

Aus der Universitäts-Hals-Nasen- und Ohrenklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Rudolf Hagen

**Mikroskopische und statistische
Auswertung der Auftretenshäufigkeit von Hensen-Körpern in
kochleären Haarzellen vom Meerschweinchen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Marc Höller
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2005

Referent:

Prof. Dr. med. Rudolf Hagen

Koreferent:

Prof. Dr. med. Ralf Dieler

Dekan:

Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2005

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Aufbau und die Funktion des Innenohres	2
1.1.1 Schalleitung	2
1.2 Aufbau der Kochlea	2
1.2.1 Scala vestibuli, Scala tympani und Ductus cochlearis	2
1.2.2 Elektrophysiologie und Ionenkonzentrationen	4
1.3 Aufbau und Struktur des Cortischen Organs	4
1.4. Aufbau und Funktion der äußeren und inneren Haarzellen	5
1.4.1 Äußere Haarzellen	5
1.4.2 Feinstruktureller Aufbau der äußeren Haarzellen	6
1.4.3 Innere Haarzellen	9
1.5 Funktionsweise des Innenohrs	10
1.5.1 Schallweiterleitung	10
1.5.2 Ortstheorie	10
1.5.3 Elektrophysiologie der Basilarmembran	11
1.5.4 Schallverstärkung	11
1.6 Hensen-Körper	12
1.6.1 Morphologie	12
1.6.2 Funktion der Hensen-Körper	13
1.6.2.1 Speicherung von Ca^{2+}	13
1.6.2.2 Membranbiosynthese	14
1.6.2.3 Membrantransport	14
1.6.2.4 Weitere Funktionen der Hensen-Körper	15
1.7 Salicylate und Chinin	15
1.7.1 Salicylate	15
1.7.2 Chinin	16
1.7.3 Salicylate und Chinin in der Innenohrforschung	16
1.7.4 Einfluss der Salicylate auf das Hören	17
1.7.5 Einfluss von Chinin auf das Hören	17
1.8 Schädigung des Gehörs durch Schall	17
2. Ziele der Arbeit	19
3. Material und Methoden	20

3.1 Kontrollgruppen	20
3.1.1 Gruppe der neugeborenen Tiere (KN):	20
3.1.2 Gruppe der vier Wochen alten Tiere („jugendliches Alter“, K4W)	20
3.1.3 Gruppe der vier Monate alten Tiere („jugendliches Erwachsenenalter“, K4M)	20
3.1.4 Geräuscharm aufgewachsene Tiere (KG)	21
3.2 Mit Schall behandelte Gruppen	21
3.2.1 Gruppe 90 dB (SPL) für 1 Stunde und Gruppe 90 dB (SPL) über 1 Woche	21
3.2.2 Gruppe 110 dB (SPL) 1 Stunde	21
3.3 Salicylgruppe	21
3.4 Chiningruppe	22
3.5 Gewinnung und Aufarbeitung der Innenohre für feinstrukturelle Untersuchungen	22
4. Ergebnisse	25
4.1 Versuchsanordnung	25
4.2 Ergebnisse aller Versuchstiergruppen	26
4.3 Fisher Test	26
4.4 Vergleich der Versuchstiergruppen mit der zusammengefassten Kontrolltiergruppe (K)	27
4.5 Vergleich der einzelnen Windungshöhen	28
4.6 Vergleich der p- Werte der verschiedenen Windungen untereinander	29
4.7 Ergebnisse innere Haarzellen	30
5. Diskussion	31
5.1 Hensen-Körper bezogen auf das Alter	31
5.2 Bildung der Kontrollgruppe „K“	32
5.3 Hensen-Körper als Korrelat für Schädigungen durch Schall	33
5.4 Hensen-Körper und Salicylate	34
5.5 Hensen-Körper und Chinin	35
5.6 Diskussion über das signifikante Auftreten von Hensen-Körpern in den verschiedenen Windungen der Cochlea	37
5.7 Hensen-Körper als Korrelat für Schädigungen durch Schall pro Windungshöhe	37
5.8 Hensen-Körper und Salicylate pro Windung	37

5.9 Hensen-Körper und Chinin pro Windung	38
5.10 Hensen-Körper in Inneren Haarzellen	38
6. Zusammenfassung	39
7. Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

In verschiedenartigen am Ionen- und Flüssigkeitsaustausch teilnehmenden Epithelzellen und Haarzellen existiert ein durch Membranen begrenztes System: das tubulo-vesiculäre endoplasmatische Retikulum. Dieses System wird, Spicer et al. [62] folgend, in der folgenden Arbeit canalicular reticulum (CR) genannt. Spicer et al. beschreiben bei der Fixierung mit „Osmium-tetroxide-ferrocyanide“ eine vermehrte Anzahl von Hensen-Körpern und weitere neu entdeckte membranreiche Systeme: lineare Zisternen, Vesikelanhäufungen, Komplexe aus Kanälen und segmentierten Zisternen. Diese Systeme liegen in enger räumlicher Nachbarschaft zu Mitochondrien.

Das CR der Haarzelle liegt neben und unterhalb der Kutikularplatte und wird von apikal gelegenen Golgiapparaten gebildet. Das CR steht mit seinem seitlichen Anteil in Verbindung mit den apikaleren Anteilen der subplasmalemalen Zisternen (subsurface cisternae, SSC). Des Weiteren verbinden unverzweigte, lineare Zisternen Anteile vom CR mit tiefer gelegenen Anteilen der SSC.

Im Zytosol der kochleären äußeren Haarzellen liegende und den Hensen-Körpern ähnelnde Vesikelanhäufungen liegen in enger Nachbarschaft zu Mitochondrien und besitzen ebenfalls Kanäle und segmentierte Zisternen. Unter der Annahme, dass Hensen-Körper und diese Vesikelanhäufungen wie die meisten anderen zytoplasmatischen Vesikel für den Membrantransport zuständig sind, berechtigt dies zur Folgerung, dass Hensen-Körper und Vesikelanhäufungen unter anderem dem Transport von nachwachsenden Membranen zu den SSC dienen.

So kommt es bei einer Schädigung der Haarzellen zu einem Defekt an den um die Kutikularplatte gelegenen Membransystemen. Es besteht demnach ein vermehrter Bedarf an Membranbestandteilen die für Reparatur und Wiedererlangung der Funktion nötig sind. Daher nimmt man an, dass Hensen-Körper vermehrt in Haarzellen auftreten, die durch eine Noxe geschädigt worden sind. Z.B. bewirkt eine Stimulation mit Schall strukturelle und funktionelle Veränderungen in den Haarzellen des Cortischen Organs [52, 65]. Veränderungen an Haarzellen konnten ebenfalls durch Salicylat-Intoxikation [10] und durch Chinin [12] beobachtet werden.

1.1 Aufbau und die Funktion des Innenohres

1.1.1 Schalleitung

Schallwellen gelangen über den äußeren Gehörgang zum Trommelfell. Dort wird die Schallenergie über den Schalleitungsapparat, der insbesondere aus den drei Gehörknöchelchen (Malleus, Stapes und Incus) besteht, zur Cochlea geleitet. Die Cochlea windet sich spiralförmig um den Modiolus und den darin befindlichen Spiralganglienzellen. Sie besitzt je nach Tierart eine unterschiedliche Länge und eine unterschiedliche Anzahl von Windungen. Beim Menschen ist sie zwischen 29 - 42 mm lang und 2,5 mal um den Modiolus gewunden, beim Meerschweinchen besitzt die Cochlea 4 Windungen und eine Länge von etwa 21 mm [30].

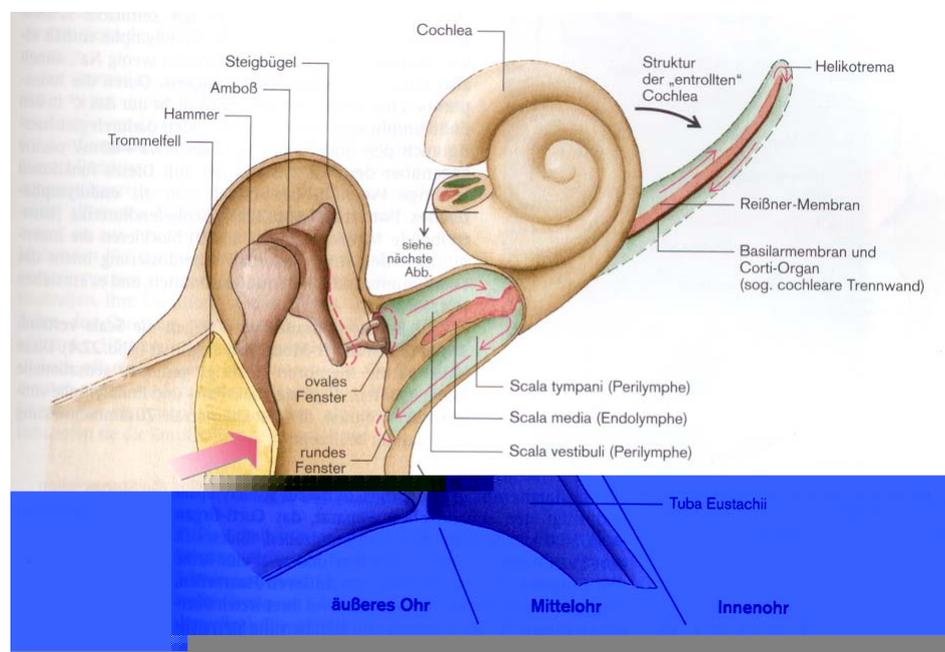


Abb. 1: Schematische Darstellung des peripheren Hörorgans, Cochlea

in physiologischer und in ausgezogener Form dargestellt (modifiziert nach [42]).

1.2 Aufbau der Cochlea

1.2.1 Scala vestibuli, Scala tympani und Ductus cochlearis

Die Cochlea besteht aus drei getrennten Kammern:

- Oben (siehe Abb.2) liegt die Scala vestibuli, die mit dem Vestibulum in Verbindung steht
- Unten befindet sich die Scala tympani, die durch das runde Fenster (siehe Abb.1) begrenzt wird

- In der Mitte liegt die Scala media, auch Ductus cochlearis genannt. Sie wird gegen die Scala tympani durch die Basilarmembran und gegen die Scala vestibuli durch die Reissnersche Membran abgegrenzt.

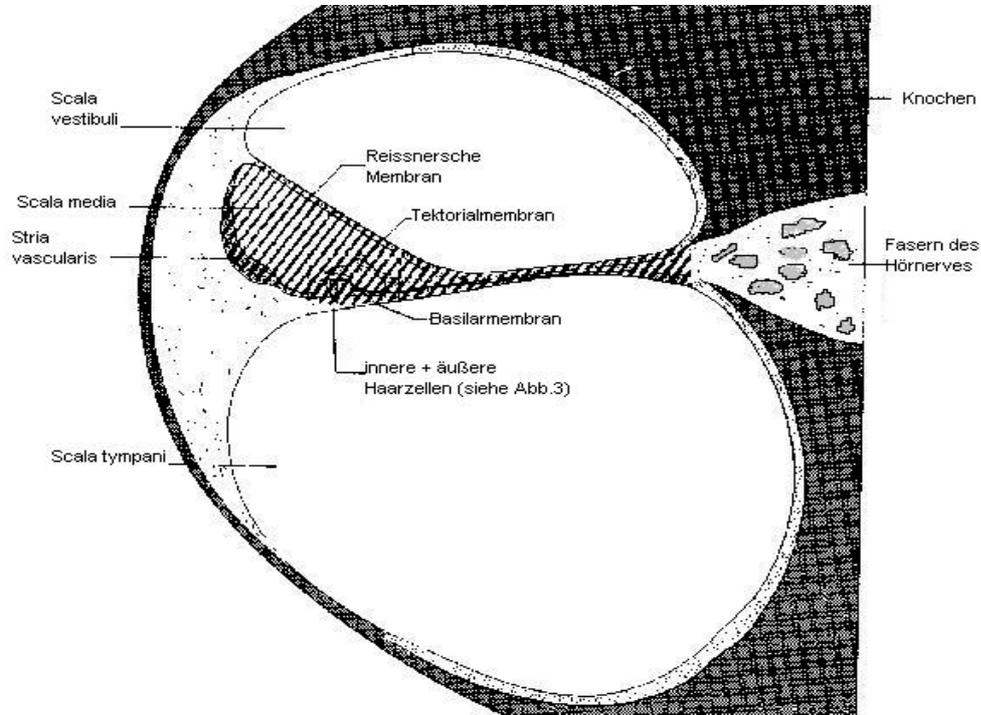


Abb. 2: Querschnitt durch das Cortische Organ, die für die Funktion wichtigen Strukturen sind beschriftet (modifiziert nach [42]).

Die Reissnersche Membran ist auf der Scala media zugewandten Seite aus einer dünnen einlagigen Epithelschicht aufgebaut, deren Zellen über Zonulae occludentes miteinander verbunden sind. Auf der der Scala vestibuli zugewandten Seite besteht sie aus einer Basalmembran, die von einer dünnen und lückenhaften Schicht mesenchymaler Zellen bedeckt ist [63]. So feinstrukturell aufgebaut, ist die Reissnersche Membran fähig, den großen elektrochemischen Gradienten zwischen Endo- und Perilymphe aufrecht zu erhalten.

Die Basilarmembran ist zwischen der Lamina spiralis ossea des Modiolus und dem Ligamentum spirale, das die Stria vascularis trägt, an der seitlichen Kochleawand gespannt. Sie wird in ihrem Verlauf von der Basis zum Apex der Cochlea immer dünner und breiter [42]. Auf ihre Funktion wird später noch eingegangen. In ihrem feinstrukturellen Aufbau besteht die Basilarmembran aus Fibrillen, die radiär in eine homogene Grundsubstanz eingebettet sind [26]. In der basalen Windung befindet sich auf der der Scala tympani zugewandten Seite eine Schicht amorphen Materials, welches von mesothelialen Zellen der tympanalen Belegschaft und longitudinal laufenden Kapillaren überzogen ist.

1.2.2 Elektrophysiologie und Ionenkonzentrationen

In der Scala vestibuli und in der Scala tympani befindet sich Perilymphe. Diese entspricht weitgehend der extrazellulären Ionenkonzentration mit einer hohen Natriumionenkonzentration von etwa 140 mmol/l [54]. Beide Perilymphräume sind miteinander über das Helikotrema an der Schneckenspitze verbunden. Die Scala media ist mit Endolymphe gefüllt. Diese enthält etwa 145 mmol/l K^+ und relativ wenig Natrium. Sie entspricht in ihrer Ionenkonzentration etwa dem intrazellulären Milieu [42, 54]. Im Gegensatz zur Scala tympani und vestibuli endet die Scala media blind im Apex der Cochlea. An ihrer Basis ist sie über den Ductus reuniens mit dem Sacculus und so indirekt mit dem endolymphatischen System des Vestibularapparates verbunden.

