Aus der

Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus

Tumornekrosefaktor in der Pathogenese des Hörsturzes – Entwicklung eines neuen Therapiekonzeptes

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin An der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



Vorgelegt von Kariem-Noureldin Sharaf

aus

Hamburg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Alexander Berghaus		
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Andrej Khandoga		
	Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Hamann		
	PrivDoz. Dr. med. Bernhard Olzowy		
	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Brandt		
Mitbetreuung durch die			
promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Martin Canis		
	PrivDoz. Dr. med. Christoph Reichel		
	PrivDoz. Dr. med. Friedrich Ihler		
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel		
Tag der mündlichen Prüfung:	06.04.2017		

Förderung des Projekts:

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Promotionsstudiengangs "Molekulare und Systembiologische Medizin" des Förderprogramms für Forschung und Lehre der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität. Die Experimente wurden im Zeitraum zwischen Oktober 2010 und Juni 2013 in der Gastgruppe der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin in Zusammenarbeit mit dem Integrierten Forschungs- und Behandlungszentrum für Schwindel, Gleichgewichts- und Augenbewegungsstörungen an der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus.

Meiner Familie

« Niemals

Wonach du sehnlich ausgeschaut, Es wurde dir beschieden, Du triumphierst und jubelst laut: Jetzt hab ich endlich Frieden!

Ach, Freundchen, rede nicht so wild, Bezähme deine Zunge! Ein jeder Wunsch, wenn er erfüllt, Kriegt augenblicklich Junge. »

Wilhelm Busch (1832 - 1908)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitu	Einleitung1		
	1.1 Epidemiologie der Innenohrerkrankungen			
	1.2 An	atomie2		
	1.2.1	Innenohr		
	1.2.2	Blutversorgung		
	1.3 Ph	ysiologie des Hörens		
	1.3.1	Schallübertragung12		
	1.3.2	Schallumwandlung13		
	1.3.3	Elektro-mechanische und mechano-elektrische Transduktion15		
	1.4 Kli	nik und Pathophysiologie des Hörsturzes17		
	1.4.1	Diagnostik		
	1.4.2	Vaskuläre Genese		
	1.4.3	Virale Genese		
	1.4.4	Autoimmunologische Genese		
	1.4.5	Endolymphatische Hydrops-Genese		
	1.5 The	erapie des Hörsturzes		
	1.5.1	Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes		
	1.5.2	Gefäßregulatorische Verbesserung des Blutflusses		
	1.5.3	Anti-inflammatorische/anti-apoptotische Therapie		
	1.6 Tu	mornekrosefaktor, Sphingosin-1-Phosphat und spezifische Inhibitoren27		
	1.6.1	Tumornekrosefaktor27		
	1.6.2	Etanercept		

	1.	6.3	Sphingosin-1-Phosphat und JTE-013	. 28
2	Fra	igest	ellung und wissenschaftliche Zielsetzung	. 29
3	Ma	iteria	l und Methoden	. 30
	3.1	Ve	rsuchstiere	. 30
	3.2	Na	rkose und Monitoring	. 30
	3.3	Lag	gerung	. 32
	3.4	Chi	irurgische Technik	. 32
	3.	4.1	Präparation des äußeren Ohrs und des Mittelohrs	.33
	3.	4.2	Präparation des zentralen Venenkatheters	. 34
	3.	4.3	Cochleäre Fensterung	. 34
	3.5	Inti	ravitale Fluoreszenzmikroskopie	.35
	3.	5.1	Fluoreszeinisothiozyanat	.35
	3.	5.2	Technischer Aufbau	.36
	3.	5.3	Superfusion	. 38
	3.	5.4	Parameter der cochleären Mikrozirkulation	. 38
	3.6	Bei	i der Superfusion verwendete Lösungen	.40
	3.	6.1	Tumornekrosefaktor	.40
	3.	6.2	Etanercept	.40
	3.	6.3	JTE-013	.41
	3.7	Ve	rsuchsprotokolle	.41
	3.	7.1	Dosisfindung Tumornekrosefaktor	.42
	3.	7.2	Evaluation protektiver Effekte durch Etanercept	.43
	3.	7.3	Evaluation therapeutischer Effekte durch Etanercept und JTE-013	.43

