuli. *Exp Brain Res* 1994;**98**(1):53-64.

LITERATURVERZEICHNIS

14. Morest DK. The Neuronal Architecture of the Medial Geniculate Body of the Cat. *Journal of anatomy* 1964;**98**:611-30.
15. Kvašňák E, Šuta D, Popelář J, et al. Neuronal connections in the medial geniculate body of the guinea-pig. *Exp Brain Res* 2000;**132**(1):87-102.
16. Calford MB, Aitkin LM. Ascending projections to the medial geniculate body of the cat: evidence for multiple, parallel auditory pathways through thalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1983;**3**(11):2365-80.
17. Ehret GR, Romand. *THE CENTRAL AUDITORY SYSTEM*, 1997, page: ISBN-Number: 0-19-509684-3.
18. Lee CC, Winer JA. Connections of cat auditory cortex: I. Thalamocortical system. *The Journal of comparative neurology* 2008;**507**(6):1879-900.
19. Lee CC. Thalamic and cortical pathways supporting auditory processing. *Brain and language* 2013;**126**(1):22-8.
20. Bartlett EL. The organization and physiology of the auditory thalamus and its role in processing acoustic features important for speech perception. *Brain and language* 2013;**126**(1):29-48.
21. Hill PR, Hogben JH, Bishop DM. Auditory frequency discrimination in children with specific language impairment: a longitudinal study. *Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR* 2005;**48**(5):1136-46.
22. Rinker T, Kohls G, Richter C, et al. Abnormal frequency discrimination in children with SLI as indexed by mismatch negativity (MMN). *Neuroscience letters* 2007;**413**(2):99-104.
23. Hackett TA. Information flow in the auditory cortical network. *Hear Res* 2011;**271**(1-2):133-46.
24. Read HL, Winer JA, Schreiner CE. Functional architecture of auditory cortex. *Current opinion in neurobiology* 2002;**12**(4):433-40.
25. Imig TJ, Morel A. Organization of the thalamocortical auditory system in the cat. *Annual review of neuroscience* 1983;**6**:95-120.
26. Lee CC, Winer JA. Connections of cat auditory cortex: III. Corticocortical system. *The Journal of comparative neurology* 2008;**507**(6):1920-43.
27. Lee CC, Winer JA. Connections of cat auditory cortex: II. Commissural system. *The Journal of comparative neurology* 2008;**507**(6):1901-19.

LITERATURVERZEICHNIS

28. Pandya DN. Anatomy of the auditory cortex. *Revue neurologique* 1995;**151**(8-9):486-94.
29. Davis RR, Kozel P, Erway LC. Genetic influences in individual susceptibility to noise: a review. *Noise & health* 2003;**5**(20):19-28.
30. Huang Q, Tang J. Age-related hearing loss or presbycusis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010;**267**(8):1179-91.
31. Albera R, Lacilla M, Piumetto E, et al. Noise-induced hearing loss evolution: influence of age and exposure to noise. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010;**267**(5):665-71.
32. Robertson D, Johnstone BM, McGill TJ. Effects of loud tones on the inner ear: a combined electrophysiological and ultrastructural study. *Hear Res* 1980;**2**(1):39-43.
33. Stopp PE. Effects on guinea pig cochlea from exposure to moderately intense broad-band noise. *Hear Res* 1983;**11**(1):55-72.
34. Harding GW, Baggot PJ, Bohne BA. Height changes in the organ of Corti after noise exposure. *Hear Res* 1992;**63**(1-2):26-36.
35. Nordmann AS, Bohne BA, Harding GW. Histopathological differences between temporary and permanent threshold shift. *Hear Res* 2000;**139**(1-2):13-30.
36. Spoendlin H. Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta oto-laryngologica* 1971;**71**(2):166-76.
37. Latoni J, Shivapuja B, Seidman MD, et al. Pentoxifylline maintains cochlear microcirculation and attenuates temporary threshold shifts following acoustic overstimulation. *Acta oto-laryngologica* 1996;**116**(3):388-94.
38. Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, et al. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear and hearing* 2006;**27**(1):1-19.
39. Wang Y, Hirose K, Liberman MC. Dynamics of noise-induced cellular injury and repair in the mouse cochlea. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 2002;**3**(3):248-68.
40. Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 2003;**4**(3):339-52.
41. Pourbakht A, Yamasoba T. Cochlear damage caused by continuous and intermittent noise exposure. *Hear Res* 2003;**178**(1-2):70-8.