Innerhalb der Scala media stellen die Nuelsen Räume und der Cortische Tunnel eine funktionell bedeutende Ausnahme bezüglich der Ionenkonzentration dar. Trotz ihrer Lage im Endolymphe gefüllten Raum fließt in ihnen Perilymphe [8].

Die laterale Wand der Scala media wird durch die Stria vascularis gebildet. Ihre Aufgabe ist es, die Ionenkonzentration in der Scala media konstant zu halten.

In der Stria vascularis wird durch oxidative Phosphorylierung Energie in Form von ATP gewonnen. Durch einen energieabhängigen Ionentransport in den Ductus endolymphaticus kommt es zu einer Potentialdifferenz von +80 bis +110 mV im Vergleich zu den perilymphatischen Räumen. Dies stellt den sog. Ruheionenstrom dar [73, 74].

1.3 Aufbau und Struktur des Cortischen Organs

Das Cortische Organ liegt in der Scala media auf der Basilarmembran und bildet das eigentliche Transformationsorgan für den Schall. Es besteht aus drei Reihen äußerer und einer Reihe innerer Haarzellen. Diese Sinneszellen sind von Stützzellen umrahmt und bilden zusammen eine funktionelle Einheit, die beim Menschen ca. 3.500 mal aufgereiht auf der Basilarmembran zu finden ist.

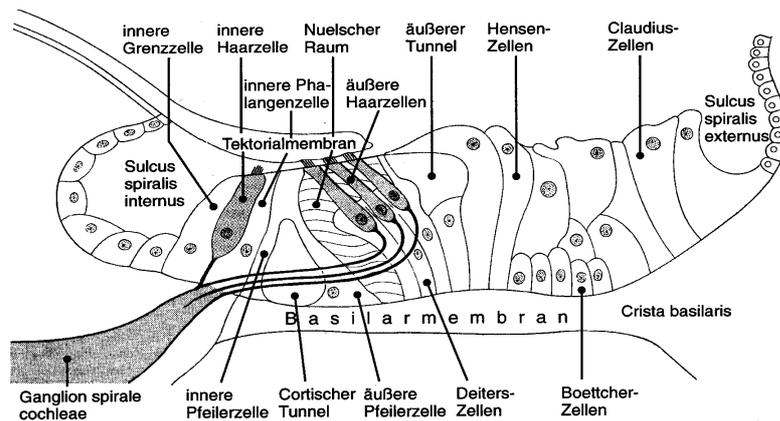


Abb. 3: Schematische Darstellung der Anatomie des Cortischen Organs. Die Stereozilien der drei Reihen äußerer Haarzellen haben direkten Kontakt mit der Tektorialmembran, während die Stereozilien der inneren Haarzellen frei stehen (modifiziert nach [11]).

Somit finden sich beim Menschen ca. 10.000 bis 12.000 äußere und ca. 3.500 innere Haarzellen [8]. Wegen der apikalen von Zellmembranen umgebenen Ausstülpungen und den darin längsverlaufenden Filamenten, zumeist Aktinfilamenten, werden diese Zellen auch Haarzellen genannt. Obwohl diese Ausstülpungen keinen typischen Aufbau eines Stereoziliums, d.h. Mikrotubuli in der „9+2“-Anordnung, haben werden sie in der Literatur meist als solche bezeichnet [11].

1.4. Aufbau und Funktion der äußeren und inneren Haarzellen

1.4.1 Äußere Haarzellen

Die äußeren Haarzellen sind schmale längliche Zellen mit einem basal gelegenen Zellkern. An das Cortische Organ sind sie basal durch die sie umschließenden Deiters-Zellen befestigt. Apikal sind sie durch die Lamina reticularis horizontal fixiert. Der Zellkörper selbst steht frei und wird von der im Nuelschen Raum enthaltenen Perilymphe umspült. Entlang der Kochlea unterscheiden sich die äußeren Haarzellen in Form und Länge beträchtlich. Die seitlich gelegenen äußeren Haarzellen der oberen Windung sind in etwa doppelt so lang wie die medial gelegenen. Von lateral nach medial findet sich ein abnehmender Neigungswinkel der Zellen bezogen auf die Basilar membran. Die äußeren Haarzellen in den basalen Windungen der Kochlea sind kürzer als die in den apikalen Windungen.

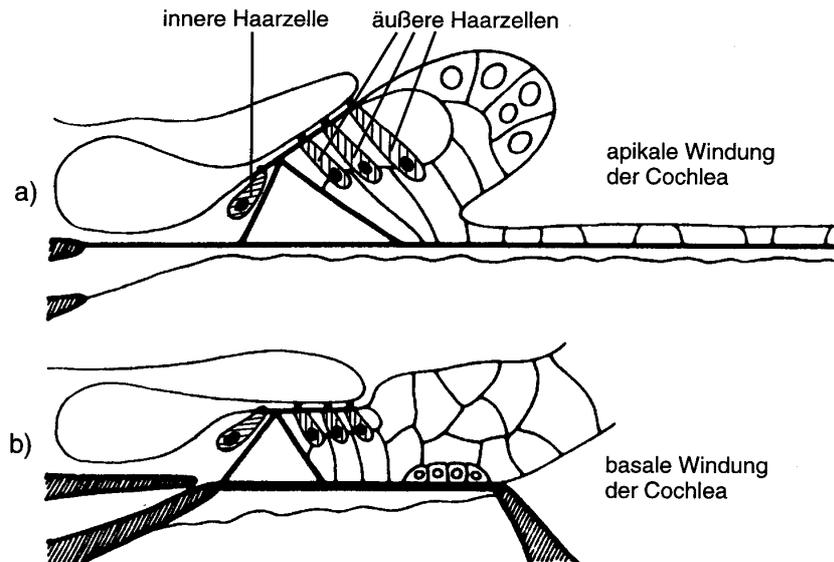


Abb. 4: Schematische Darstellung der Morphologie des Cortischen Organs in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Cochlea. Zu Beachten sind die strukturellen Unterschiede zwischen apikaler (a) und basaler Windung (b), vor allem in Form und Lage der äußeren Haarzellen sowie der Lokalisation der inneren Haarzellen zur Lamina spiralis ossea des Modiolus (modifiziert nach [63]).

1.4.2 Feinstruktureller Aufbau der äußeren Haarzellen

Einen Überblick über den feinstrukturellen Aufbau einer äußeren Haarzelle gibt Abb. 5.

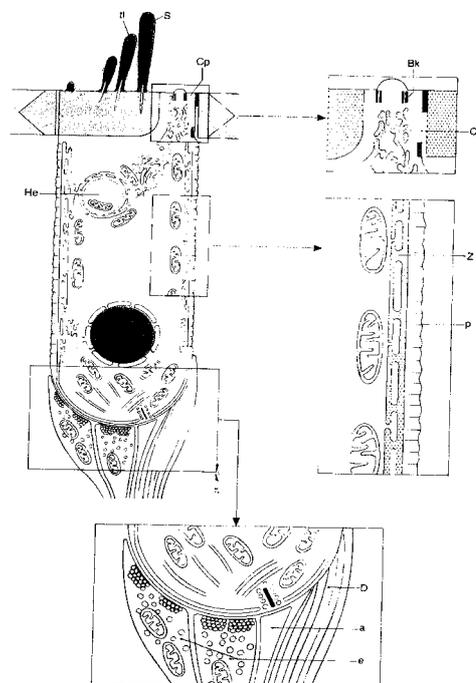


Abb. 5: Schematische Darstellung einer äußeren Haarzelle. Stereozilien (S) mit „tip links“ (tl), Hensen-Körper (He) mit reichlich apikalem endoplasmatischem Retikulum, das sich bis in die Kutikularpore (Cp) erstreckt. In der Pore befindet sich ein Basalkörperchen (Bk). Plasmamembran (p) mit Oberflächenzisternen (Z). Deiters-Fortsatz (D) zur Fixierung der Zellbasis. Afferente Nervenendigungen (a) und efferente Nervenendigungen (e) (modifiziert nach [26]).

Am apikalen Pol der Haarzellen treten beim Menschen ca. 80 Stereozilien aus der Kutikularplatte aus [42]. Diese Stereozilien nehmen von zentral nach peripher in der Länge zu und sind in 3-5 Reihen in typischer „W“- Form angeordnet. Sie sind von der Zellmembran überzogen und enthalten vor allem länglich verlaufende Mikrofilamente. An der Spitze weisen die Stereozilien einen größeren Durchmesser auf als an ihrer in der Kutikularplatte fixierten Basis. Die Stereozilien sind von einer Glykokalix bedeckt und untereinander durch feine Eiweißfäden verbunden. Diese sog. „tip links“ sind etwa 10 nm dick und ziehen von den Spitzen der kürzeren Villi zu den längeren Villi [42]. Die Kutikularplatte ist aus einer homogenen Masse aufgebaut und kann eine dreieckige Form haben, deren spitzer Winkel in das Zytoplasma reicht. Lateral hat jede Kutikularplatte eine Lücke, die sog. Kutikularpore. Hier finden sich glattes endoplasmatisches Retikulum und evtl. einige Mitochondrien. Zudem liegt dort ein Basalkörper, der für einen ontogenetischen Überrest eines Kinoziliums gehalten wird [63]. Das Zytoskelett der Stereovilli besteht insbesondere aus Aktin und Fimbrin [15]. In der Kutikularplatte kommen nicht polymerisiertes Aktin, α -Aktin, Myosin, Fimbrin und Tubulin vor [15, 20, 21, 60, 71]. Zwischen den Fasern des Zytoskeletts liegt Hyaluronsäure um ein leichteres Gleiten zu ermöglichen [1].

Unterhalb der Kutikularplatte befinden sich Mitochondrien, Lysosomen, Golgi-Apparate, glattes endoplasmatisches Retikulum und multivesikuläre Körper. In der unteren Hälfte des Zytoplasmas der äußeren Haarzellen liegen Glykogengranula, Polyribosomen, einige Mitochondrien und kleine membranständige Vesikel [40, 53].

Bei verschiedenen Säugetieren wurde eine zytoplasmatische Membranbesonderheit beschrieben: die SSC (subsurface cisternae, subplasmalemmale Zisternen) [53].

Wegen ihres feinstrukturellen Aufbaus wurden sie mit dem sarkoplasmatischen Retikulum der Skelettmuskulatur verglichen [22]. Es konnte zudem eine erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration [31] und das Enzym Ca^{2+} -ATPase [57] gefunden werden. Zum ersten Mal wurden SSC in Verbindung mit Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems von Wirbeltieren und wirbellosen Tieren beschrieben [53]. Engström und Sjöstrand [16] waren die Ersten, welche die Doppelmembrananhäufungen in den äußeren Haarzellen beschrieben. Die SSC liegen parallel verlaufend direkt unter der seitlichen Plasmamembran und reichen von der Spitze der äußeren Haarzelle bis zu ihrer Basis. Der basal gelegene synaptische Bereich wird jedoch ausgespart. Parallel zu den SSC liegen typischerweise Mitochondrien. Im supranukleären Bereich sind die SSC aus bis zu 12 Schichten aufgebaut. Im Verlauf zur Zellbasis dünnen sie dann bis auf nur noch eine Schicht aus.

Die äußerste Schicht der SSC besteht im supranukleären Bereich aus flachen Zisternen und im infranukleären Bereich aus Röhren (Tubuli). Diese Tubuli der äußersten Schicht verlaufen fast senkrecht zur Zellachse und liegen parallel nebeneinander. Zwischen der äußersten Schicht der SSC und der lateralen Plasmamembran wurden entlang dieser Tubuli elektronendichte Strukturen im Zytoplasma gefunden. An der inneren Fläche der innersten Schicht der SSC finden sich häufig Ribosomen [61]. Eine Verbindung zwischen den einzelnen Schichten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Tiefere Schichten bestehen aus gefensterten Zisternen, wobei im apikalen Bereich auch scheibenartige Strukturen zu finden sind [53].

Die laterale Plasmamembran und die äußere Schicht der SSC sind über Pfeiler miteinander verbunden. Diese stehen mit Filamenten in Verbindung, die sich in einem Winkel von ca. 15° um den Umfang der Zelle winden und selbst mit dünneren Filamenten querverbunden sind [3, 27, 28, 38]. An der Oberfläche der innersten Innenschicht sind Ribosomen zu finden. Die um die Haarzelle verlaufenden Filamente sind wahrscheinlich aus Aktin und die dünneren Filamente aus Spektrin aufgebaut [28]. Myosin und Tropomyosin konnten ebenfalls nachgewiesen werden [15, 22, 60, 72].

Die SSC stehen mit dem glatten endoplasmatischen Retikulum, den in der Kutikularpore liegenden Zisternen, der Kernmembran, den subsynaptischen Zisternen und auch mit den Hensen-Körpern in Verbindung. Eine nähere Beschreibung der Hensen-Körper folgt.

Eine weitere Struktur in äußeren Haarzellen sind die Vesikelhaufen („clusters of cytosolic vesicles“), die vor allem in der oberen Hälfte der Zelle gefunden werden. An den Stellen, an denen die SSC nur aus wenigen Schichten bestehen, werden sie von diesen Vesikelhaufen kontaktiert. Die Vesikelhaufen sind meist von Kanälchen und Mitochondrien umgeben [62].

In den äußeren Haarzellen des Ohres wird noch ein weiteres, auf Membranen basierendes System beschrieben. Bei Engström und Wersäll [17] wird es „lamellar bodies“ genannt. Es liegt unterhalb der Kutikularplatte, besteht aus konzentrischen Schichten von unterschiedlich großen, gefensterten Zisternen bzw. aus miteinander verbundenen Tubuli, wie sie auch in den SSC zu finden sind. Diese „lamellar bodies“ sind von Mitochondrien umgeben und liegen in enger räumlicher Nachbarschaft zu den Golgi-Apparaten. Gewöhnlich findet man 2-4 in jeder Zelle, von denen einige frei im Zytoplasma liegen und einige mit den SSC verbunden sind. Ähnlich wie auch die SSC sind diese „lamellar bodies“ mit elektronendichtem Material gefüllt. Ob zwischen den SSC und den „lamellar bodies“ eine funktionelle Beziehung besteht ist trotz desselben Ursprungs, dem endoplasmatischen Retikulum, noch nicht endgültig

geklärt. Man vermutet jedoch, dass beide Membransysteme eine Rolle bei der Empfindungswahrnehmung spielen [17, 64]. Saito hält die „lamellar bodies“ für ein Membran-Reservoir, das für den Aufbau und die Anzahl der Schichten der SSC zuständig ist [53].

Für eine hohe Stoffwechselaktivität der SSC spricht die enge Nachbarschaft der Mitochondrien zu den SSC [64].

Die genaue Funktion der SSC in den Haarzellen ist nicht bekannt.