	3.8	Statistische Auswertung	44	
4	Erg	gebnisse	46	
	4.1	Dosisfindung Tumornekrosefaktor	46	
	4.2	Evaluation protektiver Effekte durch Etanercept	49	
	4.3	Evaluation therapeutischer Effekte durch Etanercept und JTE-013	50	
5	Dis	kussion	55	
	5.1	Wissenschaftlicher Hintergrund	55	
	5.2	Versuchsmodell	57	
	5.	2.1 Versuchstier	57	
	5.	2.2 Mikrochirurgische Technik	58	
	5.	2.3 Visualisierung und Messung der cochleären Mikrozirkulation	59	
	5.	2.4 Weitere Methoden zur Erfassung der cochleären Funktion	61	
	5.3	Ergebnisse und klinische Implikation	62	
	5.	3.1 Dosisfindung Tumornekrosefaktor	62	
	5.	3.2 Effekte durch Etanercept und JTE-013 und Ausblick	63	
6	Zus	sammenfassung	67	
7	Ab	kürzungsverzeichnis	69	
8	Lite	eraturverzeichnis	71	
9	Ab	bildungsverzeichnis	87	
	9.1	Bildrechte	91	
10) Ta	abellenverzeichnis	94	
11	11 Danksagung			
12	12 Publikationen			

13	Eidesstattliche V	ersicherung	97

1 Einleitung

Das Innenohr als peripherer Sitz des Hör- und Gleichgewichtssinns ist ein über die evolutionäre Entwicklung besonders gegen externe Einflüsse geschütztes Organ des Menschen. Die Lage im Felsenbein als härtester Knochen des Schädels der Säugetiere und des Menschen unterstreicht dies. Anders als beispielsweise das Auge als Organ des Sehens ist das Innenohr kaum von externer Verletzung betroffen und wenn doch, dann meistens nur bei erheblich ausgeprägten Traumata des Schädels. Trotz dieses natürlichen Schutzes gegen äußere Einflüsse sind Erkrankungen des Innenohres relativ häufig. Mit ungefähr 1,3 Milliarden Betroffenen gehören Höreinschränkungen zu den Erkrankungen mit der größten Prävalenz in der Weltbevölkerung. (1)

1.1 Epidemiologie der Innenohrerkrankungen

Erkrankungen des Innenohres zeigen sich primär als Beeinträchtigung des Hörempfindens. Häufige Symptome sind eine Einschränkung des Hörens in bestimmten oder allen Hörfrequenzen, des Richtungshörens und des Sprachverständnisses. Weitere Zeichen von Innenohrerkrankungen sind Ohrgeräusche ("Tinnitus") und Einschränkungen des Gleichgewichtssinns wie Schwindel. Folgen dieser Symptome liegen vor allem in der sozialen Interaktion und in einer gestörten Kommunikationsfähigkeit, im Kindesalter oft auch mit einem gestörten Spracherwerb verbunden. In der Folge kommt es häufig zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität, sozialer Isolation und psychiatrisch-psychosomatischen Krankheitsbildern wie Schlafstörungen und Depression. (2-4)