LITERATURVERZEICHNIS

42. Hamernik RP, Patterson JH, Turrentine GA, et al. The quantitative relation between sensory cell loss and hearing thresholds. *Hear Res* 1989;**38**(3):199-211.
43. Borg E. Loss of hair cells and threshold sensitivity during prolonged noise exposure in normotensive albino rats. *Hear Res* 1987;**30**(2-3):119-26.
44. Chen GD, McWilliams ML, Fechter LD. Succinate dehydrogenase (SDH) activity in hair cells: a correlate for permanent threshold elevations. *Hear Res* 2000;**145**(1-2):91-100.
45. Chen G-D, Fechter LD. The relationship between noise-induced hearing loss and hair cell loss in rats. *Hearing Research* 2003;**177**(1-2):81-90.
46. Bohne BA, Harding GW, Lee SC. Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hear Res* 2007;**223**(1-2):61-70.
47. Bohne BA, Harding GW, Nordmann AS, et al. 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.
48. Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Extremely rapid induction of outer hair cell apoptosis in the chinchilla cochlea following exposure to impulse noise. *Hear Res* 2006;**211**(1-2):16-25.
49. Yang WP, Henderson D, Hu BH, et al. 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.
50. Fredelius L, Rask-Andersen H, Johansson B, et al. Time sequence of degeneration pattern of the organ of Corti after acoustic overstimulation. A light microscopical and electrophysiological investigation in the guinea pig. *Acta oto-laryngologica* 1988;**106**(1-2):81-93.
51. Henderson D, Spongr V, Subramaniam M, et al. Anatomical effects of impact noise. *Hear Res* 1994;**76**(1-2):101-17.
52. Nakashima T, Naganawa S, Sone M, et al. Disorders of cochlear blood flow. *Brain research Brain research reviews* 2003;**43**(1):17-28.
53. Huang T, Cheng AG, Stupak H, et al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2000;**18**(2-3):259-70.
54. Thalmann R, Miyoshi T, Kusakari J, et al. Normal and abnormal energy metabolism of the inner ear. *Otolaryngologic clinics of North America* 1975;**8**(2):313-33.

LITERATURVERZEICHNIS

55. Koga K, Hakuba N, Watanabe F, et al. Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti: an experimental study in gerbils. *The Journal of comparative neurology* 2003;**456**(2):105-11.
56. Wiesel TN, Hubel DH. Comparison of the effects of unilateral and bilateral eye closure on cortical unit responses in kittens. *Journal of neurophysiology* 1965;**28**(6):1029-40.
57. Webster DB, Webster M. Neonatal sound deprivation affects brain stem auditory nuclei. *Arch Otolaryngol* 1977;**103**(7):392-6.
58. Webster DB, Webster M. Cochlear nerve projections following organ of corti destruction. *Otolaryngology* 1978;**86**(2):ORL342-53.
59. Trune DR. Influence of neonatal cochlear removal on the development of mouse cochlear nucleus: II. Dendritic morphometry of its neurons. *The Journal of comparative neurology* 1982;**209**(4):425-34.
60. Kane EC. Patterns of degeneration in the caudal cochlear nucleus of the cat after cochlear ablation. *The Anatomical record* 1974;**179**(1):67-91.
61. Hall RD. Estimation of surviving spiral ganglion cells in the deaf rat using the electrically evoked auditory brainstem response. *Hear Res* 1990;**49**(1-3):155-68.
62. Morest DK, Bohne BA. Noise-induced degeneration in the brain and representation of inner and outer hair cells. *Hear Res* 1983;**9**(2):145-51.
63. Kim J, Morest DK, Bohne BA. Degeneration of axons in the brainstem of the chinchilla after auditory overstimulation. *Hear Res* 1997;**103**(1-2):169-91.
64. Feng J, Bendiske J, Morest DK. Degeneration in the ventral cochlear nucleus after severe noise damage in mice. *Journal of neuroscience research* 2012;**90**(4):831-41.
65. Pienkowski M, Eggermont JJ. Long-term, partially-reversible reorganization of frequency tuning in mature cat primary auditory cortex can be induced by passive exposure to moderate-level sounds. *Hear Res* 2009;**257**(1-2):24-40.
66. Pienkowski M, Eggermont JJ. Intermittent exposure with moderate-level sound impairs central auditory function of mature animals without concomitant hearing loss. *Hear Res* 2010;**261**(1-2):30-5.
67. Groschel M, Gotze R, Ernst A, et al. Differential impact of temporary and permanent noise-induced hearing loss on neuronal cell density in the mouse central auditory pathway. *Journal of neurotrauma* 2010;**27**(8):1499-507.

