



**Entwicklung und Validierung eines Tiermodells zur Quantifizierung von Parametern
der cochleären Mikrozirkulation und der Hörschwelle *in vivo***

**vorgelegt von
Catalina Sofia Meßmer
2012**

**Aus dem
Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl**

**Entwicklung und Validierung eines Tiermodells zur Quantifizierung von Parametern
der cochleären Mikrozirkulation und der Hörschwelle *in vivo***

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Catalina Sofia Meßmer
aus Heidelberg
2012**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Canis

Mitberichterstatter. Prof. Dr. Andreas Riederer
Prof. Dr. Michael Strupp

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. S. Strieth

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2012

Für meine Eltern

*„ Nicht sehen können trennt von den Dingen,
nicht hören können von den Menschen.“
(Immanuel Kant)*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Anatomie des Innenohres	1
Corti- Organ	1
Stria vascularis	4
1.2 Blutversorgung der Cochlea	6
1.3 Physiologie des Innenohres	8
Schallübertragung	8
Wanderwelle und Tonotopie	9
Endocochleäres Potential	9
Elektro-mechanische Transduktion	10
Mechano-elektrische Transduktion	11
1.4 Regulation des Blutflusses der Cochlea	11
1.5 Pathologien	14
1.5.1 Hörsturz	14
1.5.2 Pathophysiologie des Hörsturzes	14
1.5.3 Therapien des Hörsturzes	18
2 Ziel der Studie	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Etablierung eines Modells	22
3.1.1 Versuchstiere	22
3.1.2 Narkose	22
3.1.3 Lagerung und makrohämodynamisches Monitoring	23
3.1.4 Chirurgische Technik	24
3.1.5 Intravitalmikroskopie	25
3.1.5.1 Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)	26
3.1.5.2 Technischer Aufbau	27
3.1.5.3 Mikrozirkulatorische Parameter	30
3.1.5.3.1 Erythrozytenfließgeschwindigkeit	30
3.1.5.3.2 Gefäßdurchmesser	30
3.1.6 Hörschwellenbestimmung mittels Akustisch Evozierte Potentiale (AEP)	31
3.1.6.1 Akustisch evozierte Potentiale	31
3.1.6.2 Vorbereitungen zur Messung der akustisch evozierten Potentiale	32
3.1.6.3 Messung und Auswertung der akustisch evozierten Potentiale	34

3.2 Der Einfluss vasodilatierender Stoffe auf die Mikrozirkulation und die Hörschwelle in vivo	36
3.2.1 Natriumnitroprussid	36
3.2.2 Versuchsgruppe	36
3.2.3 Versuchsprotokoll	36
4 Statistik	38
5 Ergebnisse	39
5.1 Körpertemperatur	39
5.2 Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz	39
5.3 Mikrozirkulation	39
5.3.1 Durchmesser der Gefäße der Stria vascularis	39
5.3.2 Cochleärer Blutfluss (CBF)	40
5.4 Akustisch evozierte Potentiale	41
5.5 Mittlerer arterieller Blutdruck	42
6 Diskussion	46
6.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Zielsetzungen	46
6.2 Diskussion des Modells	46
6.2.1 Einsatz des Meerschweinchens als Versuchstier	46
6.2.2 Mikrochirurgische Technik	47
6.2.3 Einsatz der intravitale Videofluoreszenzmikroskopie	48
6.2.3.1 Messung der Sauerstoffspannung mittels Mikroelektroden	49
6.2.3.2 Messung des cochleären Blutflusses mit Mikrosphären	49
6.2.3.3 Laser Doppler Flussmessung (LDF)	50
6.2.3.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)	51
6.2.4 Hörschwellenbestimmung mittels akustisch evozierter Potentiale	51
6.3 Diskussion der Ergebnisse	53
6.3.1 Mikrozirkulation der Cochlea	53
6.3.2 Akustisch evozierte Potentiale	54
6.3.3 Effekte von Natriumnitroprussid auf die cochleäre Mikrozirkulation und die Hörschwelle	55
7 Zusammenfassung	58
8 Literatur	60
9 Dank	77

10 Abkürzungen	78
11 Curriculum Vitae	79
12 Publikationen	81

1 Einleitung

Eine Hörbeeinträchtigung kann die Sprachwahrnehmung von Personen in lauter Umgebung stark beeinflussen, da sie das Richtungshören, das Sprachverstehen im Störgeräusch sowie den Musikgenuss herabsetzt. Daraus resultierende sekundäre Symptome können Kommunikationsstörungen mit Sprachentwicklungsverzögerung (bei Kindern), Angststörungen, inadäquate Krankheitsbewältigung, diverse psychosomatische Beeinträchtigungen und letztlich eine Einschränkung der Lebensqualität durch sozialen Rückzug, Isolation, Einsamkeit sowie eventuell Schlafstörungen und Depressionen sein.

Weltweit leiden etwa 250 Mio. Menschen an einer mittel- bis hochgradigen Schwerhörigkeit was die große klinische und sozioökonomische Bedeutung von Innenohrerkrankungen verdeutlicht. Hörstörungen im Erwachsenenalter stehen damit auf Platz 15 der Liste der häufigsten Ursachen für Krankheit, Behinderung und Risikofaktoren des Projekts Global Burden of Disease (GBD) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und auf Platz 2 der häufigsten Ursachen der Liste Years lived with disability (YLD). In Deutschland leiden laut WHO insgesamt etwa 14 Mio. Menschen und damit fast 20% der Bevölkerung an Hörstörungen.

1.1 Anatomie des Innenohres

Cortiorgan

Das Innenohr liegt in der Pars petrosa (Felsenbein) des Schläfenbeins und besteht aus mehreren zusammenhängenden Gängen, die insgesamt als Labyrinth bezeichnet werden. Das häutige Labyrinth wird in das vestibuläre Labyrinth und die Cochlea unterteilt, die gemeinsam in das knöchere Labyrinth eingebettet sind (Abbildung 1).

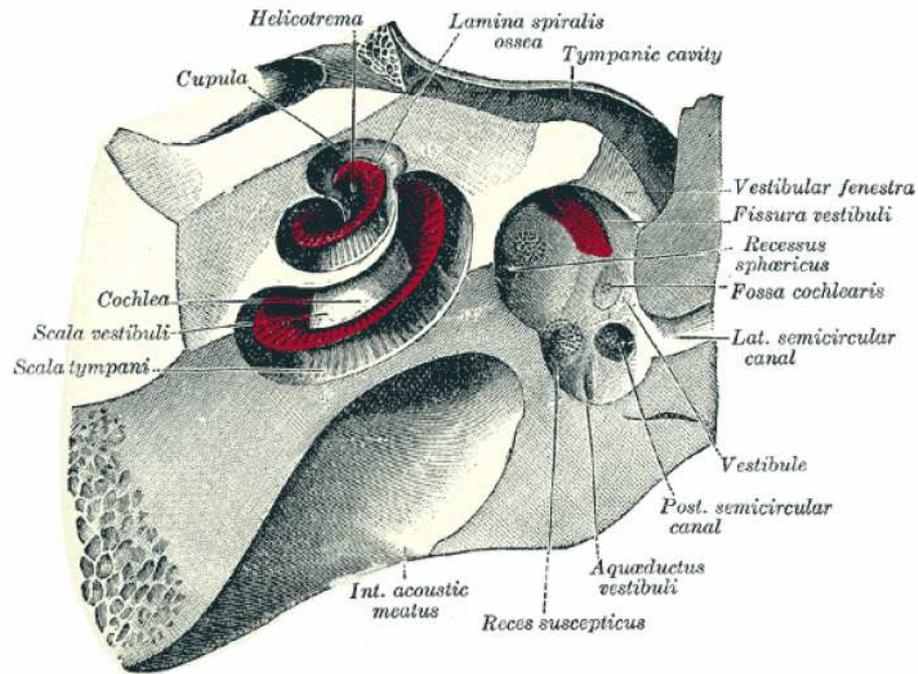


Abb. 1: Anatomische Lage der Cochlea (Gray's Anatomy of the Human Body, 20th U.S. Edition)

Die Cochlea besteht aus drei schneckenförmig gewundenen Kanälen, welche als Scala vestibuli, Scala media und Scala tympani bezeichnet werden. Die Scala vestibuli und die Scala tympani werden hierbei durch die Stapesfußplatte am ovalen Fenster und durch eine Membran am runden Fenster abgeschlossen.

Alle Skalen sind mit Flüssigkeit gefüllt: die Scala media mit Endolymphe, die beiden anderen mit Perilymphe. Die Perilymphe ist ein Ultrafiltrat des Blutplasmas, sodass sie in der Zusammensetzung extrazellulären Flüssigkeiten ähnelt und dementsprechend eine hohe Natriumkonzentration (140 mmol/l) und eine geringe Kaliumionenkonzentration (5 mmol/l) enthält. Die Perilymphe der Scala vestibuli und Scala tympani stehen an der Schneckenspitze, dem sogenannten Helikotrema, miteinander in Verbindung. Die Endolymphe wird von der Stria vascularis, einem stoffwechselaktiven Gewebe der lateralen Schneckenwand, sezerniert. Die Endolymphe enthält etwa 145 mmol/l Kalium- und nur 12 mmol/l Natriumionen, sodass sie intrazellulären Flüssigkeiten ähnelt.

Die laterale Wand der Cochlea wird durch das Periost und das Ligamentum spirale gebildet. Unter dem Ligamentum spirale liegt die Stria vascularis, ein sehr stoffwechselaktives Gewebe, welches für die Homöostase und ionale Zusammensetzung der Endolymphe von wesentlicher Bedeutung ist. Durch Adenosintriphosphat (ATP) abhängige Ionentransportproteine der Stria vascularis

werden Kaliumionen in den Endolymphraum sezerniert und bilden somit ein gegenüber dem Perilymphraum um 80 mV positives Potential. Der Endolymphraum wird gegen die Scala vestibuli durch die Reißner-Membran begrenzt die somit Peri- und Endolymphe voneinander trennt. Der sensorische Apparat, das sogenannte Corti-Organ, befindet sich in der Scala media und liegt der Basilarmembran auf (Abbildung 2).

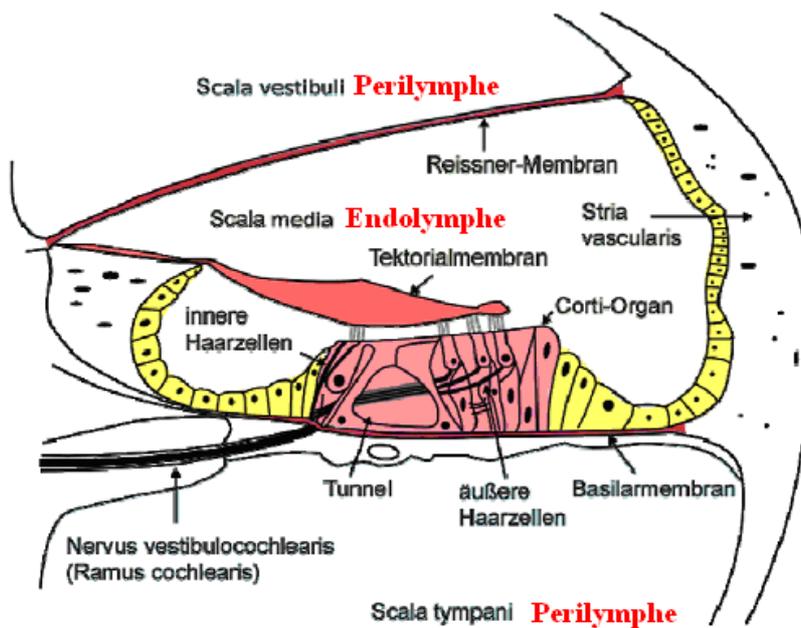


Abb. 2: Schnitt durch die Hörschnecke, Aufbau des Corti-Organs (verändert nach Academic dictionaries and encyclopedias)

Umgeben von Stützzellen, finden sich dort zwei Arten von Rezeptorzellen, eine Reihe innere und drei Reihen äußere Haarzellen. Beide Arten von Haarzellen besitzen an ihrer Oberfläche sogenannte Stereovilli, die untereinander Querverbindungen („tip links“) aufweisen und der Länge nach in Reihen hexagonal zueinander angeordnet sind. Die „tip-links“ sind mit Ionenkanälen verbunden, welche sich durch Abscherbewegungen in Folge von Schallreizen öffnen und schließen. Äußere und innere Haarzellen unterscheiden sich in ihrer Form, Anzahl, Anordnung und in ihrem Genexpressionsmuster (1). Die 3000 inneren Haarzellen sind kolbenartig geformt und als einzelne Reihe angeordnet und von Stützzellen umgeben. Jede innere Haarzelle (Abbildung 3) wird von mehreren Fasern des Nervus (N.) cochlearis innerviert.

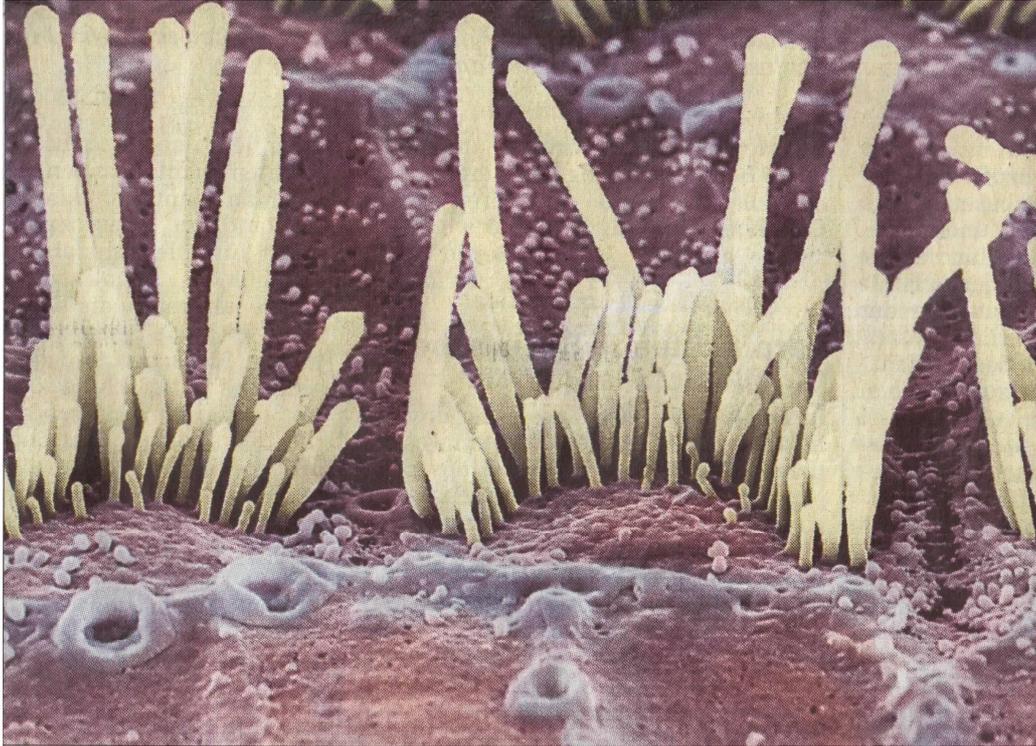


Abb. 3. Mikroskopische Aufnahme der inneren Haarzellen beim Menschen (Foto: Lennart Nilsson, Lennart Nilsson Photography AB)

Die 12000 äußeren Haarzellen sind zylindrisch geformt und sind in drei Reihen lateral der inneren Haarzellen angeordnet. Das Corti- Organ wird von der Tektorialmembran, einem gallertartigen, azellulären, aus amorpher Substanz und Fibrillen bestehendem Gewebe, nach apikal begrenzt. Die apikalen Enden der Stereovilli der äußeren Haarzellen sind im Gegensatz zu den inneren Haarzellen mit der Tektorialmembran verbunden. Die äußeren Haarzellen sind primär efferent innerviert wodurch wahrscheinlich Änderungen ihrer Funktion aktiv beeinflusst werden können.

Stria vascularis

Im Gegensatz zum Corti- Organ sind das Ligamentum spirale und die Stria vascularis stark vaskularisiert. Die Stria vascularis ist drüsenähnlich aufgebaut. Es lassen sich neben den Kapillaren drei Zelltypen unterscheiden: die Marginalzellen, die Intermediärzellen (auch chromophobe oder helle Zellen genannt) und die Basalzellen (Abbildung 4).

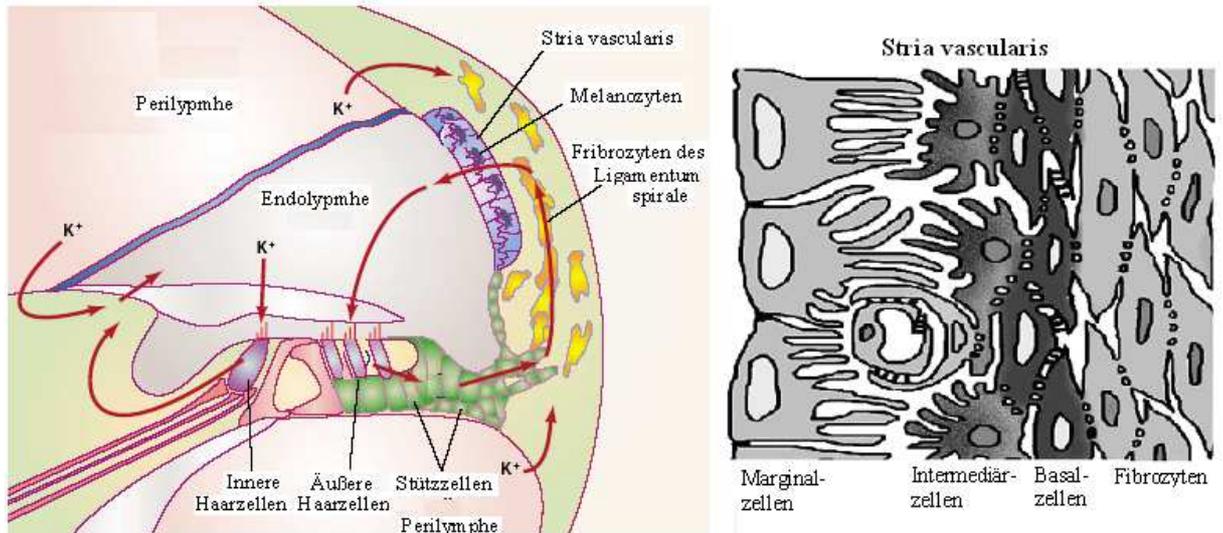


Abb. 4: Lage und Aufbau der Stria vascularis (verändert nach Academic dictionaries and encyclopedias).

Die Blutgefäße verlaufen ausschließlich innerhalb des Epithels an der Oberfläche zwischen den Marginal- und Intermediärzellen. Die zum Endolymphaum gelegenen Marginalzellen weisen Mikrovilli an ihrer Oberfläche sowie enge Zellkontakte untereinander auf. Intrazellulär finden sich Vesikel und Vakuolen. Eine Sekretionstätigkeit der Marginalzellen konnte bisher allerdings nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Die hellen Zellen sind wesentlich kleiner als die Marginalzellen. Ihre Zellfortsätze stehen mit denen der Marginal- und Basalzellen in Kontakt. Sie besitzen einen gelappten Zellkern, große Mitochondrien, glattes und rauhes endoplasmatisches Retikulum und einen prominenten Golgi-Apparat. Der Nachweis des Zytoskelettproteins Vimentin in den Intermediär- und Basalzellen deutet auf eine mesenchymale Herkunft dieser Zellen hin.

Die Regulation der Kalium Konzentration wird in mehreren Schichten der Stria vascularis durch verschiedene Arten von Kaliumkanälen und -transportern bestimmt. Zwei sehr gut untersuchte Kanäle sind die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter, die an der Membran der Marginalzellen lokalisiert sind (19). Aus der Perilymphe wird Kalium in die Fibrozyten des Ligamentum spirale aufgenommen und kann durch Diffusion die Basal- und Intermediärzellen der Stria vascularis passieren. In „tight junctions“ zwischen den inneren und äußeren Epithelschichten wird das Kalium über die basolaterale Membran der Marginalzellen über die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und den $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter aufgenommen und dann über die apikale Membran an die Endolympe sezerniert. Hiermit zusammenhängende Prozesse fordern viel Energie (19), so dass auch kurze Störungen der cochleären Blutzufuhr und der damit verbundenen Verminderung der Sauerstoffversorgung zu einer schnellen

(Abbildung 6). Hierbei schlagen die Arteriolen drei Hauptverlaufsrichtungen in jeweils nicht miteinander kommunizierende Versorgungsgebiete ein:

- 1 Die Arteriolae radiatae superiores verlaufen im Dach der Scala vestibuli, teilen sich in mehrere Äste und versorgen die Gefäßnetze der äußeren Schneckwand (30,33,34).
- 2 Die Arteriolae radiatae mediales versorgen die Gefäße der Basilarmembran.
- 3 Die Arteriolae radiatae inferiores versorgen die Kapillargebiete der Modioluswand, des Ganglion spirale und des N. acusticus.

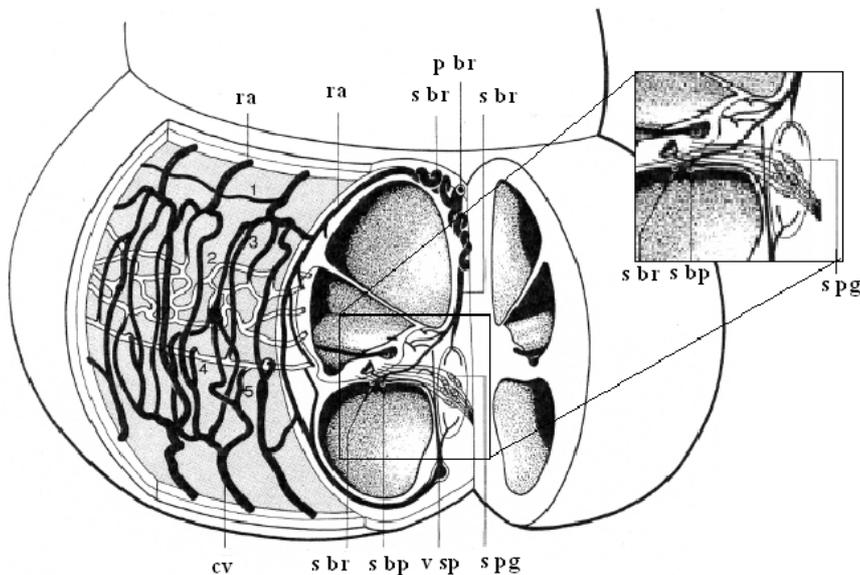


Abb. 6: Schematische Darstellung des Gefäßsystems der 1. Windung der Meerschweinchencochlea, cv Sammelvenole, p br primärer Ast der Labyrintharterie (A. spiralis modioli), s br sekundärer Ast (A. radiata modioli nach Ritter), ra Arteriola radiata anteriores, s bp inneres Spiralgefäß, s pg Spiralganglion, v sp V. spiralis posterior, 1. Kapillaren im oberen Lig. Spirale, 2. Netzwerk der Stria vascularis, 3. arteriovenöse Arkaden, 4. Kapillare der Prominentia spiralis, 5. Kapillaren im unteren Lig. Spirale (modifiziert nach Smith (37)).

Die Arteriolae radiatae superiores und mediales sind anfangs gewunden und werden auch als „korkenzieherartig“ bezeichnet. Sie treten in die Stria vascularis unterhalb des Ansatzes der Reissnerschen Membran ein und teilen sich dort in zahlreiche, vielfach sehr dicht miteinander kommunizierende Äste des strialen Netzwerkes auf. Die Kapillaren dieses Netzes (Abbildung 7) zeigen *in vivo* (38,39) und *post mortem* (40) einen größeren Durchmesser als die übrigen lateralen Netzwerke, dafür haben sie keine perivaskulären Räume; das darin befindliche Blut hat eine höhere Viskosität und fließt mit langsamerer Strömungsgeschwindigkeit (39). Das Volumen des cochleären Blutflusses ist sehr klein. Es wird ungefähr auf 1×10^{-4} des Herzschlagvolumens bei

Nagetieren wie dem Meerschweinchen und auf 1×10^{-6} des Herzschlagvolumens beim Menschen geschätzt (40).

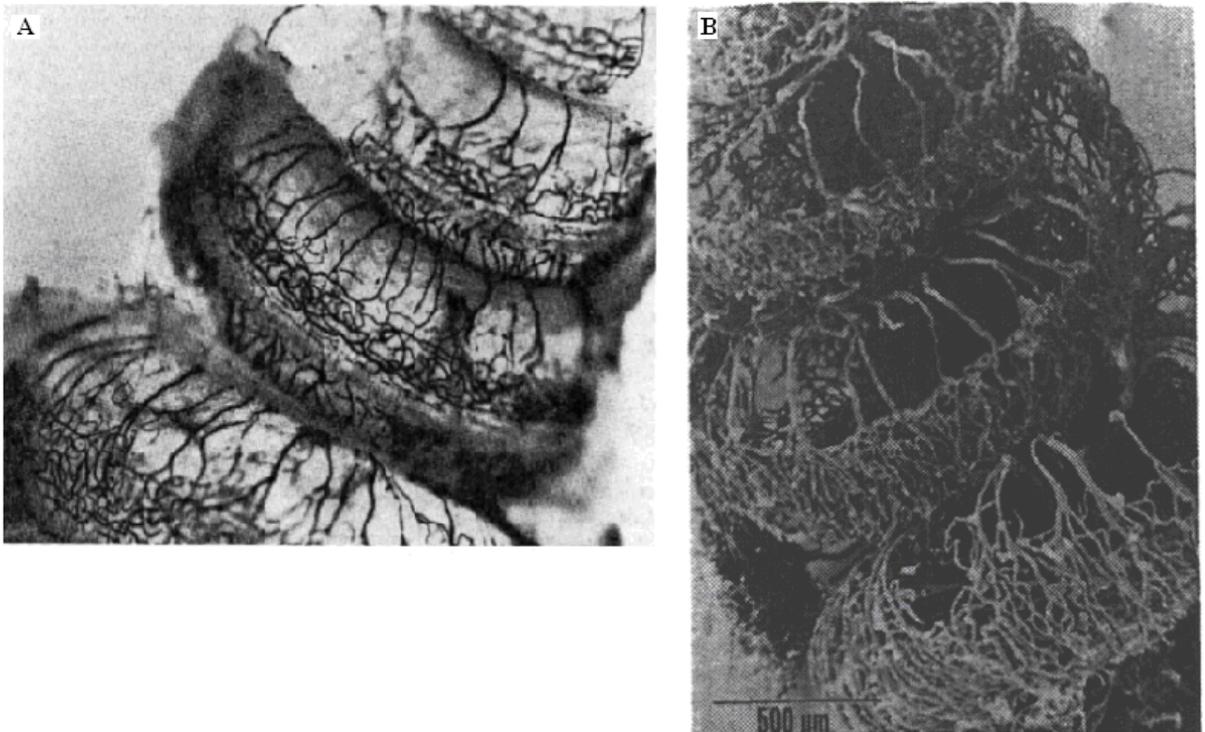


Abb. 7: A: Benzidinpräparat der lateralen Wand der Meerschweinchencochlea zur Darstellung der kapillären Endaufzweigungen (nach Maas (28)); B: elektronenmikroskopische Darstellung der cochleären Blutgefäße (nach Lawrence (29)).