Laut den Zahlen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahr 2004 leiden weltweit mehr als 275 Millionen Menschen an einer mittel- bis hochgradigen Höreinschränkung sowie mehr als 360 Millionen Menschen an einer milden Schwerhörigkeit. Zusammen mit der Eisenmangel-Anämie und Migräne gehört die Schwerhörigkeit zu den drei Krankheiten mit der höchsten Prävalenz. Der Hörverlust im Erwachsenenalter ist außerdem weltweit die häufigste Ursache für eine Behinderung. (5) Der im Erwachsenenalter erworbene Hörverlust in Ländern mit hohem Einkommen ist eine der wichtigsten Ursachen für die mit einer Behinderung gelebten Jahre (YLD). (6, 7) Bei den behinderungsbereinigten Lebensjahren (DALY), in die die mit einer Behinderung gelebten Jahre maßgeblich einfließen, ist insgesamt bis zum Jahr 2030 gegenüber 2004 eine deutliche Zunahme und auch eine bedeutsame Steigerung beim Anteil an den behinderungsbereinigten Lebensjahren prognostiziert. (5, 8, 9) Diese Prognose wurde aufgrund der Alterung der Gesellschaft für die mit einer Behinderung gelebten Jahre von den 2010 gewonnenen Daten für die neueste Global Burden of Disease Studie ausgehend erneuert. (1, 10) In Deutschland leben schätzungsweise 13 bis 14 Millionen Menschen mit einer behandlungsbedürftigen Schwerhörigkeit. (11)

1.2 Anatomie

Die Anatomie des Ohres gliedert sich in das äußere Ohr, das Mittel- und das Innenohr. (Abbildung 1) Zum äußeren Ohr wird neben der Ohrmuschel und dem Ohrläppchen (Auricula auris und Lobulus auriculae) der äußere Gehörgang (Meatus acusticus externus) gezählt. Das Trommelfell (Membrana tympani) ist die Begrenzung zwischen Außen- und Mittelohr. Das Mittelohr besteht aus der Paukenhöhle (Cavum tympani) und beherbergt die Gehörknöchelchenkette (Ossicula auditiva), die vom Trommelfell zum ovalen Fenster (Fenestra vestibularis) des Innenohres reicht. Beim Menschen besteht die Gehörknöchelchenkette aus Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes), bei anderen Säugetieren wie dem Meerschweinchen sind Hammer und Amboss zu einem Knochen verschmolzen. Das Innenohr teilt sich in die Hörschnecke (Cochlea) und das Gleichgewichtsorgan (Vestibuläres Labyrinth). (12, 13)



Abbildung 1 Schematische Darstellung der Anatomie des Ohres: Einteilung der Abschnitte in äußeres Ohr, Mittelohr und Innenohr mit den Leitstrukturen, übernommen von Frings et al. (14)

1.2.1 Innenohr

Das Innenohr ist in das Felsenbein (Pars petrosa) als Teil des Schläfenbeins (Os temporale) eingebettet. (Abbildung 2) Das Felsenbein bildet das knöcherne Labyrinth, das einen Hohlraum für das häutige Labyrinth darstellt. Das Labyrinth ist insgesamt ein zusammenhängendes Gangsystem, das unterschiedliche Kompartimente für die verschiedenen Innenohrflüssigkeiten (Endo- und Perilymphe) ausbildet. Während sich die primären Sinneszellen des Gleichgewichtssinnes in den Ampullen der Bogengänge und den Makulaorganen befinden, liegen die primären Sinneszellen des Hörsinnes in der Cochlea. (12)



Abbildung 2 Lage der Cochlea und Bogengänge innerhalb des Felsenbeins: Ansicht von kranial, farbliche Darstellung der drei Abschnitte eines rechten Ohres: Äußeres Ohr in gelb, Mittelohr in türkis und Innenohr in hellgrün, modifiziert nach Kirsch (12)

1.2.1.1 Cochlea

Die Cochlea besteht aus drei übereinander liegenden Kanälen, die sich gemeinsam schneckenhausartig in zweieinhalb Drehungen aufwinden und als Scala tympani, Scala media (auch Ductus cochlearis) und Scala vestibuli bezeichnet werden. (Abbildung 3) Die Scala tympani sowie die Scala vestibuli sind mit Perilymphe und die zwischen den beiden anderen Kanälen liegende Scala media ist mit Endolymphe gefüllt. Die Scala tympani und Scala vestibuli kommunizieren außerdem in der Schneckenspitze (Helicotrema). (15)