LITERATURVERZEICHNIS

68. Sekiya T, Canlon B, Viberg A, et al. Selective vulnerability of adult cochlear nucleus neurons to de-afferentation by mechanical compression. *Experimental neurology* 2009;**218**(1):117-23.
69. Matsumoto M, Sekiya T, Kojima K, et al. An animal experimental model of auditory neuropathy induced in rats by auditory nerve compression. *Experimental neurology* 2008;**210**(1):248-56.
70. Sekiya T, Viberg A, Kojima K, et al. Trauma-specific insults to the cochlear nucleus in the rat. *Journal of neuroscience research* 2012;**90**(10):1924-31.
71. Sekiya T, Hatayama T, Shimamura N, et al. An in vivo quantifiable model of cochlear neuronal degeneration induced by central process injury. *Experimental neurology* 2000;**161**(2):490-502.
72. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepetz S, et al. Screening and detection of apoptosis. *The Journal of surgical research* 2007;**139**(1):143-56.
73. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 1995;**146**(1):3-15.
74. Fiske BK, Brunjes PC. Cell death in the developing and sensory-deprived rat olfactory bulb. *The Journal of comparative neurology* 2001;**431**(3):311-9.
75. Mandairon N, Jourdan F, Didier A. Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. *Neuroscience* 2003;**119**(2):507-16.
76. Kawabata K, Maeda S, Takanaga A, et al. Apoptosis and retinal projections in the dorsal lateral geniculate nucleus after monocular deprivation during the later phase of the critical period in the rat. *Anatomical science international* 2003;**78**(2):104-10.
77. Coordes A, Groschel M, Ernst A, et al. Apoptotic cascades in the central auditory pathway after noise exposure. *Journal of neurotrauma* 2012;**29**(6):1249-54.
78. Aarnisalo AA, Pirvola U, Liang XQ, et al. Apoptosis in auditory brainstem neurons after a severe noise trauma of the organ of Corti: intracochlear GDNF treatment reduces the number of apoptotic cells. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 2000;**62**(6):330-4.
79. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 1992;**119**(3):493-501.

80. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, et al. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 1998;**52**(6):252-8.
81. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 2009;**16**(1):3-11.
82. Przyborowski J, Wilenski H. Homogeneity of Results in Testing Samples from Poisson Series: With an Application to Testing Clover Seed for Dodder. *Biometrika* 1940;**31**(3/4):313-23.
83. Groschel M, Muller S, Gotze R, et al. 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.
84. Jewett DL, Williston JS. Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. *Brain : a journal of neurology* 1971;**94**(4):681-96.
85. Starr A, Zaaroor M. Eighth nerve contributions to cat auditory brainstem responses (ABR). *Hear Res* 1990;**48**(1-2):151-60.
86. Basta D, Ernst A. Erratum to "Noise-induced changes of neuronal spontaneous activity in mice inferior colliculus brain slices". *Neuroscience letters* 2005;**374**(1):74-9.
87. Basta D, Tzschentke B, Ernst A. Noise-induced cell death in the mouse medial geniculate body and primary auditory cortex. *Neuroscience letters* 2005;**381**(1-2):199-204.
88. Shore SE, Koehler S, Oldakowski M, et al. Dorsal cochlear nucleus responses to somatosensory stimulation are enhanced after noise-induced hearing loss. *The European journal of neuroscience* 2008;**27**(1):155-68.
89. Patterson JH, Jr., Hamernik RP. Blast overpressure induced structural and functional changes in the auditory system. *Toxicology* 1997;**121**(1):29-40.
90. Roberto M, Hamernik RP, Turrentine GA. Damage of the auditory system associated with acute blast trauma. *The Annals of otology, rhinology & laryngology Supplement* 1989;**140**:23-34.
91. Liberman MC. Chronic ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear Res* 1987;**26**(1):65-88.
92. Liberman MC, Dodds LW. Acute ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear Res* 1987;**26**(1):45-64.