1.3 Physiologie des Innenohres

Schallübertragung

Wie ein Trichter fängt die Ohrmuschel den Schall auf und leitet die Schwingungen über den äußeren Gehörgang an das Trommelfell. In der Paukenhöhle liegen die Gehörknöchelchen Hammer, Amboss und Steigbügel (Malleolus, Incus und Stapes), welche gelenkig miteinander verbunden sind und den Schall über die Fußplatte des Steigbügels zum flüssigkeitsgefüllten Innenohr übertragen (Abbildung 8). Die Mechanik des Mittelohres gleicht Impedanzunterschiede zwischen Luft und Perilymphe aus.

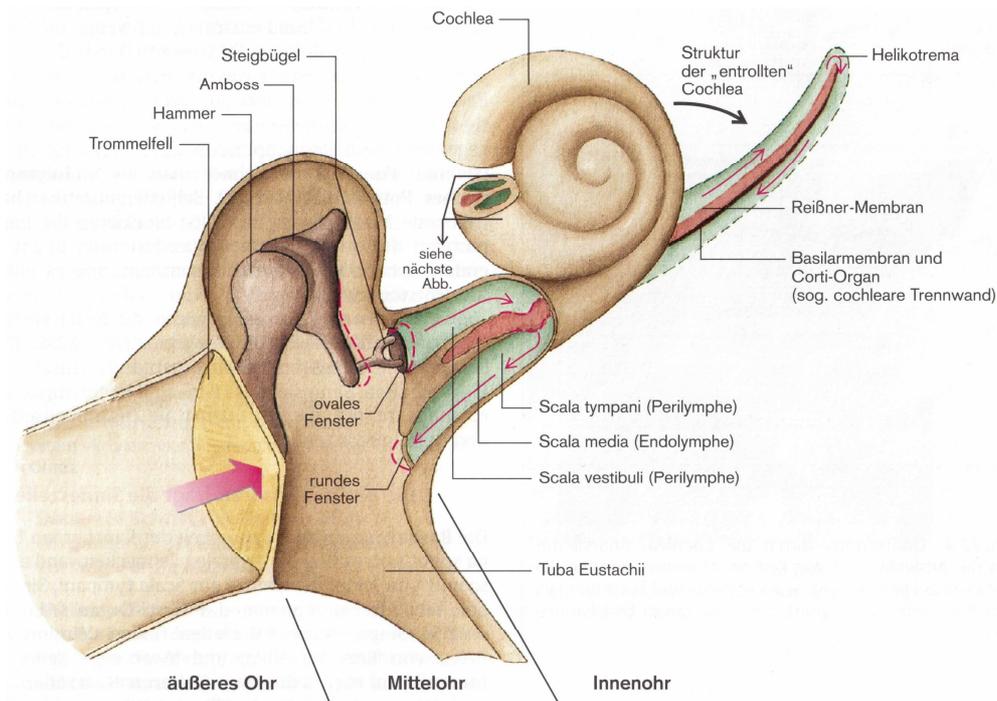


Abb. 8: Der Schallübertragungsweg vom äußeren Gehörgang zum Innenohr (modifiziert nach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Herausgeber: Probst, Grevers, Iro; Thieme Verlag, 3. Auflage, 2008).

Wanderwelle und Tonotopie

Die vom Stapes auf die Endolympe übertragenen Schwingungen führen zu einer wellenförmigen Bewegung der Basilarmembranen (Békésy-Wanderwelle). Diese Welle hat ein frequenzspezifisches Maximum zwischen Stapesfußplatte und Helikotrema. Grundlage hierfür ist die nach apikal hin abnehmende Steifigkeit der Basilarmembran. Hohe Frequenzen werden in der Cochlea basal, niedrige apikal abgebildet. Das Phänomen, dass jeder Frequenz ein bestimmter Ort auf der Basilarmembran zugeordnet wird, bezeichnet man als Tonotopie.

Endocochleäres Potential

Das endocochleäre Potential wurde in der Literatur erstmals von de Békésy 1951 (17) beschrieben. Wie schon erwähnt weist die Perilymphe ähnlich anderen extrazellulären Flüssigkeiten eine hohe Natriumionen- (130-150 mmol/l) und eine niedrige Kaliumionenkonzentration (4-5 mmol/l) (18) auf. Die Endolympe hingegen zeigt eine hohe Kaliumionen- (140-160 mval/l) und eine geringe Natriumkonzentration (12-16 mval/l). Hieraus resultiert ein positives Potential, das als endocochleäres Potential bezeichnet wird und einen Betrag von + 80 mV gegenüber der Perilymphe besitzt. Die Haarzellen besitzen ein physiologisches Membranpotential von etwa -70 mV, dadurch entsteht zwischen dem mit +80 mV positiv geladenen Endolymphraum

und dem Zytoplasma der Haarzellen eine Potentialdifferenz von etwa 150 mV (Abbildung 9).

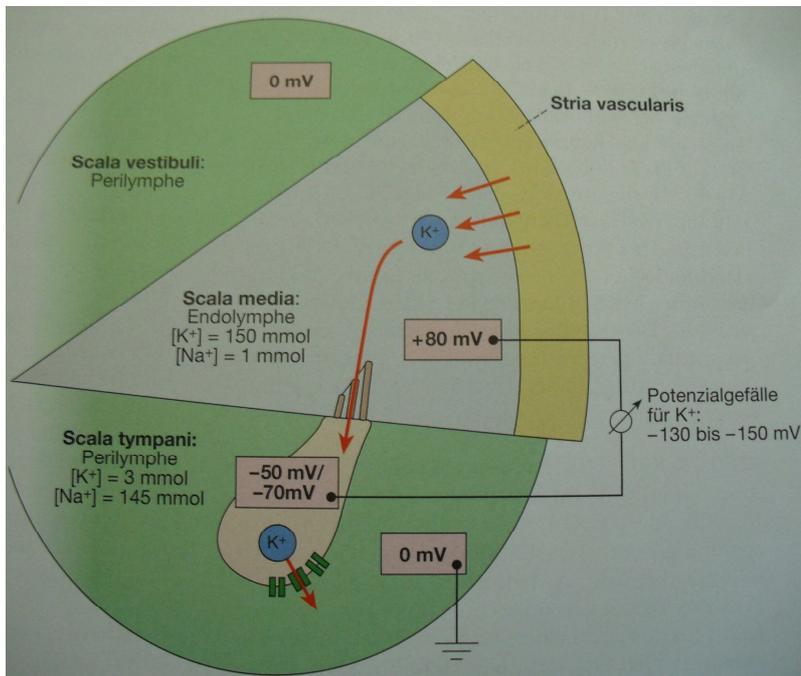


Abb. 9: Intracochleäre Ionenverteilung und endocochleäres Potential (verändert nach Speckmann et al. 2008)

Elektro-mechanische Transduktion

Die Wellenbewegungen der Basilarmembran führen insbesondere am Ort der Maximalauslenkung zu einer Scherbewegung der Tektorialmembran. Hierdurch werden die Stereovilli der äußeren Haarzellen ausgelenkt. Bei einer Aufwärtsbewegung der Basilarmembran werden dadurch die „tip links“ gedehnt, worauf sich Ionenkanäle in der Plasmamembran öffnen, so dass Kaliumionen entlang des positiven Potentialgefälles in die Zelle einströmen. Bei Abwärtsbewegungen werden diese Kanäle wieder geschlossen, so dass die Zelle repolarisiert, da sich nun in den lateralen Zellmembranen gelegene spannungsabhängige Kaliumkanäle öffnen und Kaliumionen entlang des Konzentrationsgradienten in die kaliumarmen Extrazellularräume fließen. Hierbei führen der Einstrom von Kaliumionen und die Depolarisation der Zelle zu spannungsabhängigen Konformationsänderungen und zur Verkürzung eines Motorproteins (Prestin) der lateralen Plasmamembranen. Der hierbei entstehende axiale Kraftvektor wird auf das Zytoskelett der Zelle übertragen. Diese spannungsabhängigen Längenänderungen (elektro-mechanische Transduktion)

verstärken die Wanderwelle im Bereich des Maximums zusätzlich um 50 dB und führen zu der hohen Frequenzspezifität des menschlichen Ohres (Abbildung 10).

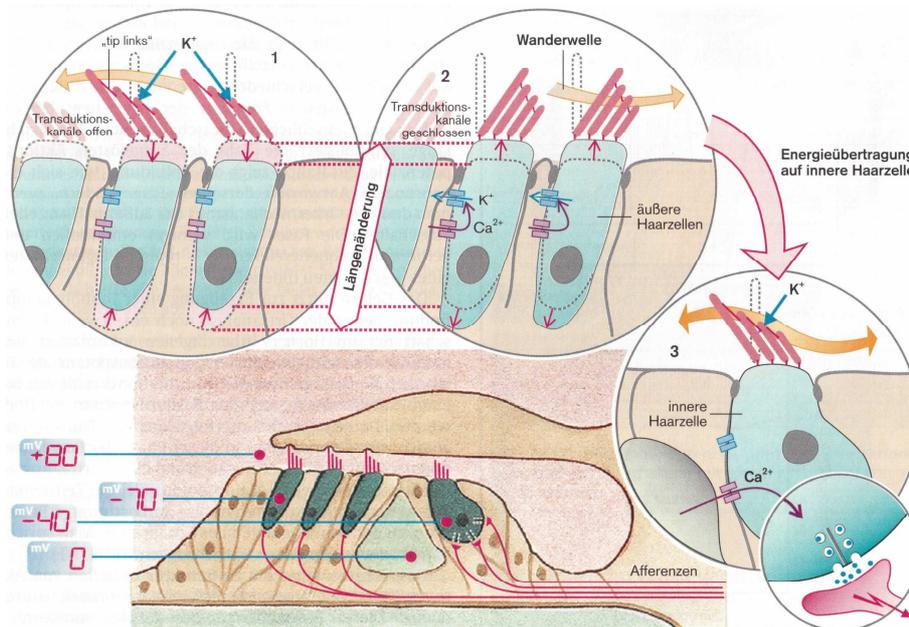


Abb. 10: Transduktionsprozess im Innenohr (modifiziert nach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Herausgeber: Probst, Grevers, Iro; Thieme Verlag, 3. Auflage, 2008).

Mechano-elektrische Transduktion

Die verstärkte Wanderwelle führt zur Auslenkung der Tektorialmembran, welche wiederum die inneren Haarzellen stimuliert. Durch die verstärkte Schwingungsenergie werden nun auch die Stereovilli der inneren Haarzellen ausgelenkt. Auch hierdurch werden Ionenkanäle geöffnet, so dass Kaliumionen ins Zellinnere einströmen und eine Depolarisation der inneren Haarzellen hervorrufen. Die Depolarisation führt über einen Calcium- Einstrom zu einer Ausschüttung des Transmitters Glutamat und somit zur Auslösung eines Aktionspotentials am ersten Neuron des Hörnerven.

1.4 Regulation des Blutflusses der Cochlea

Um das endocochleäre Potential und die Funktion der Cochlea zu erhalten, muss der cochleäre Blutfluss eng an die metabolischen Bedürfnisse angepasst werden (41,45). Eine Beeinträchtigung der cochleären Mikrozirkulation führt zu Änderungen des Blutflusses, was dementsprechend die Versorgung mit Sauerstoff und metabolischen Substraten, die für eine physiologische Funktion der Cochlea nötig sind, beeinflusst. Eine Störung des cochleären Blutflusses wird im Zusammenhang mit zahlreichen

pathophysiologischen Prozessen und otologischen Funktionsstörungen wie z.B. dem lärminduzierten Hörverlust, der Altersschwerhörigkeit und dem Hörsturz diskutiert (46-48). Trotz zahlreicher klinischer und tierexperimenteller Studien ist die Regulation des cochleären Blutflusses nach wie vor nur unzureichend aufgeklärt. Dennoch konnten einige Untersuchungen darstellen, dass die Hauptregulation des cochleären Blutflusses in der A. spiralis modioli (49,50) und den Arteriolen stattfindet. Neben der Blutzufuhr besteht eine wesentliche Aufgabe der A. spiralis modioli in einer Druckminderung und einem Schutz des Kapillarbetts der Stria vascularis vor dem systemischen Druck in der Labyrintharterie (51).

Histologische Studien konnten zeigen, dass die kontraktilen Proteine Tropomyosin und Myosin auch in den Arteriolen des Ligamentum spirale exprimiert werden (52,53), was auch eine lokale Regulation des Blutflusses erklären könnte (54,55).

Tierexperimentelle Studien konnten darüber hinaus eine Autoregulation des cochleären Blutflusses darstellen (56,57). Yamamoto et al. (58) konnten am Meerschweinchen in einem Versuchsaufbau bei welchem der Innenohr- und Hirnstammbloodfluss durch Norepinephrin oder Exsanguination beeinflusst wurde, eine Autoregulierung darstellen. Diese zeigte sich im Gehirn stärker ausgeprägt als in der Cochlea. Zu der gleichen Feststellung kamen auch Kawamaki et al. (59) in ihrer Studie am Meerschweinchen, die den Effekt von erhöhtem Liquordruck auf den cochleären und cerebellären Blutfluss beim Meerschweinchen untersuchten. Hierbei wurde der Liquordruck direkt auf das Innenohr über den cochleären Aquädukt übertragen. Sie beschrieben, dass der cochleäre Blutdruck durch die Liquordruckerhöhung gleichsinnig, aber nicht so stark wie der cerebelläre Blutfluss gesenkt wurde. Bei der Untersuchung der Wirkung von vasodilatierenden Substanzen auf den cochleären Blutfluss kamen Ohlsen et al. (60) zu dem Ergebnis, dass die systemische Zufuhr von potenten vasodilatatorischen Substanzen zu einer geringen bzw. keiner Erhöhung des cochleären Blutflusses führte. Hieraus wurde geschlossen, dass durch autoregulatorische Mechanismen der cochleäre Blutfluss bei unterschiedlichen Perfusionsdrücken konstant bleiben kann. Insgesamt kann die Regulierung des cochleären Blutflusses durch mechanische, elektrische oder chemische Reize geschehen.

Unter den vaskulären Regulationsmechanismen, ist der adrenerge Signalweg der am besten untersucht (61,62). Der Gefäßtonus der A. spiralis modioli wird durch Nervenfasern der zervikalen sympathischen Ganglien wie auch durch Nervenfasern

um die Arteria anterior inferior cerebelli und die Basilararterien kontrolliert. Die Stimulation der sympathischen Nervenfasern führt zu einer neurogenen und myogenen Vasokonstriktion (50). Der Mechanismus dieser Kontraktion beinhaltet verschiedene Signalwege, welche alle zu einem intrazellulären Calcium- Anstieg führen (80-83). Daneben gibt es eine Calcium unabhängige Kaskade, die ebenfalls zu einer Kontraktion der glatten Muskelzellen führt. Bei konstanter Calciumionenkonzentration kann hierbei die Muskelkontraktionskraft durch eine Erhöhung der Calcium Sensitivität der Kontraktionspartner erhöht werden (83,84). Wird das Innenohr zum Beispiel durch laute akustische Stimulation stark beansprucht induziert die exzessive Aktivität dieser Mechanismen eine Vasokonstriktion, was zu einer lokalen Gewebeischämie und einem sensorischen Hörverlust führen kann.

Weiterhin wird der cochleäre Blutfluss durch die vasodilatierenden Effekte von Stickstoffmonoxid (NO) reguliert. NO wird in der lateralen Wand der Cochlea gebildet (62-64) und führt zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen in den zuführenden Arteriolen (65). Um die Gefäße vor pathologischen Veränderungen wie zum Beispiel einer Erhöhung des Blutdrucks zu schützen (67,68), wird der endogene Vasodilatator NO durch die endotheliale Isoform der Stickstoffsynthase (eNOS) synthetisiert (66). Die Stickstoffsynthase, welche in der Stria vascularis, im Ligamentum spirale, in den Haarzellen und in den Nervenfasern des Ganglion spirale vorkommt (62,64), spaltet die Aminosäure L- Arginin in NO und L- Citrullin. NO diffundiert daraufhin in Muskelzellen und führt über weitere Aktivierungsschritte zu einer Modulation der Myosinleichtkettenkinase und einer Relaxation glatter Muskelzellen (65,70-75). Zudem gibt es übergreifende Mechanismen der Relaxation. Die potente vasodilatative Aktivität der cyclischen Guanosinmonophosphat(GMP) - abhängigen Proteinkinase (cGK) führt zu einer Abnahme der Calcium Sensitivität des glatten Muskels über eine Stimulation der Myosin Leichtketten Phosphatase (MLCP) (85). Über weitere Zwischenschritte kann dann eine konsequente Inhibition induzierter Calcium Sensitivierung zusätzlich zu der vasodilatierenden Aktivität des NO beitragen (Abbildung 11).

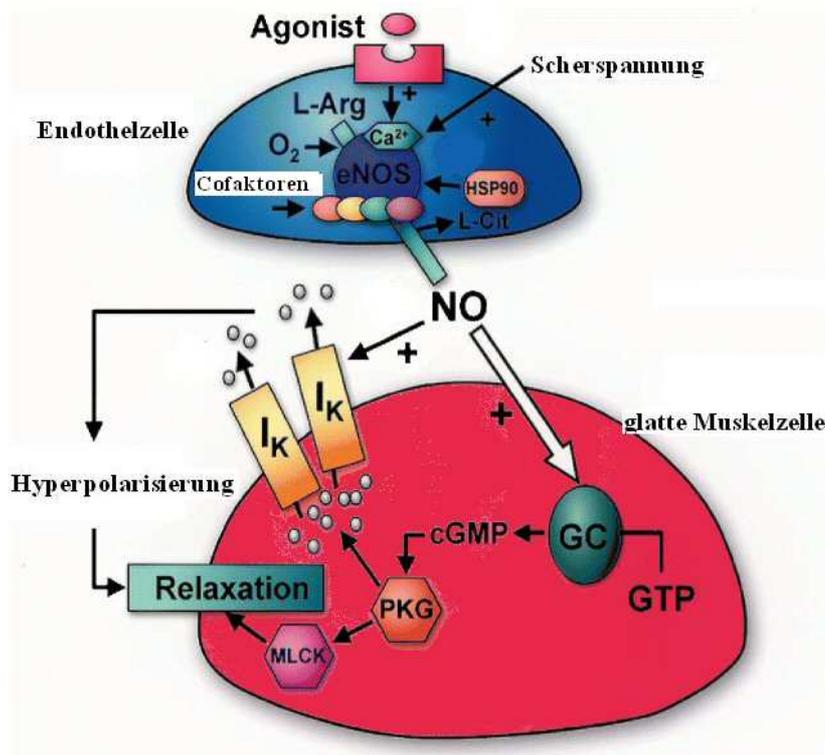


Abb. 11: Relaxation der glatten Muskelzellen der Gefäßwände durch Stickstoffmonoxid. NO: Stickstoffmonoxid, eNOS: Stickstoffsynthase, HSP90: Hitzeschockprotein 90, L-Arg: L- Arginin, L-Cit: L- Citrullin, GC: Guanylatzyklase, GTP: Guanosintriphosphat, cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, PKG: Proteinkinase G, MLCK: Myosinleichtkettenkinase, I_k: Kaliumkanäle (modifiziert nach 79).

1.5 Pathologien

1.5.1 Hörsturz

Der Hörsturz ist eine ohne erkennbare Ursache (idiopathisch) plötzlich auftretende, meist einseitige Schallempfindungsstörung. Er tritt hinsichtlich Frequenzbereich und Schweregrad in 5 unterschiedlichen Formen auf: Hochtoninnenohrschwerhörigkeit, Tieftoninnenohrschwerhörigkeit, Mitteltoninnenohrschwerhörigkeit, pancochleäre Schwerhörigkeit und Taubheit.

1.5.2 Pathophysiologie des Hörsturzes

Nur selten kann die Ursache eines Hörsturzes durch die in der Klinik zur Verfügung stehenden diagnostischen Mittel (Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Sonographie, Röntgen, etc.) dargestellt werden, da das Innenohr nur etwa 3 bis 4 mm groß und in den soliden Knochen des Felsenbeins eingebettet ist. Experimentelle Untersuchungen, epidemiologische Erhebungen und pathophysiologische Erwägungen

legen die Vermutung nahe, dass der Hörsturz ein multifaktorielles Geschehen ist (87-90).

1. Störungen der Durchblutung

Der Krankheitsverlauf und die Begleitumstände des Hörsturzes führten schon früh zur Vermutung einer vaskulären Ursache. So bezeichnete Pollitzer bereits 1887 den Hörsturz als angioneurotische Oktavuskrise (96). Störungen der cochleären Durchblutung stehen heute im Zentrum der Forschung. Zahlreiche klinisch-wissenschaftliche Arbeiten sprechen für eine regionale Perfusionsstörung der Cochlea. Es wird angenommen, dass Veränderungen der cochleären Mikrozirkulation die lokale Durchblutung des Innenohres unter einen für die Funktion des Organs notwendigen Grenzwert senken, wodurch eine optimale Versorgung mit Sauerstoff und Energieträgern sowie eine Entsorgung von Stoffwechselprodukten nicht mehr gewährleistet werden kann. Eine Durchblutungsstörung kann durch Gefäßdysregulation (z.B. Vasospasmus), eine Epithelschwellung, eine rheologische Störung (Mikrosludge-Phänomen), aber auch durch eine Thrombose oder Embolie bedingt sein. Hierzu konnte in tierexperimentellen Studien bereits gezeigt werden, dass die cochleäre Mikrozirkulation sehr störanfällig ist und dass bereits geringe Veränderungen des regionalen Blutflusses sofort zu Funktionsveränderungen des Corti-Organ führen (97). Beispielsweise scheinen erhöhte Cholesterin- und Fibrinogenspiegel einen negativen Effekt auf die Innenohrfunktion zu haben. Erhöhte LDL (low-density-lipoprotein) und erniedrigte HDL (high-density-lipoprotein)-Werte gelten allgemein als vaskuläre Risikofaktoren und können auch die cochleäre Mikrozirkulation durch eine reduzierte Ausschüttung des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) aus den Endothelzellen direkt beeinflussen (98,99). Lin et al. (100) fanden beispielsweise in einer Kohorte von 1.423 Hörsturzpatienten ein im Vergleich zur Kontrollgruppe 1,64-fach höheres Risiko, in den nächsten fünf Jahren einen Schlaganfall zu erleiden. Auch konnte nachgewiesen werden, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus nicht nur zu Durchblutungsstörungen im Gefäßbett von Herz, Niere, Augen und Gehirn führen, sondern auch im Kollektiv der Innenohrpatienten gehäuft vorkommen. Auch Rudack et al. (102) untersuchten in ihrer Studie den Zusammenhang zwischen verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren und einer Innenohrschwerhörigkeit und zeigten, dass Rauchen und Hyperfibrinogenämie als Risikofaktoren anzusehen

sind. Das pro-inflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF α) kommt als zentraler Akteur im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke in der Pathogenese des Hörsturzes ebenfalls in Frage. Eine aktuelle Studie zeigte, dass Inflammation über einen Signalweg mit einer TNF α abhängigen Aktivierung von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) den cochleären Blutfluss reduzieren kann. Zusammengefasst lassen diese Daten darauf schließen, dass TNF α einen prokonstriktiven Effekt auf allen Ebenen der cochleären Mikrozirkulation durch eine Aktivierung des S1P Signalweges induziert; daher könnte jede Pathologie, die an eine Freisetzung von TNF α geknüpft ist (Infektion, Autoimmunkrankheiten, systemisch- inflammatorische Antwort etc.), einen vaskulär bedingten Hörsturz verursachen (101).

2. autoimmunologische Prozesse

Verschiedene immunologische Funktionsstörungen könnten bei der Entstehung eines Hörsturzes beteiligt sein. Diese beinhalten ein weites Spektrum an immunvermittelten Störungen wie der Bildung von Immunkomplexen, der Produktion von Autoantikörpern gegen Innenohrproteine sowie zelluläre Immundefekte. So wird vermutet, dass zirkulierende Antikörper mit Innenohrantigenen oder aktivierten T-Zellen kreuzreagieren und so das Innenohr schädigen. Einige Innenohrantigene werden als Ziel solcher Antikörper gesehen, wie z.B. Kollagen 2, Beta-Aktin, Cochlin und Beta- Tectorin. Unter den zahlreichen Antigenen scheint insbesondere das Cholin-Transporter-like-Protein 2 (CTL2) eine Rolle beim Hörsturz zu spielen. Es konnte dargestellt werden, dass intracochleär eingebrachte Antikörper gegen CTL2 beim Meerschweinchen einen Hörverlust auslösten (102,103).

3. endolymphatischer Hydrops

Auch der endolymphatische Hydrops wird als Ursache für Hörstürze gesehen. Hierbei kommt es zu einer gesteigerten Menge an Endolymphe mit Erweiterung des Ductus cochlearis und dadurch zu einer Verlagerung der Reissner- Membran gegen die Scala vestibuli. Dies kann durch eine Überproduktion oder durch eine mangelnde Resorption der Endolymphe im Saccus endolymphaticus auftreten. Der Hydrops führt zu einer Verlagerung der Basilarmembran mit ungünstigen mechanischen Voraussetzungen für die Haarzellen; dies kann zu einer Schallempfindungs-Schwerhörigkeit führen. In ausgeprägten Fällen kann es zu einer Ruptur der Reissner-

Membran kommen und hierdurch zu einer Durchmischung von Peri- und Endolymphe mit Kaliumintoxikation im perilymphatischen Raum (111).