Die extrazellulären Innenohrflüssigkeiten unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung deutlich. Während die Perilymphe mit einem hohen Natrium-Ionen-Gehalt (140 mmol/l) und einem niedrigen Kalium-Ionen-Gehalt (4-5 mmol/l) große Ähnlichkeit mit anderen extrazellulären Flüssigkeiten wie dem Liquor cerebrospinalis oder dem Blutplasma hat, weist die Endolymphe einen hohen Gehalt an Kalium-Ionen (130-150 mmol/l) und einen niedrigen Gehalt an Natrium-Ionen (12-16 mmol/l) auf. (16, 17) Damit ähnelt die Endolymphe eher der intrazellulären Flüssigkeit. Außerdem enthält die Endolymphe gegenüber der Perilymphe deutlich weniger freie Calcium-Ionen, Chlorid- und Bicarbonat-Ionen. Die Homöostase der Endolymphe wird durch die Stria vascularis reguliert, ein gut vaskularisiertes Epithel, das in der äußeren Wand der Scala media liegt. (14, 15)



Abbildung 3 Aufbau der Cochlea im Längsschnitt: Meerschweinchen-Cochlea in Goldner-Färbung, modifiziert nach Welsch et al. (15); 1 knöcherne Cochlea, 2 Modiolus, 3 Ganglion spirale, 4 N. acusticus, 5 Scala vestibuli, 6 Scala media, 7 Scala tympani

1.2.1.2 Corti-Organ

Die Hör-Sinneszellen befinden sich im Corti-Organ, das sich in der Scala media befindet. Das Epithel des Corti-Organs bildet ein eigenes Tunnelsystem aus. Dieses besteht aus einem inneren Tunnel zwischen inneren und äußeren Haarzellen, auch Corti-Tunnel genannt, sowie dem Nuël-Raum medial und dem äußeren Tunnel lateral der äußeren Haarzellen. (15)

Die inneren Haarzellen sind die Sensorzellen des Hörens. Sie bilden eine einreihige Zellreihe aus ca. 3500 Zellen, die sich am äußeren Rand der Lamina spiralis ossea der Schneckenspindel (Modiolus) mit dieser von der Cochlea-Basis zum Helicotrema hochwindet. (Abbildung 4) An der apikalen Zelloberfläche tragen die Zellen C-förmige Reihen von abkippbaren, mit Tip-Links und Seitenfäden verbundenen Stereozilien, die als sehr empfindliche Mechanosensoren dienen und insbesondere von den durch die Cochlea wandernden Schallwellen ausgelenkt werden können. (15, 18)

Die ca. 15000 äußeren Haarzellen winden sich in drei bis fünf nebeneinander liegenden Reihen im Corti-Organ lateral der inneren Haarzellen. (Abbildung 4) Auch sie besitzen miteinander verbundene Reihen von Stereozilien auf der apikalen Zelloberfläche, die allerdings eher M-förmig angeordnet sind. Anders als die inneren Haarzellen berühren die äußeren Haarzellen mit ihren Stereozilien die Tektorialmembran und besitzen außerdem über das Motorprotein Prestin vermittelte kontraktile Eigenschaften. (15, 19-21)



Abbildung 4 Elektronenmikroskopische Darstellung der Haarzellen: ÄHZ Drei Reihen äußerer Haarzellen, IHZ eine Reihe innerer Haarzellen, jeweils mit * Stereozilien; modifiziert nach Otolaryngology Imaging Core, Stanford School of Medicine (22)

Die Haarzellen können nach der Geburt nicht mehr nachgebildet werden. Sie werden sowohl afferent als auch efferent innerviert, wobei die inneren Haarzellen hauptsächlich afferent innerviert werden und die äußeren Haarzellen eine deutlichere efferente Innervation aufweisen.