93. Michiels C. Physiological and pathological responses to hypoxia. *The American journal of pathology* 2004;**164**(6):1875-82.
94. Yu CH, Moon CT, Sur JH, et al. Serial expression of hypoxia inducible factor-1alpha and neuronal apoptosis in hippocampus of rats with chronic ischemic brain. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 2011;**50**(6):481-5.
95. Hu BH, Cai Q, Manohar S, et al. Differential expression of apoptosis-related genes in the cochlea of noise-exposed rats. *Neuroscience* 2009;**161**(3):915-25.
96. Saljo A, Bao F, Jingshan S, et al. Exposure to short-lasting impulse noise causes neuronal c-Jun expression and induction of apoptosis in the adult rat brain. *Journal of neurotrauma* 2002;**19**(8):985-91.
97. Popelar J, Grecova J, Rybalko N, et al. Comparison of noise-induced changes of auditory brainstem and middle latency response amplitudes in rats. *Hear Res* 2008;**245**(1-2):82-91.
98. Syka J, Rybalko N. Threshold shifts and enhancement of cortical evoked responses after noise exposure in rats. *Hear Res* 2000;**139**(1-2):59-68.
99. Lim HW, Lee JW, Chung JW. Vulnerability to acoustic trauma in the normal hearing ear with contralateral hearing loss. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 2014;**123**(4):286-92.
100. 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.
101. Jacono AA, Hu B, Kopke RD, et al. Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla. *Hear Res* 1998;**117**(1-2):31-8.
102. Leake PA, Hradek GT, Bonham BH, et al. Topography of auditory nerve projections to the cochlear nucleus in cats after neonatal deafness and electrical stimulation by a cochlear implant. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 2008;**9**(3):349-72.
103. Mostafapour SP, Cochran SL, Del Puerto NM, et al. Patterns of cell death in mouse anteroventral cochlear nucleus neurons after unilateral cochlea removal. *The Journal of comparative neurology* 2000;**426**(4):561-71.
104. Lesperance MM, Helfert RH, Altschuler RA. Deafness induced cell size changes in rostral AVCN of the guinea pig. *Hear Res* 1995;**86**(1-2):77-81.

LITERATURVERZEICHNIS

105. Browne CJ, Morley JW, Parsons CH. Tracking the expression of excitatory and inhibitory neurotransmission-related proteins and neuroplasticity markers after noise induced hearing loss. *PloS one* 2012;**7**(3):e33272.
106. Norena AJ, Eggermont JJ. Changes in spontaneous neural activity immediately after an acoustic trauma: implications for neural correlates of tinnitus. *Hear Res* 2003;**183**(1-2):137-53.
107. Dong S, Mulders WH, Rodger J, et al. Acoustic trauma evokes hyperactivity and changes in gene expression in guinea-pig auditory brainstem. *The European journal of neuroscience* 2010;**31**(9):1616-28.
108. Dong S, Mulders WH, Rodger J, et al. Changes in neuronal activity and gene expression in guinea-pig auditory brainstem after unilateral partial hearing loss. *Neuroscience* 2009;**159**(3):1164-74.
109. Kaltenbach JA. The dorsal cochlear nucleus as a participant in the auditory, attentional and emotional components of tinnitus. *Hear Res* 2006;**216-217**:224-34.
110. Kraus KS, Canlon B. Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hear Res* 2012;**288**(1-2):34-46.
111. Kraus KS, Mitra S, Jimenez Z, et al. Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2010;**167**(4):1216-26.
112. Salinska E, Danysz W, Lazarewicz JW. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* 2005;**43**(4):322-39.
113. Canzoniero LM, Babcock DJ, Gottron FJ, et al. Raising intracellular calcium attenuates neuronal apoptosis triggered by staurosporine or oxygen-glucose deprivation in the presence of glutamate receptor blockade. *Neurobiology of disease* 2004;**15**(3):520-8.
114. Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. Ion homeostasis and apoptosis. *Current opinion in cell biology* 2001;**13**(4):405-11.
115. Johnson EM, Jr., Koike T, Franklin J. A "calcium set-point hypothesis" of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Experimental neurology* 1992;**115**(1):163-6.
116. Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, et al. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1987;**7**(7):2203-13.