- Wegen der Nähe zur präsynaptischen Membran kann angenommen werden, dass die SSC die präsynaptischen Ionenströme erhöhen, die für eine Transmitterfreisetzung an den afferenten Synapsen nötig sind [53].
- Eine andere Hypothese sieht die SSC direkt am Transport der synaptischen Transmitter beteiligt [45].
- Ein weiterer Vorschlag sieht in den SSC ein mechanisches System, das die seitliche Plasmamembran und den Zellkörper in Form hält [53].

1.4.3 Innere Haarzellen

Innere Haarzellen besitzen einen zentral gelegenen Zellkern. Ihr schematischer Aufbau ist in Abb. 6: erklärt.

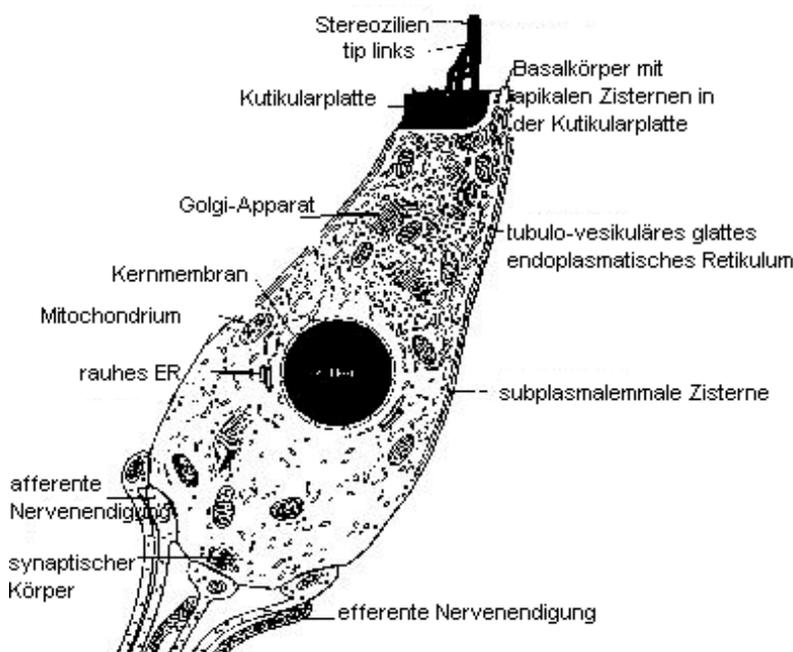


Abb. 6: Schematische Abbildung einer inneren Haarzelle; die Strukturen sind in der Abbildung beschrieben (modifiziert nach [11]).

Die inneren Haarzellen sind so von Zellen umgeben, dass nur noch ihre Zellapex frei in die Cochlea ragt. In den basalen Anteilen der Cochlea liegen die inneren Haarzellen soweit außen

über der Ansatzstelle der Basilarmembran am Rand der Lamina spiralis ossea, dass die inneren Haarzellen nicht mehr direkt durch die Schwingungen der Basilarmembran erregt werden können (siehe Abb.4). Aus der ovalförmigen Kutikularplatte gehen die Stereovilli hervor. Diese sind meist größer als die der äußeren Haarzellen [44]. Ihr weiterer Aufbau entspricht ansonsten dem der äußeren Haarzellen. Die Stereovilli sind in drei Reihen angeordnet, wobei ihre Länge in Richtung der inneren Pfeilerzellen zunimmt. Bei einigen inneren Haarzellen kann in der Kutikularpore ein Basalkörperchen, das ein Rudiment des Kinoziliums darstellt, erkannt werden. Im Zytoplasma findet man subapikal viele Lysosomen, Golgi-Apparate und Mitochondrien. Die bei den äußeren Haarzellen beschriebenen Strukturproteine des Zytoskeletts findet man in leicht veränderter Anordnung auch in den inneren Haarzellen wieder. Supranukleär kann man vor allem endoplasmatisches Retikulum in tubulo-vesikulärer Form finden. Auf gleicher Höhe liegen auch die in den äußeren Haarzellen beschriebenen SSC [44, 63]. Im Gegensatz zu den dort beschriebenen SSC sind sie hier immer einlagig und bilden kein zusammenhängendes subplasmalemmales Zisternensystem. Mikrotubuli liegen vermehrt apikal und basal.

1.5 Funktionsweise des Innenohrs

1.5.1 Schallweiterleitung

Bei Beschallung überträgt der Stapes die Schwingungsenergie über das ovale Fenster auf die Perilymphe der Scala vestibuli. Die Perilymphe ist nahezu inkompressibel. Kommt es jetzt zu einer Einwärtsbewegung des Stapes in Folge eines Schallreizes, überträgt die Perilymphe die Schallenergie auf die kochleären Membranen (Basilarmembran, Tektorialmembran und Reissnersche Membran), die mit Ausweichbewegungen reagieren. Durch diese wird wiederum die Perilymphe der Scala tympani verdrängt. Diese Verdrängung der Perilymphe wird durch die Elastizität der Membran des runden Fensters ermöglicht [6, 42].

Bei der Auswärtsbewegung des Stapes kommt es zu den gleichen Bewegungsabläufen in umgekehrter Reihenfolge. Folglich schwingen die kochleären Membranen nach einer akustischen Reizung laufend auf und ab. Für die mechanische Funktion der Kochlea ist die Reissnersche Membran ohne Bedeutung [8]. Von Bedeutung ist jedoch die Basilarmembran. Sie ist Dank ihres Aufbaus für die Fortleitung von passiven Wanderwellen gut geeignet.

1.5.2 Ortstheorie

Die Basilarmembran wird in ihrem Verlauf von der Basis bis zum Helikotrema zunehmend breiter. Durch diese Breitenzunahme kommt es in ihrem Verlauf zum Helikotrema zu einer

10.000-fachen Abnahme ihrer Steifheit. Durch diese Elastizitätszunahme wird bestimmt, an welchem Ort der Basilarmembran die Schwingungsfähigkeit für eine bestimmte Schallfrequenz optimal ist [42]. Hohe Frequenzen haben ihr Optimum an der Basis der Basilarmembran, tiefe Frequenzen am Apex.

Schallwellen, die über den Stapes ans Innenohr weitergeleitet werden, verursachen über diesen Mechanismus Wanderwellen, die von der Basis der Basilarmembran bis zur Apex laufen. Je nach Schallfrequenz erreichen diese Wanderwellen an unterschiedlicher Stelle auf der Basilarmembran eine maximale Auslenkung. Durch diese passive mechanische Eigenschaft der Basilarmembran wird jeder Schallfrequenz ein spezifischer Ort auf der Basilarmembran zugeordnet. Durch diese „Frequenz-Ortsabbildung“ (= „Ortstheorie“) wird der Schall grob in seine spektralen Einzelkomponenten zerlegt [42].

Durch die frequenzspezifische Auslenkung der Basilarmembran kommt es auch an den entsprechenden Abschnitten der Kochlea zu einer maximalen Auslenkung. Dabei kommt es in diesen Bereichen zu einer Verschiebung zwischen Basilarmembran und Tektorialmembran, so dass Scherkräfte entstehen, die die in die Tektorialmembran eingelagerten Stereovilli tangential verschieben. Dieses „Verschieben“ stellt den adäquaten Reiz für die Haarzellen dar [6].

1.5.3 Elektrophysiologie der Basilarmembran

Bei der Aufwärtsbewegung der Basilarmembran kommt es zur Dehnung der „tip links“ und so zum Öffnen von mechanosensitiven Transduktionskanälen in den Stereovilli. Während der „Offenphase“ der Transduktionskanäle kommt es zu einem K^+ - Ionen Einstrom entlang des Potentialgefälles des Endolymphraumes (der ein Potential von +80 mV hat) in das Innere der äußeren Haarzelle (die ein Membranpotential von -70 mV besitzt). Es resultiert eine Depolarisation der Zelle. Bei der darauf folgenden Abwärtsbewegung entspannen sich die „tip links“ und es schließen sich die Kanäle wieder. K^+ - Ionen fließen in die kaliumarmen Extrazellulärräume des Cortischen Organs. Es kommt zur Repolarisation der Zelle [42].

1.5.4 Schallverstärkung

Die äußeren Haarzellen haben neben der mechanoelektrischen Transduktion des Schalls noch eine weitere Funktion: Durch den ständigen Wechsel des Membranpotentials beginnen die äußeren Haarzellen in ihrer Länge zu oszillieren. Dazu besitzen sie in ihrer Zellmembran einen kontraktilem Apparat, über den sich die äußeren Haarzellen je nach Membranpotential aktiv verlängern oder verkürzen können. Auf diesem Weg erzeugen sie zusätzliche

mechanische Energie, die aktiv die Wanderwelle verstärkt. Da dies vor allem in den Bereichen der maximalen Auslenkung der Basilarmembran geschieht, wird auf diesem Weg die Frequenzselektivität verbessert. Durch die so verstärkten Schwingungsenergien werden nun auch die inneren Haarzellen erregt. Die Depolarisation der inneren Haarzelle führt jedoch nicht wie bei den äußeren Haarzellen zu einer Längenänderung. Es kommt hier durch Ca^{2+} -Einstrom zur Freisetzung des Transmitters Glutamat am basalen Pol der Haarzelle. Auf diese Weise entstehen Aktionspotentiale. Es folgt eine Erregung der afferenten Nerven.

Trotz dieser Verstärkung sind die Amplituden der Basilarmembran sehr gering und entsprechen bei der Hörschwelle gerade mal einer Höhe von 10^{-10} m, d.h. sie haben gerade mal den Durchmesser eines Wasserstoffatoms [42].

1.6 Hensen-Körper

1.6.1 Morphologie

In der Arbeit von Spicer et al. wird ein erhöhtes Auftreten von Hensen-Körpern unter der Fixation mit Osmium-Ferrocyanid beschrieben.

Hensen-Körper (Hensen bodies, HB) kommen in verschiedenen Größen vor. Die kleineren Exemplare zeigen eine kompakte kreisförmige Gestalt. Die größeren Exemplare haben eine ringförmige Struktur, die von vielen Vesikeln gebildet wird. Hensen-Körper werden von sich verzweigenden Kanäle und segmentierten Zisternen umgeben. Oft liegen diese Strukturen bogenförmig angeordnet vor und bilden eine Brücke zu den SSC. Zusätzlich stehen Hensen-Körper in engem Kontakt mit zahlreichen Mitochondrien. In der Literatur werden sie auch als lamellenförmig aufgebaut beschrieben [17]. Hensen-Körper kommen hauptsächlich in der oberen Hälfte der äußeren Haarzelle vor, liegen an der Seitenwand und grenzen meistens an die SSC an. Vereinzelt liegen sie frei im Zytoplasma unterhalb des CR (canalicular reticulum) ohne in direktem Kontakt mit den SSC zu stehen [62]. Spicer et al. fanden bei ihren Untersuchungen auch supranukleär gelegene kleine vesikuläre Strukturen in den äußeren Haarzellen. Diese liegen nicht in direkter Nachbarschaft mit den SSC. Sie werden aber wie die Hensen-Körper von Kanälchen, segmentierten Zisternen und von Mitochondrien umgeben. Daher vermuten Spicer et al. [62], dass es sich bei diesen Strukturen um frühe Vorstufen von Hensen-Körpern handelt.



Abb. 7: Vergrößerung mit Ölimmersion; in der medialen äußeren Haarzelle liegt apikal ein Hensen-Körper (mit Pfeil markiert), der in Verbindung mit den subplasmalemmalen Zisternen liegt.

In den inneren Haarzellen wurden Hensen-Körper in der Literatur bisher nicht beschrieben.

1.6.2 Funktion der Hensen-Körper

1.6.2.1 Speicherung von Ca^{2+}

Äußere Haarzellen erhöhen die Empfindlichkeit der Kochlea und führen durch aktive Prozesse zu einer Beeinflussung der akustischen Stimulation. Für diese Prozesse sind unter anderem Calciumionenströme nötig.

Mammano et al. [46] fanden bei ihrer Suche nach subzellulären Strukturen für eine intrazelluläre Calciumfreisetzung in äußeren Haarzellen, dass diese in einem Gebiet unterhalb der Kutikularplatte gelegen sein muss. Hier befinden sich „tubulovesicular and cisternal ER and densely packed mitochondria“, die die Hensen-Körper bilden. Mammano et al. wiesen durch Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz nach, dass Hensen-Körper als Ca^{2+} Speicher fungieren. In den äußeren Haarzellen kommt es nach Stimulation mit Inositol-Triphosphat zu einem Anstieg von Ca^{2+} im Zytoplasma der äußeren Haarzellen. Dieser Anstieg erfolgt unterhalb der Kutikularplatte, dem Bereich, in dem die Hensen-Körper vorkommen [46]. Wie schon beschrieben, sind Hensen-Körper von Kanälchen und segmentartig angeordnete Zisternen umgeben und stehen in engem räumlichen Kontakt mit Mitochondrien. Diese enge Nachbarschaft zu den Mitochondrien kann mit der Ca^{2+} Speicherfunktion der Hensen-Körper erklärt werden. Mitochondrien sind Hauptverantwortlich

für eine Senkung des intrazellulären Ca^{2+} Spiegels in den Haarzellen, nachdem es aus den Hensen-Körpern freigesetzt wurde. Eine weitere Erklärung für die Lage der Mitochondrien ist die Energieabhängigkeit der Calcium-Freisetzung in äußeren Haarzellen. Für diesen Prozess ist Adenosin-Triphosphat (ATP) notwendig. Dieses stammt aus den Mitochondrien [46].

1.6.2.2 Membranbiosynthese

In Zellen, die wie die äußeren Haarzellen auf die Funktionsfähigkeit dieser aus Membranen gebildeten Strukturen angewiesen sind, hat die Membranbiosynthese eine Schlüsselrolle.

Spicer et al. [62] fanden, dass Hensen-Körper mit Komplexen aus Kanälchen, segmentierten Zisternen und Mitochondrien in engem Kontakt stehen. Kanälchen aus den SSC umschlossen die Hensen-Körper. Einige dieser Kanälchen wuchsen in die Hensen-Körper ein und sonderten Vesikel in diese ab. Aus dieser strukturellen Anlage lässt sich folgern, dass die Zisternen und Kanälchen Adenosin-Triphosphate (ATP) aus den benachbarten Mitochondrien zur Energiegewinnung für die Proteinphosphorylierung benutzen.

1.6.2.3 Membrantransport

Spicer et al. [62] nahmen an, dass Hensen-Körper in Verbindung mit dem Transport von Zellmembranen von ihrem Bildungsort zu ihrem Zielort, bzw. wieder für den Transport von den zellulären Endstrukturen zu den lysosomalen aktiven Lysosomen stehen. Wenn man die Vesikel und Hensen-Körper für Transportvesikel hält, setzt das voraus, dass sie aus den Kanälchen und Zisternen, die aus dem apikal gelegenen kanalikulärem Retikulum stammen, entstehen bzw. mit ihnen verschmelzen. Aus dem morphologischen Erscheinungsbild und dem Mangel einer anderen „Membranquelle“ schließen Spicer et al., dass diese begrenzenden Kanälchen der Entstehungsort und nicht das Ziel der Transportvesikel sind. Als Ziel kommen für Spicer et al. nur die SSC in Frage. Bei Weaver und Schweitzer [70] wird von der postnatalen Genese von SSC berichtet, aber dies erklärt ihr Fortbestehen beim Erwachsenen noch nicht. Jedoch konnte beobachtet werden, dass Hensen-Körper häufig dort den SSC anliegen, wo diese nur einige Schichten dick sind. Dies legt nahe, dass sie dazu dienen, bei erwachsenen Tieren diese dünnen Stellen in den SSC aufzufüllen. In der Literatur wird eine hohe Regenerierungsfähigkeit des Innenohres beschrieben [62].