1.2.1.3 Innervation

Innerviert werden die inneren Haarzellen von Zellausläufern der Nervenzellen aus dem Ganglion spirale, das spiralig im Modiolus der Cochlea liegt. (Abbildung 5) Die Axone dieser bipolaren Ganglienzellen vereinigen sich zum N. cochlearis. Im inneren Gehörgang, der einen knöchernen Kanal im Felsenbein darstellt, vereinigen sich die Nervenfasern mit den vom Ganglion vestibulare ausgehenden Fasern des N. vestibularis zum N. vestibulocochlearis, dem VIII. Hirnnerv. Dieser tritt zusammen mit dem N. intermediofacialis, der als VII. Hirnnerv neben den Gesichtsmuskeln auch den M. stapedius versorgt, durch den Porus acusticus internus in die hintere Schädelgrube und im Kleinhirnbrückenwinkel in den Hirnstamm ein, in dem die Nuclei cochleares ventrales et dorsales liegen. (23-26)



Abbildung 5 Aufbau einer cochleären Windung im Längsschnitt: Meerschweinchen-Cochlea in Goldner-Färbung, modifiziert nach Welsch et al. (15); 1 Scala vestibuli, 2 Scala media, 3 Scala vestibuli, 4 Ganglion spirale, 5 Limbus spiralis mit den Interdentalzellen, 6 Ligamentum spirale, Pfeilspitze Reißner-Membran, Pfeil Stria vascularis, * Corti-Organ auf Basilar-Membran

1.2.1.4 Stria vascularis

In der lateralen Wand der Scala media liegt ein besonders kapillarreiches Epithel, die Stria vascularis. Das Epithel ist dreigeschichtet, wobei sich Marginalzellen, Intermediärzellen und Basalzellen unterscheiden lassen. Die Kapillaren des Epithels verlaufen lediglich zwischen den Schichten der Marginal- und Intermediärzellen.

Die Marginalzellen liegen zum Endolymphraum der Scala media gelegen und bilden durch eine Vielzahl von Zell-Zell-Kontakten eine geschlossene Epithelschicht. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche Mikrovilli, welche die Oberfläche zur Endolymphe vergrößern. Außerdem besitzen die Marginalzellen in ihrem Zytosol eine größere Zahl an Vakuolen und Vesikeln. Trotzdem konnten diesen Zellen erst kürzlich auch sekretorische Fähigkeiten nachgewiesen werden. (27, 28)

Die Intermediärzellen sind gegenüber den Marginalzellen deutlich kleiner und chromophob, da sie sich histologisch deutlich weniger anfärben. Sie stehen über Zellfortsätze mit den benachbarten Schichten der Marginal- und Basalzellen in Verbindung. Die Intermediärzellen stellen spezialisierte Melanozyten dar. Die Basalzellen vermitteln den Kontakt des Epithels zum fibrozytären Bindegewebe der Außenwand der Scalen. In den Intermediär- und Basalzellen lässt sich Vimentin nachweisen, was gegenüber der epithelialen Herkunft der Marginalzellen auf einen mesenchymalen Ursprung dieser Zellen hinweist.

Der Stria vascularis ist die Produktion der Endolymphe und damit vor allem das dauerhafte Halten des hohen Kalium-Gehalts in dieser Flüssigkeit zugeordnet. Da der hohe Kaliumgehalt als entscheidend für das Aufrechterhalten des endocochleären Potenzials angesehen wird, gilt die Stria vascularis als wesentlicher Faktor in der Endolymph-/Perilymph-Homöostase im Innenohr. (29) (Abbildung 6)