LITERATURVERZEICHNIS

117. Faye-Lund H, Osen KK. Anatomy of the inferior colliculus in rat. *Anatomy and embryology* 1985;**171**(1):1-20.
118. Meininger V, Pol D, Derer P. The inferior colliculus of the mouse. A Nissl and Golgi study. *Neuroscience* 1986;**17**(4):1159-79.
119. Lu YM, Yin HZ, Chiang J, et al. Ca(2+)-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca²⁺ influx underlies potent induction of injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1996;**16**(17):5457-65.
120. Eimerl S, Schramm M. The quantity of calcium that appears to induce neuronal death. *Journal of neurochemistry* 1994;**62**(3):1223-6.
121. Dawes P, Munro KJ, Kalluri S, et al. Acclimatization to hearing aids. *Ear and hearing* 2014;**35**(2):203-12.
122. Humes LE, Wilson DL, Barlow NN, et al. Changes in hearing-aid benefit following 1 or 2 years of hearing-aid use by older adults. *Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR* 2002;**45**(4):772-82.
123. Silva AC, Bock NA. Manganese-enhanced MRI: an exceptional tool in translational neuroimaging. *Schizophrenia bulletin* 2008;**34**(4):595-604.
124. Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Molecular neurobiology* 2001;**24**(1-3):107-29.
125. Aoki I, Naruse S, Tanaka C. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR in biomedicine* 2004;**17**(8):569-80.
126. Kaltenbach JA, Zhang J, Finlayson P. Tinnitus as a plastic phenomenon and its possible neural underpinnings in the dorsal cochlear nucleus. *Hear Res* 2005;**206**(1-2):200-26.
127. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes & cancer* 2013;**4**(9-10):401-08.
128. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, et al. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995;**21**(5):1465-8.
129. Zille M, Farr TD, Przesdzing I, et al. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2012;**32**(2):213-31.

LITERATURVERZEICHNIS

130. Hight NG, McFadden SL, Henderson D, et al. Noise-induced hearing loss in chinchillas pre-treated with glutathione monoethylester and R-PIA. *Hear Res* 2003;**179**(1-2):21-32.
131. Lu J, Li W, Du X, et al. Antioxidants Reduce Cellular and Functional Changes Induced by Intense Noise in the Inner Ear and Cochlear Nucleus. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO* 2014.
132. Moteki H, Kitoh R, Tsukada K, et al. The advantages of sound localization and speech perception of bilateral electric acoustic stimulation. *Acta oto-laryngologica* 2014:1-7.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Felix Aslan Fröhlich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss wiederholter Lärmexposition auf die Auslösung von Zelltodmechanismen in der zentralen Hörbahn“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Felix Fröhlich hatte bisher folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation: „Gröschel M, Muller S, Gotze R, et al. 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“

Felix Fröhlich assistierte während der Messungen. Darüberhinaus war er in Teilen für die statistische Auswertung der BERA-Ergebnisse verantwortlich.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

LEBENS LAUF

Lebenslauf

Felix Aslan Fröhlich

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

LEBENS LAUF

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

Berlin, 12. Dezember 2014

Komplette Publikationsliste

Fröhlich, F.; Gröschel, M.; Ernst, A. und Basta D.: "Time Course of Cell Death Mechanisms within the Mouse Central Auditory System after Noise Trauma"
38th ARO Annual MidWinter Meeting, February 21-25th 2015, Baltimore, Maryland, USA

Fröhlich, F.; Gröschel, M.; Ernst, A. und Basta D.: "Characterization of cell-death mechanisms within the central auditory pathway upon repeated noise exposure"
Berlin Neuroscience Forum 2014, June 12-13th 2014, Liebenwalde, Germany

Fröhlich, F.; Gröschel, M.; Ernst, A. und Basta D.: "Characterization of cell-death mechanisms within the central auditory pathway upon repeated noise exposure"
37th ARO Annual MidWinter Meeting, February 22-26th 2014, San Diego, USA

Fröhlich, F.; Coordes, A.; Gröschel, M.; Jansen, S.; Ernst A.; Basta D.: "Noise Induced Apoptotic Mechanisms in the Central Auditory Pathway"
Berlin Neuroscience Forum 2012, July 5-6th 2012, Liebenwalde, Germany

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. Auf seine Hilfe bei praktischen wie theoretischen Problemen war immer Verlass. Dieses Kompliment möchte ich auch Herrn Dr. Moritz Gröschel aussprechen, der mir mit unermüdlichem Einsatz und seinen Ratschlägen immer zur Seite stand. Ein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arne Ernst, der die Durchführung dieser Projekte als Leiter der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Unfallkrankenhauses Berlin ermöglicht hat.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken für die erquickenden Gespräche, die befruchtenden Ratschläge, das gute Zusammenarbeiten, das produktive Arbeitsklima und die gemeinsamen Momente. Danken möchte ich auch dem gesamten Personal, das in dieses Projekt miteingebunden war, vor allem den Mitarbeitern der Klinik für Pathologie des Unfallkrankenhauses Berlin für die Mitarbeit in der Histologie.