4. virale Infektion

Die virale Innenohrinfektion bleibt weiterhin eine häufig angeführte Theorie für den Hörsturz. Virale Infektionen die mit Hörstürzen in Verbindung gebracht werden sind unter anderem durch das Herpes simplex Virus, Masern, Mumps, Röteln, Influenza-Viren, das Varizelle Zoster Virus oder auch das Cytomegalie-Virus bedingt. Drei Mechanismen wurden vorgeschlagen um zu erklären, wie eine virale Infektion einen Hörsturz hervorrufen könnte (104). Der erste beinhaltet eine virale Invasion der Cochlea (Cochleitis) oder des Nervus cochlearis (Neuritis). Das Virus könnte das Innenohr entweder über den Blutweg, aus dem Liquorraum oder über das Mittelohr erreichen. Der zweite Mechanismus geht davon aus, dass das Virus im Innenohr inaktiv ist und aus irgendeinem Grund zu einem gewissen Zeitpunkt reaktiviert wird und einen Hörsturz hervorruft. Der dritte Mechanismus beinhaltet eine systemische Infektion. Diese Infektion soll eine Antikörperantwort triggern, die zu einer Kreuzreaktion mit Innenohrantigenen führt und eine pathologische Aktivierung von zellulären Stresssignalwegen in der Cochlea hervorruft. Die virale Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass Läsionen ähnlich derer einer viralen Cochleitis bei Hörsturzpatienten im Felsenbein gefunden wurden (105). Eine direkte Kultur von Innenohrflüssigkeit ist für einen Virusnachweis aufgrund der negativen Folge für das Gehör nicht möglich, sodass eine morphologisch Identifizierung einer viralen Infektion nur post mortem möglich ist. Jedoch konnte mittels hochsensitiver serologischer Techniken, wie der Polymerasekettenreaktion und durch die Bestimmung von Immunglobulin-Titern, die Anwesenheit von infektiösen Agentien bei Hörsturzpatienten dargestellt werden (106).

Schließlich führen die unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen in der Folge zu einer gleichförmig ablaufenden Schädigung des Innenohres über eine vermehrte Ausschüttung des Transmitters Glutamat (101) in die Synapse zwischen inneren Haarzellen und dem ersten Neuron der Hörbahn. Dieser Vorgang endet in einer Störung der mechano-elektrischen Transduktion. Die Folge ist eine Hörminderung, die prinzipiell reversibel ist, insbesondere wenn der schädigende Mechanismus, zum Beispiel eine regionale Perfusionsstörung, beseitigt wird.

Andererseits kann eine anhaltende Störung zu einer Apoptose der Haarzellen und letztlich zu einer nicht reversiblen Schädigung des afferenten Neurons (102) führen.

1.5.3 Therapien des Hörsturzes

Das grundsätzliche Problem der Hörsturztherapie liegt darin, dass im Einzelfall die Ätiologie ungeklärt bleibt und keine Behandlungsmethoden mit Evidenzgrad Ia existieren; daher orientieren sich die etablierten Therapieformen an der vermuteten Pathophysiologie und sind lediglich empirisch abgesichert (107). Auch ist zu beachten, dass in den ersten Tagen nach dem Ereignis in 40-60 % der Fälle eine Spontanremission auftreten kann.

Ein therapeutischer Ansatzpunkt ist die Vermeidung der Haarzellapoptose. Zum einen werden Substanzen verabreicht, die als Inhibitoren oder Radikalfänger wirken und so den durch Sauerstoffradikale entstehenden Schaden minimieren können. Hierzu zählen unter anderem Magnesium, Glutathion, Vitamine (A, C oder E), Allopurinol oder auch Melatonin. Das zellpermeable Peptid AM-111 kann durch eine selektive Inhibition von Enzymen die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) Signalkaskade und die dadurch ausgelöste Apoptose von Haar- und Nervenzellen der Cochlea blockieren (111).

Neuere Therapien, wie die intratympanale Injektion von Methylprednisolon, Insulin-like Growth Faktor 1 oder Glutamat Inhibitoren (z.B. Taurine) sollen eine Degeneration der Neuronen bei Hörsturz verhindern. Diese Therapieoptionen befinden sich jedoch noch in präklinischen oder frühen klinischen Untersuchungsphasen (112).

Corticosteroide stellen ein sehr häufig verwendetes Therapieverfahren dar, da sie durch ihre antiapoptotische als auch antiinflammatorische und antiödematöse Wirkung an verschiedenen Punkten der vermuteten Pathophysiologie ansetzen können (113).

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt bei Innenohrerkrankungen besteht in der Verbesserung des cochleären Blutflusses. Das Fließverhalten des Blutes ist abhängig von der Plasmaviskosität, der Erythrozytenrigidität sowie dem Perfusionsdruck, der Angioarchitektur und funktionellen Parametern der Mikrozirkulation (funktionelle Gefäßdichte, Gefäßdurchmesser). Diese verschiedenen Ansatzpunkte führten dazu, dass bisher verschiedene Therapieformen evaluiert wurden:

1. Plasmaexpander, die das Volumen des zirkulierenden Blutes erhöhen und gleichzeitig den relativen Anteil der zellulären Blutbestandteile reduzieren. Hierzu zählt niedermolekulares Dextran (z.B. Dextran 40), das überdies zu einer Hemmung von Erythrozyten- und Thrombozytenaggregation führt oder Hydroxyethylstärke (HAES). Probst et al. (114) konnten in einer prospektiven, randomisierten, klinischen Studie bei der Behandlung des Hörsturzes und des akustischen Traumas allerdings keinen Wirksamkeitsnachweis bezüglich des relativen Hörgewinns gegenüber Kochsalzinfusionen nachweisen. Im Gegensatz zu Deutschland und Österreich ist im angloamerikanischen sowie im skandinavischen Raum die rheologische Infusionstherapie beim Hörsturz auf Grund des fehlenden signifikanten Wirkungsnachweises unüblich.
2. Pentoxifyllin wird allgemein zur Therapie peripherer Durchblutungsstörungen eingesetzt und zeigt einen, nicht primär vasodilatierenden, Effekt durch Erniedrigung der Blutviskosität, Verbesserung der Erythrozytenfluidität und einer Thrombozytenaggregationshemmung. In der bereits zitierten Studie von Probst et al. konnte aber auch für diesen Wirkstoff kein signifikanter Wirksamkeitsnachweis bei Innenohrerkrankungen erbracht werden.
3. Prinzipiell ist der Einsatz der bei kardiovaskulären Erkrankungen im Rahmen der Akuttherapie und der Prävention eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer (z.B. Acetylsalicylsäure) auch bei der Therapie von akuten Innenohrerkrankungen unter dem Verdacht einer vaskulären Ursache denkbar. Weinaug et al. (115) fanden in ihrer Studie bei der Therapie von 34 Hörsturzpatienten keinen Vorteil bezüglich des Hörgewinns im Vergleich zu früheren Ergebnissen des Spontanverlaufs.
4. Ein innovativer Ansatz zur Verbesserung der Fließeigenschaft des Blutes besteht in der Senkung der Plasmaviskosität durch Herabsetzen der Fibrinogenkonzentration mittels Heparin induzierter extrakorporaler LDL-Präzipitation (H.E.L.P.) Aphaese (112). Die Fibrinogenabsenkung im Blutplasma senkt die Plasmaviskosität und reduziert die Neigung zur Aggregation zellulärer Blutbestandteile. Im Gegensatz zur hypervolämischen Hämodilution mit Dextran oder HAES bleiben der Hämatokrit und damit die Sauerstofftransportkapazität des Blutes konstant, es wird allerdings die Fließeigenschaft des Blutes in den Kapillaren verbessert. Das Absenken der Konzentration von LDL und Cholesterin

im Blut führt darüber hinaus zusätzlich zu einer Verbesserung der Endothelzellfunktion.

5. Das Spektrum der bei Hörsturztherapie eingesetzten vasoaktiven Stoffe ist breit. So werden Patienten auch mit Calcium- Kanal- Blockern (z.B. Verapamil), Prostaglandinen, Piracetam, Betahistidin, Gingko biloba oder auch mit einer hyperbare Sauerstofftherapie behandelt.

2 Ziel der Studie

Der Hörsturz gehört mit einer Inzidenz von 200 Neuerkrankungen/ 100.000 Einwohnern pro Jahr zu einer der häufigsten Erkrankungen des Ohres. Angesichts der großen Anzahl von 14-15 Millionen hörgeschädigter Patienten in Deutschland und der überragenden Bedeutung des Gehörsinnes für das soziale Zusammenleben sind neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet von großer klinischer und sozioökonomischer Bedeutung. Bei Innenohrpathologien scheinen Änderungen der cochleären Mikroperfusion eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zu spielen. Radiologisch können diese Veränderungen nicht diagnostiziert werden, da das Gefäßgebiet der Cochlea durch seine Lage im Felsenbein selbst mit hochauflösenden Bildgebungsverfahren nur unzureichend dargestellt werden kann. Untersuchungen zur Pathogenese sind daher auf tierexperimentelle Studien angewiesen. In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze zur Darstellung und Quantifizierung des cochleären Blutflusses am Tiermodell etabliert (126-128). Die hierbei eingesetzten Verfahren wie die Laser-Doppler-Flussmessung können nur relative Änderungen der Innenohrdurchblutung darstellen oder sind wie die Messung mit Mikrosphären nicht dynamisch. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vivo* Modell zur Analyse der cochleären Mikrozirkulation mittels der Intravitalmikroskopie (IVM) in Kombination mit der Analyse der Hörschwelle entwickelt und validiert. Mit diesem neuartigen Modell sollten dann Veränderungen der Mikrozirkulation und die Unabhängigkeit der Hörschwelle von makrozirkulatorischen Parametern wie dem systemischen mittleren arteriellen Blutdruck untersucht werden. Um die Methode mit bereits vorhandenen Daten der Literatur vergleichen zu können und somit die Reproduzierbarkeit der Messungen zu untersuchen und darzustellen, wurden die cochleäre Mikrozirkulation und der systemische Blutdruck mittels des Vasodilatators Natriumnitroprussid beeinflusst.

Als wesentliche Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit ergaben sich somit:

- 1.) Etablierung eines Tiermodells zur Analyse der cochleären Mikrozirkulation und der Hörschwelle *in vivo*
- 2.) Validierung des Messsystems zur Quantifizierung von Unterschieden des cochleären Blutflusses
- 3.) Darstellung der Unabhängigkeit der Hörschwellen- Messmethode von makrozirkulatorischen Parametern wie dem mittleren arteriellen Blutdruck.

3 Material und Methoden

Alle beschriebenen Untersuchungen und die erforderlichen Voruntersuchungen wurden in der Zeit vom 05.11.2006 bis 25.04.2008 mit der Genehmigung der zuständigen Behörde der Regierung von Oberbayern im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.1 Etablierung eines Modells

3.1.1 Versuchstiere

Für die Aufbauoptimierung, Voruntersuchungen und die Modelletablierung wurden 34 weibliche Meerschweinchen (Albino Hartley Meerschweinchen, Firma Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 250-418 g verwendet. Zur Validierung des Systems mit den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurden weitere 6 weibliche Meerschweinchen (Albino Hartley Meerschweinchen, Firma Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 250-418 g verwendet.

Die Tiere wurden bei konstanter Raumtemperatur von 23 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 14 zu 10 Stunden gehalten. Sie erhielten standardisiertes Futter (Altromin C1000, Altromin, Lage) und Wasser ad libitum.

3.1.2 Narkose

Die Narkoseeinleitung erfolgte bei den spontan atmenden Meerschweinchen in einem Kunststoffkasten durch ein Gasgemisch aus 0,7 l/min Sauerstoff (O₂), 0,5 l/min Lachgas (N₂O) und 2 Volumenprozent Halothan. Die Narkose wurde im weiteren Verlauf durch die Gabe von Ketamin i.p. 85mg/kg Körpergewicht (KG) und Xylazine 8,5mg/kg KG abgelöst. Ein chirurgisches Anästhesieniveau wurde aufrechterhalten indem die Meerschweinchen (alle 30 min) eine halbe Dosis Ketamin (42,5 mg/kg KG) und Xylazine (4,25 mg/kg KG) erhielten.

Mit der Kombination von Ketamin und Xylazine lässt sich eine Vollnarkose mit guter Analgesie und Muskelrelaxation erreichen. Diese Form der Narkose hat darüber hinaus nur geringe Auswirkungen auf die Vitalparameter wie Herzfrequenz,

Blutdruck, Atemfrequenz und Temperatur (129-131). Zusätzlich mindert die sympathomimetische Wirkung des Ketamins die durch Xylazin verursachte Bradykardie und AV-Blöcke. Ketamin und Xylazine wurden ausgewählt, da sie schon früher bei der Anästhesie von anderen Labortieren als sicher beschrieben wurden und ihre pharmakologischen Wirkungen durch langjährige Anwendung bekannt sind (131). Diese gewählte Anästhesieform ermöglicht somit physiologische und konstante Versuchsbedingungen.

Zusätzlich zu der i.p. Narkose wurden fortdauernd 0,7 l/min O₂ und 0,5 l/min N₂O über die Atemluft appliziert. Während der gesamten Versuchsdauer wurde Flüssigkeit i.v. zugeführt (NaCl 0,9 % (Braun, Melsungen, Deutschland), 8 µl/100g KG/min) um den renalen Blutfluss konstant zu halten und den operativ bedingten Flüssigkeitsverlust zu kompensieren.

3.1.3 Lagerung und makrohämodynamisches Monitoring

Nach Induktion der Narkose wurden die Tiere zur Vermeidung einer Hypothermie auf einer temperaturregulierten Heizplatte in Rückenlage gelagert, so dass eine rektal gemessene Temperatur von 37,5 °C – 38,5 °C aufrechterhalten wurde.

Der Kopf des Tieres wurde mit einem speziell angefertigten Kopfhalter fixiert, sodass die Atembewegungen des Tieres keinen Einfluss auf die Bildqualität ausübten.

Für die kontinuierliche Aufzeichnung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und zur Applikation von Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) und Natriumnitroprussid (SNP) wurden die linke Arteria femoralis sowie die rechte Vena jugularis interna durch einen Hautschnitt freigelegt und mit Polyethenkathetern (Portex Polythene Tubing, innerer Durchmesser: 0,28 mm, äußerer Durchmesser: 0,61 mm, Smiths Medical International Ltd, London, England) kanüliert. Die Platzierung der Katheter in den Gefäßen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Leica Operationsmikroskops (Leica, WILD Heerburg M650, Schweiz).

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde in der A. femoralis über einen AD-Wandler gekoppelten Druckabnehmer (Statham Pressure Transducer, Hugo Sachs, March, Deutschland) unter Zuhilfenahme der Software DASY Lab (National Instruments, Austin, USA) kontinuierlich aufgezeichnet.

Auf eine Katheterisierung der A. carotis wurde bei den Versuchen bewusst verzichtet, um mögliche Interferenzen mit den Ableitungen der Hirnstammpotentiale auszuschließen.

Über ein am rechten Vorderlauf angebrachtes Pulsoxymeter (NONIN SpO₂, HF Messung, mediquip Medizintechnik, Kirchzarten, Deutschland) wurden Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet und aufgezeichnet.

3.1.4 Chirurgische Technik

Nach Umlagerung in Bauchlage und erfolgte der retroaurikuläre Schnitt am rechten Ohr. Anschließend wurden die Muskeln durch stumpf-scharfe Präparation nach dorsal und kranial verlagert und der temporale Knochen und der knorpelige Gehörgang dargestellt. Unter Zuhilfenahme des Leica Operationsmikroskops konnte nun die Bulla mechanisch im dorsalen Teil über einen ventrolateralen Zugang eröffnet werden. Bei Nagetieren ist die das Mittelohr umgebende Bulla tympanica immer pneumatisiert, so dass sich Nagetiere besonders für eine Darstellung der Cochlea eignen. Das Trommelfell und die Sehne des M. tensor tympani wurden durchtrennt. Alle Gehörknöchelchen wurden dargestellt und im weiteren Verlauf entfernt, um einen besseren Zugang zur Cochlea zu ermöglichen. Anatomische Orientierungspunkte wie der Nervus facialis und die Bogengänge wurden identifiziert. Die anschließende Erweiterung des Zugangs erlaubte eine freie Sicht auf die Cochlea (Abbildung 12).

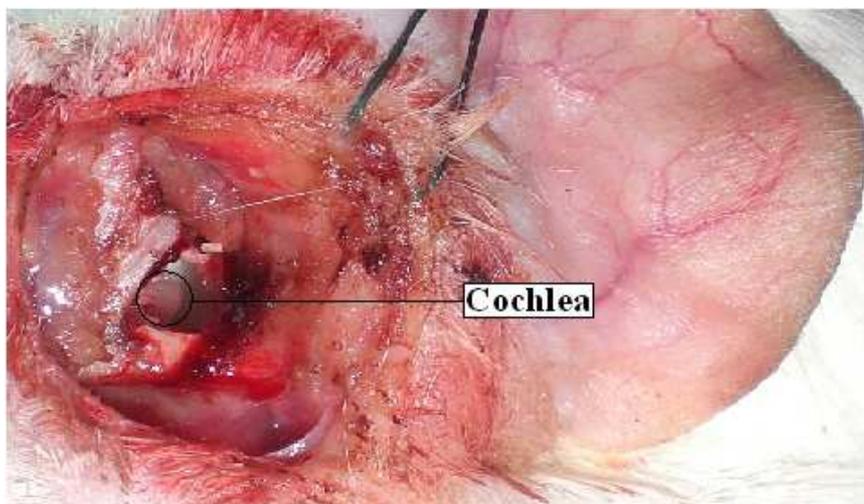


Abb. 12: Rechtes Ohr eines Meerschweinchens: Postaurikulärer Zugangsweg mit Darstellung der Cochlea.

Zur Darstellung und Beobachtung des cochleären Blutflusses im Kapillarbett der Stria vascularis wurde ein rechteckiges Fenster (Größe ca. 0,2 x 0,3 mm) im Bereich der zweiten bis dritten Windung der Cochlea angelegt.

Hierzu wurde mit einem Skalpell (Feather disposable Scalpel No.11, FEATHER SAFETY RAZER CO., LTD, Osaka, Japan) ein Rechteck präpariert. Der hierdurch entstehende Knochendeckel wurde mit einer dünnen Pinzette abgehoben. Abbildung 13 zeigt eine schematische Darstellung des Cochleafensters.

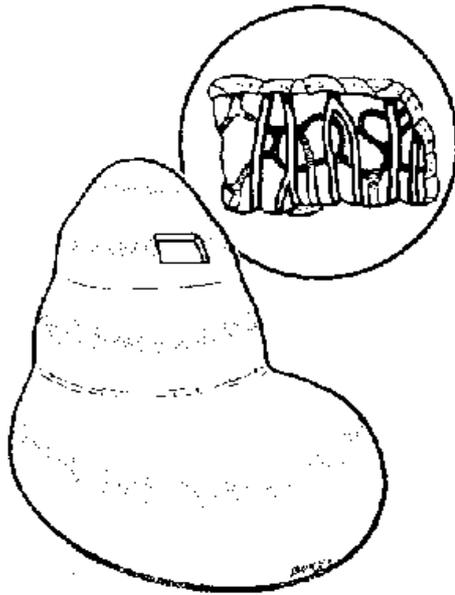


Abb. 13: Schematische Darstellung der Cochlea mit dem herausgehobenen Knochendeckel (aus Ren et al. (133)).

3.1.5 Intravitalmikroskopie (IVM)

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine Quantifizierung von Parametern der cochleären Mikrozirkulation wie der Erythrozytenfließgeschwindigkeit, des Kapillardurchmessers, der funktionellen Gefäßdichte und des Blutvolumenstromes.

Lebende biologische Gewebe haben üblicherweise unter einem hellen Lichtfeldmikroskop wenig Kontrast, so dass Maßnahmen zur Verbesserung des Kontrastes bei ungefärbten Geweben notwendig sind. Diese basieren oft auf Techniken, welche sich polarisiertes Licht zu Nutze machen. Dies ist bei der intakten Cochlea jedoch nicht möglich, weshalb Fluoreszenztechniken ein wichtiger Bestandteil zur Quantifizierung von Parametern der cochleären Mikrozirkulation sind, da die Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen den Kontrast des cochleären Kapillarbettts bei *in vivo* Aufnahmen des Innenohres verbessert (Abbildung 14).

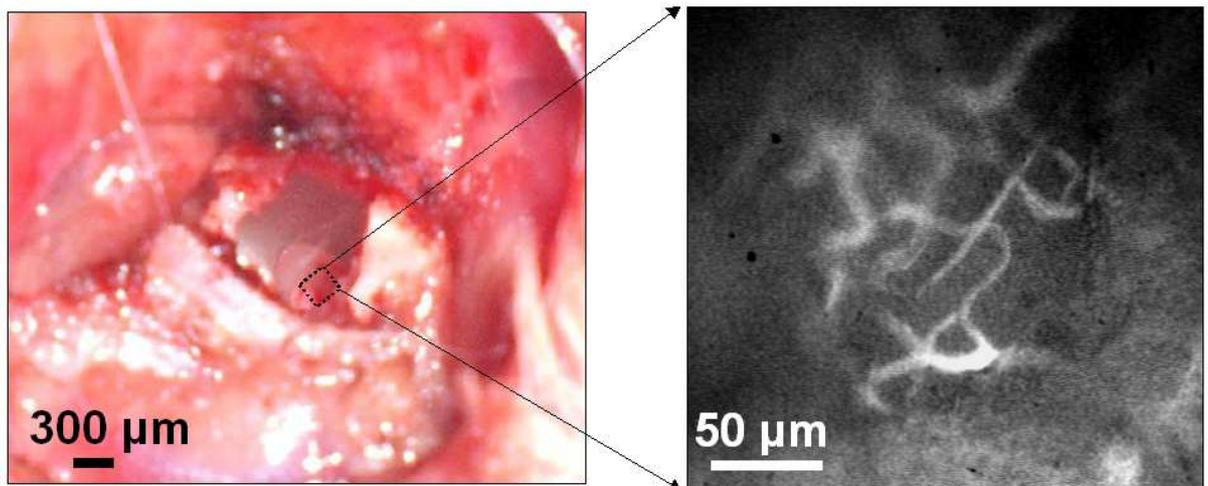


Abb. 14: Diese Abbildung zeigt eine mikroskopische Sicht der Cochlea im operativen Situs und das mit FITC-Dextran markierte Gefäßbett der Stria vascularis unter dem Intravitalmikroskop.

3.1.5.1 Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)

Die Visualisierung der cochleären Mikrozirkulation erfolgte bei diesen Versuchen durch die intravenöse Gabe von 0,05 - 0,1 ml 5% Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markiertem Dextran (MW 150,000; Sigma, Aldrich, Deisenhofen, Deutschland, 5 g/dl, gelöst in 9% Kochsalzlösung) über einen Zeitraum von 5 min vor der IVM. FITC-Dextran fungierte hierbei als Plasmamarker.

Dextrane sind stabile, nicht toxische Polymere, die in einer großen Breite verschiedener Molekulargewichte zur Verfügung stehen. Von de Belder und Granath (134) wurde eine Methode zur Bindung von Fluoreszeinisothiozyanat an Dextranmoleküle entwickelt, sodass die Visualisierung und Analysierung des Blutflusses bei Kreislaufversuchen deutlich verbessert werden konnte (135). FITC Substituenten sind bei normalen pH Wert und bei Raumtemperatur stabil und verteilen sich gleichmäßig über die Dextranmoleküle. Die Fluoreszeinpartikel werden durch eine stabile Thiocarbamyl-Bindung an das Dextran gebunden, ohne dass eine Depolymerisierung des Dextrans während des Markierungsvorganges stattfindet. Hierbei bleiben die Permeabilitätseigenschaften des FITC markierten Dextrans im Wesentlichen unverändert, sind in vivo stabil und weisen eine sehr gute Bioverträglichkeit auf (136). FITC-Dextran wurde dem Meerschweinchen intravenös verabreicht. Bei der in diesen Versuchen verwendeten Molekülgröße besteht nur eine geringe Extravasation des Plasmas, da nur Moleküle bis zu einer Größe von 70 kDa durch die Gefäßwand treten

können und die ausgeschiedene Fraktion durch die Nieren sehr gering ist. Seine Halbwertszeit hängt von der Amylasekonzentration im Blut der Tierspezies ab. Erst wenn die Dextrane von der Amylase auf eine Größe kleiner 70 kDa gespalten wurden, kommt es zur einer Diffusion nach extravasal; dies tritt erst nach mehreren Stunden ein. Somit kommt es bei der vorliegenden Versuchsdauer nicht zu einer Extravasation (137).

Das gegebene Volumen beträgt weniger als 1% bis 2% des Blutvolumens eines 350 g Meerschweinchens und hat somit keine Auswirkung auf den Versuch.

Unter dem Intravitalmikroskop erscheint das Blutplasma in den Lumina der Gefäße hell und die einzelnen Erythrozyten dunkel, so dass eine Messung der Erythrozytengeschwindigkeit möglich wird (136,137).

3.1.5.2 Technischer Aufbau

Für die videofluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Tiere auf einem Präzisions X-Y-Tisch (Merzhäuser, Wetzlar, Deutschland) platziert.

Die selektive Beobachtung von FITC- Dextran markiertem Plasma erfolgte in Epiilluminationstechnik mit einem modifizierten Zeiss Mikroskop (AxioTech Vario, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland), einer FluoArc Lichtquelle (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und einer 100 W Quecksilberlampe (HBO, Osram, München, Deutschland).

Das Licht wurde durch an einen spezifischen Filterblock geleitet (Anregung: 450-490 nm, Emission: ≥ 515 nm), sodass unter Verwendung dieses Fluorochroms und des angegebenen Emissionsspektrums die cochleäre Mikrozirkulation im Gefäßsystem visualisiert werden konnte (Abbildung 16).