Abbildung 6 Ionen-Bewegungen im Bereich der Scala media: Betonung des hauptsächlich durch die Stria vascularis betriebenen Kalium-Kreislaufs (rote Pfeile) und die für die Ionen-Homöostase bekannten Kanalproteine (schwarze Kästen mit weißer Schrift), modifiziert nach Lang et al. 2007 (30); ÄHZ Äußere Haarzellen, ÄSZ Äußere Sulkuszellen, CZ Claudius-Zellen, DZ Deiter-Zellen, HZ Hensen-Zellen, IHZ Innere Haarzellen, I-V spezialisierte Fibrozyten

Die Kalium-Konzentration der Endolymphe wird durch mehrere Kalium leitende Kanäle und Transporter reguliert. (Abbildung 6) Kalium wird aus der Endolymphe von den äußeren Haarzellen aufgenommen und kann dann über die äußeren Phalangenzellen, die lateralen Epithelzellen im Sulcus spiralis externus, spezielle Fibrozyten im Ligamentum spirale und dann über die äußeren beiden Epithelschichten zu den Marginalzellen weitgehend passiv zu den Marginalzellen rezirkulieren. Von den Marginalzellen können die Kalium-Ionen über Kaliumkanäle wiederum in die Endolymphe sezerniert werden. An der basolateralen Zelloberfläche der Marginalzellen finden sich die Na-K-ATPase und der Na-K-2Cl-Cotransporter, die besonders eingehend untersucht sind. (15, 18, 31) Außerdem spielen diese Kanäle eine Rolle bei der Ototoxizität von Medikamenten wie zum Beispiel den Schleifendiuretika. (32)

Diese Kalium-Homöostase erfordert insgesamt sehr viel Energie. (29) Surrogatparameter dieses hohen Energie-Aufwandes sind die hohe Mitochondrien-Dichte und die hohe Kapillardichte der Stria vascularis, die für eine regelhafte Funktion eine konstante Blut- und Nährstoffversorgung voraussetzen. (33, 34)

1.2.2Blutversorgung

Der Anteil der cochleären Durchblutung am Herzminutenvolumen (HMV) ist trotz der hohen erforderlichen Energie absolut gesehen relativ klein. Bei Nagetieren wie dem Meerschweinchen macht er ungefähr 0,1 ‰ des HMV aus und beim Menschen wird er sogar nur auf 0,001 ‰ des HMV geschätzt. (35)

1.2.2.1 Gefäße

Die Blutversorgung des Innenohres geht von der Labyrintharterie (A. labyrinthi) aus. Diese geht direkt oder indirekt über die A. cerebelli inferior anterior aus der A. basilaris hervor, die aus den Aa. vertebrales gespeist und Teil des Circulus arteriosus Willisi ist, welcher das Gehirn versorgt. In ihrem Verlauf teilt sich die A. labyrinthi in die A. cochlearis communis und die A. vestibularis anterior. Im Modiulus der Cochlea zweigt sich die A. cochlearis communis in die A. spiralis modioli und die A. vestibulocochlearis, die sich danach in zwei Endäste aufteilt, den R. cochlearis und den R. vestibularis (auch A. vestibularis posterior). (Abbildung 7 A)

Bevor der R. vestibularis zum Vestibularorgan zieht und dieses teilweise versorgt, versorgt er im unteren Drittel die basale Windung der Cochlea. Das mittlere Drittel der basalen Windung und die weiteren Windungen bis zum Helicotrema werden vom R. cochlearis und dessen Endast, der A. spiralis modioli, versorgt. (Abbildung 7 A) Der venöse Abfluss richtet sich nach den anatomischen Strukturen und geschieht hauptsächlich über die mit dem cochleären Aquädukt verlaufende Vene und gegebenenfalls zusätzlich eine den N. cochlearis begleitende Vene. (Abbildung 7 B)