1.6.2.4 Weitere Funktionen der Hensen-Körper

- Im Allgemeinen gilt, dass zytoplasmatische Vesikel für den Transport von Sekreten oder für den Transport von einem Zellkompartiment in ein anderes zuständig sind [69].
- Dafür, dass die Vesikel in den Hensen-Körpern bzw. in den oben beschriebenen kleinen vesikulären Strukturen, eine sekretorische Funktion haben, sieht Spicer et al. keinerlei Anhaltspunkte.
- Sie können aber auch ein Korrelat für eine Schädigung durch Noxen sein. Nach akustischer Überstimulation [24, 40, 44], experimentellem Endolymphhydrops [29], Salicylat - Intoxikation [10], Gentamycin - Intoxikation [9], Cisplatin - Intoxikation [25] und Intoxikation mit α - Difluormethornithin (DFMO) [34, 55] wurden sie gehäuft beobachtet.

1.7 Salicylate und Chinin

1.7.1 Salicylate

Sie sind seit mehr als 200 Jahren bekannt und stammen aus der Rinde der Weide (*Salix alba*). Von Dr. F. Hoffmann, einem bei Bayer angestellten Chemiker, wurde 1897 die Acetylsalicylsäure synthetisiert und seit 1899 als Aspirin vermarktet [7, 75]. Heute werden fast nur noch chemische Derivate der Salicylsäure verwendet [43] um die Wirksamkeit und die Toxizität besser steuern zu können.

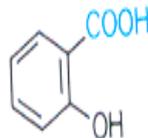


Abb. 8: Strukturformel der Salicylsäure (modifiziert aus [43]).

Salicylsäure und ihre Derivate werden rasch und vollständig in Magen und Darm resorbiert und esterolytisch gespalten. Im Plasma liegt Salicylsäure zu 75-95 % an Eiweißen gebunden vor. Die Metabolisierung findet vor allem im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien der Leber statt. Abbauprodukte werden renal eliminiert. Salicylate hemmen irreversibel die Cyclooxygenase, die Synthese von Prostaglandinen und Thromboxan - A₂. Sie wirken analgetisch, antipyretisch, antiphlogistisch und hemmen die Thrombozytenaggregation [43].

Wichtige Nebenwirkungen sind Übelkeit und Magenblutungen bedingt durch Magenerosionen. Eine lebensbedrohliche Komplikation ist das Reye-Syndrom bei Kindern und Jugendlichen

nach Aspiringabe bei fieberhaften Virusinfekten. Dabei kann es zu einer Leber-Hirnerkrankung mit meist letalem Verlauf kommen. Ein Überdosierung (Salicylismus) kann zu Atemdepression, Koma, Seh- und Hörstörungen, Tinnitus, Fieber, Kopfschmerz, Schwindel, Erbrechen und generalisierte Krämpfe führen [33].

1.7.2 Chinin

Chinin stammt aus der Rinde der Chinarinde (Gattung Chinchona). 1820 isolierten Pelletier und Caventou Chinin aus der Chinarinde [68]. Seit den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wird es durch synthetische Antimalariamittel ersetzt und ist heute ein Alternativtherapeutikum bei Chloroquin- und multiresistenten Malariaerregern [23, 50, 68].

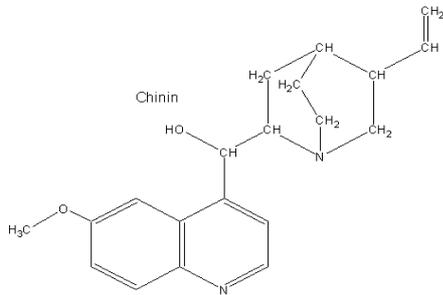


Abb.9: Strukturformel von Chinin (modifiziert aus [43]).

Chinin wird im Magen- Darm- Trakt fast vollständig resorbiert und zu ca. 70 % an Blutplasma gebunden. Nach Metabolisierung in der Leber (>90 %) wird es renal ausgeschieden [23]. Es wirkt analgetisch, lokalanästhetisch, antipyretisch und die Skelettmuskulatur erschlaffend. Bei der Malariatherapie greift Chinin in den Vermehrungszyklus der Plasmodien ein und hemmt dort bestimmte Vermehrungsformen. In der Nahrungsmittelindustrie wird es als Bitterstoff verwendet [18].

Eine Überdosierung (Chinchonismus) kann gastrointestinale Störungen, Tinnitus, Ertaubung, Erblindung, Verwirrheitszustände, Kopfschmerzen, Lähmungen und Herzrhythmusstörungen verursachen [23, 50, 68].

1.7.3 Salicylate und Chinin in der Innenohrforschung

Die ototoxische Wirkung von beiden Substanzen ist schon seit dem 18. Jahrhundert bekannt und gut untersucht. Wegen ihrer Fähigkeit, eine reversible Hörminderung zu induzieren, werden beide Substanzen gerne im Tiermodell eingesetzt. Auf diese Weise lassen sich pathophysiologische Vorgänge innerhalb der Cochlea gut untersuchen.

1.7.4 Einfluss der Salicylate auf das Hören

Salicylate können zu Tinnitus und Hörverlust führen [48, 51]. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass es zu strukturellen und mechanischen Veränderungen nach *in vitro* Salicylatgabe gekommen ist [12, 58]. Eine Beeinträchtigung des Mittelohres und seines Schalleitungsapparates konnte nicht gefunden werden. Durch Salicylate kann es zu einer beidseitigen Verminderung des Hörvermögens von bis zu 40 dB HL kommen [48, 51]. Nach Absetzen der Salicylate ist die Hörminderung innerhalb von 24 bis 72 Stunden vollständig reversibel [58].

1.7.5 Einfluss von Chinin auf das Hören

Chinin bewirkt eine sensoneurinale Hörminderung und Tinnitus. Diese Hörminderung kann schon bei therapeutischen Chininplasmakonzentrationen auftreten und ist nach Absetzen von Chinin innerhalb einer Woche wieder vollständig verschwunden [67]. In der Literatur wird von einem pankochleären Absinken der Tongehörschwelle [39] bzw. einer Verminderung der Hochtonhörbarkeit berichtet [5, 67].

1.8 Schädigung des Gehörs durch Schall

Es ist schon lange bekannt, dass das Gehör unter sehr hohen Schalldrücken leidet und in Mitleidenschaft gezogen wird. Slepecky et al. [59] setzten Chinchillas 5-mal einem 155 dB SPL (Sound Pressure Level) starken Schallimpuls aus. Sie beobachteten eine Zunahme von Lysosomen, multivesikulären Körpern, eine Vakuolenbildung der SSC sowie eine Auflockerung der Struktur der SSC. Diese liegen normalerweise zusammen mit den Hensen-Körpern in mehreren Reihen neben der Plasmamembran der äußeren Haarzellen und stehen oft in Kontakt mit diesen.

Zudem konnten Slepecky et al. [59] und Beagley [4] eine Proliferation von Hensen-Körpern feststellen. Beagley sah Hensen-Körper vor allem an den Stellen, an denen die Plasmamembran als Folge der akustischen Traumatisierung Einziehungen aufweisen konnte.

Zusätzlich wurden in einem Großteil der geschädigten Tiere ultrastrukturelle Veränderungen an den Stereozilien beobachtet. Die Stereozilien verloren die sie umhüllende Membran bzw. die Membran faltete sich. Innerhalb der Stereozilien kam es zu einem Verlust der Steifheit der Aktinfilamente bzw. zum Verlust der Aktinfilamentbasis [56, 59]. Eine Arbeitsgruppe um Kachar et al. [38] konnte im Jahr 2002 einen kontinuierlichen dynamischen Erneuerungsprozess der Aktinfilamente in den Stereozilien nachweisen.

Es kam auch zur Bildung von übergroßen Stereozilien („giant stereocilia“) [59].

Beagley beschallte Meerschweinchen mit einer Frequenz von 50 Hz und einem Schalldruck von 128 dB (SPL) für 20 Minuten. Diese extremen Schalldrücke führten zu einer Hörschwellenminderung und es kam zu einer Einziehung der Haarzellwände. Bei weiter fortgeschrittenen Schädigungen stellte er eine Schwellung des Zellkernes und der Haarzellen fest, die im Extremfall bis zur Ruptur derselben führen konnte. Bei sehr starken Hörschwellenminderungen von über 80 dB konnte ein Verlust der subplasmalemmalen Zisternen und evtl. auch eine Ruptur der Plasmamembran beobachtet werden [4].

2. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wurden Semidünnschnitte des Cortischen Organs von verschiedenen Meerschweinchen lichtmikroskopisch untersucht, nachdem diese zuvor mit Salicylsäure, Chinin bzw. mit Schall behandelt wurden. Als Vergleichsgruppe wurden ungestört aufgewachsene Tiere verschiedenen Alters herangezogen. Es erfolgte eine stochastische Auswertung mit dem Ziel, festzustellen, ob es einen Zusammenhang in der Auftretenswahrscheinlichkeit von Hensen-Körpern und dem schädigenden Agens gibt, bzw. ob überhaupt ein Nachweis erbracht werden kann, dass Hensen-Körper vermehrt in geschädigten Haarzellen vorkommen.

3. Material und Methoden

Für die Untersuchung wurden pigmentierte Meerschweinchen verwendet. Sie wurden in der Tierversuchseinrichtung der Kopfklinik der Universität Würzburg gezüchtet und gehalten. Die legalen Voraussetzungen entsprechend dem Tierschutzgesetz in der jeweils gültigen Fassung wurden eingehalten, und alle Tierversuche waren von der zuständigen Behörde (Regierung von Unterfranken) genehmigt. Die Untersuchungsgruppen bestanden aus je sechs Meerschweinchen.

Es gab folgende Gruppen:

Kontrolltiergruppen:

- Neugeborene Tiere (KN)
- 4 Wochen alte Tiere (K4W)
- 4 Monate alte Tiere (K4M)
- geräuscharm aufgewachsene, 4- 6 Wochen alte Tiere (KG)

Versuchstiergruppen:

- 90 dB über eine Stunde ausgesetzte Tiere (90 dB 1Std)
- 90 dB über eine Woche ausgesetzte Tiere (90 dB 1 Woche)
- 110 dB über eine Stunde ausgesetzte Tiere (110 dB 1Std.)
- mit Salicylsäure behandelte Tiere (Salicylsäure)
- mit Chinin behandelte Tiere (Chinin)

3.1 Kontrollgruppen

Um Vergleiche mit nicht behandelten Tieren aufstellen zu können wurden Kontrollgruppen eingerichtet.

3.1.1 Gruppe der neugeborenen Tiere (KN):

Zwei Tiere aus dieser Gruppe wurden am zweiten Lebenstag dekapitiert und wogen je 95 g. Die anderen vier Tiere wurden ca. 1 Woche alt.

3.1.2 Gruppe der vier Wochen alten Tiere („jugendliches Alter“, K4W)

Die Tiere waren ca. 4- 6 Wochen alt und hatten ein Gewicht von 300- 310 g.

3.1.3 Gruppe der vier Monate alten Tiere („jugendliches Erwachsenenalter“, K4M)

Die Tiere wogen zwischen 485 und 940 g und waren zwischen zehn und zwölf Wochen alt.

Die Tiere der Gruppen (3.1.1 bis 3.1.3) wuchsen in normaler Tierhaltung im Tierstall auf.

3.1.4 Geräuscharm aufgewachsene Tiere (KG)

Die Tiere wurden ca. zwei Tage nach der Geburt in eine geräuscharme Umgebung gegeben. In diesem schallisoliertem Raum (Camera silenta, IAC, Niederkrüschten, Deutschland) wurden sie sechs Wochen gehalten und wogen zum Zeitpunkt der Dekapitation 395 bis 525 g.

Die Meerschweinchen der Kontrollgruppen (3.1) wurden einer Atmosphäre mit 100 % CO₂ ausgesetzt, bis sie das Bewusstsein verloren hatten. Nach Dekapitation wurden die Schädel streng in der Medianen eröffnet und die Felsenbeine entnommen. Die weiteren Präparationsschritte entsprachen dem unten beschriebenen Vorgehen.

3.2 Mit Schall behandelte Gruppen

3.2.1 Gruppe 90 dB (SPL) für 1 Stunde und Gruppe 90 dB (SPL) über 1 Woche

In diesen Gruppen wogen die Meerschweinchen zwischen 400 und 475 g. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von einer Stunde bzw. über eine Woche mit einem Breitbandrauschen von 90 dB (SPL) beschallt. Dieses wurde von einem Rauschgenerator erzeugt, verstärkt und über Westra-Aktivlautsprecher appliziert, die in einem Abstand von einem Meter von den Tieren standen. Dies erfolgte in einem schallisolierten Raum der Firma IAC, Niederkrüschten. Die Intensität des Breitbandrauschen wurde mit einem „Modular Precision Sound Level Meter“ der Firma Brüel & Kjaer, Type 2231, Dänemark kontrolliert.

Die Tiere waren zum Zeitpunkt ihrer Dekapitation 4- 8 Wochen alt.

3.2.2 Gruppe 110 dB (SPL) 1 Stunde

In dieser Gruppe hatten die Tiere ein Gewicht zwischen 300 und 420 g und wurden über eine Stunde mit einem Breitbandrauschen bei einer Schallintensität von 110 dB (SPL) beschallt. Die Apparatur zur Beschallung ist oben beschrieben. Zum Zeitpunkt ihrer Dekapitation waren sie 4- 8 Wochen alt.

3.3 Salicylgruppe

Zu Beginn der Behandlung wogen die Meerschweinchen zwischen 305 und 505 g. Zum Zeitpunkt ihres Todes waren die Tiere zwischen 4- 8 Wochen alt. Natriumsalicylat (Sigma,

St. Louis, MO, USA) wurde in steriler physiologischer NaCl- Lösung gelöst, sterilfiltriert und jedem Meerschweinchen über eine Woche in einer ototoxischen Tagesgesamtdosis von 400 mg/kg Körpergewicht subcutan injiziert [19, 14, 36, 66]. Wegen hoher Plasmaeiweißbindung beträgt die biologische Halbwertszeit von Salicylaten 15- 30 Stunden, so dass eine Applikation einmal täglich ausreichte, um ototoxische Wirkspiegel über 24 Stunden aufrechterhalten zu können [32].