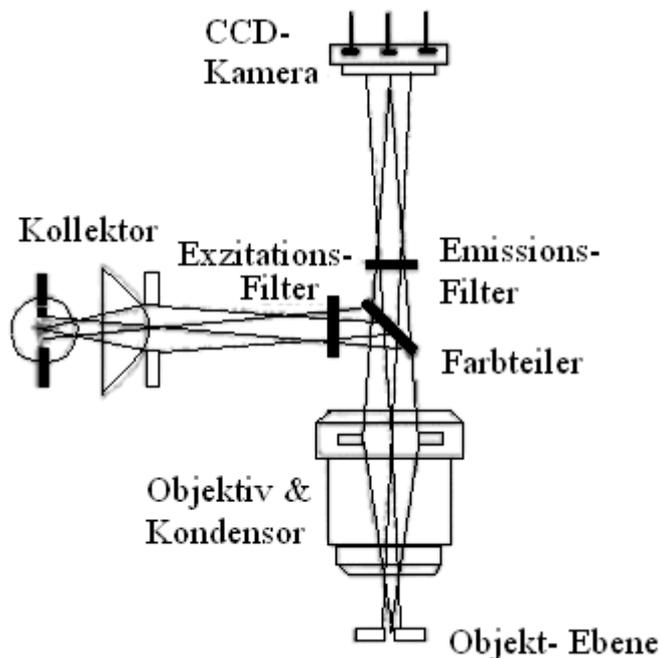


Abb. 16: Aufbau des Intravitalmikroskops.

Wir verwendeten ein 2,5x Plan Neofluar Objektiv (Zeiss) mit einem Arbeitsabstand von 9,3 mm und einer numerischen Apertur (NA) von 0,075 NA (Zeiss Plan-Neofluar 2,5 x/0,075 Pol 1113-113 ∞/-, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) für eine orientierende Einstellung des Aufnahmegebietes sowie ein 20x Olympus SLMPL Objektiv (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einem Arbeitsabstand von 21 mm und einer numerischen Apertur (NA) von 0,35 NA (Olympus SLMPLN 20x/0,35 ∞/-/26,5) für die Aufnahmeeinstellungen. Die Mikrozirkulation wurde mittels einer Videokamera (C2400-08; Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) auf einem Bildschirm (Sony, Tokyo, Japan, Diagonale 48 cm) dargestellt und mit einem digitalen Videorekorder (Sony DV Digital Videocassette recorder DSR-45D DV Cam, Sony, Tokyo, Japan) auf S-VHS Videokassetten (Sony, Tokyo, Japan) aufgenommen. Datum und Uhrzeit wurden über einen in das Videosignal eingeblendeten Videozeitgenerator (For A Video Timer VTG-33, For A Company limited, Tokyo, Japan) aufgezeichnet, um später die aufgenommene cochleäre Mikrozirkulation und die ermittelten Hörschwellen zeitlich zu korrelieren (Abbildung 17).

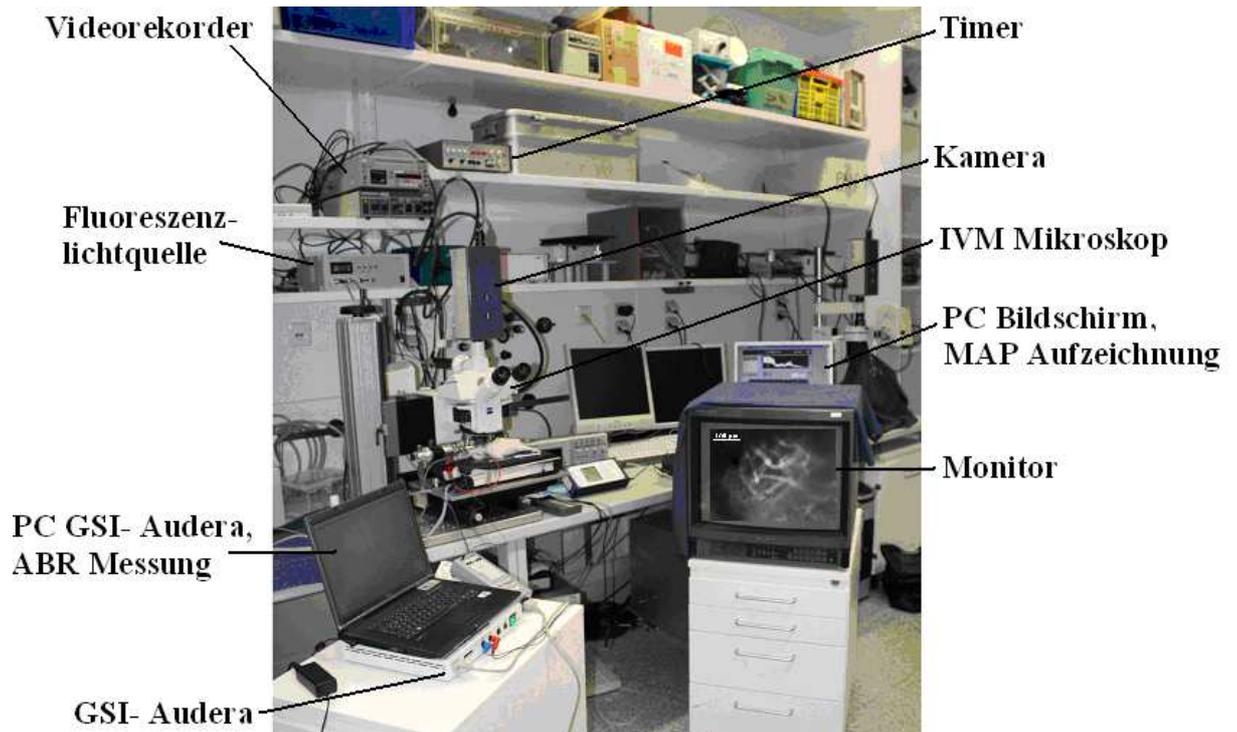


Abb. 17: Zeigt den Versuchsaufbau. Intravitalefluoreszenzmikroskopie (IVM) kombiniert mit der Hörschwellenmessung (GSI- Audera, PC GSI- Audera).

Später wurden die Aufnahmen off-line mit einem Bildanalyseprogramm (CAP IMAGE, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Dieses System wurde von Zeintl et al. und Klyscz et al. (138-141) beschrieben und erlaubt Messungen mikrozirkulatorischer Parameter wie der funktionellen Gefäßdicke, der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser (141). Die Auswertung der erhobenen Daten der Erythrozytenfließgeschwindigkeit erfolgte mittels der Line-Shift-Diagramm-Methode, da sie reliable und objektive Messergebnisse liefert. Hierbei wird eine gerade oder beliebig gekrümmte Messlinie entlang des zu messenden Blutgefäßes gelegt. Danach können Bildsequenzen mit einer Dauer von bis zu einer Minute ausgewertet werden. Während der Messung werden für jedes Halbbild die Grauwertdaten entlang der Messlinie gelesen und in einem Bildspeicher mit den aneinandergereihten Messlinien angezeigt. Wenn sich z.B. während der Messsequenz eine dunkle Plasmalücke entlang der Messlinie fortbewegt, wird diese Fortbewegung im Diagramm der nebeneinander gezeichneten Grauwertlinien als dunkle, schräg verlaufende Linie sichtbar, da die dunkle Plasmalücke auf der Messlinie von Halbbild zu Halbbild je nach Flussrichtung etwas nach unten bzw. nach oben wandert (Line-Shift-Diagramm). Durch Markierung dieser schrägen Linien im Line-Shift-Diagramm (Abbildung 18) wird automatisch deren Steigung ermittelt und daraus die Geschwindigkeit berechnet. Es besteht die Möglichkeit, mehrere Messlinien

gleichzeitig zu zeichnen und somit in einem Durchlauf an mehreren Stellen gleichzeitig die Erythrozytengeschwindigkeit zu messen.

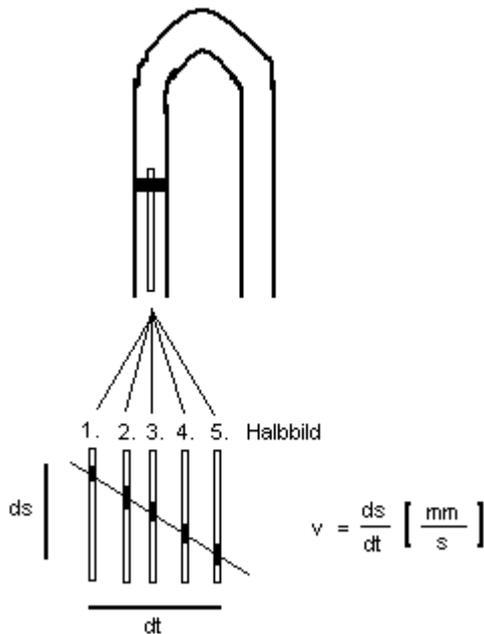


Abb. 18: Schematische Darstellung der Line- Shift- Diagramm- Methode (nach Klysc et al.).

3.1.5.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Mit Hilfe der Auflichtvideofluoreszenzmikroskopie wurden die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser der Kapillaren der Stria vascularis der Cochlea quantifiziert.

3.1.5.3.1 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit erfolgte an mindestens vier sich in der Fokusebene befindenden Kapillaren des Cochleafensters. Nach Abschluss des Experimentes wurde die Fließgeschwindigkeit mit Hilfe des Programms Cap Image bestimmt.

3.1.5.3.2 Gefäßdurchmesser

Analog zu der Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurden die Gefäßdurchmesser zu den festgelegten Messzeitpunkten in drei der visualisierten Gefäße mit Hilfe des Programms Cap Image in Mikrometern gemessen. Beim Cap- Image- System wird die Vergrößerung, nach vorheriger Einstellung der in dem Versuch verwendeten

Objektvergrößerungen, über die gesamte Abbildungskette in horizontaler und vertikaler Richtung gemessen. Die dabei gemessene Verzerrung wird bei allen geometrischen Berechnungen berücksichtigt, sodass durch manuelle Markierung der Gefäßränder, bei automatischer Berechnung der Senkrechten zum Gefäßverlauf, der Gefäßdurchmesser gemessen werden kann. Messungen können sowohl am Standbild als auch am laufenden Bild durchgeführt werden.

3.1.6 Hörschwellenbestimmung mittels akustisch evozierter Potentiale

3.1.6.1 Akustisch evozierte Potentiale (AEP)

Der physiologische Vorgang des Hörens hat eine Vielzahl von bioelektrischen Potentialänderungen in der Cochlea, im Hörnerv und im ZNS zur Folge. Diese Potentialänderungen können zu einer objektiven Funktionsprüfung des Gehörs verwendet werden, da die Hirnstammpotentiale auch im Schlaf, in Narkose und bei Versuchstieren nachgewiesen werden können. Die auditorisch evozierten Potentiale (AEP) werden an der Schädeloberfläche mit Hilfe von Nadel- oder Oberflächenelektroden abgeleitet. Durch konsekutive Applikation gleichförmiger Reize und Mittelung der Reizantworten wird auch die Aufzeichnung sehr kleiner Potentialänderungen möglich. Ein wiederholter akustischer Reiz bewirkt innerhalb eines Zeitabschnitts gleichförmige Potentiale, die mit immer gleicher Latenz auftreten und somit durch Addition dargestellt werden können. Die Addition bewirkt gleichzeitig eine erwünschte Verkleinerung der nicht mit dem Reiz korrelierten Hintergrundpotentiale (Störpotentiale), da ihre Aktivität zeitlich zufällig erfolgt.

Frühe akustisch evozierte Potentiale (FAEP), auch ABR (auditory brainstem response), BERA (brainstem evoked response audiometry) oder Hirnstammaudiometrie genannt, sind eine Untergruppe der akustisch evozierten Potentiale. Sie entstammen verschiedenen Kerngebieten im Hirnstamm (Oliva superior, Lemniscus lateralis, Colliculus inferior) und bestehen aus Wellen, die nach den Erstbeschreibern Jewett und Williston (1971) benannt wurden. Diese Wellen weisen sechs typische Potentiale auf, die mit den römischen Ziffern I-VI beschrieben werden (142). Klinisch ordnet man den Ursprung jeder Welle einem Kerngebiet im Hirnstamm zu (Abbildung 19).

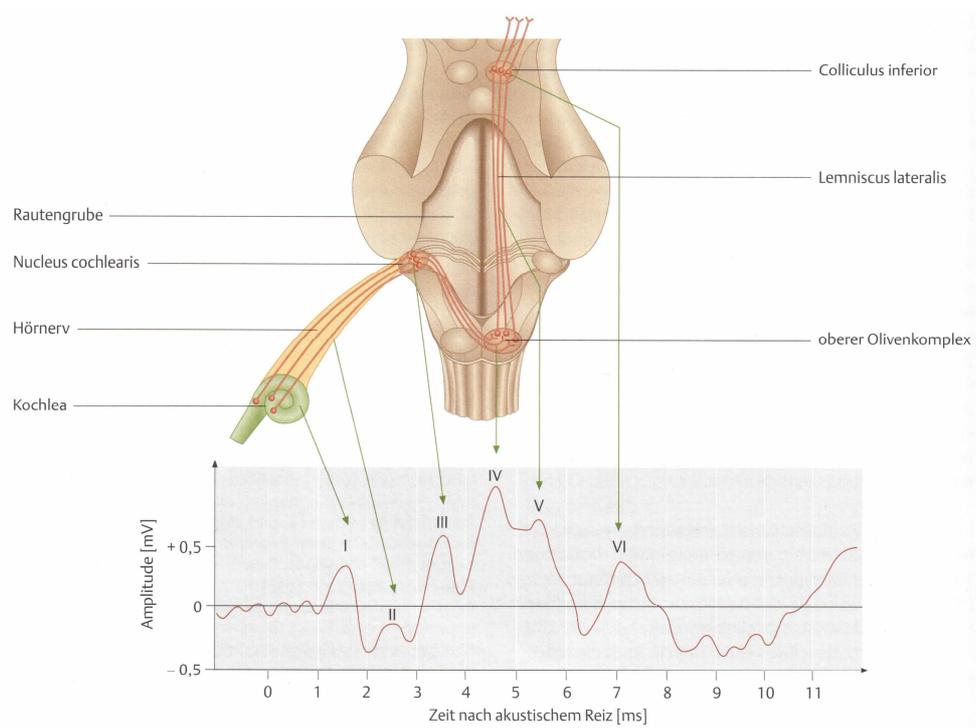


Abb. 19: Die Kurve nach Jewett und Williston zeigt die typische Form der auditorisch evozierten Hirnstammpotentiale, die aus 5-6 Wellen (I-VI) besteht. Die Potentiale sind Ausdruck der akustisch induzierten Aktivität des Hörnervs und der Hörbahnneuronen. Die Wellen entstehen durch Dipolbildungen in den angegebenen anatomischen Strukturen. (modifiziert nach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Herausgeber: Probst, Grevers, Iro; Thieme Verlag, 3. Auflage, 2008.)

3.1.6.2 Vorbereitungen zur Messung der akustisch evozierten Potentiale

Zur Generierung der akustischen Stimuli und Messung der Hörschwelle am kontralateralen Ohr wurde für die Versuche ein System zur Bestimmung akustisch evozierter Potentiale (GSI Audera, VIASYS Neuro Care, Inc., Madison, USA) verwendet (siehe Abbildung 20).

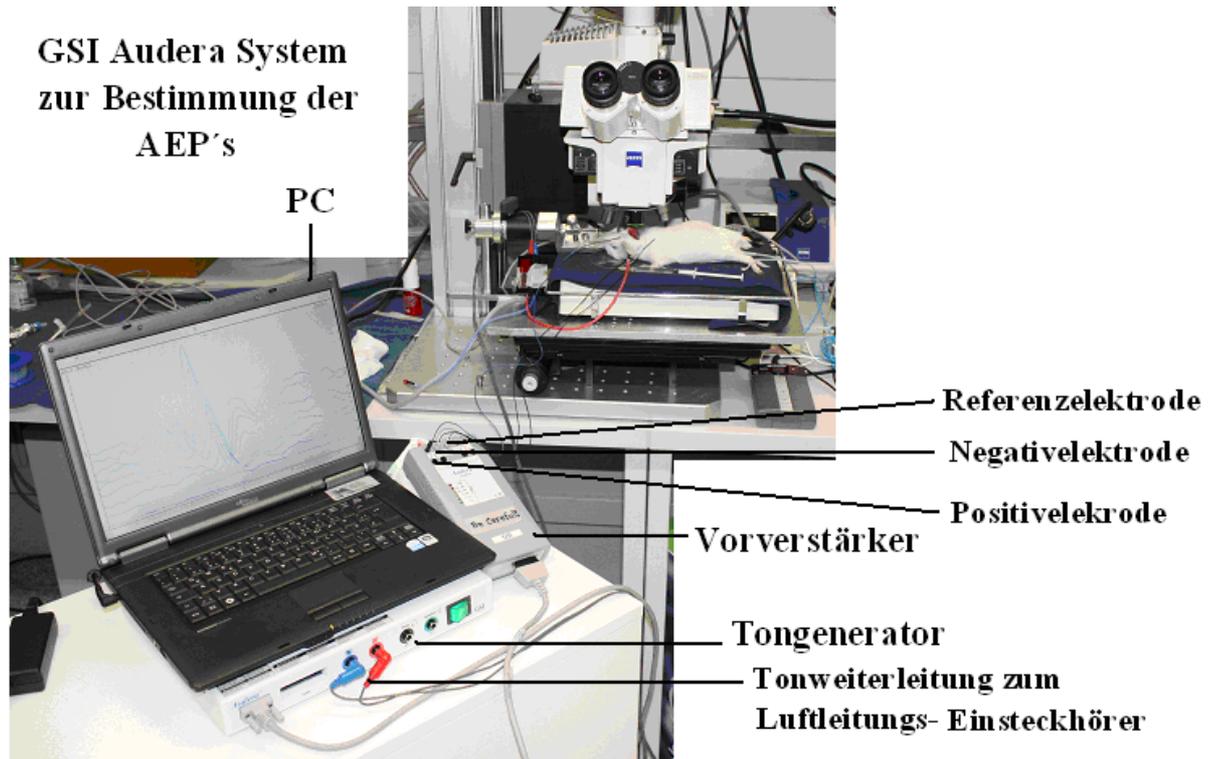
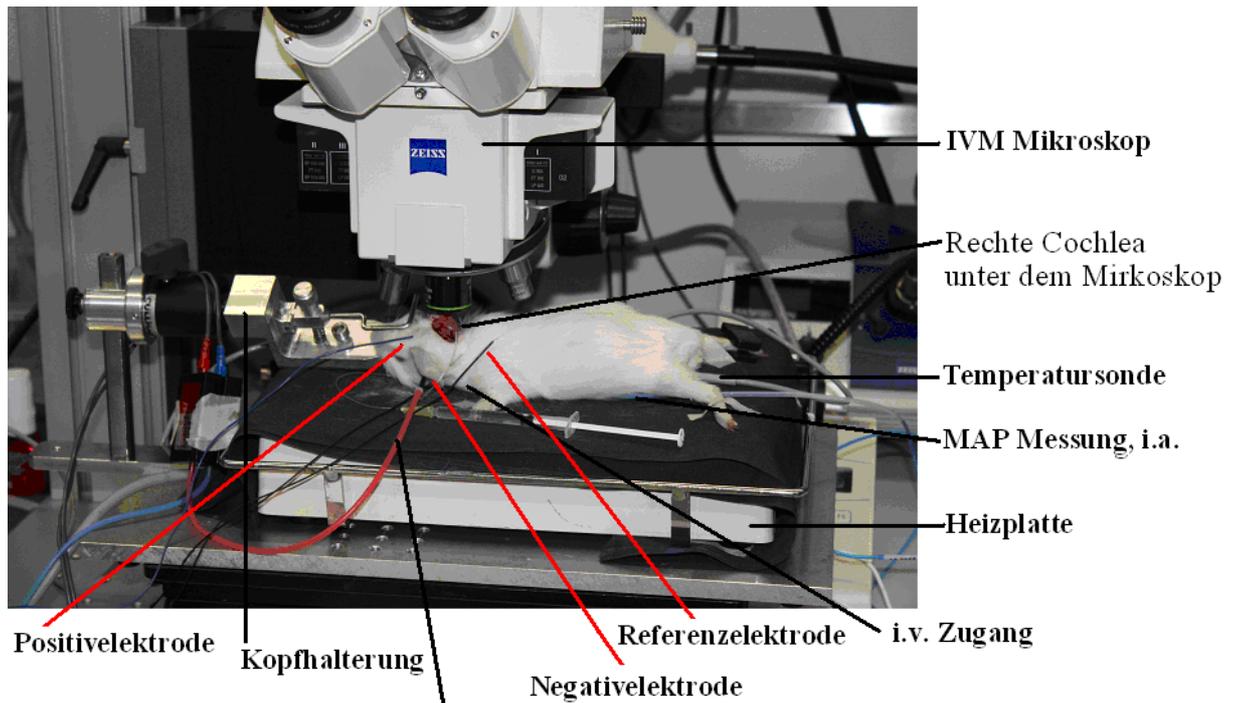


Abb. 20: Versuchsaufbau zur Messung der Hirnstammpotentiale.

Zur Messung der akustisch evozierten Potentiale wurden den Tieren vor der Eröffnung des Cochleafensters Messelektroden angelegt. Die Negativelektrode wurde subdermal am linken Proccus mastoideus plziert, die Positivelektrode über dem Vertex. Die Referenzelektrode wurde ebenfalls subdermal im zervikalen Muskel unter der Nackenhaut positioniert und alle Elektroden wurden an das Messgerät über einen Vorverstärker angeschlossen (Abbildung 21).



Luftleitungs-Einsteckhörer zur ABR- Messung
Abb. 21: Elektrodenplatzierung zur Messung der Hirnstammpotentiale unter dem IVM.

Bei allen Tieren wurde vor Beginn der Messungen überprüft, ob ein positiver Preyer Reflex vorlag, der Gehörgang frei von Detritus und das Trommelfell regelrecht konfiguriert war. Die Impedanz wurde ebenfalls vor Versuchsbeginn durch die Impedanz Testfunktion des GSI Audera Systems bis zu einem Mindestwiderstand von 5 k Ω getestet. Alle Messungen wurden in einem extra für diesen Versuchsaufbau angefertigten Faradayschen Käfig durchgeführt, um möglichen Interferenzen und damit gegebenen Messungenauigkeiten vorzubeugen.

3.1.6.3 Messung und Auswertung der akustisch evozierten Potentiale

Die Elektroden wurden über einen Vorverstärker an das GSI Audera Messsystem angeschlossen. Zur cochleären Stimulation wurde bei diesen Versuchen ein Sinuston mit einer Frequenz von 8 kHz und einer Dauer von ca. 50 Millisekunden verwendet. Die Steuerung der Stimulusparameter erfolgte digital über den Steuerungsrechner des Systems. Für eine Ableitung der BAEP müssen die Stimuli 1000-2000 mal wiederholt und die nachfolgende Antwort gemittelt werden. Die wichtigsten Messwerte der BAEP sind die zeitlichen Abstände zwischen den Wellen und die Nachweisschwelle des Potentials V. Das Potential V kann bereits etwa 10 dB über der Hörschwelle registriert werden (143) (Abbildung 22).

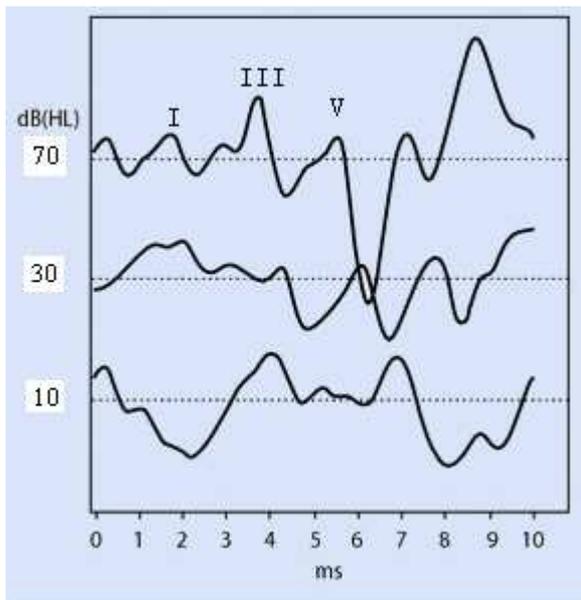


Abb. 22: BERA mit Normalbefund.

Die Hörschwelle wurde durch schrittweise Reduktion der Lautstärke ausgehend von 75 dB SPL und Mittelung der elektrischen Signale nach jeweils 1200 aufgezeichneten Reizantworten ermittelt. Während Potentiale, die weit über der Hörschwelle lagen, ausgehend von 75 dB in 10 dB Schritten aufgezeichnet wurden, wurden Potentiale nahe der Hörschwelle in 5 dB Schritten dargestellt. Um die Reliabilität der erhobenen Werte zu ermitteln, wurde jede Messstufe der Hörschwellenmessungen mindestens zweimal durchlaufen. Bei diesem Messverfahren geht man von einer Messgenauigkeit von ± 10 dB aus.

Die initiale Hörfunktion des linken Ohres wurde vor dem Zeitpunkt der ersten Natriumnitroprussidgabe am Punkt 0 min gemessen. Weitere Hörschwellenmessungen fanden jeweils nach der Blutdrucksenkung durch Natriumnitroprussid und Blutdruckerholung bis zum Versuchsende nach 120 min statt.

3.2 Der Einfluss vasodilatierender Stoffe auf die Mikrozirkulation und die Hörschwelle *in vivo*

3.2.1 Natriumnitroprussid

Die Substanz Natriumnitroprussid wurde auf Grund ihrer Eigenschaften zur direkten Vasodilatation der cochleären Blutgefäße in dieser Studie verwendet. Die Wirkung wird über die lokale Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in der cochleären Mikrozirkulation vermittelt. NO stimuliert die Aktivität der Guanylatcyclase; dadurch kommt es zu einem intrazellulären Anstieg von cGMP, welches die Konzentration von freien Kalziumionen im Zytoplasma, das heißt das zur Bindung mit Calmodulin verfügbare Kalzium, durch eine Verschiebung in das endoplasmatische Retikulum reduziert. Die Erhöhung der cGMP Konzentration führt zu einer Dephosphorylierung der Myosinleichtketten und damit zu einer Relaxation der glatten Muskulatur. Somit kommt es zu einer starken Vasodilatation der Arterien und in geringem Ausmaß auch der Venen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Natriumnitroprussid von weniger als zehn Minuten ist eine kontinuierliche intravenöse Verabreichung erforderlich (97).