3.4 Chiningruppe

Das Gewicht der Meerschweinchen betrug zu Beginn der Behandlung zwischen 330 und 660 g. Sie waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 6- 10 Wochen alt. Chininhydrochlorid (Sigma, St. Louis, MO, USA) wurde in steriler physiologischer NaCl- Lösung gelöst, sterilfiltriert und jedem Meerschweinchen subcutan über eine Woche in einer Tagesgesamtdosis von 200 mg/kg Körpergewicht injiziert [35]. Die durchschnittliche Halbwertszeit von Chinin beträgt 11- 18 Stunden [68]. Daher wurde die Tagesgesamtdosis in jeweils 2 gleichen Dosen alle 12 Stunden injiziert.

Die Tiere der Gruppen (3.2 bis 3.4) wuchsen in der restlichen Zeit in normaler Tierhaltung im Tierstall auf.

3.5 Gewinnung und Aufarbeitung der Innenohre für feinstrukturelle Untersuchungen

Die Tiere der Gruppen 3.2- 3.4 erhielten eine Allgemeinanästhesie mit dem Sedativum, Analgetikum und Muskelrelaxans Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2 %; 0,05 ml/100g Körpergewicht) sowie Ketaminhydrochlorid (Ketanest® 50 mg/ml; 0,025 ml/100g Körpergewicht). Unter dieser Narkose wurden die Tiere dekapitiert, die Schädel streng in der Medianen eröffnet und die Felsenbeine herauspräpariert. Die Aufarbeitung der Cochlea für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte in modifizierter Form nach den in Dieler et al. (1991) und Jiang et al. (1993) beschriebenen Methoden. Der um die otische Kapsel gelegene Knochen der Felsenbeine wurde mit einer kleinen Weil- Blakesly-Siebbeinzange abgetragen und die Felsenbeine in eine Dulbecco's PBS (Gibco BRL, Berlin, Deutschland) gepufferte artifizielle Perilymphlösung eingebracht. Diese bestand aus einer an das extrazelluläre Milieu angeglichenen Ionenzusammensetzung (Werte in mmol/l):

137 NaCl; 2,7 KCl; 1,5 KH₂PO₄; 8,1 Na₂HPO₄*7H₂O; 1,5 CaCl₂; 1,5 MgCl₂; 10 Glukose. Zusätzlich wurden 10 mmol/l NaCl zur Anpassung der Osmolalität eingewogen. Der pH-Wert lag ohne weitere Korrekturen zwischen 7,35 und 7,4, die Osmolalität betrug 300 ± 5 mosm/kg, gemessen mit einem Wescor Modell 5500 Dampfdruckosmometer oder einem

Osmomat 030 Kryosmometer. In der Perilymphlösung liegend, wurde die otische Kapsel sofort durch Abtragen des apikalen Kapselknochens sowie durch Entfernung des Stapes und der runden Fenstermembran eröffnet. So konnte die Lösung rasch in die Perilymphräume eindringen. Die Dekapitation und die Eröffnung der otischen Kapsel im Kontrollmedium erfolgten innerhalb von 5 Minuten.

Die Perilymphräume wurden mit 5 ml der Fixationslösung über 5 Minuten manuell perfundiert. Dazu wurde eine Spritze verwendet, der ein aus einer Eppendorf- Pipettenspitzen ausgezogener Kunststoffschlauch mit dünnem Lumen aufgesteckt war. Die Fixationslösung bestand aus einer 1,25 % igen Glutaraldehydlösung in 0,1 mol/l Natriumcacodylatpuffer mit 2 mmol/l CaCl_2 . Der pH- Wert betrug 7,3 (pH- Meter: pH 522, Wissenschaftlich- technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland), die Osmolalität wurde, falls nötig, durch die Zugabe von NaCl auf 305 ± 5 mmol/kg eingestellt. (Kryosmometer Osmomat 030, Gonotec, Berlin, Deutschland). Anschließend wurden die Kochleae in die reine Fixationslösung zu einer vierstündigen Immersionsfixation gelegt.

Nach Abschluss der Immersionsfixation wurden die Kochleae im Kontrollmedium bei 4°C über Nacht gespült. Am folgenden Tag erfolgte in dieser Lösung unter einem Olympus Stereo- Zoom- Mikroskop die vollständige Entfernung der otischen Kapsel jeder Kochlea mit feinen Dumont Pinzetten (Typ 5 und 7 Biologie) und mit Skalpellen (Klingenform Nr.11), so dass die Scala media mit Cortischem Organ und pigmentierter Stria vascularis freilag. Die Präparate wurden im Anschluss nachfixiert (1 % OsO_4 in 0,1 mol/l Cacodylatpuffer für 60 Minuten im Dunklen), zweimal in Aqua bidest. gespült und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 3x 100 % Ethanol für jeweils 15 Minuten). Die en bloc- Kontrastierung erfolgte unter Lichtabschluss mit 2 % Uranylacetat während der Entwässerung in 70 % igem Ethanol für 60 Minuten. Nach dem letzten Entwässerungsschritt in 100 % igem Ethanol wurden die Präparate über Propylenoxid, ein Propylenoxid/Polarbed 812 Epoxidharz- Gemisch (1:1) und über einen dreimaligen Wechsel reinen Epoxidharzes (Einbettkit: Polarbed Kit, Bio- Rad, München, Deutschland; Austauschzeiten je 30 Minuten) in flache Einbettgießformen eingebettet.

Nach Abschluss der Polymerisation des Einbettmediums (3 Tage bei 40°C) ließen sich die eingebetteten Kochleae mit einer feinen Säge entlang des Modiolus in zwei Hälften unterteilen. Mit Rasierklingen wurden dann die einzelnen Windungen dieser Hälften voneinander getrennt und unter Kontrolle der Orientierung wieder in flache

Einbettgießformen in Epoxidharz eingebettet. Nach erneuter Polymerisation und dem Trimmen der Kunstharzblöcke waren Querschnitte durch das Cortische Organ zu erhalten. Bei vier Windungen der Meerschweinchenkokchlea und zwei Hälften waren somit acht Querschnitte pro Ohr anzufertigen, so dass insgesamt 24 äußere Haarzellen pro Innenohr untersucht werden konnten.

Mit Glasmessern wurden Semidünnschnitte von 1 µm Dicke angefertigt, mit Toluidinblau gefärbt und lichtmikroskopisch mit einem Olympus Simplex Lichtmikroskop untersucht. Auf jedem Objektträger wurden mehrere verschiedene Schnitte eines Präparates aufgebracht. Jedoch wurde nur der Schnitt mit der besten Qualität zur Auswertung herangezogen. Wenn mehrere qualitativ gleichwertige Schnitte vorhanden waren, wurde nur derjenige in die Auswertung aufgenommen, in dem ein Hensen-Körper vorhanden war. Konnte kein Schnitt oder auch nur eine der äußeren oder der inneren Haarzellen nicht bewertet werden, wurde dies in einer Tabelle vermerkt.

Es wurden die drei äußeren und die eine innere Haarzelle unter dem Lichtmikroskop unter 400facher Vergrößerung betrachtet. Die äußeren Haarzellen (= OHC = outer hair cell) wurden in äußere (in Richtung Sulcus spiralis externus gelegen), mittlere und innere, der inneren Haarzelle zugewandten, äußere Haarzellen eingeteilt.

Bei der Begutachtung der Schnitte wurde zusätzlich tabellarisch unterschieden, in welcher Windungshöhe 1- 4 (1 = basal und 4 = apikal) sich Hensen-Körper fanden oder nicht.

Zur statistischen Auswertung der morphometrischen Daten wurde der exakte Signifikanz-Test nach Fisher verwendet. Alle Ergebnisse wurden mit der Software SPSS Version 10.0.7 berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Versuchsanordnung

Insgesamt wurden 1413 Schnitte bewertet, wobei unter optimalen Bedingungen auf jedem Schnitt je eine innere Haarzelle und jeweils eine äußere-, mittlere- und innere äußere Haarzelle (OHC) bewertet wurde.

Von den äußeren Haarzellen konnten, bedingt durch Fixierungsartefakte,

- 839 äußere OHC (d.h. 59,5 % der 1413 zu erwartenden äußeren OHC)
- 914 mittlere OHC (d.h. 64,8 % aller zu erwartenden intermediären OHC) und
- 914 innere OHC (d.h. 64,8 % aller zu erwartenden medialen OHC) bewertet und in die statistische Auswertung übernommen werden.

Bei den inneren Haarzellen wurden

- 955 innere Haarzellen (d.h. 70,5 % aller zu erwartenden inneren Haarzellen) bewertet und statistisch ausgewertet.

In dieser Arbeit wurden die Gruppen K4W, K4M und KG bzgl. der Auftretenswahrscheinlichkeit von Hensen-Körpern mit der Neugeborenenengruppe (KN) verglichen. Dieser Vergleich wurde für jede kochleäre Windungshöhe durchgeführt. Der zweite Gruppenvergleich bezog sich auf eine Kontrollgruppe „K“, die sich aus allen unbehandelten Tieren zusammensetzt. Auch hier wurde ein Vergleich der Auftretenswahrscheinlichkeit von Hensen-Körpern innerhalb der verschiedenen Gruppen bezogen auf die Kontrollgruppe „K“ und einmal pro Windung pro Gruppe gegen die Kontrollgruppe „K“ verglichen.

4.2 Ergebnisse aller Versuchstiergruppen

Die Auszählung ergab folgendes Ergebnis:

Tabelle 1: Auftretenshäufigkeit von Hensen-Körpern in den verschiedenen Versuchstiergruppen (HB = Hensen-Körper)

Versuchstiergruppe	Bewertete Schnitte	Anzahl der gefundenen HB (absolut)	Anzahl der gefundenen HB (in Prozent)
KN	130	29	22,3
K4W	144	6	4,2
K4M	164	19	11,6
KG	147	20	13,6
90 dB 1 Stunde	139	39	28,1
90 dB 1 Woche	174	41	23,6
110 dB 1 Stunde	189	28	14,8
Chinin	159	36	22,6
Salicylsäure	167	39	22,3

Bei der Neugeborengruppe der Meerschweinchen wurde bei 130 bewerteten Schnitten in 29 Fällen (= 22,3 %) Hensen-Körper gefunden. In der Gruppe „4 Wochen“ wurden in 6 Schnitten (4,2 %) der Fälle Hensen-Körper gesehen. In der Gruppe „jugendliches Erwachsenenalter“ wurden in 19 (11,6 %) der Fälle Hensen-Körper nachgewiesen. Die 4- 6 Wochen alten Tiere, die in einer geräuscharmen Umgebung aufwuchsen, hatten in 20 (13,6 %) der Fälle Hensen-Körper vorzuweisen.

In der Tiergruppe, die über eine Stunde mit einem Schalldruck von 90 dB beschallt wurde, kamen Hensen-Körper in 39 (28,1 %) der Fälle vor. Wurden die Tiere der anderen Gruppe mit der gleichen Intensität über eine Woche beschallt, ließen sich in 41 (23,6 %) der äußeren Haarzellen Hensen-Körper nachweisen. Bei der Gruppe die mit 110 dB über eine Stunde beschallt wurde, war dies 28- mal (14,8 %) der Fall.

In den Gruppen, in denen den Tieren eine Noxe verabreicht wurde, konnten im Falle der Chininbelastung bei 36 (22,6 %) Schnitten und im Falle der Salicylgruppe in 39 (22,3 %) der Fälle Hensen-Körper beobachtet werden.

4.3 Fisher Test

Bei der Ermittlung der p- Werte wurde als Vergleichswert die Gruppe der Neugeborenen Tiere (KN) gewählt, da diese Tiere weder Geräuschen oder sonstigen schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt waren.

Bei dem durchgeführten Test nach Fisher ergaben sich folgende p- Werte.

Tabelle 2: P- Werte ermittelt beim Vergleich gegen die KN- Gruppe (signifikante Werte sind fett gedruckt)

Versuchstiergruppe	p- Wert
K4W	0.000
K4M	0,017
KG	0,061
90 dB 1 Stunde	0,326
90 dB 1 Woche	0,891
110 dB 1 Stunde	0,102
Chinin	1.000
Salicylsäure	0,890

Ein signifikanter Unterschied ergibt sich, wenn $p < 0,05$ erreicht [49]. Demzufolge waren sowohl in der Gruppe der vier Wochen als auch vier Monaten alten Tieren signifikant weniger Hensen-Körper vorhanden, als in der Neugeborenenvergleichsgruppe. In allen anderen Gruppen lies sich keine signifikante Veränderung nachweisen.

4.4 Vergleich der Versuchstiergruppen mit der zusammengefassten Kontrolltiergruppe (K)

Damit das eventuell altersabhängig veränderte Auftreten von Hensen-Körper den Vergleich mit verschiedenen Noxen nicht überproportional beeinträchtigt, wurden die Gruppen KN, K4W, K4M und KG zusammengefasst. Dadurch entstand eine Gruppe aus 585 bewerteten Schnitten, in der 74 Hensen-Körper auftraten. Diese wurde im Folgenden als Gruppe „K“ bezeichnet.

Die erfolgte Auszählung ergab folgendes Ergebnis:

Tabelle 3: Auftretenshäufigkeit von Hensen-Körpern in den Versuchstiergruppen („K“ entspricht den zusammengefassten Gruppen KN, K4W, K4M und KG)

Versuchstiergruppe	Bewertete Schnitte	Anzahl der gefundenen HB (absolut)	Anzahl der HB pro Gruppe(in %)
K	585	74	12,6
90 dB 1 Stunde	139	39	28,1
90 dB 1 Woche	174	41	23,6
110 dB 1 Stunde	189	28	14,8
Chinin	159	36	22,6
Salicylsäure	167	39	22,3

Dabei traten folgende p- Werte nach Fisher auf:

Tabelle 4: P- Werte ermittelt beim Vergleich gegen die KN- Gruppe (signifikante Werte sind fett gedruckt)

Versuchstiergruppe	p- Wert
90 dB 1 Stunde	0,000
90 dB 1 Woche	0,001
110 dB 1 Stunde	0,459
Chinin	0,002
Salicylsäure	0,001

Der statistische Fehler wurde mit 5,0 % ($p < 0,05$) festgelegt. Signifikant mehr Hensen-Körper als in der Gruppe aller Kontrolltiere ließen sich in allen Gruppen außer der mit „110 dB 1 Stunde“ feststellen.

4.5 Vergleich der einzelnen Windungshöhen

Um zu unterscheiden, ob Hensen-Körper in den unterschiedlichen Windungshöhen signifikant häufiger oder seltener vorkommen, wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren ein Vergleich der einzelnen Windungen erstellt. Die Cochlea des Meerschweinchens besteht, wie schon beschrieben, aus 4 Windungen: der apikalen Windung (= Windung 4) bis zur basalen Windung (= Windung 1). Es wurden nur die Windungsschnitte zur Auszählung herangezogen, die fehlerfrei fixiert waren. Dies erklärt die unterschiedliche Anzahl an bewerteten Windungen pro Versuchstiergruppe.

Im ersten Schritt wurden alle sich entsprechenden Windungen der Gruppen K4W, K4M und KG mit der Neugeborenenengruppe verglichen. Hierbei konnten folgende absolute Werte ermittelt werden.

Tabelle 5: Auftretenshäufigkeit von Hensen-Körpern in den Kontrollgruppen (*Anzahl der bewerteten Schnitte pro Windung// Anzahl der gefundenen Hensen-Körper; ** Anteil der HB in der jeweiligen Windung in %, in Klammern ist die Windungshöhe angegeben)

Gruppe	Windung1*	** (1)	Windung 2*	** (2)	Windung 3*	** (3)	Windung 4*	** (4)
KN	28//5	17,9 %	35//5	14,3 %	37//16	43,2 %	19//3	15,8 %
K4W	24//0	0 %	29//2	6,9 %	34//2	5,9 %	27//2	7,4 %
K4M	32//2	6,3 %	38//7	18,4 %	39//6	15,4 %	29//4	13,8 %
KG	40//4	10 %	34//6	17,6 %	31//5	16,1 %	29//5	17,2 %

Bei den neugeborenen Tieren konnten in den Windungen 1, 2 und 4 zwischen 14,3 % und 17,9 % Hensen-Körper gefunden werden. In der 3- ten Windung kamen in 16 Schnitten (43,2 %) Hensen-Körper vor.

Die Meerschweinchen aus der K4W Gruppe hatten in den drei dem Helikotrema nahen Windungen jeweils zwischen 5,9 % und 7,4 % Hensen-Körper. Auffällig in dieser Gruppe war die erste (= basale) Windung, da in ihr keine Hensen-Körper vorkamen.

In der basal gelegenen Windung der K4M Tiere ließen sich in 6,3 % der Fälle Hensen-Körper nachweisen. In den restlichen Windungen kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Anzahl der Hensen-Körper von 18,4 % in der zweiten Windung, bis zu 13,8 % in der vierten Windung.

Die geräuscharm aufgewachsenen Tiere besaßen in 10 % der basalen ersten Windungen Hensen-Körper. In den restlichen Windungen konnten zwischen 16,1 % und 17,6 % der Schnitte Hensen-Körper gefunden werden.

4.6 Vergleich der p- Werte der verschiedenen Windungen untereinander

Um die p- Werte der Windungen ermitteln zu können, wurden sie gegen die Gruppe der Neugeborenen verglichen.

Tabelle 6: P- Werte ermittelt beim Vergleich gegen die KN- Gruppe (signifikante Werte sind fett gedruckt)

Versuchstiergruppe	Windung 1	Windung 2	Windung 3	Windung 4
K4W	0,054	0,442	0,000	0,635
K4M	0,235	0,756	0,011	1,000
KG	0,471	0,752	0,019	1,000

Bei dem Vergleich aller Windungen gegen die Windungen der Neugeborenen erkennt man, dass nur in der dritten Windung signifikant weniger Hensen-Körper in den Gruppen K4W, K4M und KG vorkamen als bei den Neugeborenen Tieren. In den anderen Windungshöhen konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von Hensen-Körpern nachgewiesen werden.

Um einen eventuellen Fehler bzgl. der Signifikanz in der dritten Windung (Tabelle 6) zu minimieren und um vom Alter der Tiere weniger beeinflusste Ergebnisse zu erzielen, wurde wieder die Vergleichsgruppe „K“ gebildet.

Gegen diese Gruppe „K“ wurden die verbleibenden Gruppen (Tabelle 7) unter Rücksichtnahme auf die verschiedenen Windungshöhen verglichen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Auftretenshäufigkeit von Hensen-Körpern in den Versuchstiergruppen („K“ entspricht den zusammengefassten Gruppen KN, K4W, K4M und KG); (*Anzahl der bewerteten Schnitte pro Windung// Anzahl der gefundenen Hensen-Körper; ** Anteil der HB in der jeweiligen Windung in %, in Klammern ist die Windungshöhe angegeben)

Gruppe	Windung 1*	** (1)	Windung 2*	** (2)	Windung 3*	** (3)	Windung 4*	** (4)
K	124//11	8,9 %	136//20	14,7 %	141//29	20,6 %	104//11	10,6 %
90 dB 1h	22//4	18,2 %	37//12	32,4 %	33//10	30,3 %	29//13	44,8 %
90dB1 Wo	37//9	24,3 %	45//11	24,4 %	44//9	20,5 %	40//12	30 %
110 dB 1h	38//1	2,6 %	43//4	9,3 %	50//12	24 %	41//11	26,8 %
Chinin	27//2	7,4 %	36//12	33,3 %	43//14	32,6 %	26//8	30,8 %
Sal	28//6	21,4 %	46//11	23,9 %	38//12	31,6 %	37//10	27 %

Mittels dieser Ergebnisse konnte ein exakter Test nach Fisher durchgeführt werden. Es wurden folgende p- Werte ermittelt (Tabelle 8).

Tabelle 8: P- Werte ermittelt beim Vergleich gegen die „K“- Gruppe (signifikante Werte sind fett gedruckt)

Gruppe	Windung 1	Windung 2	Windung 3	Windung 4
90 dB 1h	0,244	0,029	0,249	0,001
90 dB 1 Wo	0,021	0,170	1,000	0,029
110 dB 1h	0,297	0,449	0,689	0,085
Chinin	1,000	0,016	0,148	0,044
Sal	0,090	0,175	0,191	0,075

Bei den Tieren, die mit 90 dB eine Stunde beschallt wurden, traten in der zweiten und vierten Windungshöhe signifikant mehr Hensen-Körper auf als in der Kontrollgruppe. In der ersten und vierten Windung der über eine Woche mit 90 dB beschallten Tiere ließen sich signifikant mehr Hensen-Körper nachweisen als in der entsprechenden Vergleichsgruppe. Die Tiere, die mit 110 dB beschallt wurden, wiesen keine signifikanten p- Werte auf. Das gleiche galt für die Tiere, die mit Salicylsäure behandelt wurden. Bei den Meerschweinchen die Chinin exponiert waren, konnten in der zweiten und vierten Windung signifikant höhere Anzahlen von Hensen-Körpern nachgewiesen werden.

4.7 Ergebnisse innere Haarzellen

Bei der Auszählung von inneren Haarzellen wurden 1413 Schnitte bewertet. Davon wiesen 955 Schnitte (70,5 % aller Schnitte) bewertbare innere Haarzellen auf. In diesen Haarzellen konnten keine Hensen-Körper gefunden werden.

5. Diskussion

In der Literatur werden Hensen-Körper als Strukturen beschrieben, die ein Korrelat für eine Schädigung der äußeren Haarzellen des Innenohrs darstellen sollen. Um festzustellen, ob sie wirklich als eine pathologische Reaktion der Haarzellen zu werten sind, wurde 1413 Schnitte durch Kochleae von Meerschweinchen bewertet. Die Tiere wurden vorher mit Schall verschiedener Intensität (90 dB bzw. 110 dB) oder mit Salicylsäure oder Chinin behandelt

5.1 Hensen-Körper bezogen auf das Alter

Wenn Hensen-Körper mit dem Alter der Tiere an Häufigkeit zunehmen, müsste bei der Auswertung festgestellt werden, dass es in der Gruppe der Neugeborenen weniger Hensen-Körper gibt als in den anderen Gruppen, die im Laufe ihres Lebens mit den verschiedensten potentiellen Noxen in Kontakt gekommen sind.

Bei den Neugeborenen Tieren, die zwischen 2 Tagen und einer Woche alt waren, wurden in 29 Fällen, d.h. in 22,3 % der untersuchten Schnitte Hensen-Körper gefunden. Um den Einfluss des natürlichen Umgebungslärms ausschließen zu können wurde ein Vergleich mit den Tieren erstellt, die ab ihrem zweiten Lebenstag in einer geräuscharmen Umgebung gehalten wurden. In dieser Gruppe konnten Hensen-Körper in 20 Fällen, d.h. in 13,6 % der Schnitte gefunden werden. Beim Fishertest ergab sich ein p- Wert von 0,061. Eine signifikant veränderte Auftretenswahrscheinlichkeit von Hensen-Körper bei neugeborenen und bei geräuscharm aufgewachsenen Meerschweinchen konnte nicht festgestellt werden.

Um festzustellen, ob Hensen-Körper im Laufe des Lebens eines Meerschweinchens als Zeichen eines natürlichen Alterungsprozesses auftreten, wurde ein Vergleich mit den 4- 6 Wochen alten (K4W) und den 10- 12 Wochen alten (K4M) Tieren erstellt. In der K4W-Gruppe kamen nur 4,2 % Hensen-Körper vor. Dies ergab eine signifikante Reduzierung der Hensen-Körper $p(K4W) = 0,000$. Im Alter von 10 –12 Wochen stieg ihre prozentuale Anzahl wieder auf 11,6 % an, blieb aber immer noch signifikant unter den Zahlen $p(K4M) = 0,017$, die in der Neugeborenenengruppe gefunden wurden. Somit konnte ein direkter Zusammenhang mit dem Alter und dem Altern der Tiere nicht nachgewiesen werden. Es wurde im Gegenteil sogar festgestellt, dass die Tiere kurz nach ihrer Geburt eine signifikant höhere Anzahl an Hensen-Körpern aufwiesen.

Da Hensen-Körper in allen Kontrollgruppen vorkommen, stellt sich die Frage, ob Hensen-Körper eine physiologische Funktion beim Aufbau von Membranen der äußeren Haarzellen

haben bzw. für andere physiologische Vorgänge nötig sind. Für diese These gibt es in der Literatur einige Anhaltspunkte.

Bei Weaver und Schweitzer [70] wird von der postnatalen Genese von SSC berichtet. In solchen Zellen, die wie die äußeren Haarzellen sehr von der Funktionsfähigkeit dieser aus Membranen gebildeten Strukturen abhängig sind, hat die Membranbiosynthese eine Schlüsselrolle.

Bei Spicer et al. [62] wurde festgestellt, dass Hensen-Körper mit Komplexen aus Kanälchen, segmentierten Zisternen und Mitochondrien in engem Kontakt stehen. Kanälchen aus den SSC umschließen die Hensen-Körper. Einige dieser Kanälchen wuchsen in die Hensen-Körper ein und sonderten Vesikel in diese ab. Spicer et al. vermuten, dass sie in Verbindung mit dem Transport von Zellmembranen von ihrem Bildungsort zu Ihrem Zielort bzw. wieder für den Transport von zellulären Endstrukturen zu den lysotisch aktiven Lysosomen stehen. Aus dieser strukturellen Anlage lässt sich folgern, dass die Zisternen und Kanälchen Nukleotid-Triphosphate (ATP) aus den benachbarten Mitochondrien zur Energiegewinnung für die Proteinphosphorylierung benutzen. Im Verlauf dieser engen funktionellen Nachbarschaft kommt es zur Entstehung von Vesikeln, die in einer Entstehung von Hensen-Körper mündet. Auf diese Weise könnte das erhöhte Auftreten von HB bei den neugeborenen Meerschweinchen erklärt werden. Da sie im weiteren Lebensverlauf der Meerschweinchen nicht mehr im selben Ausmaße für den Aufbau von membranösen Strukturen benötigt werden, nimmt ihre Häufigkeit beim Älterwerden ab. Zu späteren Zeitpunkten dienen sie nur noch dem Ersatz von physiologisch verbrauchten Membranen. Dafür sprechen Beobachtungen, dass Hensen-Körper sehr häufig dort den SSC anliegen, an denen sie nur einige Schichten dick sind. Normalerweise kommen sie als mehrlagige Systeme vor [53]. Dies legt nahe, dass sie dazu dienen, bei erwachsenen Tieren diese dünnen Stellen in den SSC aufzufüllen [62], bzw. sie wieder herzustellen.

5.2 Bildung der Kontrollgruppe „K“

Bei den folgenden Auswertungen wurde die zusammengezogene Gruppe der Kontrolltiere verwendet. D.h. die Gruppen KN, K4W, K4M und KG wurden zusammengelegt. Dadurch entstand eine große Gruppe mit 585 zur Auswertung herangezogener Schnitte. Damit wurde versucht:

- 1) Fehler, die durch das geringe Alter der Tiere entstanden sein könnten, zu verhindern;
- 2) eine größere Gruppe mit mehr auswertbaren Schnitten zu erhalten und dadurch die subjektiven Fehler zu reduzieren.

Diese Gruppe wurde als „K“ bezeichnet.

5.3 Hensen-Körper als Korrelat für Schädigungen durch Schall

Um Aussagen darüber machen zu können, ob Schall zu einer Erhöhung der Anzahl von Hensen-Körper führt, wurden 139 ausgewertete Schnitte aus der 90 dB (1 Stunde)- Gruppe und 174 Schnitte der über eine Woche beschallten Meerschweinchen (90 dB 1 Woche) mit der Gruppe K verglichen.

Dabei konnten signifikant mehr Hensen-Körper in den beiden beschallten Gruppen festgestellt werden. Es zeigten sich in der Gruppe, die nur eine Stunde beschallt wurde mehr Hensen-Körper (in 28,1 %) als in der Gruppe, die über eine Woche dem Breitbandrauschen ausgesetzt war (23,6 %). Als weitere Vergleichsgruppe gegen die Gruppe K wurde die Gruppe 110 dB herangezogen. Es stellte sich eine Abnahme der prozentualen Häufigkeit der Hensen-Körper auf 14,8 % heraus. Jedoch hatten nur die beiden mit 90 dB beschallten Gruppen signifikant mehr Hensen-Körper.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass Hensen-Körper als Reparaturmechanismen der Haarzellen für eventuelle leichte Schäden fungieren, die durch zu hohe Schalldrücke entstehen. Für diese Hypothese sprechen auch die Beobachtungen, die Beagley [4] und Spicer et al. [62] gemacht hatte. Ihnen fiel auf, dass Hensen-Körper genau an den Stellen mit den SSC in Verbindung standen, an denen die Plasmamembran als Folge von akustischen Traumen (128 dB (SPL) für 20 Minuten) Einziehungen aufwies bzw. die Membranen der SSC nur aus einigen Schichten aufgebaut waren.

Das Abfallen der Anzahl an Hensen-Körpern ließe sich evtl. dadurch erklären, dass der hohe Schalldruck von 110 dB, der auf die Tiere über eine Stunde einwirkte, dieses Reparatursystem beginnt zu schädigen. Diese Schädigung könnte bei einer Belastung mit 110 dB soweit fortschreiten, dass nur noch in 14,8 % der Tiere Hensen-Körper nachweisbar wären. Es wäre in einer anderen Arbeit zu klären, ob sich nach einer gewissen Erholungsphase, in der es zu keiner akustischen Reizung kommt, der Bestand an Hensen-Körper erholen würde.