3.2.2 Versuchsgruppe

Zur Modellvalidierung wurde eine Gruppe mit insgesamt 6 Meerschweinchen untersucht.

3.2.3 Versuchsprotokoll

Die Tiere wurden wie zuvor beschrieben mit einem arteriellen und einem venösen Katheter versorgt. Nachfolgend erfolgten die Präparation des Cochleafensters für die Intravitalmikroskopie und die Positionierung der subdermalen Elektroden zur Bestimmung der Hörschwelle. Die Dauer der chirurgischen Präparation betrug ca. 1 h. Direkt im Anschluss an die Präparation erfolgte die i.v. Applikation des Plasmamarkers Fluoreszeinisothiozyanat zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Daraufhin wurde der Erythrozytenfluss

visualisiert und aufgezeichnet. Zeitgleich wurden die AEP's bestimmt. Der Ablauf der Untersuchung ist schematisch in Abbildung 23 wiedergegeben.

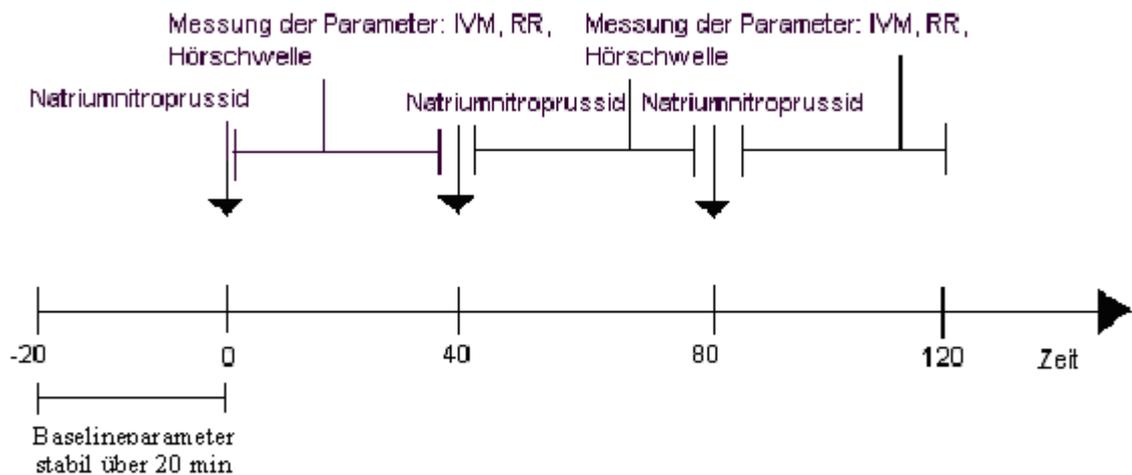


Abb. 23: Experimentelles Protokoll im Rahmen der Modelletablierung. Einzelheiten vgl. Text.

Natriumnitroprussid (Nitropruss®; Nitroprussidnatrium, Schwarz Pharma, Monheim, Deutschland, 1 Ampulle Trockensubstanz mit 52,75 mg in 50 ml Glucose 5%) wurde in einer Verdünnung von 1:10 über den venösen Katheter mit Hilfe einer Infusionspumpe verabreicht. In einem ersten Schritt wurde eine Bolusgabe (0,5 mg/kg KG, 0,3-0,5 ml) appliziert. Anschließend erfolgte die kontinuierliche Gabe von Natriumnitroprussid (0,0125mg/ml, 0,05 ml/min, errechnet aus der Produktangabe 0,2 µg/kg/min) durch eine Infusionspumpe (Sp100i syringe pump WPI, UK). Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), cochleäre Blutfluss (CBF) und die AEP's wurden kontinuierlich registriert nachdem stabile Basiswerte über einen Zeitraum von mindestens 10 min aufgezeichnet worden waren. Nach Senkung des Blutdrucks über einen Zeitraum von 10-20 min, wurde die Infusionspumpe ausgeschaltet und eine komplette Remission des Effekts abgewartet. Um den Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck, den cochleären Blutfluss und die Hörschwelle erneut zu testen, wurde dieser Vorgang zweimal pro Tier, so wie zuvor beschrieben, wiederholt. Daten wurden während eines Zeitraumes von 120 min nach der ersten Applikation erhoben. Die Nitroprussid- Versuche wurden max. 120 min nach Beginn der intravitale Videofluoreszenzmikroskopie durch i.v. Gabe einer Überdosis des Narkotikums (Ketamin und Xylazine) terminiert.

4 Statistik

Alle statistische Analysen wurden unter Verwendung des Software SPSS (Version12.0) durchgeführt.

Pearson´s Korrelationsanalysen wurden benutzt, um die Beziehung zwischen dem mittleren arteriellen Blutdruck, dem cochleären Blutfluss und der Hörschwelle zu verschiedenen Zeitpunkten zu ermitteln. Die Grundwerte der cochleären Blutflussgeschwindigkeit und des mittleren arteriellen Blutdrucks wurden mittels t – Test mit den Werten nach Nitroprussidgabe verglichen. Die Korrelationen wurden nach der Bonferroni Methode (145,146) korrigiert. Unterschiede wurden bei einem $p < 0,05$ als signifikant gewertet.

Sämtliche Werte werden als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Mittelwerte der jeweiligen Parameter rekrutieren sich aus den Mittelwerten der sechs (n=6) Versuchstiere.

5 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche (n=6) dargestellt. Zunächst wird auf die Vitalparameter der Versuchstiere eingegangen. Anschließend werden die analysierten mikrodynamischen Parameter der cochleären Mikrozirkulation und der Hörschwelle sowie die Veränderungen des mittleren arteriellen Blutflusses dargestellt. Die chirurgische Präparation zur Versuchsvorbereitung wurde von allen Meerschweinchen gut toleriert. In der Kontrollphase vor Versuchsbeginn wurden alle Parameter mindestens 20 min beobachtet und aufgezeichnet bevor der Versuch gestartet wurde.

5.1. Körpertemperatur

Die rektale Temperatur wurde während des gesamten Versuchsablaufs konstant bei $38,0 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten (n=6).

5.2. Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz

Die Sauerstoffsättigung lag durch fortlaufende Sauerstoffgabe von 0,7 l/min zwischen 99 und 100%.

Die Herzfrequenz aller Tiere (n=6) betrug während der Versuche zwischen 150 und 210 Schläge pro Minute.

5.3 Mikrozirkulation

5.3.1 Durchmesser der Gefäße der Stria vascularis

Die intravitalmikroskopisch beobachteten Gefäße der Stria vascularis der einzelnen Versuchstiere variierten in ihrem Durchmesser zwischen 6,1 μm und 14,9 μm . Die Gefäße zeigten über den Versuchszeitraum einen errechneten Mittelwert von $9,4 \pm 2,7 \mu\text{m}$. Diese Messung erfolgte bei jedem Tier in jeweils vier intravitalmikroskopisch sichtbaren Gefäßen (n=6). Es konnten keine signifikanten Änderungen der Gefäßdurchmesser in dem beobachteten Versuchszeitraum dargestellt werden.

5.3.2 Cochleärer Blutfluss (CBF)

Nach der intravitalmikroskopischen Darstellung des Kapillarnetzes der Stria vascularis wurden entsprechend des Versuchsprotokolls Videoaufzeichnungen des cochleären Blutflusses vorgenommen.

Der cochleäre Blutfluss wurde bei jedem Versuchstier (n=6) in mindestens vier der sichtbaren Kapillaren mit Hilfe des Programms CAP Image offline gemessen.

Die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit vor Versuchsbeginn bewegte sich zwischen $53 \pm 6 \mu\text{m/s}$ in Gefäßen mit kleinem Durchmesser und $283 \pm 56 \mu\text{m/s}$ in größeren zuführenden Gefäßen.

Um Änderungen des cochleären Blutflusses über eine längere Versuchszeit darzustellen, wurde die Natriumnitroprussidgabe unterbrochen und eine komplette Remission des Effekts abgewartet.

Die mittlere Fließgeschwindigkeit aller beobachteten Gefäße lag bei $109 \pm 19 \mu\text{m/s}$.

Nach Gabe von Natriumnitroprussid kam es zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg der Erythrozytenfließgeschwindigkeit bis zu einem Maximum von $161 \pm 26 \mu\text{m/s}$ ($52 \pm 7 \mu\text{m/s}$ Abweichung von dem Ausgangswert) nach 16 min. Die Veränderungen der cochleären Mikrozirkulation wurden im Versuchsablauf mit zwei weiteren Messperioden erneut getestet. Nach Beendigung der SNP Gabe, reduzierte sich die Erythrozytenfließgeschwindigkeit auf $123 \pm 17 \mu\text{m/s}$ 40 min nachdem die Aufnahmen begonnen wurden. Nach der zweiten Gabe von Natriumnitroprussid (30 min), stieg die Fließgeschwindigkeit erneut signifikant ($p < 0,01$) auf ein Maximum von $160 \pm 31 \mu\text{m/s}$ ($51 \pm 12 \mu\text{m/s}$ Unterschied zum Ausgangswert). Die zweite cocheläre Blutfluss-Restitution ($125 \pm 14 \mu\text{m/s}$; $16 \pm 5 \mu\text{m/s}$ vom Ausgangswert) wurde 80 min nachdem die Aufnahmen begonnen wurden erreicht. Während des zweiten Re-tests, stieg der cochleäre Blutfluss signifikant ($p < 0,01$) auf ein Maximum von $157 \pm 25 \mu\text{m/s}$ ($48 \pm 6 \mu\text{m/s}$ vom Grundwert). Es wurde also parallel zum Blutdruckabfall ein Anstieg des cochleären Blutflusses von 39% während des ersten, 56% während des zweiten und 61% während des dritten Zyklus beobachtet. Die test-retest Korrelation für die cochleären Blutflussmessungen an fünf Zeitpunkten der Natriumnitroprussidgabe lag in einer Spanne (Pearson's r) von 0,78-0,82 ($p < 0,01$), dies zeigt eine gute Reproduzierbarkeit.

5.4 Akustisch evozierte Potentiale

Die Messung der akustisch evozierten Potentiale im linken Ohr der Versuchstiere erfolgte zunächst ausgehend von 75 dB in 10 dB Schritten. Hörschwelennahe Potentiale, in diesem Versuch war das ab 20 dB der Fall, wurden in 5 dB Schritten gemessen. Es erfolgten bei allen Versuchen Messungen bis zu einer unteren Grenze von 5 dB.

Die mittlere Hörschwelle aller 6 Tiere lag in den von uns gemessenen Grenzen bei 19 ± 6 dB bei einer Frequenz von 8 kHz.

Abbildung 24 zeigt exemplarisch das Ergebnis der Messung der akustisch evozierten Potentiale bei einem Meerschweinchen während eines Versuches.

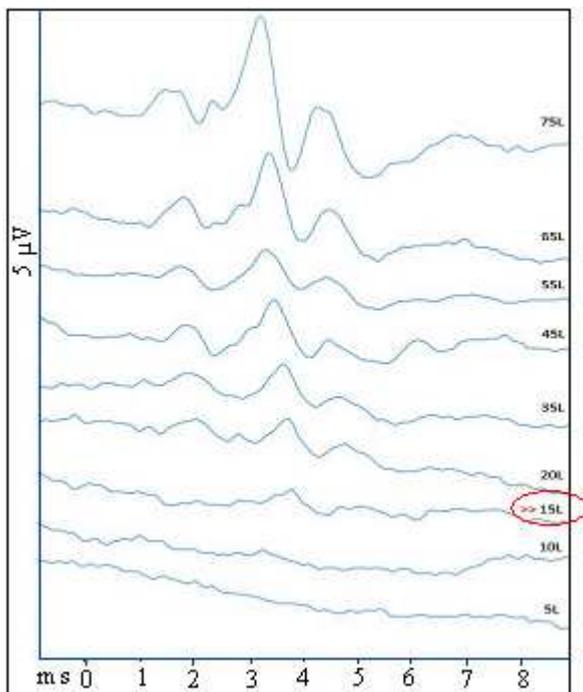


Abb. 24: Abbildung 24 zeigt exemplarisch die Messung der AEP's am linken Ohr eines Versuchstieres einer Frequenz von 8 kHz. Die Welle 5 nach Jewitt lässt sich deutlich bis 15 dB identifizieren. Bei diesem Tier lag die Hörschwelle bei 15 dB.

Die Hörschwelle veränderte sich nach Natriumnitroprussidgabe nicht signifikant. Die Korrelation zwischen dem mittleren arteriellen Blutdruck und den erhobenen akustisch evozierten Potenzialen zeigt Abbildung 13.

Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,01$ und zeigt, dass bei dem durchgeführten Versuch keine Korrelation zwischen der Hörschwelle und dem mittleren arteriellen Blutdruck besteht (Abbildung 25).

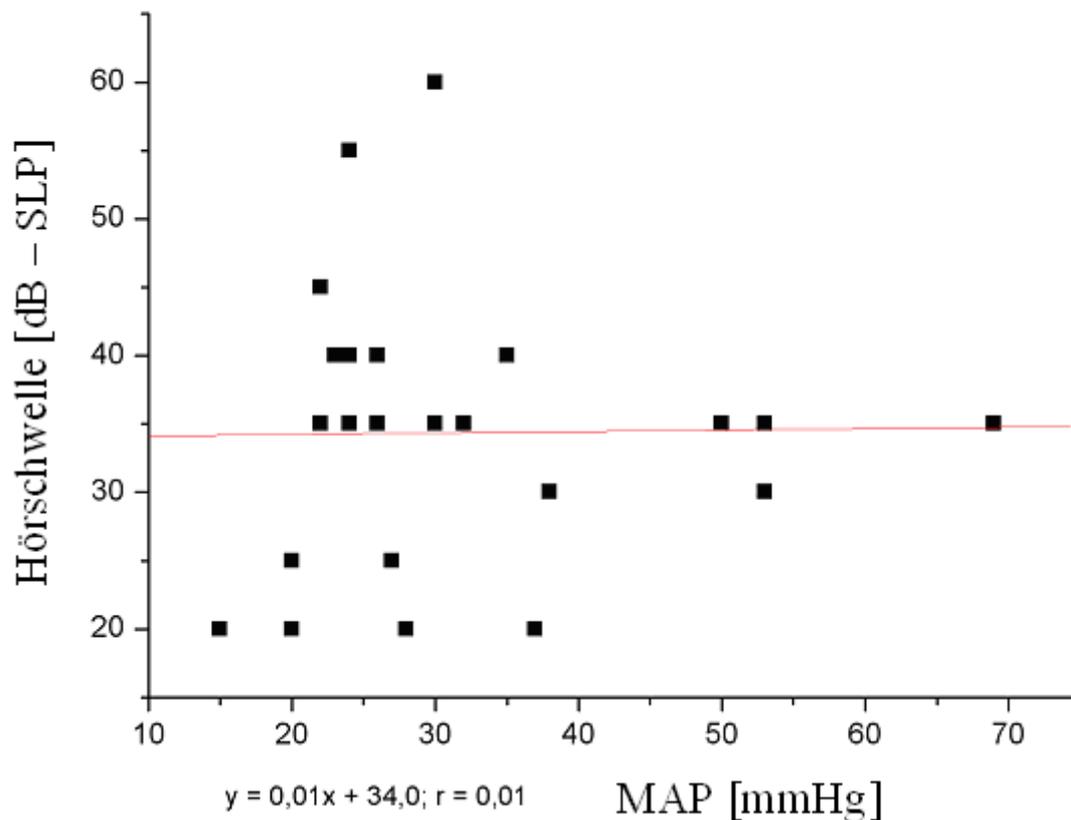


Abb. 25: Abbildung 25 zeigt die Korrelation zwischen der AEP Hörschwelle und dem mittleren arteriellen Blutdruck aller Versuchstiere. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,01$ ($p > 0,05$). Es besteht somit keine Korrelation.

5. 5 Mittlerer arterieller Blutdruck

Die Basalwerte des mittleren arteriellen Blutdrucks aller Versuchstiere lagen bei 54 ± 15 mmHg.

Nach 24 min nach der Applikation von Natriumnitroprussid fiel der Blutdruck signifikant ($p < 0,01$) auf ein Minimum von 36 ± 13 mmHg. Dies entspricht einer Reduktion von bis zu 54% des Ausgangswertes. Die Hypotension wurde über einen Zeitraum von 30 min aufrechterhalten.

Um die Reproduzierbarkeit und Stabilität der erhobenen Daten über eine längere Versuchszeit zu zeigen, wurde die Gabe von Natriumnitroprussid unterbrochen und eine komplette Remission des Effekts abgewartet. Die Veränderung des mittleren arteriellen Blutdrucks unter Gabe von Natriumnitroprussid wurde mit zwei erneuten SNP Gabezyklen und Messungen wiederholt. Die vollständige Erholung des MAP trat 35 min nach dem Ende der Natriumnitroprussidgabe ein.

Bei der zweiten SNP- Applikation (30 min), sank der MAP signifikant ($p < 0,01$) auf ein Minimum von 32 ± 11 mmHg. Das entspricht einem Blutdruckabfall von bis zu 56%. Diese Hypotension wurde für 30 min durch die Dauerinfusion von SNP aufrechterhalten. Die zweite Erholung des Blutdrucks wurde 75 min nach Beginn der Behandlung erreicht.

Während des zweiten Re-tests (30 min) (d.h. der dritten SNP Gabe), sank der MAP signifikant ($p < 0,01$) auf ein Minimum von 27 ± 12 mmHg. Der dritte Zyklus brachte damit eine Blutdrucksenkung von bis zu 60%, der MAP wurde bis zum Ende des Experiments 110 min nach erstmaliger SNP- Gabe erniedrigt gehalten.

Der gesamte Versuchsverlauf mit Messung der Parameter eines Tieres ist exemplarisch in Abbildung 26 dargestellt.

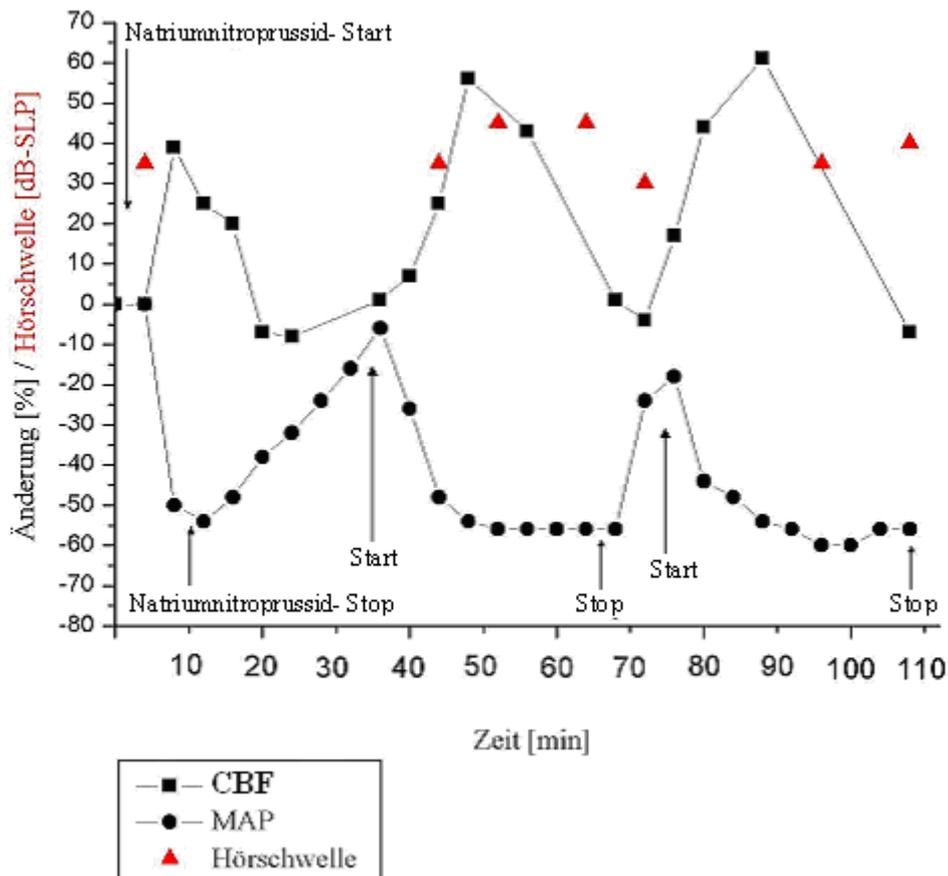


Abb. 26: Zeigt den Versuchsverlauf bei einem Tier mit repräsentativen Messergebnissen des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP), des cochleären Blutflusses und der Hörschwelle.

Eine Zusammenfassende Darstellung des Verhaltens des cochleären Blutflusses, der Hörschwelle und des mittleren arteriellen Blutdrucks aller Versuchstiere veranschaulicht Abbildung 27. Die Abbildung 28 zeigt das Verhalten der

Versuchsparameter von allen sechs Tieren während der ersten Natriumnitroprussidgabe.

Während der Perioden des erniedrigten Blutdruckes kam es zu keinem Abfall der Sauerstoffsättigung, allerdings aber zu einem erwarteten Anstieg der Herzfrequenz von 10–30 Prozent im Vergleich zum Ausgangswert.

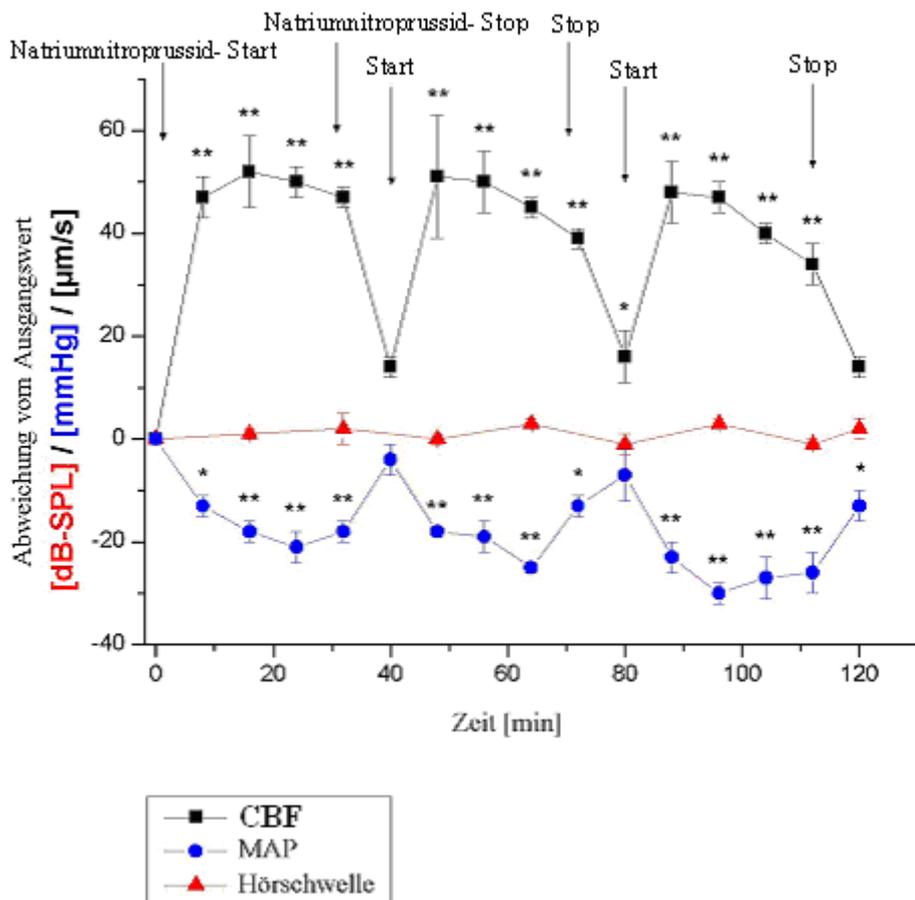


Abb. 27: Dargestellt sind die Änderungen des cochleären Blutflusses (CBF), der Hörschwelle und des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) über einen Messzeitraum von 120 min. Die Werte sind als Mittelwerte \pm einer Standardabweichung angegeben. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

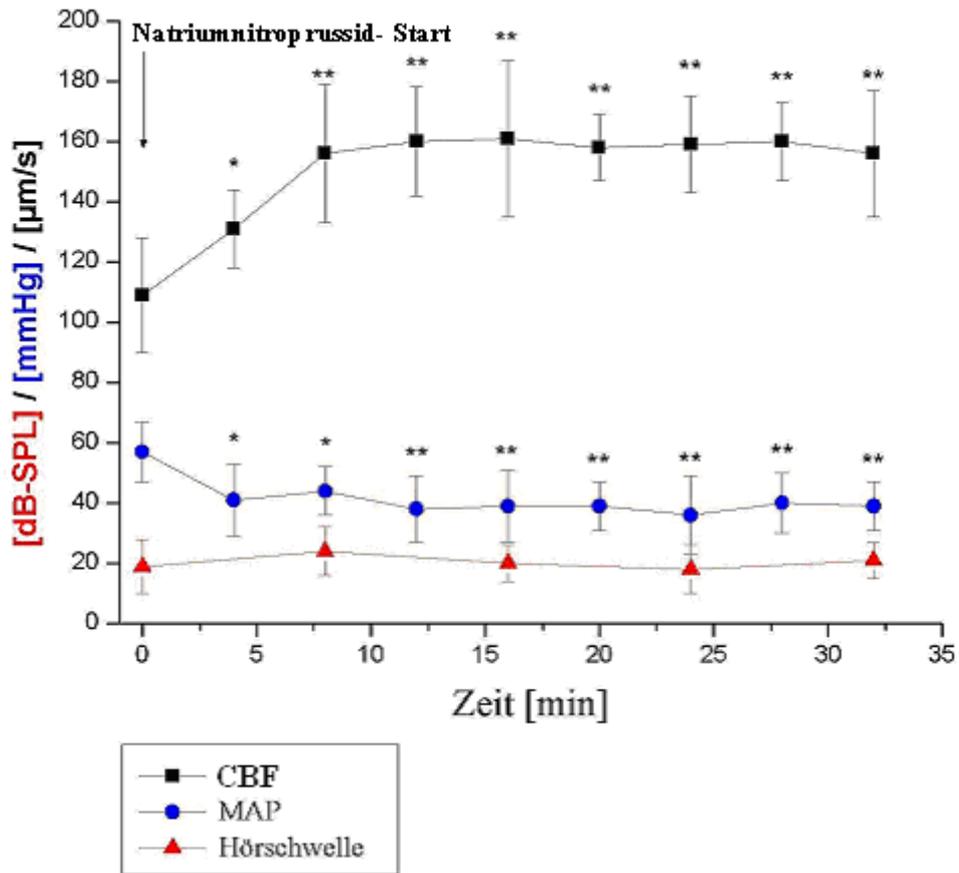


Abb. 28: Mittelwerte von cochleärem Blutfluss (CBF), Hörschwelle und mittlerem arteriellem Blutdruck (MAP) aller 6 Versuchstiere in Abhängigkeit der Zeit nach der ersten Natriumnitroprussidgabe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

6 Diskussion

6.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Zielsetzungen

Eine Veränderung des cochleären Blutflusses wird als einer der Hauptfaktoren in der Pathophysiologie verschiedener Innenohrerkrankungen wie dem Hörsturz diskutiert (147-150). Dennoch konnten bisher nur wenige Beweise für diese Hypothese erbracht werden. Diese Tatsache könnte darauf beruhen, dass eine direkte Beobachtung von Blutgefäßen in der Cochlea aufgrund der anatomischen Situation im Felsenbein beim Menschen schwierig ist. Hinzu kommt, dass die Cochlea nicht groß genug für eine Darstellung mit bildgebenden Verfahren wie der Angiographie oder der Kernspintomographie ist. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell zu etablieren, welches eine Darstellung und Quantifizierung der cochleären Mikrozirkulation mit Hilfe der Intravitalmikroskopie in Kombination mit der Hörschwellenbestimmung mittels akustisch evozierter Potentiale (AEP) ermöglicht (149).

6.2 Diskussion des Modells

6.2.1 Einsatz des Meerschweinchens als Versuchstier

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden an Albino Meerschweinchen durchgeführt.

Für experimentelle Studien am Gehör wurden in der Vergangenheit verschiedene Tierarten z. B. Mäuse (151,152), Wüstenrennmäuse (153,154), Ratten (151,155-157), Kaninchen (158-161) und Chinchillas (162,163) benützt. Für die Darstellung der cochleären Mikrozirkulation stellt das Meerschweinchen das gängigste Modell dar (151,163,164-173).

Daher wurde auch für diese Versuche das Meerschweinchen aufgrund der guten Zugänglichkeit der Cochlea, der Sensitivität für Lärm im Hochtonbereich (174) und der hinreichend bekannten Physiologie für diese Studie als Versuchstier ausgewählt. Im Unterschied zum Menschen, ist die Cochlea bei Meerschweinchen nicht in den Knochen des Felsenbeines eingebettet und ragt frei in den Hohlraum des Mittelohres hervor. Sie ist durch einen posterioren Zugang zu erreichen. Das Fehlen des Ramus

stapedius der Arteriae stylomastoideae, die bei einigen Nagern die basale Windung der Cochlea kreuzt, stellt einen weiteren Vorteil dar (175). Das ausreichende Blutvolumen der Meerschweinchen erlaubt zudem die Gabe von kleinen Mengen intravenöser Flüssigkeiten und Probenentnahmen für Blutgasanalysen ohne merkliche Auswirkungen auf den Kreislauf.

Albino Meerschweinchen, werden im Gegensatz zu pigmentierten Meerschweinchen gewählt, da die mikrovaskulären Gefäße (Kapillaren, Arteriolen, Venolen) mit der IVM bei nicht pigmentierten Tieren deutlicher sichtbar sind. Vasoaktive Substanzen haben keine unterschiedlichen Effekte in Albino- und pigmentierten Tieren gezeigt.

Es steht allerdings fest, dass Melanin in der Cochlea als vasoaktives Agens fungieren kann. Dies sollte dann berücksichtigt werden, wenn Blutflusssergebnisse absolut und nicht wie in unseren Versuchen relativ betrachtet werden sollen (176), da die Werte bei pigmentierten Meerschweinchen dadurch verfälscht werden könnten.

6.2.2 Mikrochirurgische Technik

Für die IVM der Cochlea folgten wir den Beschreibungen von Nuttal et al. (177). Für eine bessere Darstellung der Cochlea mussten das Trommelfell, die Sehne des M. tensor tympani und alle Gehörknöchelchen entfernt werden.

Für die Messung des cochelären Blutflusses ist es von essentieller Bedeutung die Fensterung der Lamina spiralia ossea atraumatisch auszuführen. Dies ist ein kritischer Schritt, welcher mit höchster Präzision und Vorsicht durchgeführt werden sollte. Die Gefäße der Stria vascularis werden hierbei in der zweiten bis dritten Windung der Meerschweinchencochlea dargestellt und quantifiziert. Hier ist die otogene Kapsel dünn, sodass ein Fenster angelegt werden kann, ohne dass die Kapillaren der lateralen Wand beeinflusst werden. Größere Perilymphfisteln können mit dieser Technik ebenfalls vermieden und darüber hinaus scharfe Bilder über ein größeres Gesichtsfeld erhalten werden.

Um ein optimales Bildergebnis zu erhalten wurde das cochleäre Fenster mit dem Skalpell in der zweiten bis dritten Windung eröffnet. Die erste Windung hat einen höheren Biegungsgrad wodurch es schwieriger ist, verschiedene Gefäßtypen im Bild scharf darstellen zu können. Vorausgehende physiologische Arbeiten haben auch gezeigt, dass es schwierig ist ein Fenster in der basalen Windung zu eröffnen ohne einen lokalisierten Verlust der cochelären Funktion zu riskieren. Die vierte Windung

ist sehr zerbrechlich und das zirkulatorische Bild ist reduziert auf wenige vaskuläre Kreisläufe im Vergleich zu der ersten, zweiten oder dritten cochleären Windung (178); die Wahrscheinlichkeit mehrere Gefäße in dem begrenzten Ausschnitt durch das Cochleafenster beobachten zu können ist damit geringer. Aus diesen Gründen wurde die zweite bis dritte Windung bevorzugt.

Während der Präparation wurden Blutungen vermieden, da bereits kleinste Blutungen während der Intravitalmikroskopie zu einer behinderten und unscharfen Aufnahme der striatalen Gefäße führen.

In früheren Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass diese Präparationstechnik keinen Einfluss auf den cochleären Blutfluss hat (165).

6.2.3 Einsatz der intravitralen Videofluoreszenzmikroskopie

Das Gefäßsystem der Cochlea ist durch seine anatomische Lage bedingt allgemein schlecht zugänglich. In der Literatur wurden zahlreiche Verfahren angewendet um dieses komplexe cochleäre Blutflusssystem und die Prozesse, die mit der Pathologie der Blutversorgung in Verbindung stehen, zu analysieren.

Ein Großteil der Grundlagen über das cochleäre Blutflusssystem wurde durch Studien gewonnen, die in Temporalknochen humaner Kadaver durchgeführt wurden (179-183). Diese Studien beinhalteten eine histologische Aufarbeitung und Betrachtung des cochleären Gefäßsystems. Schwierigkeiten dieser Modelle liegen jedoch darin, dass sie einen einzelnen statischen und terminalen Gesichtspunkt des Gefäßbettes liefern. Weiterhin sind strukturelle Veränderungen oft schwierig mit funktionellen Veränderungen zu korrelieren (180). Trotz aller Schwächen entstanden aus diesen Beobachtungen jedoch schon frühzeitig Hypothesen hinsichtlich der Rolle des Blutflusses der Stria vascularis bei Hörstürzen, bei intensiver Lärmexposition (181-188), bei der Altersschwerhörigkeit (189), beim Morbus Menière (190,191) und sowie bei bestimmten kongenitalen Anomalien (z.B. bei dem Waardenburg- Syndrom) (169,192).

Heute werden im Wesentlichen vier verschiedene Techniken für die Quantifizierung des cochleären Blutflusses verwendet. Zu diesen zählen:

- Messung der Sauerstoffspannung mittels Mikroelektroden.

- Messungen mit Indikatoren, die eine direkte Bewertung des cochleären Blutflusses erlauben, in dem sie markierte oder nicht-markierte Teilchen (Mikrosphären) verwenden. Diese können im weiteren Verlauf quantitativ bestimmt werden.
- indirekte Messungen, die auf sekundären Funktionen des cochleären Blutflusses beruhen, wie z.B. die Laser Doppler Flussmessung (LDF).
- Techniken, die darauf basieren den cochleären Blutfluss direkt zu visualisieren, wie z.B. die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM).

Die verschiedenen Systeme unterscheiden sich in den gemessenen Flussparametern und besitzen Vorteile, aber auch Nachteile.

6.2.3.1 Messung der Sauerstoffspannung mittels Mikroelektroden

Mittels dieser Methode können indirekte Parameter des Stoffwechsels, der Stoffwechselprodukte und des Sauerstoffgehaltes quantifiziert werden, die in Relation zum cochleären Blutfluss stehen (184,199).

Die gemessenen Werte stehen allerdings nur indirekt mit dem cochleären Blutfluss in Relation, da sie auf Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffversorgung basieren.

6.2.3.2 Messung des cochleären Blutflusses mit Mikrosphären

Bei dieser Methode liefern markierte und unmarkierte Teilchen quantitative cochleäre Blutflussmessungen in absoluten Werten. Die Mikrosphären Technik wurde schon lange zur Quantifizierung des Blutflusses in Organen wie der Leber und der Niere verwendet. Bis zur Etablierung der Mikrosphären-Methode in der Innenohrforschung fehlten jedoch quantitative Daten des cochleären Blutflusses (196). Seit der Anpassung der Teilchenmethode an den Innenohrblutfluss durch Angelborg et al. war es nun möglich, hiermit eine quantitative Aussage über Parameter des cochleären Blutflusses zu machen (176,196-202).

Obwohl die Mikrosphärentechnik in den meisten Körpersystemen für den absoluten Blutfluss als Standardmethode gilt, könnte die limitierte Anzahl von Mikrosphären die in der Cochlea erfasst werden, ungenaue Blutflussmessungen liefern. Auch Änderungen in der Gefäßstruktur (z.B. Gefäßverschluss, Flussumverteilung) könnten geschehen, ohne erfasst zu werden. Aus statistischen Gründen ist es erforderlich, dass eine ausreichende Teilchenanzahl in das beobachtete Organ eingelagert wird

(Buckberg et al.) (197). Diese Zahl stellt die untere Grenze der zu injizierenden Teilchen dar. Die obere Grenze entsteht durch die Tatsache, dass zu viele Teilchen die Gefäße embolisieren und in physiologische Funktion des Ohres eingreifen würden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode bei Messungen des cochleären Blutflusses ist, dass die Teilchen selbst einen Gefäßstillstand und damit eine Umverteilung des cochleären Blutflusses auslösen können. Aus technischen Gründen ist zudem keine kontinuierliche Aufzeichnung der Messparameters (cochleärer Blutfluss und Gefäßdurchmesser) möglich, da dies nur zu einem bestimmten Zeitpunkt (d.h. zu dem Zeitpunkt der Teilcheninjektion) während des Experiments erfolgen kann, so dass keine dynamischen Messungen vorgenommen werden können.

6.2.3.3 Laser Doppler Flussmessung (LDF)

Mittels LDF kann eine kontinuierliche Messung des regionalen cochleären Blutflusses durchgeführt werden. Hierfür werden die zu messenden Gefäße mit Laserlicht bestrahlt, das durch die sich bewegenden Erythrozyten gestreut und gleichzeitig reflektiert wird. Das reflektierte Laserlicht kann daraufhin analysiert werden. Die fließenden Erythrozyten rufen einen Doppler-Effekt hervor, der gemessen werden kann. Die reflektierten Signale sind proportional zu Anzahl und Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen. Die LDF liefert gute Informationen der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Diese Information kann allerdings nicht in einer physikalischen Einheit erfasst werden, da die gelieferten Werte lediglich ein relativer Indikator und proportional zum Blutvolumenstrom sind. Im Vergleich zur IVM ist das Probenentnahmefeld des LDF wesentlich größer und erlaubt daher keine Messungen auf der Basis einzelner Kapillaren.

Weiterhin kann die LDF durch Bewegungen und geringfügige Temperaturänderungen des Versuchstieres verfälscht werden. Die LDF ist jedoch eine oft verwendete, einfach zu handhabende und nicht invasive Methode, die keinen Einfluss auf den cochleären Blutfluss hat. Sie erlaubt wiederholte Messungen des cochleären Blutflusses in einem intakten System und ist daher eine gute Technik für proportionale Messungen des cochleären Blutflusses (140,141,201-214).

6.2.3.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

Als Methode zur direkten und kontinuierlichen Visualisierung der cochleären Mikrozirkulation wurde in der vorliegenden Arbeit die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie (IVM) verwendet. Anders als die beschriebenen Verfahren erlaubt die IVM eine direkte Visualisierung der cochleären Mikrozirkulation und gleichzeitig eine quantitative Beurteilung des mikrovaskulären Blutflusses. Darüber hinaus kann eine Quantifizierung von Parametern der cochleären Mikrozirkulation in absoluten Werten erfolgen (201,165,204,205). Es können dynamische Messungen der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser in einzelnen Kapillaren (184) erfolgen, so dass auch mikrozirkulatorische Veränderungen bestimmt werden können. Bei dieser Technik ist es weiterhin möglich, exakte Beobachtungsgebiete zu bestimmen, die über den ganzen Versuchszeitraum aufgenommen werden können. Somit können auch morphologische und physiologische Veränderungen in einzelnen Gefäßen erforscht werden.

Die Studie von La Rouere et al. 1989 (165) zeigt, dass die IVM eine sensitivere Messung der mikrovaskulären Durchblutung erlaubt als die LDF. Es konnte gezeigt werden, dass der Wert bei elektrischer Stimulation ab dem sich Veränderungen der cochleären Blutflussantwort feststellen lassen bei der IVM viermal niedriger ist als bei der LDF.

Die IVM erfordert allerdings das Entfernen des Knochens über dem membranösen Labyrinth. Es wäre denkbar, dass dies die cochleäre Physiologie stören und einen Einfluss auf den cochleären Blutfluss haben könnte. Kontrollierende Experimente mittels LDF Messung zeigten aber, dass mit der aktuellen Mikropräparationstechnik keine Veränderungen des cochleären Blutflusses dargestellt werden können, auch wenn kleine beobachtbare Effekte wie zum Beispiel gelegentliche Kapillarverschlüsse in den cochleären Gefäßen beobachtet wurden.

6.2.4 Hörschwellenbestimmung mittels akustisch evozierter Potentiale

Eine Frequenz von 8 kHz wurde gewählt, da hier reproduzierbare und gut zuzuordnende Hirnstammpotentiale darstellbar waren. Der Grund dafür ist die Empfindlichkeit des Gehörs der Meerschweinchen für hochfrequente Töne. Nach Untersuchungen von Thorne und Nuttall (163,166) liegt das Maximum der

Hörschwellenänderung bei Meerschweinchen zwischen 6 und 8 kHz. Während unserer Vorversuche wurde die Hörschwelle bei verschiedene Frequenzen bestimmt und bei 8 kHz die beste Wellenkurve erhalten, so dass die Wellen V nach Jewett gut zuzuordnen war.

Die Messungen der akustisch evozierten Potential wurden in dieser Studie im linken Ohr des Meerschweinchens durchgeführt. Die Basalwerte der Hörschwellenmessungen ergaben einen berechneten Mittelwert von 19 ± 6 dB. Dieser Wert ist vergleichbar mit früheren Ergebnissen von Ashida und Chertoff (207,208).

Bei den beschriebenen Versuchen können nur objektive Hörschwellenmessverfahren zum Einsatz kommen, da es sich um Messungen bei Tieren handelt. Zudem muss ein Messverfahren verwendet werden bei dem es unter Narkose zu keiner Beeinflussung der Messungen kommt. Die akustisch evozierten Potentiale (AEP's) wie auch die otoakustische Emissionen (OAE's) zählen zu den objektiven Verfahren der Hörschwellenbestimmung.

Die klinische Bedeutung der OAE's liegt in der Überprüfung der Funktion des „cochleären Verstärkers“. Sie sind Ausdruck einer mehr oder weniger intakten Funktion der Cochlea. Insbesondere die äußeren Haarzellen sind für die Entstehung wichtig. Allerdings wird ausschließlich die Funktion des peripheren Hörorgans und nicht der neuralen Strukturen geprüft. Im Gegensatz dazu kann man mit den akustisch evozierten Potentialen auch die Funktion der neuralen Hörbahn im Hirnstamm messen (Abbildung 29).

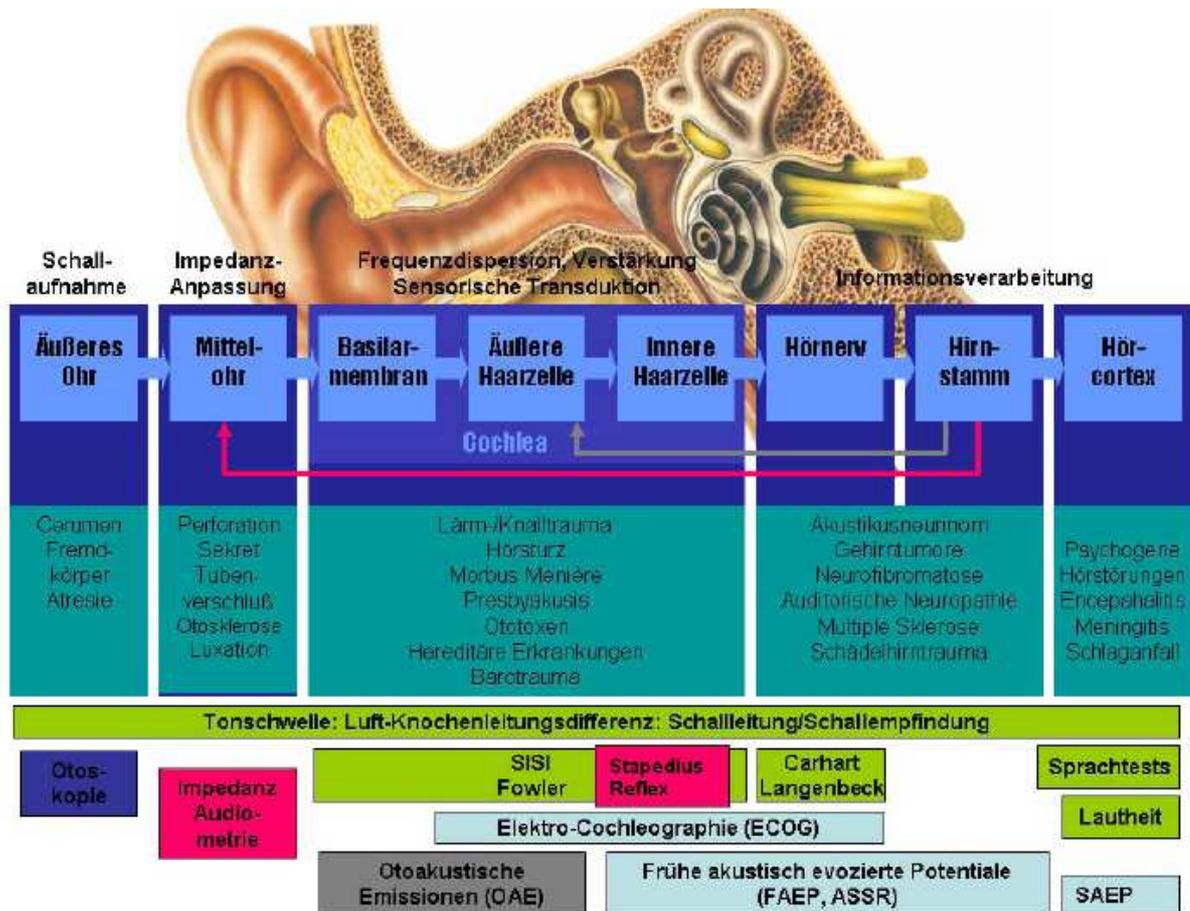


Abb. 29: Hörbahn und Hörfunktionsprüfungen (verändert nach Springer Images, Springer Verlag, Zürich).

Da einem Hörsturz eine cochleäre Dysfunktion zu Grunde liegt haben wir ein Messverfahren gewählt mit dem die cochleäre Funktion überprüft werden kann. Mit der Messung akustisch evozierter Potentiale kann im Gegensatz zu den otoakustischen Emissionen auch die Funktion der inneren Haarzellen bis zum Hörcortex untersucht werden.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

6.3.1 Mikrozirkulation der Cochlea

Die Intravitalmikroskopie wurde seit vielen Jahren an verschiedensten Organen wie Gehirn (209), Lunge (210), Leber (211-213), Pankreas (214-217), Skelettmuskel (218;219), Darm (220) und anderen als Methode zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation eingesetzt (221).

Durch die intravitale Videofluoreszenzmikroskopie ist es möglich kapilläre Gefäßnetzwerke in der lateralen Wand der Cochlea direkt zu visualisieren. Die

Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser wurden in 4 Gefäßen pro untersuchtem Ohr beobachtet. Es wurden stabile Ausgangswerte für mindestens 15 min aufgezeichnet, um zu verifizieren, dass die Messungen nicht durch die verwendete Anästhesie beeinflusst wurden. Alle Veränderungen der mikrozirkulatorischen Parameter wurden in den jeweiligen Gefäßen während des Beobachtungszeitraumes wiederholt gemessen. Die Gefäßdurchmesser lagen zwischen 6,1 μm in kleinen Gefäßen und 14,9 μm in größeren zuführenden Gefäßen. Diese Unterschiede stimmen mit einer vorherigen Studie von Nuttall et al. überein, in der größere striatale Kapillaren und Kapillaren des Ligamentum (Lig.) spirale kategorisiert wurden (126). Nuttall et al. folgerten in ihrer Studie daraus, dass die striatalen Kapillaren durch den größeren Durchmesser eine geringere Fließgeschwindigkeit erlauben als die Kapillaren des Lig. spirale. In unserer Studie lag der Durchschnitt der Gefäßdurchmesser aller beobachteten Gefäße bei $9,4 \mu\text{m} \pm 2,7 \mu\text{m}$. Dies ist vergleichbar mit dem Wert 9,3 μm für Kapillaren des Lig. spirale und 12,2 μm für striatale Kapillaren wie zuvor beschrieben (126). Allerdings konnte bei unseren Versuchen keine eindeutige Grenze zwischen den beiden Gefäßtypen gezogen werden. Die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit lag zwischen $53 \pm 6 \mu\text{m/s}$ in Gefäßen mit kleinem Gefäßdurchmesser und $283 \pm 56 \mu\text{m/s}$ in Gefäßen mit großem Gefäßdurchmesser. Die mittlere Fließgeschwindigkeit aller beobachteten Gefäße lag bei $109 \pm 9 \mu\text{m/s}$. Diese Werte stehen im Einklang mit der von Pearlman und Kimura (39) gemessenen mittleren Blutflussgeschwindigkeit von 112 $\mu\text{m/s}$ und liegen im von Nuttall et al. gemessenen Bereich der mittleren Geschwindigkeit der Erythrozyten in den Kapillaren des Lig. spirale ($120 \pm 60 \mu\text{m/s}$) (126).

6.3.2 Akustisch evozierte Potentiale

Für die Hörschwelle ist es schwierig die Mittelwerte mit anderen Studien zu vergleichen, da die Art der Stimulierung (z.B. Klickreiz oder Sinuston), die Frequenz der Stimuli (4, 6 oder 8 kHz) und die Tierarten (z.B. Mäuse, Ratten und Chinchillas) in jeder Studie verschieden sind.

Die Hörschwelle vor Versuchsbeginn lag in den von uns gemessenen Grenzen bei $19 \pm 6 \text{ dB}$ bei einer Frequenz von 8 kHz. Diese Werte sind vergleichbar mit den von Nadar et al. (222) bei einer Studie am Meerschweinchen mit einer Frequenz von 8 kHz gemessenen und Anhand der Welle V nach Jewett bestimmten akustisch evozierten

Potentiale. In der Studie von Nadar et al. lag der Mittelwert der Hörschwelle bei 16,5 dB (Hörschwellenwerte in einem Bereich zwischen 10 und 20 dB).

Die Änderung des cochleären Blutflusses, die durch eine Senkung des mittleren arteriellen Blutdruckes hervorgerufen wurde, hatte keine Änderung der Hörschwelle zur Folge, da ein Anstieg des cochleären Blutflusses eine bereits normale Hörschwelle nicht zu verbessern mag.

Mit dem Versuch konnte aber gezeigt werden, dass eine Messung der Hörschwellen mittels Hirnstammaudiometrie in dem dargestellten Frequenzspektrum und den gemessenen Grenzen von mikrozirkulatorischen Parametern unabhängig ist. Damit kann gezeigt werden, dass Änderungen der mittels akustisch evozierter Potentiale gemessenen Hörschwelle keine Artefakte in Bezug auf den gesenkten mittleren arteriellen Blutdruck und Hirnstammischämie sind (149,223,224). Hiermit versuchten wir die Beständigkeit der Hörschwelle und Unabhängigkeit von mikrozirkulatorischen Parameter darzustellen, welche sich zum Beispiel während Langzeitanästhesie verändern könnten.

6.3.3 Effekte von Natriumnitroprussid auf die cochleäre Mikrozirkulation und die Hörschwelle

Unter zu Hilfenahme des etablierten Modells sollte die Messgenauigkeit dargestellt werden, mit der Änderungen der cochleären Mikrozirkulation quantifiziert werden können. Zu diesem Zweck wurde Natriumnitroprussid über 30 Min appliziert und somit ein direkter vasodilatativer Effekt auf die präkapillären Widerstandsgefäße erreicht. Diese Substanz agiert direkt lokal in der cochleären Mikrozirkulation durch die Freisetzung von Stickoxid (NO). NO stimuliert die Aktivität der Guanylatzyklase; dies führt zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP's (zyklisches Guanosinmonophosphat). Auf den cGMP Anstieg hin kommt es zu einer Dephosphorylierung des Myosins der glatten Muskelzellen der Gefäße und einer gleichmäßigen Relaxation der glatten Muskulatur in der Wand der Arterien und Venen.