Bei dem Vergleich der mit Schall behandelten Gruppen gegen die Neugeborenen Gruppe konnten sich keinerlei signifikante Werte ermittelt lassen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass neugeborene Tiere einen erhöhten Bedarf an Membranbestandteilen für den weiteren Aufbau der SSC [62, 70] und die eventuellen Anpassungsvorgänge des Gehörs haben.

5.4 Hensen-Körper und Salicylate

Bei den Forschungen, die dieser Arbeit vorausgingen und auf deren Ergebnissen diese Arbeit basiert, wurde bestätigt, dass Salicylsäure und Chinin die Haarzellen beeinflussen bzw. schädigen.

Bei *in vitro*-Untersuchungen wurden nachfolgende Ergebnisse an äußeren Haarzellen gefunden. Ab einer gewissen Salicylatkonzentration ($> 50\mu\text{mol/l}$) reagierten äußere Haarzellen mit einem Verlust des Zellturhors, der sich in einer Abflachung der Zellkonturen und einer Faltenbildung der Zellmembranen erkennen ließ. Dieser Turgorverlust war jedoch nach Auswaschen der Salicylate bzw. nach Erholung der Zelle für einige Minuten (konzentrationsabhängig) vollständig reversibel und die Zellen sahen wieder wie vor der Exposition mit Salicylsäure aus.

Durch die Salicylatexposition konnte ebenfalls eine Abnahme bzw. eine komplette Hemmung der Elektromotilität der isolierten äußeren Haarzellen erkannt werden. Genauso wie der Zellturgor waren diese Einschränkungen unter Beseitigung der Noxe vollständig reversibel. Zudem konnte eine Zunahme der transmembranösen Gesamtionenleitfähigkeit durch die Applikation von Salicylsäure beobachtet werden. Diese blieb auch nach Entfernung der Salicylsäure bestehen [11].

Bei der Auswertung von *in situ* fixierten äußeren Haarzellen, die zuvor 1 Woche mit Salicylsäure behandelt worden waren, ließen sich keine pathologischen Veränderungen, die auf eine Schädigung durch Salicylsäure zurückzuführen waren, an den Haarzellen, Stützzellen oder anderen Strukturen des Cortischen Organs nachweisen. Bei der feinstrukturellen Untersuchung konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu der Kontrollgruppe in der Salicylgruppe eine erhöhte Anzahl von aus subplasmalemalen Zisternen ausgehenden Vesikeln auftrat. Dabei waren vor allem die, dem Zellinneren zugewandten Zisternen mehr von der Vesikelzunahme betroffen, als die nach außen gerichteten Zisternen. Zudem zeigte sich eine Veränderung des Erscheinungsbildes der Vesikel, ihrer Größe und eine veränderte Orientierung, weg von der regulären subplasmalemalen Orientierung in Richtung Zellinneres. Die subplasmalemalen Zisternen waren nur in wenigen Zellen verbreitert und wiesen dabei vor allem eine Verbreiterung der lateralen subplasmalemalen Zisternen auf.

Bei *in vitro*-Untersuchungen kam es abhängig von der Salicylatkonzentration bis zu einer Aufhebung der regulären Struktur der subplasmalemalen Strukturen. Wie schon oben beim Zellturgor beschrieben, waren alle Veränderungen nach Beseitigung der Noxe voll reversibel. An anderen Organellen, wie z.B. den Mitochondrien und den Golgi- Apparaten wurden keine strukturellen Veränderungen beschrieben. Bei den damaligen Untersuchungen wurde das

Auftreten von Hensen-Körpern in allen Konzentrationsstufen beschrieben. Es stellt sich für diese Arbeit die Frage, ob es signifikant mehr Hensen-Körper in den geschädigten Haarzellen gibt oder nicht.

Um festzustellen, ob es bei den Tieren, die eine Woche mit Salicylsäure behandelt wurden, zu einer erhöhten Anzahl von Hensen-Körpern kam, wurden 167 Schnitte von behandelten Tieren gegen 130 Schnitte der Neugeborenen Gruppe verglichen. Dabei waren in beiden Gruppen in 22,3 % der Fälle Hensen-Körper vorzufinden. Beim Vergleich der daraus errechneten Signifikanzen lies sich keine signifikante Veränderung der Auftretenswahrscheinlichkeit von Hensen-Körpern zeigen.

Das nicht signifikant veränderte Ergebnis beim Vergleich gegen die Neugeborenen Gruppe, lässt sich wie unter Punkt 5.1 und 5.2 mit der durch die Salicylsäure geschädigten Zellstruktur, die durch die oben beschriebenen Reparaturmechanismen wieder hergestellt wird erklären. Im Rahmen der Reparatur kam es zu einer Vermehrung der Hensen-Körper.

Wenn man die Gruppe „K“, in der mögliche altersabhängige Fehler reduziert wurden, zum Vergleich heranzieht, zeigte sich ein p- Wert von 0,001 bei einem Auftreten von Hensen-Körpern in 12,6 % der Fälle. Es zeigte sich jetzt ein signifikant höheres Auftreten von HB in der mit Salicylsäure behandelten Gruppe. Dies entspräche den Ergebnissen, die bei den Untersuchungen von Dieler et al. erzielt wurden und wäre ein Beleg dafür, dass Hensen-Körper wichtig für Reparationsvorgänge und Membranbiosynthese in äußeren Haarzellen sind [62].

5.5 Hensen-Körper und Chinin

Bei Untersuchungen von *in situ* fixierten äußeren Haarzellen nach Applikation von Chinin über eine Woche konnten bei den mit Chinin behandelten Haarzellen keine regelmäßigen feinstrukturellen Veränderungen an den subplasmalemalen Zisternen, den zytoplasmatischen Zisternenstapeln oder den Hensen-Körpern beobachtet werden. Die subplasmalemalen Zisternen lagen, wie in den Kontrollgruppen auch, als meist unfenestrierte und unvesikulierte, unterhalb der Zellmembran verlaufende Strukturen vor. Es kamen hier, im Gegensatz zu den mit Salicylsäure behandelten Zellen, nur ausnahmsweise mehr oder weniger Vesikel an den subplasmalemalen Zisternen vor. Eine signifikante Veränderung der Lumenbreite der Zisternen wurde nicht beobachtet. Genau wie in der mit Salicylsäure behandelten Gruppe waren in der Chiningruppe keine auffälligen Veränderungen

in den anderen Zellorganellen wie z.B. Mitochondrien oder Golgi- Apparaten festzustellen. Durch die Chininexposition konnten jedoch Beeinträchtigungen in der Elektromotilität der äußeren Haarzellen verursacht werden. Eine komplette Hemmung der Elektromotilität wie bei Salicylsäure, wurde jedoch nicht beschrieben. Zudem ließen sich diese Veränderungen in 75 % der untersuchten Zellen nach Auswaschen der Noxe wieder rückgängig machen. Eine, wie bei den mit Salicylsäure behandelten Zellen, beschriebene Veränderung der Gesamtionenleitfähigkeit konnte bei den mit Chinin perfundierten äußeren Haarzellen nicht beobachtet werden. Durch die Chininbehandlung konnte aber eine Veränderung des Membranpotentials induziert werden. Es kam anfänglich zu einer konzentrationsabhängigen Hyperpolarisation der Zellmembran, der eine ebenfalls konzentrationsabhängige Depolarisation folgte. Diese waren weitestgehend reversibel [11].

Bezogen auf das Auftreten von Hensen-Körpern ließ sich jedoch dasselbe Ergebnis wie bei der Salicylgruppe zeigen. Gegen die „K“- Gruppe ergab sich ein p- Wert von 0,002. Es trat also ein eindeutig vermehrtes Auftreten von Hensen-Körpern auf. Eine Korrelation der Auftretenswahrscheinlichkeit von Hensen-Körpern scheint somit bei elektrophysiologischen Veränderungen des Membranpotentials (Chinin) bzw. der Gesamtionenleitfähigkeit (Salicylsäure) zu existieren. Dies lässt sich mit einer Funktion als intrazellulärer Ionenspeicher (Ca^{2+}) [22] begründen. Auch Mammano et al. vermuteten, dass Hensen-Körper in Zusammenhang mit der Freisetzung von Ca^{2+} Ionen stehen. Sie sahen bei der Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder von äußeren Meerschweinchen- Haarzellen, dass die intrazellulären Ca^{2+} - Speicher in enger Lokalisation mit Hensen-Körper stehen. Dies konnte auch bei Immunfluoreszenz gestützten Forschungen nachgewiesen werden [46].

Eine weitere Möglichkeit ist die Beeinflussung der Elektromotilität der Haarzellen. Durch diese aktiven Prozesse kommt es zu einer Beeinflussung der akustischen Stimulation in der Cochlea. Für diese Prozesse sind Kalium- und Calciumströme nötig. Um diese Ströme aufrecht zu halten sind wiederum apikal- und lateral gelegene Zellstrukturen nötig. Unter anderem die subplasmalemmalen Zisternen, die in engem Kontakt mit den Hensen-Körpern stehen [2]. Spicer et al. [62] fanden in ihrer Arbeit keinerlei Anhalt für diese Theorie.

Das in dieser Arbeit festgestellte signifikant vermehrte Auftreten von Hensen-Körper in den mit Chinin bzw. Salicylsäure geschädigten Zellen ließe sich durch die Störung der Elektromotilität durch beide Noxen erklären.

5.6 Diskussion über das signifikante Auftreten von Hensen-Körpern in den verschiedenen Windungen der Cochlea

Beim Vergleich der p- Werte der Kontrollgruppen gegen die Neugeborenen Gruppe fällt auf, dass nur in der dritten Windung signifikant veränderte Werte auftreten. Dies scheint ein systematischer bzw. diagnostischer Fehler bei der Auswertung der Neugeborenen Gruppe zu sein, der weiter untersucht werden müsste. Um diesen Fehler zu reduzieren wird der weitere Vergleich gegen die zusammengefasste Kontrollgruppe "K" durchgeführt.

5.7 Hensen-Körper als Korrelat für Schädigungen durch Schall pro Windungshöhe

Wie schon oben beschrieben traten in der 90 dB (1Stunde)- Gruppe in den Windungen 2 und 4 signifikant vermehrt Hensen-Körper auf. Bei 90 dB (1Woche) kam es in der 1-ten und 4-ten Windung zum Auftreten von signifikant mehr Hensen-Körpern. Die dritte Windung konnte, bedingt durch den Fehler in der Neugeborenen Gruppe nicht als reliabel betrachtet werden und wurde nicht weiter in die Vergleiche einbezogen. Eine signifikante Auftretenshäufigkeit von Hensen-Körpern in nur einer bestimmten Windungshöhe trat nicht auf. Daraus ließ sich ableiten, dass die Schädigungen, die ein vermehrtes Auftreten von Hensen-Körper hervorriefen in der gesamten Cochlea auftraten. Dieser Effekt war auf das verwendete Breitbandrauschen zurückzuführen. Wie schon beim „windungsunspezifischen“ Vergleich kommt es auch hier in der 110 dB Gruppe zu keinem signifikanten Anstieg der Hensen-Körper. Es kam wohl zu einer Schädigung der gesamten Cochlea, die die Reparaturmechanismen soweit außer Funktion setzte, dass hier kein signifikant vermehrtes Auftreten von Hensen-Körper vorkam. Hier wäre in weiteren Forschungen abzuklären, ob sich die Cochlea nach einer ausreichend langen Ruhephase soweit erholt, dass es wie bei den 90 dB- Gruppen zu einem signifikanten Anstieg von Hensen-Körpern kommt.

5.8 Hensen-Körper und Salicylate pro Windung

In der Salicylatgruppe kommt es, bzgl. der Windungshöhe, zu keiner signifikanten Veränderung der Auftretenshäufigkeit der Hensen-Körper. Hier führt die Salicylsäure zu keiner signifikant windungsspezifischen Schädigung in den äußeren Haarzellen.

5.9 Hensen-Körper und Chinin pro Windung

Hierbei wurden in der Windung 2 und der Windung 4 signifikant veränderte Werte gefunden. Dies könnte mit der im Verhältnis zur Kontrollgruppe, die pro Windung zwischen 104 – 141 Schnitte aufweist, relativ kleinen Anzahl von 26- 43 bewerteten Schnitten pro Windung in der Chiningruppe begründet sein. Die vermeintlich erhöhte Anzahl von HB kam evtl. durch Fixierungsartefakte, die zu einer fehlerhaften Auswertung führten, zustande. Für eine zuverlässigere Aussage über eine direkte Beziehung von Chinin und dem Auftreten von Hensen-Körpern in bestimmten Windungshöhen in äußeren Haarzellen wäre eine weitere Untersuchung notwendig.

5.10. Hensen-Körper in inneren Haarzellen

In der gängigen Literatur werden Hensen-Körper in den inneren Haarzellen nie beschrieben. Auch in dieser Arbeit konnten bei der Auswertung von 955 Schnitten keine Hensen-Körper in inneren Haarzellen nachgewiesen werden.

6. Zusammenfassung

Hensen-Körper sind seit längerem in der Literatur beschrieben, jedoch ist ihre Funktion bis dato nicht hinreichend geklärt. Es wird vermutet, dass Hensen-Körpern nach Schädigung des Innenohres vermehrt in kochleären äußeren Haarzellen vorkommen.

Hensen-Körper sind kreisförmige Strukturen, die aus kleinen Vesikeln aufgebaut sind. Diese liegen meist zentral im Zytoplasma der kochleären äußeren Haarzellen mit Kontakt zu den subplasmalemalen Zisternen, einem an die Plasmamembran grenzenden Membransystem.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob eine Beziehung zwischen einer Schädigung des Innenohres (chemisch-toxisch oder akustisch) und der Auftretenswahrscheinlichkeit von Hensen- Körpern besteht.

Es wurden 1413 Semidünnschnitte des Cortischen Organs von Meerschweinchen lichtmikroskopisch untersucht, nachdem diese mit Salicylsäure, Chinin bzw. mit Breitbandrauschen einer Intensität von 90 bzw. 110 dB SPL behandelt wurden. Als Kontrollgruppe dienten Neugeborene, 4-6 Wochen junge und ca. 11 Wochen alte unbehandelte Tiere. Im Anschluss daran erfolgte eine statistische Auswertung.

Hensen-Körper kamen vermehrt in der Gruppe der neugeborenen Meerschweinchen vor, bei älteren Tieren zeigten sich keine signifikanten Vermehrungen. Bei den Meerschweinchen, die Noxen ausgesetzt wurden, kommen sie bei den mit 90 bzw. 110 dB beschallten und den mit Salicylsäure behandelten Tieren vor, sofern in diesen Fällen eine reversible, morphologisch nachweisbare Schädigung in der Zellmembran stattgefunden hatte. Bei irreversiblen Zellschädigungen jedoch kam es nicht zur Ausbildung von Hensen-Körpern. Somit ist zu vermuten, dass Hensen-Körper im Rahmen der Zellregeneration in kochleären äußeren Haarzellen auftreten.