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurde bei jedem Tier kontinuierlich und in mehreren Kapillaren des Lig. spirale und der Stria vascularis gemessen. Insgesamt lag die cochleäre Blutflussgeschwindigkeit zu Beginn der Versuche zwischen 53 $\mu\text{m/s}$ in kleinen Gefäßen und 283 $\mu\text{m/s}$ in größeren zuführenden Gefäßen. Der

Gefäßdurchmesser lag zwischen 6,1 µm und 14,9 µm. Diese Daten entsprechen früheren Beobachtungen von Ren et al. (127) bei denen eine Geschwindigkeit zwischen 30 µm und 180 µm und Gefäßdurchmesser von 6,5 µm bis 14,5 µm gemessen worden waren. Als Antwort auf die dreimalige Gabe von 0,5 mg/kg Natriumnitroprussid wurde eine Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks von 54%, 56% und 60% vom Basiswert beobachtet; zwischen den Zyklen kam es zu einer kompletten Erholung des mittleren arteriellen Blutdrucks. Die Hörschwelle blieb trotz der Änderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks stabil. Die gemessenen Änderungen der Kapillardurchmesser waren sehr gering, da Kapillaren keine Muskelzellen besitzen und somit keine eigene Regulation haben. Die Regulation findet in den vorgeschalteten Arteriolen statt. Bei der Messung der Kapillardurchmesseränderungen lag eine große Streuung vor, so dass keine signifikanten Änderungen messbar waren.

Zeitgleich zum mittleren arteriellen Blutdruckabfall erfolgte ein Anstieg des cochleären Blutflusses als direkter Effekt auf die Natriumnitroprussidgabe von 39% während dem ersten, 56% während dem zweiten und 61% während dem dritten Zyklus. Diese Werte stimmen mit denen aus der Studie von Ohlsen et al. (128) überein, die den cochleären Blutfluss als Antwort auf Natriumnitroprussid mittels Laser Doppler Messungen quantifizierten. Diese Autoren beobachteten einen Abfall des Blutdruckes von bis zu 34% nach 0,5 mg/kg Natriumnitroprussidgabe. Daraufhin kam es zu einem Anstieg des cochleären Blutflusses von bis zu 13%. Der cochleäre Blutflussanstieg resultiert durch eine direkte Wirkung des Natriumnitroprussids auf die cochleären Gefäße. Die höheren Werte in der vorliegenden Studie sind wohl das Ergebnis einer höheren Natriumnitroprussid-Dosis als Bolusgabe (0,5 mg/kg KG; 0,3-0,5 ml) in Kombination mit einer kontinuierlichen Gabe des Natriumnitroprussids über 30 min (0,0125 mg/ml; 0,05 ml/min). Ohlsen et al. beschrieben auch eine Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks von 34%. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Hier sank der MAP signifikant ($p < 0,01$) auf ein Minimum von 36 ± 11 mmHg (-37%) nach SNP Gabe. Auch die Studie von Miller et al. (149) bestätigt den bei den vorliegenden Versuchen beobachteten cochleären Blutflussanstieg durch eine direkte Wirkung des Natriumnitroprussids.

Zur Darstellung der Reproduzierbarkeit und Stabilität der erhobenen Daten über einen längeren Zeitraum wurde die Natriumnitroprussid-Applikation nach 30 min gestoppt und eine Erholung der Werte abgewartet. Daraufhin wurden zwei erneute Messzyklen

durchgeführt. Dies geschah insgesamt über einen Zeitraum von 120 min. Nach Beendigung der SNP Gabe erholte sich der cochleäre Blutfluss auf ein Minimum von $123 \pm 17 \mu\text{m/s}$. Im Rahmen des zweiten SNP Gabe Zyklus stieg der cochleäre Blutfluss wieder signifikant ($p < 0,01$) auf ein Maximum von $160 \pm 31 \mu\text{m/s}$. Die zweite Regenerierung des cochleären Blutflusses wurde bei den Werten $125 \pm 14 \mu\text{m/s}$ erreicht. Im zweiten Re-Test stieg der cochleäre Blutfluss signifikant ($p < 0,01$) auf ein Maximum von $157 \pm 25 \mu\text{m/s}$. Die Test-retest Korrelation der cochleären Blutflussmessungen lag in einer Spanne von 0,78 – 0,82 ($p < 0,01$). Dies zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen.

Das etablierte Modell erlaubt somit den cochleären Blutfluss und die Effekte auf die Hörschwelle *in vivo* zu analysieren. Weiterhin ist das Modell geeignet Effekte, Kinetik und Effizienz vorhandener Therapien, die auf die Innenohrmikrozirkulation abzielen, zu evaluieren.

In zukünftigen Versuchen können mit diesem Modell Innenohrpathologien wie der Hörsturz weiter untersucht und pathophysiologische Zusammenhänge unter Umständen erklärt werden.

7 Zusammenfassung

Die Inzidenz des Hörsturzes in entwickelten Ländern wird heute auf 20 pro 100.000 Einwohner pro Jahr geschätzt. Neuere Erhebungen aus Deutschland weisen sogar auf eine Inzidenz von bis zu 300/100.000/Jahr hin. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) leiden allein in Deutschland 14 Millionen Menschen und weltweit etwa 250 Millionen Menschen unter mittel- bis hochgradiger Schwerhörigkeit.

Eine der Ursachen wird in einer Störung der Mikrozirkulation des Innenohrs gesehen. Die heute angewandeten Therapiemodalitäten zur Verbesserung der Cochleadurchblutung konnten bislang nicht validiert werden, da klinisch anwendbare Methoden zur Quantifizierung der Innenohr- bzw. Cochleadurchblutung nicht bestehen. Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Etablierung und Validierung eines Tiermodells zur Darstellung der cochleären Mikrozirkulation und Messung der Hörschwelle *in vivo*, da die cochleäre Mikrozirkulation auf Grund ihrer Komplexität und der Lokalisation im Temporalknochen beim Menschen nicht gemessen werden kann und bisher auch experimentelle Modelle fehlen, welche eine gleichzeitige Messung der Cochleadurchblutung und der Hörschwelle zulassen würden.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell entwickelt und etabliert, das mit Hilfe der Intravitalvideofluoreszenzmikroskopie die Bestimmung der striatalen kapillären Durchblutung bei gleichzeitiger Ableitung akustisch evozierter Potentiale unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zulässt. Hierzu wurde am narkotisierten Meerschweinchen mikrochirurgisch ein Cochleafenster angelegt, welches Zugang zum striatalen Kapillarnetz erlaubt. Gleichzeitig wurden am kontralateralen Ohr die akustisch evozierten Potentiale zur Bestimmung der Hörschwelle mittels Hirnstammaudiometrie (BERA) abgeleitet. Zur Etablierung dieses neuen Tiermodells waren 34 Tiere erforderlich.

Nachdem die Stabilität der Präparation für einen Zeitraum von 120 min und die Reproduzierbarkeit der hämodynamischen Daten (mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, cochleärer Blutfluss) nachgewiesen war, erfolgte im zweiten Abschnitt der Arbeit die Validierung des Modells durch Änderung des cochleären Blutflusses mittels Dilatation der Arteriolen durch Natriumnitroprussid und die Darstellung der Unabhängigkeit der Hörschwellen- Messmethode von makrozirkulatorischen Parametern wie dem mittleren arteriellen Blutdruck. Zu diesem Zweck wurde in einer Studie an 6 Meerschweinchen der arterielle Blutdruck durch intravenöse Infusion von

Natriumnitroprussid gesenkt. Zu Beginn der Messungen lag die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit an jeweils 4 quantifizierten Kapillaren pro Tier zwischen $53 \pm 6 \mu\text{m/s}$ in Gefäßen mit kleinem Durchmesser und $283 \pm 56 \mu\text{m/s}$ in größeren zuführenden Gefäßen und der arterielle Mitteldruck bei $54 \pm 15 \text{ mmHg}$. Nach Gabe des Vasodilatators Natriumnitroprussid kam es zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg der Erythrozytenfließgeschwindigkeit bis zu einem Maximum von $161 \pm 26 \mu\text{m/s}$. Der arterielle Mitteldruck reduzierte sich auf ein Minimum von $36 \pm 13 \text{ mmHg}$. Nach Restitution physiologischer Werte wurde in zwei Retest Experimenten eine Test-Retest Korrelation für die cochleären Blutflussmessungen von $r = 0,78-0,82$ (Pearson; $p < 0,01$) errechnet. Dies zeigt eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen. Die gleichzeitige Messung der Hörschwelle ergab keine Veränderungen des Auditus.

Mit unserem neuen Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass die Messung der Hörschwelle mittels Hirnstammpotentialen nicht von aktuellen Änderungen des arteriellen Blutdrucks abhängig ist und somit in zukünftigen Experimenten Hörschwellenänderungen nicht darauf zurückzuführen sind. Auf Grund der guten Reproduzierbarkeit unseres Modells am Meerschweinchen ergibt sich die Möglichkeit Therapiekonzepte, die auf eine Verbesserung des Hörvermögens durch rheologische Maßnahmen abzielen, auf Effektivität und Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Das Modell kann somit als Grundlage für experimentelle Studien zur Verbesserung der Innenohrmikrozirkulation und des Hörvermögens eingesetzt werden. Damit wurde ein essentieller Beitrag zur Verbesserung der gegenwärtig unbefriedigenden Therapieoptionen bei akuten Hörproblemen (Hörsturz, Tinnitus) geleistet.

8 Literatur

1. Steel KP, Kros CJ. A genetic approach to understanding auditory function, *Nat Genet.* 2001; 27: 143-9.
2. Platzter J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell.* 2000; 7; 102: 89-97.
3. Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C. A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet.* 1999; 21: 363-9.
4. Juhn SK. Current review of Inner Ear Biochemistry. Thesis, Minnesota. 1972.
5. Chou JT, Hughes DE. Respirometrie. In *Biochemie des Hörorgans*, hrsg. von S. Rauch, Thieme Verlag Stuttgart, 1964; 446-455.
6. Smith CA. Structure of the stria vascularis and spiral prominence. *Ann.Otol.(St.Louis)* 1957; 66: 521-536.
7. Vosteen K-H. Neue Aspekte zur Biologie und Pathologie des Innenohres. *Arch Ohr., Nas.- u.Kehlk.-Heilk.* 1961; 178: 1-104.
8. Mishray GA, Hildreth KP, Shinabarger EW, Clark LC, Rice EA. Endolymphatic oxygen tension in the cochlea of the guinea-pig. *J.Acoust.Soc.Am.* 1958; 30, 247-257.
9. Silverstein H. Biochemical studies on the inner ear fluids in the cat. *Ann.Otol.(St.Louis)* 1966; 75: 48-63.
10. Iurato S. Elektronenoptische Struktur der Innenohr-Membranen mit Rückschlüssen auf ihre Eignung zum Stoffaustausch. *Arch.klin.exp.Ohr,-Nas.- u.Kehlkopf.-Heilk.* 1967; 189: 113-126.
11. Lawrence M. Effects of interference with terminal blood supply on organ of Corti. *Laryngoscope (St.Louis)* 1966; 76: 1318-1337.
12. Perlman HB, Kimura RS. Experimental obstruction of venous drainage and arterial supply of the inner ear. *Ann.Otol.(St.Louis)* 1957; 66: 537-546.
13. Takeda S, Hata R, Cao F, Yoshida T, Hakuba N, Hato N, Gyo K. Ischemic tolerance in the cochlea. *Neurosci Lett*: 2009; 25; 462: 263-6.
14. Morizane N, Hakuba Y, Shimizu Y, Shinomori K, Fujita T, Yoshida M, Shudou K, GyoK: Transient cochlear ischemia and its effects on the stria vascularis. *Neuroreport.* 2005; 31; 16: 799-802.

15. Morizane I, Hakuba N, Hyodo J, Shimizu Y, Fujita K, Yoshida T, Gyo K. Ischemic damage increases nitric oxide production via inducible nitric oxide synthase in the cochlea. *Neurosci Lett.* 2005; 31; 391: 62-7.
16. Nuttall AL, Hultcrantz E, Lawrence M. Does loud sound influence the intracochlear oxygen tension? *Hear Res* 1981; 5: 285-293.
17. de Békésy G. The coarse pattern of the electrical resistance in the cochlea of the guinea pig (electro-anatomy of the cochlea). *J. Acoust. Soc. Am.* 1951; 23: 18-28.
18. Smith CA, Lowry OH, Wu M-L. The electrolytes of the labyrinthine fluids. *Laryngoscope (St. Louis)* 1954; 64: 141-153.
19. Takeuchi, Ando, Kakigi, Japan, Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys J.* 2000 Nov; 79: 2572-82.
20. Dallos P. Overview: cochlear neurophysiology. *The Cochlea*, P. Dallos, A.N. Popper and R.R. Fay, editors, Springer, New York, 1996; 1-43.
21. Tasaki I, Spyropoulos CS. Stria vascularis a source of endocochlear potential. *J. Neurophysiol.* 1959; 22: 149-155.
22. Konishi T. Some observations on negative endocochlear potential during anoxia. *Acta Otolaryngol.* 1979; 87: 505-516.
23. de Békésy G. Gross localization of the place of origin of cochlear microphonics. *J Acoust Soc Amer* 1952; 24: 399-412.
24. Konishi T, Bulter RA, Fernández C. Effect of anoxia on cochlear potentials. *J Acoust Soc Amer* 1961; 33: 349-357.
25. Hannover A. Mikroskopische Untersuchungen des Nervensystems. *Det Kongelige Danske Videnskaberne Selskabs Naturvidenskabelige og Mathematiske Afhandlinger. Tiende Deel.* Bianco Lunos Bogtrykkeri, Kopenhagen 1843; 74-81
26. Ibsen I. Anatomiske undersøgelser over Ørets Labyrinth. *Carlsbergfondets, Kopenhagen* 1881 (nach Ritter K. Die Gefäße des Innenohres. *Arch. Otorhinolaryngol.* 1978; 219: 115-177).
27. Corti A. Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères. *Z. Wiss. Zool.* 1851; 3: 109-169 (nach Ritter K. Die Gefäße des Innenohres. *Arch. Otorhinolaryngol.* 1978; 219: 115-177).
28. Hensen V. Zur Morphologie der Schnecke des Menschen und der Säugetiere. *Z. Wiss. Zool.* 1863; 13: 481-512 (nach Ritter K. Die Gefäße des Innenohres. *Arch. Otorhinolaryngol.* 1978; 219: 115-177).

29. Winiwarter AV. Untersuchungen über die Gehörschnecke der Säugetiere. S.-B.Kais.Akad.Wiss., math.- naturw.Cl. 1870; 61: 683-714 (nach Ritter K. Die Gefäße des Innenohres. Arch.Otorhinolaryngol. 1978; 219: 115-177).
30. Eichler O. Anatomische Untersuchungen über die Wege des Blutstroms im Ohrlabyrinth. Klasse der Königl.-Sächs.Ges.Wissensch. 1892;18: 310-349 (nach Ritter K. Die Gefäße des Innenohres. Arch.Otorhinolaryngol. 1978; 219: 115-177).
31. Schwalbe G. Über die Glomeruli arteriosi der Gehörschnecke. Anat.Anz. 1887;4: 93-96 (nach Ritter K. Die Gefäße des Innenohres. Arch.Otorhinolaryngol. 1978; 219: 115-177).
32. Axelsson A. The vascular anatomy of the cochlea in the guinea pig and in man. Acta Otolaryngol 1968; Suppl.243.
33. Siebenmann F. Die Blutgefäße des Labyrinths des menschlichen Ohres. Bergmann, Wiesbaden;1894 (nach Ritter K. Die Gefäße des Innenohres. Arch.Otorhinolaryngol. 1978; 219: 115-177).
34. Kimura RS, Ota CY. Ultrastructure of the cochlear blood vessels. Acta Oto-Laryngol. 1974; 77: 231-250.
35. Mootz W, Müsebeck K. Die Ultrastruktur der Plexus cochlearis. Arch Ohr.-,Nas.- u.Kehlk.-Heilk.1970; 196: 301-306.
36. Balogh K, Koburg E. Der Plexus cochlearis. Arch Ohr.-,Nas.- u.Kehlk.-Heilk. 1965; 185: 638-645.
37. Smith CA. Capillary areas of the cochlea in the guinea pig. Laryngoscope 1951; 61: 1073-1095.
38. Nomura Y. Capillary permeability of the cochlea. Ann.Otol. (St.Louis) 1961; 70: 81-101.
39. Perlman HB, Kimura RS. Observation of the living blood vessels of the cochlea. Ann.Otol.(St.Louis); 1955; 64: 1176-1192.
40. Maass B. Quantitative Angaben zur Gefäßversorgung der Stria vascularis beim Meerschweinchen. Z.Laryng.Rhinol.1969; 48: 733-753.
41. Nakashima T, Naganawa S, Sone M, Tominaga M, Hayashi H, Yamamoto H, Liu X, Nuttall AL. Disorders of cochlear blood flow. Review. Brain Res Brain Res Rev. 2003 Sep; 43: 17-28.
42. Smith CA. Vascular patterns of the membranous labyrinth. In: Vascular Disorders and Hearing Defects, ed. by A.J.Darin de Lorenzo, University Park Press, Baltimore 1972.

43. Hawkins jr. JE. Vascular Patterns of the Membranous Labyrinth. 3rd Symposium on the Role of Vestibular Organin Space Exploration, ed. by A.Graybiel.NASA, Washington . 1968.
44. Hawkins jr. JE. Microcirculation in the labyrinth. Arch.Otorhinolaryngol.1976; 212: 241-251.
45. Wangemann P. Cochlear blood flow regulation. Adv Otorhinolaryngol.2002; 59: 51-7.
46. Le Prell CG, Hughes LF, Miller JM. Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. Free Radic Biol Med. 2007 May 1; 42: 1454-63.
47. Miller JM, Ren TY, Dengerink HA, Nuttall AL. Cochlear blood flow changes with short sound stimulation. Thieme Medical Publishers New York, 1995.
48. Seidman MD, Quirk WS, Shirwany NA. Mechanisms of alterations in the microcirculation of the cochlea. Ann N Y Acad Sci. 1999 Nov 28; 884: 226-32. Review.
49. Jiang ZG, Shi X, Zhao H, Si JQ, Nuttall AL. Basal nitric oxide produtciton contributes to membrane pontential and vasotone regulation of guinea pig in vitro spirial modiolar artery. Hear Res. 2004; 189: 92-100.
50. Wangemann P, Wonneberger K. Neurogenic regulation of cochlear blood flow occurs along the basilar artery, the anterior inferior cerebellar artery and at branch points of the spiral modiolar artery. Hear Res. 2005; 20991-6.
51. Scherer EQ, Lidington D, Oestreicher E, Wolfagang A, Pohl U, Bolz S. Sphingosine-1-phosphate modulates spiral modiolar artery tone: A potential role in vascular-based inner ear pathologies?. Cardiovasc Res 2006; 70: 79-81.
52. Franz P, Helmreich M, Stach M, Franz- Italon C, Böck P. Distribution of actin and myosin in the cochlear microvascular bed. Acta otolaryngol. 2004; 124: 481-485.
53. Konishi K, Yamane H, Iguchi H, Takayama M, Nakagawa T, Sunami K, Nakai Y. Local substances regulation cochlear blood flow. Acta otolaryngol. Suppl. 1998; 538: 40-6.
54. Dai M, Nuttall A, Yang Y, Shi X. Visualization and contractile activity of cochlear pericytes in the capillaries of the spiral ligament. Hear Res. 2009; 254: 100-107.
55. Yamamoto H, Omelchenko I, Shi X, Nuttall AL. The influence of NF-kappaB signal-transduction pathways on the murine inner ear by acoustic overstimulation. J Neurosci Res. 2009; 87: 1832-40.
56. Brown JN, Nuttall A: Autoregulation of cochlear blood flow in guinea pigs. Am J Physiol 1994; 266: H458-467.

57. Ren T, Avinash GB, Nuttall A, Miller JM, Laurikainen EA, Quirk WS. Dynamic response of cochlear blood flow to occlusion of anterior inferior cerebellar artery in guinea pigs. *J Appl Physiol* 1994; 76: 212-217.
58. Yamamoto K., Kubo T., Matsunaga T.; Autoregulation of inner ear blood flow in normal and hydropic guinea pig; *Acta Otolaryngol.* 1991; 111: 312-318.
59. Kawamaki M., Makimoto K., Fukuse S., Takahashi H.; Autoregulation of cochlear blood flow. A comparison of cerebral blood flow with muscular blood flow, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1991; 248: 471-474.
60. Ohlsen K.A., Didier A., Baldwein D., Miller J.M.; Cochlear blood flow in response to dilatating agents, *Hear. Res.* 1992; 58: 19-25.
61. Spoendlin H, Lichtensteiger W. The adrenergic innervation of the labyrinth. *Acta Otolaryngologica* 1966; 61: 423-434.
62. Laurikainen EA, Costa O, Miller JM, Nuttall AL, Ren TY, Masta R, Quirk WS, PJ R. Neuronal regulation of cochlear blood flow in the guinea- pig. *J Physiol* 1994; 480: 563-573.
63. Franz P, Hauser- Kronberger C, Böck P. Quint C, Baumgartner WD. Localization of nitric oxide synthase I and II in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 726-731.
64. Yamane H, Takayama M, Konishi K, Iguchi H, Shibata S, Sunami K, Nakai Y. Nitric oxide synthase and contractile protein in the rat cochlear lateral wall: possible role of nitric oxide in regulation of strial blood flow. *Hear Res* 1997; 108: 65-73.
65. Michel O, Hess A, Bloch W, Stennert E, Su J, Addicks K. Localization of the NO/cGMP- pathway in the cochlea of guinea pigs. *Hear Res* 1999; 133: 1-9.
66. Jiang ZG, Shi X, Si JQ, Nuttall AL. Basal nitric oxide production contributes to membrane potential and vasotone regulation of guinea pig in vitro spiral modiolar artery. *Hear Res* 2004; 189: 92-100.
67. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium- derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
68. Albrecht EWJA, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199: 8-17.
69. Wang-Rosenke Y, Neumayer HH, Peters H. NO signaling through cGMP in renal tissue fibrosis and beyond: key pathway and novel therapeutic target. *Curr med Chem* 2008; 15: 1396-1406.

70. Fulton D, Ruan L, Sood SG, Li C, Zhang Q, Venema RC. Agonist-stimulated endothelial nitric oxide synthase activation and vascular relaxation. Role of eNOS phosphorylation at Tyr83. *Circ Res* 2008; 102: 497-504.
71. Hoshijima H, Makimoto K, Noi O, Ohinata Y, Takenaka H. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on cochlear blood flow. *Hear Res.* 2002; 171: 32-42.
72. Heydrick S. Cellular signal transduction and nitric oxide. In: Loscalzo J, Vita JA (eds) *Nitric Oxide and the Cardiovascular System*. Humana Press Totowa, NJ, 2000; pp 33-49.
73. Sessa WC. ENos at a glance. *J Cell Sci* 2004; 117: 2427-2429.
74. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 1990; 259: C3-18.
75. Si JQ, Zhao H, Yang Y, Jiang ZG, Nuttall AL. Nitric oxide induces hyperpolarization by opening ATP- sensitive K(+) channels in guinea pig spiral modiolar artery. *Hear Res* 2002; 171: 167-176.
76. Dawson TM, Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL. Regulation of neuronal nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res* 1998; 118: 3-11.
77. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of vascular tone. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 434-456.
78. Guzik TJ, Korb R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-487.
79. Korhonen R, Lathi A, Kankaanranta H, Moilanen E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4: 471-479.
80. Khurana V, Meyer B: Translational Paradigms in Cerebrovascular Gene Transfer, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2003; 23: 1251-1262.
81. Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 593-620.
82. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-236.
83. Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001; 91: 497-503.

84. Somolyo AP, Somlyo AV. Singal transduction by G-protein, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin. II. *J Physiol* 2000; 522: 177-185.
85. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 83: 575-583.
86. Wu X, Somlyo AV, Somlyo AP. Cyclic GMP- dependent stimulation reverses G-protein- coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1996; 220: 658-663.
87. Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann S, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 2000; 275: 21722-9.
88. Strutz J, Mann W. *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*. 2.vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, 2010.
89. Paparella M, Shumrick D, Gluckman J, Meyerhoff W;W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. 1991. *Otolaryngology*, book Volume II, Chapter 43; Sudden deafness: Snow J, Telian S. 1619-1627.
90. Cummings W, Cummings otolaryngology head and neck surgery, fourth edition, volume four, Elsevier Mosby, Philadelphia.1998. Sensorineural hearing loss: evaluation and management in adults; Chapter 155, 3550-3561.
91. Alan G.Kerr, *Otologie: Booth J. Scott-brown's otolaryngology*, Butterworths; London, Boston, Durban, Singapore, Sydney, Toronto, Wellington; fifth edition.1987; chapter 17, 387-434.
92. Ulehlova L. Stria vascularis in acoustic trauma. *Arch Otorhinolaryngol* 1983; 237: 418-424.
93. Hirose K, Liberman MC. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003; 4: 339-352.
94. Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 2006; 27: 1-19.
95. Puel JL, Ruel J, Gervais d'Aldin C, Pujol R. Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise- trauma induced hearing loss. *Neuroreport* 1998; 9: 2109-2114.

96. Yamasobo T, Pourbakht A, Sokamoto T, Suzuki M. Ebselen prevents noise- induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci Lett* 2005; 380: 234-238.
97. Pollitzer A. *Lehrbuch der Ohrenheilkunde für praktische Ärzte und Studierende.* Ausgabe 2, Verlag F.Enke, 1887 (nach Reiß M; *Facharztwissen HNO- Heilkunde, Differenzierte Diagnostik und Therapie*; Springer Verlag, Zürich; 2009; XXVIII).
98. Miller JM, Ren TY, Nuttall AL. Studies of inner ear blood flow in animals and human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg.*1995; 112: 101-13.
99. Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation.*2001; 103: 113-8.
100. Lin HC, Chao PZ, Lee HC. Sudden sensorineural hearing loss increases the risk of stroke: a 5-year follow-up study. *Stroke* 2008; 39: 2744-2748.
101. Scherer E et al. Tumor necrosis factor alpha enhances microvascular tone and reduces blood flow in the cochlea via enhanced sphingosine 1-phosphate signaling; *Stroke* 2010; 41: 2618-2624.
102. Toubi E, Ben-David J, Kessel A, Halas K, Sabo E, Luntz M. Immune-mediated disorders associated with idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*2001; 113: 445-9.
103. Paludetti et al. Autoimmunity in sudden sensorineural hearing loss: possible role of anti-endothelial cell autoantibodies. *Acta Otolaryngol Suppl.*2002; 548: 30-3.
104. Wilson WR. The relationship of the herpes-virus family to sudden hearing loss: a prospective clinical study and literature review. *Laryngoscope* 1986; 96: 870-877.
105. Schuknecht HF, Donovan ED. The pathology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Arch Otorhinolaryngol* 1986; 243: 1-15.
106. Chau J, Lin J, Atashband S, Irvine R, Westerberg B. Systematic review of the evidence for the etiology of adult sudden sensorineural hearing loss. *The Laryngoscope* 2010; 120: 1011-21.
107. Rudack C, Langer C, Stoll W, Rust S, Walter M. Vascular risk factors in sudden hearing loss. *Thromb Haemost.* 2006; 95: 454-61.
108. Puel J, Ruel J, Gervais d'Aldin, Pujol R. Excitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuroreport*1998; 9: 2109-2114.
109. Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear. Res.* 2002;166: 62-71.

110. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 2004.
111. Suckfüll M. Acute diseases of the inner ear—are cardiovascular treatment strategies lacking? *MMW Fortschr Med.* 2004; 146: 52-5.
112. Suckfüll M, Seidel D, Thiery J. Treatment of sudden hearing loss through Fibrinogen/LDL-apheresis. A prospective, randomized multicenter trial. *Z Kardiol* 2003; 92: III59-III63.
113. Megighian D, Savastano M, Salvador L, Frigo A, Bolzan M. Audiometric and epidemiological analysis of elderly in the Veneto region. *Gerontology* 2000; 46:199-204.
114. Probst R, Tschopp K, Ludin E, Kellerhals B, Podvinec M, Pfaltz CR. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of dextran/pentoxifylline medication in acute acoustic trauma and sudden hearing loss. *Acta Otolaryngol* 1992; 112: 435-443.
115. Weinaug P. Treatment of acute inner ear diseases (sudden deafness and vestibular disorder) with meclofenoxate and acetylsalicylic acid. *HNO* 1988; 36: 226-229.
116. Olzowy B, Canis M, Hempel JM, Mazurek B, Suckfüll M. Effect of atorvastatin on progression of sensorineural hearing loss and tinnitus in the elderly: results of a prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Otol Neurotol.* 2007; 28: 455- 8.
117. Axelsson A. The cochlear blood vessels in guinea pig at different ages. *Acta Otolaryngol.(Stockh.)*1971; 72: 172-181.
118. Axelsson A, Vertes D. Histological findings in cochlear vessels after noise. in Hamerink RP, Henderson D, Salvi R (eds): *New Perspectives on Noise-Induced Hearing Loss*, New York, Raven, 1982; 49-67.
119. Gussen R. Sudden deafness of vascular origin: A human temporal bone study. *Ann.Otol.*1976; 85: 94-100.
120. Hawkins jr. JE. The role of vasoconstriction in noise induced hearing loss. *Ann.Otol.*1971; 80: 903-913.
121. Jaffe BF. Hypercoagulation and other causes of sudden hearing loss. *Otolaryngol.Clin.North Am.*1975; 8: 395-403.
122. Johnsson LG, Hawkins jr. JE. Vascular changes in the human inner ear associated with aging. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.* 1972; 81: 364-376.
123. Kimura RS, Perlman HB. Extensive venous obstruction of the labyrinth. A. Cochlear changes. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.*1956; 65: 332-350.

124. Prazma J, Rodgers GK, Pillsbury HC. Cochlear blood flow. Effect of noise. Arch Otolaryngol 1983; 109: 611-615.
125. Siegel LG. A national registry for idiopathic sudden deafness: Clinical study of a cochlear-vascular accident? in De Lorenzo AJ(ed): Vascular Disorders in Hearing Defects. Baltimore, University Park, 1973; 307-319.
126. Axelsson A, Nuttall AL, Miller JM. Observations of cochlear microcirculation using intravital microscopy. Acta Otolaryngol 1990; 109: 263-270.
127. Ren T, Lin X, Nuttall AL. Polarized-light intravital microscopy for study of cochlear microcirculation. Microvasc Res 1993; 46: 383-393.
128. Ohlsen KA, Didier A, Baldwin D, Miller JM, Nuttall AL, Hultcrantz E. Cochlear blood flow in response to dilating agents. Hear Res 1992; 58: 19-25.
129. Milton A, Tabor E, Gerety R.J. Combination of ketamine and xylazine for effective anaesthesia of juvenile chimpanzees. Laboratory Animals 1982; 16: 116-118.
130. Butler TM. Selected topics in laboratory animal medicine. The chimpanzee, Aeromedical Review 1973; 1: 1-81.
131. Mihaly Boros. Anaesthesia and Analgesia. University of Szeged, Institute for Surgical Research, Szeged, Hungary, 2005.
132. Banknieder A.R., Phillips J.M., Jackson K.T., Vinal S.I.Jr. Comparison of ketamine with the combination of ketamine and xylazine for effective anesthesia in the rhesus monkey. Laboratory Animal Science 1978; 28: 742-745.
133. Ren T, Lin X, Nuttall AL. Polarized-light intravital microscopy for study of cochlear microcirculation. Microvasc Res 1993; 46: 383-393.
134. de Belder AN, Granath K. Preparation and properties of fluorescein- labelled dextrans. Carbohydr Res, 1973; 118: 3-11.
135. Olsson Y., Svensjö E., Arfors K.E., Hulström D. Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. Acta Neuropathol 1975; 33: 45-50.
136. Hultström D, Malmgren L, Gilstring D, Olsson Y. FITC-Dextrans as tracers for macromolecular movements in the nervous system. A freeze-drying method for dextrans of various molecular sizes injected into normal animals. Acta Neuropathol. 1983; 59: 53-62.
137. Rutili G, Arfors KE. Fluorescein-labelled dextran measurement in interstitial fluid in studies of macromolecular permeability. Microvasc Res. 1976; 12: 221-30.

138. Monfared A, Blevins NH, Cheung EL, Jung JC, Popelka G, Schnitzer MJ. In vivo imaging of mammalian cochlear blood flow using fluorescence microendoscopy. *Otol Neurotol* 2006; 27: 144-152.
139. Zeintl TMI. Analyse stehender und bewegter Videobilder in der klinischen Mikrozirkulationsforschung. 1986, 1-10. 2009. In: Mahler, Hammersen, Meßmer: Methoden der klinischen Kapillarmikroskopie. Karger Verlag, Basel(1986), 1-10.
140. Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 1989; 8: 293-302.
141. Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 1997; 42: 168-175.
142. Jewett DL, Williston JS. Auditory far fields averaged from the scalp of humans, *Brain* 1971; 94: 681-696.
143. Schwent VL, Williston JS, Jewett DL. The effects of ototoxicity on the auditory brainstem response and the scalp-recorded cochlear microphonic in guinea pigs. *The Laryngoscope* 1980; 90: 1350-9.
144. Nakashima, Nuttall, Miller. Effects of vasodilating agents on cochlear blood flow in mice. *Hearing research* 1994; 80: 241-246.
145. Abdi H. Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons. In: N.J.Salkind (ed.) *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Thousand Oaks, CA: Sage 2007.
146. Manitoba Centre for Health Policy (MCHP) 2003. Bonferroni Correction. <http://www.umanitoba.ca/centres/mchp/concept/dict/Statistics/bonferroni.html>.
147. Goodwin PC, Miller JM, Dengerink HA, Wright JW, Axelsson A. The laser Doppler: a non-invasive measure of cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 1984; 98: 403-412.
148. Johnson A, Hawke M, Berger G. Sudden deafness and vertigo due to inner ear hemorrhage--a temporal bone case report. *J Otolaryngol* 1984; 13: 201-207.
149. Miller JM, Ren TY, Nuttall AL. Studies of inner ear blood flow in animals and human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 101-113.
150. Miller JM, Dengerink H. Control of inner ear blood flow. *Am J Otolaryngol* 1988; 9: 302-316.
151. Duan M, Laurell G, Qiu J, Borg E. Susceptibility to impulse noise trauma in different species: guinea pig, rat and mouse. *Acta Otolaryngol*. 2008; 128: 277-83.

152. Subhash HM, Davila V, Sun H, Nguyen-Huynh AT, Shi X, Nuttall AL, Wang RK. Volumetric in vivo imaging of microvascular perfusion within the intact cochlea in mice using ultra-high sensitive optical microangiography. *IEEE Trans Med Imaging*. 2011; 30: 224-30.
153. Mom T, Avan P, Bonfils P, Gilain L. A model of cochlear function assessment during reversible ischemia in the Mongolian gerbil. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1999; 4: 249-57.
154. Choudhury N, Chen F, Shi X, Nuttall AL, Wang RK. Volumetric Imaging of Blood Flow within Cochlea in Gerbil in vivo. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2009; 20: PP:1-6.
155. Ma CY, Yang SY, Zhang H, Xiang ML, Huang Q, Wei YQ. Prediction models of human plasma protein binding rate and oral bioavailability derived by using GA-CG-SVM method. *J Pharm Biomed Anal*. 2008; 47: 677-82.
156. Ding J, Gong S. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. The expression and significance of VIP and SP in the cochlea of rats. 2004; 18: 681-2, 684. Chinese.
157. Gong S, Ding J, Chang Q. J. The expression of VIP and SP in the cochlea of spontaneously hypertensive rats and its implication. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2004; 24: 396-9.
158. Angelborg C, Axelsson A, Larsen HC. Regional blood flow in the rabbit cochlea. *Arch Otolaryngol*. 1984; 110: 297-300.
159. Suckfüll M, Holtmann S, Hecht R. A new method for measuring internal ear circulation using colored microspheres. *Laryngorhinootologie*. 1995; 74: 141-4. German.
160. Morawski K, Telischi FF, Merchant F, Abiy LW, Lisowska G, Namyslowski G. Role of mannitol in reducing postischemic changes in distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs): a rabbit model. *Laryngoscope*. 2003; 113: 1615-22.
161. Vertes D, Axelsson A, Lipscomb DM. Some vascular effects of noise exposure in the chinchilla cochlea. *Arch Otorhinolaryngol*. 1979; 224: 97-101.
162. Attanasio G, Buongiorno G, Piccoli F, Mafera B, Cordier A, Barbara M, Filippo R. Laser Doppler measurement of cochlear blood flow changes during conditioning noise exposure. *Acta Otolaryngol*. 2001; 121: 465-9.
163. Thorne PR et al. Sound-induced artifact in cochlear blood flow measurements using the laser Doppler flowmeter. *Hear Res*. 1987; 31: 229-34.

164. Yokoyama K, Hasegawa M, Kobayashi N, Tamura T. Observations on cochlear blood flow using the laser Doppler method in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 1988; 106: 192-9.
165. La Rouere MJ, Sillman JS, Nuttall AL, Miller JM. A comparison of laser Doppler and intravital microscopic measures of cochlear blood flow. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989; 101: 375-84.
166. Ma KT, Guang BC, Yang YQ, Nuttall AL, Jiang ZG. 2- Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) blocks electrical coupling and inhibits voltage-gated potassium channels in guinea-pig arteriole cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 300: H335-346.
167. Fechter LD, Carlisle L. Auditory dysfunction and cochlear vascular injury following trimethyltin exposure in the guinea pig. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990; 105: 133-43.
168. Carlisle L, Aberdeen J, Forge A, Burnstock G. Neural basis for regulation of cochlear blood flow: peptidergic and adrenergic innervation of the spiral modiolar artery of the guinea pig. *Hear Res.* 1990; 43: 107-13.
169. Brown JN, Nuttall AL. Autoregulation of cochlear blood flow in guinea pigs. *Am J Physiol.* 1994; 266: H458-67.
170. Lamm K, Lamm C, Arnold W. Effect of isobaric oxygen versus hyperbaric oxygen on the normal and noise-damaged hypoxic and ischemic guinea pig inner ear. *Adv Otorhinolaryngol.* 1998; 54: 59-85.
171. Ito M, Ogawa K, Inoue Y, Sato M, Kanzaki J. Effects of neuropeptide Y on cochlear blood flow in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 2001; 121: 573-8.
172. Cassandro E, Sequino L, Mondola P, Attanasio G, Barbara M, Filipo R. Effect of superoxide dismutase and allopurinol on impulse noise-exposed guinea pigs--electrophysiological and biochemical study. *Acta Otolaryngol.* 200; 123: 802-7.
173. Chen Z, Ulfendahl M, Ruan R, Tan L, Duan M. Protection of auditory function against noise trauma with local caroverine administration in guinea pigs. *Hear Res.* 2004; 197: 131-6.
174. Wever EG, Vernon JA, Peterson EA. The high-frequency sensitivity of the guinea pig ear. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1963; 15;49: 319-22.
175. Kikuchi K, Hilding DA. The spiral vessel and stria vascularis in Shaker-1 mice. Electron microscopic and histochemical observations. *Acta Otolaryngol* 1967; 63: 395-410.

176. La Rouere MJ, Sillman JS, Nuttall AL, Miller JM. A comparison of laser Doppler and intravital microscopic measures of cochlear blood flow. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 101: 375-384.
177. Nuttall AL. Techniques for the observation and measurement of red blood cell velocity in vessels of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 1987; 27: 111-119.
178. Axelsson A, Nuttall AL, Miller JM. Observations of cochlear microcirculation using intravital microscopy. *Acta Otolaryngol* 1990; 109: 263-270.
179. Axelsson A, Vertes D. Vascular histology of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol* 1978; 85: 198-212.
180. Goodwin PC, Miller JM, Dengerink HA, Wright JW, Axelsson A. The laser Doppler: a non-invasive measure of cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 1984; 98: 403-412.
181. Hawkins JE, Jr., Johnsson LG. Light microscopic observations of the inner ear in man and monkey. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1968; 77: 608-628.
182. Hawkins JE, Jr., Johnsson LG, Preston RE. Cochlear microvasculature in normal and damaged ears. *Laryngoscope* 1972; 82: 1091-1104.
183. Johnsson LG. Vascular pathology in the human inner ear. *Adv Otorhinolaryngol* 1973; 20: 197-220.
184. Miller JM, Marks NJ, Goodwin PC. Laser Doppler measurements of cochlear blood flow. *Hear Res* 1983; 11: 385-394.
185. Axelsson A., Vertes D. Histological findings in cochlear vessels after noise. *New Perspectives on Noise-Induced Hearing Loss*, Editors: R.P. Hamerink, D. Henderson and R. Salvi, Raven Press New York, 1982; 49-67.
186. Nuttall AL, Hultcrantz E, Lawrence M. Does loud sound influence the intracochlear oxygen tension? *Hear Res* 1981; 5: 285-293.
187. Prazma J, Rodgers GK, Pilssbury HC. The effect of noise on cochlear blood flow. Presented at the ARO Midwinter Meeting, 23-27 January 1983, St. Petersburg, Fla. 1983.
188. Vertes D, Axelsson A, Lipscomb DM. Some vascular effects of noise exposure in the chinchilla cochlea. *Acta Otolaryngol* 1979; 88: 47-55.
189. Larsen HC, Angelborg C, Hultcrantz E. The effect of urea and mannitol on cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 1982; 94: 249-252.
190. De Vincetiis I. Sulla terapia medica di alcune gravi ipoacusie. *Valsalva* 1964; 40: 65-79.

191. Prazma J. Effect of glycerol on cochlea microcirculation. *Acta Otolaryngol* 1981; 92: 459-461.
192. Johnsson LG. Cochlear blood vessel pattern in the human fetus and postnatal vascular involution. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1972; 81: 22-40.
193. Kikuchi K, Hilding DA. The development of the stria vascularis in the mouse. *Acta Otolaryngol* 1966; 62: 277-92.
194. Maass B, Baumgärtl H, Lübbers DW. [Local pO₂- and pH₂-measurements with needle electrodes for the examination of the hydrogen maintenance and microcirculation of the cochleae]. *Arch.Otolaryngol.* 1976; 214: 109-124.
195. Nuttall AL, Hultcrantz E, Lawrence M. Does loud sound influence the intracochlear oxygen tension? *Hear Res* 1981; 5: 285-293.
196. Angelborg C, Hultcrantz E, Agerup B. The cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 1977; 83: 92-97.
197. Buckberg GD, Luck JC, Payne DB, Hoffman JI, Archie JP, Fixler DE. Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J Appl Physiol* 1971; 31: 598-604.
198. Hultcrantz E, Angelborg C. Cochlear blood circulation studied with microspheres. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1978; 40: 65-76.
199. Nuttall AL. Techniques for the observation and measurement of red blood cell velocity in vessels of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 1987; 27: 111-119.
200. Prazma J, Vance SG, Rodgers G. Measurement of cochlear blood flow--new technique. *Hear Res* 1984; 14: 21-28.
201. Ren T, Lin X, Nuttall AL. Polarized-light intravital microscopy for study of cochlear microcirculation. *Microvasc Res* 1993; 46: 383-393.
202. Ohlsen KA, Didier A, Baldwin D, Miller JM, Nuttall AL, Hultcrantz E. Cochlear blood flow in response to dilating agents. *Hear Res* 1992; 58:19-25.
203. Goodwin PC, Miller JM, Dengerink HA, Wright JW, Axelsson A. The laser Doppler: a non-invasive measure of cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 1984; 98: 403-412.
204. Axelsson A, Nuttall AL, Miller JM. Observations of cochlear microcirculation using intravital microscopy. *Acta Otolaryngol* 1990; 109: 263-270.
205. Prazma J, Carrasco VN, Garrett CG, Pillsbury HC. Measurement of cochlear blood flow: intravital fluorescence microscopy. *Hear Res* 1989; 42: 229-236.

206. Miller JM, Marks NJ, Goodwin PC. Laser Doppler measurements of cochlear blood flow. *Hear Res* 1983; 11: 385-394.
207. Ashida K. Comparison of vulnerability between avian and mammalian inner ears-- electrophysiological and morphological studies. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1992; 95: 1968-1980.
208. Chertoff ME, Hecox KE, Goldstein R. Auditory distortion products measured with averaged auditory evoked potentials. *J Speech Hear Res* 1992; 35: 157-166.
209. Kawamura S, Schürer L, Goetz A, Kempfski O, Schmucker B, Baethmann A. An improved closed cranial window technique for investigation of blood-brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int J Microcirc Clin Exp* 1990; 9: 369-383.
210. Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994; 76: 65-71.
211. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994; 145: 1421-1431.
212. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994; 267: G786-G793.
213. Menger M, Messmer K. Microcirculatory manifestations of hepatic ischemia/reperfusion injury. In: *Liver microcirculation and hepatobiliary function*. Messmer K. and M.D. Menger, editors. Karger, Basel, 1993; 106-124.
214. Hoffmann TF, Leiderer R, Harris AG, Messmer K. Ischemia and reperfusion in pancreas. *Microsc Res Tech* 1997; 37: 557-571.
215. Hoffmann TF, Leiderer R, Waldner H, Arbogast S, Messmer K. Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl)* 1995; 195: 125-144.
216. Hoffmann TF, Steinbauer M, Waldner H, Messmer K. Exogenous bradykinin enhances ischemia/reperfusion injury of pancreas in rats. *J Surg Res* 1996; 62: 144-151.
217. Hoffmann TF, Uhl E, Messmer K. Protective effect of the somatostatin analogue octreotide in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 1996; 12: 286-293.

218. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263: H1901-H1906.
219. Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med (Berl)* 1988; 188: 151-165.
220. Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 1998; 198: 23-35.
221. Messmer K, Krombach F. [Microcirculation research in experimental surgery]. *Chirurg* 1998; 69: 333-338.
222. Nader ME, Théorêt Y, Saliba I. The role of intratympanic lactate injection in the prevention of cisplatin-induced ototoxicity. *Laryngoscope*. 2010 Jun; 120: 1208-13.
223. Brechtelsbauer PB, Ren TY, Miller JM, Nuttall AL. Autoregulation of cochlear blood flow in the hydropic guinea pig. *Hear Res* 1995; 89: 130-136.
224. Nakashima T, Naganawa S, Sone M et al. Disorders of cochlear blood flow. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 43: 17-28.

9 Dank

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl, Direktor des Walter- Brendel- Zentrums für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München. Durch die Aufnahme und Integration in sein Institut ermöglichte er mir die Arbeit in kooperativer und motivierender Atmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern PD Dr. med. Martin Canis und PD Dr. med. Sebastian Strieth. Mit Geduld und Verständnis führten sie mich an wissenschaftlich– exaktes Denken heran und gaben mir richtungsweisende Impulse für die experimentelle Arbeit. Unter Ihrer Anleitung und konstruktiver Kritik lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Durchführung und Auswertung der Experimente bis hin zur kritischen Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse.

Herrn PD Dr. Martin Canis möchte ich zudem herzlich für die sehr engagierte und differenzierte Korrektur dieser Arbeit danken.

Außerdem möchte ich Frau Dr. med. Warangkana Arpornchayanon für die sehr gute Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe danken. Ihre Unterstützung und Hilfe haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus danke ich Herrn Müller und Herrn Dr. Peters sowie allen Mitarbeitern und Doktoranden des Walter- Brendel- Zentrums für experimentelle Medizin, die mit Gesprächen und Anregungen zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

10 Abkürzungen

A.:	Arteria
AEP:	Akustisch evozierte Potentiale
ATP:	Adenosintriphosphat
BAEP:	Hirnstammpotentiale
BERA:	brainstem evoked response audiometry; Hirnstammaudiometrie
CBF:	cochleärer Blutfluss
cGMP:	cyclisches Guanosinmonophosphat
EP:	endocochleäres Potential
FITC:	Fluoreszeinisothiozyanat
i.p.:	intraperitoneal
i.v.:	intravenös
i.a.:	intraarteriell
IVM:	intravitale Fluoreszenzmikroskopie
KG:	Körpergewicht
LDF:	Laser Doppler Flussmessung
MAP:	Mittlerer arterieller Blutdruck
N.:	Nervus
NO:	Stickoxid
ROI:	Region of interest
SNP:	Natriumnitroprussid

11 Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Catalina Sofia Meßmer
Geburtsdatum: 3.8.1983
Geburtsort: Heidelberg

Schulbildung:

09/1990- 07/1994 Volksschule Lochham
09/1994- 07/2003 Kurt- Huber- Gymnasium Gräfelfing, Neusprachliches Gymnasium,
Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/2003- 11/2009 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität
München (LMU)
08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der LMU
10/2005-01/2006 Auslandssemester an der Medizinischen Universität Wien, Österreich
10/2007-02/2008 Auslandssemester als Erasmus-Stipendiatin an der Università di Firenze,
Florenz, Italien
10-11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der LMU

Famulaturen:

03-04/2006 Aker Sykehus, Oslo, Norwegen, Abteilung für Radiologie
08-09/2006 Hospital Clinico, Granada, Spanien, Abteilung für Allgemeine Chirurgie
08/2007 Sanatorio Allende, Cordoba Argentinien, Abteilung für Innere Medizin
03/2008 Praxis für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Dr. med. C. von Kirschbaum, Gröbenzell

Praktisches Jahr:

08- 12/2008: Innere Medizin (Hepatogastroenterologie) am Hôpital Européen Georges
Pompidou, Université Paris Descartes, Paris, Frankreich
12/2008-03/2009: Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der LMU München

04/2009-07/2009 : Chirurgie am Hospital Cosme Argerich, Universidad de Buenos Aires,
Buenos Aires, Argentinien

Wissenschaftliche Arbeit:

11/2006- 04/2008 Experimenteller Teil der Promotion am Walter- Brendel- Zentrum für
Experimentelle Medizin der LMU (Direktor Prof. Dr. med. U. Pohl)

02/2010- 05/2010 Research Fellow bei Prof. M. Intaglietta, Departement of Bioengineering,
Microhemodynamics Laboratory, University California San Diego,
San Diego, USA

Seit 10/2010 Wissenschaftliche Assistentin der Klinik für Hals-Nasen- und
Ohrenheilkunde der Ludwig- Maximilians- Universität München
(Direktor Prof. Dr. med. A. Berghaus)

12 Publikationen

Canis,M.; Arpornchayanon,W.; **Messmer,C.**; Suckfuell,M.; Olzowy,B.; Strieth,S. A model for the analysis of cochlear blood flow [corrected] disturbance and hearing threshold *in vivo*. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2010 Feb; 267(2); 197-203. Epub 2009 Jul14. Erratum in Eur Arch Otorrhinolaryngol. 2010 Feb; 267(2):205.

Messmer, C.; Cabrales, P.; Intaglietta, M.; Effects of acute anemia and hyperoxia on oxygen distribution. ISOTT 2010, July 19th-23rd, Ascona, Switzerland.Poster.

Messmer, C.; Arpornchayanon, W.; Strieth, S.; Canis, M.; Analysis of cochlear blood flow and hearing threshold *in vivo*. 9 th World Congress For Microcirculation, September 26 – 28, 2010 Maison de la Chimie – Paris, France. Poster number: PS3-25.

Messmer, C.; Cabrales, P.; Tsai, A.G.; Palmer, A.F.; Intaglietta, M.; Resuscitation from hemorrhagic shock with polymerized albumin solutions. 9 th World Congress For Microcirculation, September 26 – 28, 2010 Maison de la Chimie – Paris, France. Poster number: PS3-24.

Salazar Vázquez, BY; Hightower, CM; Martini, J.; **Messmer, C.**; Friesenecker, B.; Cabrales, P.; Tsai, AG; Intaglietta, M.; Vasoactive hemoglobin solution improves survival in hemodilution followed by hemorrhagic shock. Crit Care Med. 2011; 39; 1461-6.

Messmer, C.; Yalcin, O.; Palmer, AF; Cabrales, P.; Small-volume resuscitation from hemorrhagic shock with polymerized human serum albumin. Am J Emerg Med. 2011 Nov 17. [Epub ahead of print]

Messmer, C.; Cabrales, P.; Intaglietta, M.; Effects if acute anemia and hyperoxia on oxygen distribution. Adv Exp Med Biol. 2012; 737:213-8.