Auch bei den chininexponierten Tieren trat eine Vermehrung von Hensen-Körpern auf. Dies ist auf eine elektrophysiologische Veränderungen am Membranpotential der äußeren Haarzellen zurückzuführen. Da Hensen-Körper Calciumspeicher sind, unterstützen sie so die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung des Membranpotentials und werden somit im Falle einer Schädigung der äußeren Haarzellen vermehrt gebildet.

In den inneren Haarzellen konnten keine Hensen-Körper nachgewiesen werden.

Die erarbeiteten Befunde legen nahe, dass Hensen-Körper bei Neugeborenen physiologisch vorhanden sind und bei reversiblen Schädigungen der äußeren Haarzellen im Rahmen der Regeneration vermehrt auftreten.

7. Literaturverzeichnis

1. Anniko M, Arnold W (1995) Hyaluronic Acid as a Molecular Filter and Friction-Reducing Lubricant in the Human Inner Ear. *ORL*:82-86
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Biology of the cell*, 3ed. Garland Publishing Co., New York
3. Bannister LH, Dodson HC, Astbury AR, Douek EE (1988) The cortical lattice: a highly ordered system of subsurface filaments in guinea pig cochlear outer hair cells. *Prog Brain Res* 74:212-219
4. Beagley HA (1965) Acoustic trauma in the guinea pig. *Acta Oto-Laryngol* 60:479-495
5. Berninger E, Karlsson KK, Alván G (1998) Quinine reduces the dynamic range of the human auditory system. *Acta Otolaryngol* 118(1):46-51
6. Boenninghaus HG, *Hals-Nasen-Ohrenheilkunde für Studierende der Medizin*, 10. Auflage Springer 1996, Berlin Heidelberg New York
7. Brockhaus – Enzyklopädie in 24 Bd, 19. Auflage Mannheim, 1986-1994, Band 19
8. Dallos P (1992) The active cochlea. *J Neurosci* 12:4575-4585
9. De Groot JCMJ, Huizing EH, Veldman JE (1991) Early ultrastructural effects of gentamicin cochleotoxicity. *Acta Otolaryngol* 111:273-280
10. Deer BC, Hunter-Duvar I (1982) Salicylate ototoxicity in the chinchilla: a behavioral and electron microscopy study. *J Otolaryngol* 11:260-264
11. Dieler R (1997) Salicylat -und Chininintoxikation äußerer Haarzellen des Cortischen Organs mit unmittelbarer Beeinträchtigung des kochleären Verstärkermechanismus. *Habilitationsschrift*
12. Dieler R, Shehata-Dieler W E, Richter C P, Klinke R (1994) Effects of endolymphatic and perilymphatic application of salicylate in the pigeon. II: Fine structure of auditory hair cells. *Hear Res* 74:85-98
13. Dieler R, Shehata-Dieler WE, Brownell WE (1991) Concomitant salicylate-induced alterations of outer hair cell subsurface cisternae and electromotility. *J Neurocytol* 20:637-653
14. Douek EE, Dodson HC, Bannister LH (1983) The effects of sodium salicylate on the cochlea of guinea pigs. *J Laryngol Otol* 97:793-799
15. Drenckhahn D, Schäfer T, Prinz M (1985) Actin, myosin and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs: immunocytochemical and biochemical

- studies. In: Thomas CC (ed) Auditory Biochemistry, Dreschers, Springfield IL, pp 317-335
16. Engström H, Sjöstrand FS (1954) The structure and innervation of the cochlear hair cells. *Acta Otolaryngol* 44:490-501
 17. Engström H, Wersäll J (1953) Structure of the organ of Corti in Outer hair cells. *Acta Otolaryngol* 43:1-10
 18. Estler C J (1992) *Pharmakologie und Toxikologie für Studierende der Medizin und Naturwissenschaften sowie für Ärzte und Apotheker*, 3. Auflage, Schattauer, Stuttgart New York
 19. Evans EF, Borerwe TA (1982) Ototoxic effects of salicylates on the response of single cochlear nerve fibers and of cochlear potentials. *Br J Audiol* 16:101-108
 20. Flock Å, Bretscher A, Weber K (1982) Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells. *Hear Res* 7:75-89
 21. Flock Å, Cheung HC, Flock B, Utter G (1981) Three sets of actin filaments in sensory cells of the inner ear. Identification and functional orientation determined by gel electrophoresis, immunofluorescences and electron microscopy. *J Neurocytol* 10:133-147
 22. Flock Å, Flock B, Ulfendahl M (1986) Mechanisms of movement in outer hair cells and a possible structural basis. *Arch Otolaryngol* 243:83-90
 23. Forth W, Henschler D, Rummel W (1987) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*, B.I. Wissenschaftsverlag, 5.Auflage, Mannheim Wien Zürich, S.694
 24. Hawkins JE jr (1971) The role of vasoconstriction in noise-induced hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 80: 903-913
 25. Hawkins JR jr (1991) Noise- and drug-induced microvascular constriction: a possible mechanism for one type of tinnitus. Abstract, IV. International Tinnitus Seminar, August 2-30, 1991, Bordeaux, France
 26. Helms J (1994) *Ohr (Band 1)*. In: Naumann HH, Helms J, Herberhold C, Kastenbauer E (Hrsg) *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis (in 3 Bänden)*, Georg Thieme, Stuttgart New York
 27. Holly MC, Ashmore JF (1990 a) A cytoskeletal spring for the control of cell shape in outer hair cells isolated from the guinea pig cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 247:4-7

28. Holly MC, Ashmore JF (1990 b) Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. *J Cell Ssci* 96:283-291
29. Horner KC, Guilhaume A (1995) Ultrastructural changes in the hydropic cochlea of the guinea-pig cochlea. *Eur J Neurosci* 7:1305-1312
30. Igarashi M, Yoshinobu T (1965) Comparative cochlear reconstruction in Mammels. United States Naval School of Aviation Medecine. National Aeronautics and Space Administration, S.1-12
31. Ikeda K, Takasaka T (1993) Confocal laser microscopical images of calcium distribution and intracellular organelles in the outer hair cell isolated from the guinea pig cochlea. *Hear Res* 66:169-176
32. Insel PA (1996) Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (Hrsg) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9. Aufl., McGraw-Hill, New York, S.619-657
33. Isselbacher K, Braunwald E, Wilson J, Martin J, Fauci A, Kasper D (1997) *Harrisons Kompendium Innere Medizin*, Schölmerich J (Hrsg) 13. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien
34. Jansen C, Mattox DE, Miller KD, Brownell WE (1989) An animal model of hearing loss from alpha-difluoromethylornithine. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115:1234-1237
35. Jastreboff PJ, Brennan JF, Sasaki CT (1991) Quinin-induced tinnitus in rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117:1162-1166
36. Jastreboff PJ, Sasaki CT (1986) Salicylate-induced changes in spontaneous activity of single units in the inferior colliculus of the guinea pig. *J Acoust Soc Am* 80:1384-1391
37. Jiang D, Furness DN, Hackney CM, Lopez DE (1993) Microslicing of the resin-embedded cochlea in comparison with the surface preparation technique for analysis of hair cell number and morphology. *Br J Audiol* 27:195-203
38. Kalinec F, Holly MC, Iwasa KH, Lim DJ, Kachar B (1992) A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8671-8675
39. Karlsson KK, Berninger E, Alván G (1991) The effect of quinine on psychoacoustic tuning curves, stapedius reflexes and evoked otoacoustic emissions in healthy volunteers. *Scand Audiol* 20:83-90

40. Kimura RS (1975) The ultrastructure of the organ of Corti. *Intern Rev Cytol* 42:173-222
41. Kirk DL, Yates GK (1998) ATP endolymph enhances electrically-evoked oto-acoustic emissions from the guinea pig cochlea. *Neurosci Lett* 250:149-152
42. Klinke R, Silbernagel S (1996) *Lehrbuch der Physiologie*, 2. Auflage Georg Thieme, Stuttgart New York
43. Kuschinsky G, Lüllmann H, Mohr K (1993) *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 13. Auflage Georg Thieme, Stuttgart New York
44. Lim DJ (1986) Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear Res* 22:117-146
45. Lubitz DKJE (1981) Subsurface tubular system in the outer sensory cells of the rat cochlea. *Cell Tissue Res* 220:787-795
46. Mammano F, Frolenkov GI, Lagostena L, Belyantseva IA, Kurc M, Dodane V, Colavita A, Kachar B (1999) ATP-Induced Ca^{2+} Release in Cochlear Outer Hair Cells: Localization of an Inositol Triphosphate-Gated Ca^{2+} Store to the Base of the Sensory Hair Bundle. *J Neuroscience* 19(16):6918-6929
47. Marc E. Schneider, Inna A. Belyantseva, Ricardo B. Azevedo, Bechara Kachar (2002) Rapid renewal of auditory hair bundles. *Nature* Vol 418:837-838
48. McFadden D, Plattsmier H S (1984) Aspirin can potentiate the temporary hearing loss induced by intense sounds. *Hear Res* 9:295-316
49. Metzler Peter, Krause Bodo (1988) *Angewandte Statistik*, 2. Auflage VEB Deutscher Verlag der Wissenschaft, Berlin
50. Mutschler E, Schäfer-Korting M (1991) *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 6. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, S.631-633
51. Myers E N, Bernstein J M (1965) Salicylate ototoxicity. A clinical and experimental study. *Arch Otolaryngol* 82:483-493
52. Puel JL, Ruel J, Gervais d'Aldin C, Pujol R (1998) Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport* 9(9):2109-2114
53. Saito K (1983) Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: Subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell Tissue Res*:467-481

54. Salt AN, Thalmann R (1988) Cochlear fluid dynamics. In: Jahn AF, Santos-sachi J (Hrsg) *Physiology of the Ear*, Raven Press, New York, S. 341-357
55. Salzer SJ, Mattox DE, Brownell WE (1990) Cochlear damage and increased threshold in alpha-difluoromethylornithine (DFMO) treated guinea pigs. *Hear Res* 46:101-112
56. Saunders JC, Canlon B, Flock Å (1986) Growth of threshold shift in hair-cell stereocilia following overstimulation. *Hear Res* 23(3):245-255
57. Schulte BA (1993) Immunohistochemical localization of intracellular Ca-ATPase in outer hair cells, neurons and fibrocytes in the adult and developing inner ear. *Hear Res* 65:262-273
58. Shehata W E, Brownell WE, Dieler R (1991) Effects of salicylate on Shape, Electromotility and Membrane Characteristics of Isolated Outer Hair Cells from Guinea Pig Cochlea. *Acta Otolaryngol.(Stockh)*, 111:707-718
59. Slepecky N, Hamernik R, Henderson D, Coling D (1981) Ultrastructural Changes to Cochlea Resulting from Impulse Noise. *Arch Otorhinolaryngol* 230:273-278
60. Slepecky NB, Chamberlain SC (1985) Immunoelectron microscopic and immunofluorescent localization of cytoskeletal and muscle-like contractile proteins in inner ear sensory hair cells. *Hear Res* 20:245-260
61. Smith CA, Dempsey EW (1957) Electron microscopy of the organ of Corti. *Am J Anat* 100:337-367
62. Spicer SS, Thomopoulos GG, Schulte BA (1998) Cytologic Evidence for Mechanisms of K⁺ Transport and Genesis of Hensen Bodies and Subsurface Cisternae in Outer Hair Cells. *The Anat Rec* 251:97-113
63. Spöndlin H (1994) Strukturelle Organisation des Innenohrs. In: Naumann HH, Helms J, Herberhold C, Kastenbauer E (Hrsg) *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis. Band 1: Ohr*, Thieme, Stuttgart New York, S. 32-81
64. Spöndlin H (1966) The organization of the cochlear receptor In: Ruedi L (ed) *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 13. Basel, Karger, New York, p 1
65. Spöndlin H (1971) Primary structural changes in the organ of Corti after acoustic overstimulation. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 71:166-176
66. Stypulkowski PH (1990) The mechanisms of salicylate ototoxicity. *Hear Res* 46:113-146
67. Tange RA, Dreschler WA, Claessen FA, Perenboom RM (1997) Ototoxic reactions of quinine in healthy persons and Patients with *Plasmodium falciparum* infection. *Auris Nasus Larynx* 24(2):131-136

68. Tracy JW, Webster LT jr (1996) Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (Hrsg) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9. Aufl McGraw-Hill, New York, S.965-985
69. Van Meer G (1993) Transport and sorting of membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.*: 661-673
70. Weaver SP, Schweitzer L (1994) Development of gerbil outer hair cells after the onset of cochlear function: an ultrastructural study. *Hear Res* 72:44-52
71. Zenner HP (1981) Cytoskeletal and muscle like elements in cochlear hair cells. *Arch Otolaryngol* 230:81-90
72. Zenner HP (1986a) Molecular structure of hair cells. In: Altschuler RA, Hoffmann DW, Bobbin RP (eds) *Neurobiology of Hearing*, Raven Press, New York, P 1-21
73. Zidanic M, Brownell WE (1990) Fine structure of the intracochlear potential field. I. The silent current. *Biophys J* 57:1253-1268
74. Zidanic M, Brownell WE (1992) Fine structure of the intracochlear potential field. II. Tone-evoked waveforms and cochlear microphonics. *J Neurophysiol* 67:108-124

Internetadresse:

75. <http://www.aspirin.de/medizin/produktgeschichte.html>

Ehrenwörtliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Marc Höller, geb. am 17.10.74, dass ich diese Dissertation selbständig und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und daß diese Dissertation weder vollständig, noch teilweise schon einmal an einer anderen Fakultät vorgelegt worden ist mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben. Ferner erkläre ich, daß ich bis jetzt noch keinen akademischen Grad erworben habe, bzw. zu erwerben versucht habe und daß mir weder ein akademischer Grad entzogen wurde, noch gegen mich ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder ein Disziplinarverfahren eingeleitet wurde.

Danksagung:

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ralf Dieler für seine stete Bereitschaft zur Diskussion über die Aspekte dieses Themas, sowie seine geduldige Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit danken.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Joa für Ihre Geduld und Hilfe bei der Unterstützung bei technischen Fragen.

Tabellarischer Lebenslauf:

Angaben zur Person:

Marc Höller
Geburtstag und -ort: 17.10.1974 in Saarbrücken
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1981-1985 Grundschole Kolbermoor
1985-1986 Hauptschole Kolbermoor
1986-1995 Ignaz-Günther-Gymnasium Rosenheim
1995 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Berufsausbildung:

1995-1996 Jurastudium in Osnabrück
1996 Beginn des Medizinstudiums an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
1998 Ärztliche Vorprüfung
2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.07.2003 – 31.10.2004 AiP: Chirurgie an der Main - Klinik Ochsenfurt
ab 01.11.2004 Assistenzarzt Chirurgie an der Main - Klinik Ochsenfurt

Würzburg, den 13.10.05