Abbildung 7 Gefäßversorgung der Cochlea: A Arterielle Gefäße in Bezug auf die cochleäre Anatomie **B** Venöse Gefäße in Bezug auf die cochleäre Anatomie, beide modifiziert nach Axelsson et al. (36); 1 Aa. Vertebrales, 2 A. basilaris, 3 A. cerebellaris anterior inferior, 4 A. labyrinthi, 5 A. cochlearis communis, 6 A. spiralis modioli, 7 R. cochlearis, 8 R. vestibularis, 9 A. vestibulocochlearis, 10 A. vestibularis anterior, 11 V. scalae tympani, 12 V. communis modioli, 13 V. scalae vestibuli, 14 Vene des cochleären Aquädukts, 15 Vene des runden Fensters, 16 V. vestibulocochlearis, 17 V. vestibularis anterior, 18 V. vestibularis anterior, N. VIII N. vestibulocochlearis, OF ovales Fenster, RF rundes Fenster



Abbildung 8 Cochleäre Gefäße: A Multiphotonenmikroskopische Aufnahme der Mikrogefäße einer explantierten Cochlea mit Arteriola radiata (*) und Kapillaren der Stria vascularis (Pfeilspitze), modifiziert nach Ihler (37); B Benzidinpräparat der Cochlea, modifiziert nach Hawkins (38)

Die Arteriolen, die von der A. spiralis modioli ausgehen, bilden in allen Windungen ein gleichartiges Gefäßmuster aus, das von Arteriolae radiatae superiores, mediales und inferiores aufgebaut wird, die jeweils unterschiedliche Bereiche innerhalb der Cochlea versorgen. Die Arteriolae radiatae superiores durchziehen das Dach der Scala vestibuli, bevor sie sich verästeln und die Kapillarnetze der lateralen Wand der Cochlea versorgen. (39-41) Dem gegenüber versorgen die Arteriolae radiatae mediales die Basilarmembran und die Arteriolae radiatae inferiores die Modioluswand, das Ganglion spirale sowie den angrenzenden Teil des N. cochlearis. (Abbildungen 8 und 9) (37, 42)



Abbildung 9 Darstellung der Gefäße der lateralen Cochlea-Wand: A Dreidimensionales Schema, modifiziert nach Sampaio (43); B Zweidimensionales Schema, modifiziert nach Axelsson (36); C Aussschnitt der Gefäße einer cochleären Windung in einem Benzidin-Präparat, modifiziert nach Hawkins (38); AR Arteriolae radiatae, ASM A. spiralis modioli, AVA Arteriovenöse Anastomosen, BM Basilarmembran, GRM Gefäß der Reißner-Membran, GSP Gefäß der spiralen Prominenz, KSV Kapillaren der Scala vestibuli, RM Reißner-Membran, SM Scala media, St Stria vascularis, ST Scala tympani, VC Sammelvenolen (Venulae collectores)

Die Stria vascularis wird als Teil der lateralen Wand von den korkenzieherartig geformten Arteriolae radiatae superiores und mediales versorgt. Diese Gefäße ziehen unterhalb des Ansatzes der Reißner-Membran an der lateralen Wand der Cochlea in die Stria vascularis und verzweigen sich dort in ein dichtes, vielfach kommunizierendes Kapillarnetz. (Abbildungen 8 A und 9) (37, 42) Eine Besonderheit der Kapillaren der Stria vascularis ist, dass diese gegenüber den Kapillaren des lateral befindlichen Bindegewebes einen höheren Gefäßdurchmesser aufweisen und keine perivaskulären Räume zeigen, sodass das Blut durch diese Kapillaren langsamer und mit größerer Viskosität fließt. (35, 44)

1.2.2.2 Regulation

Die Regulation des cochleären Blutflusses ist bedeutsam, da sich die Versorgung mit Substraten und der Abtransport von Stoffwechsel-Endprodukten konstant dem aktuellen Umsatz des Hörorgans und speziell der Aufrechterhaltung des endocochleären Potenzials durch die Stria vascularis anpassen müssen. (45, 46) Eine Einschränkung der cochleären Durchblutung führt zu Funktionseinschränkungen des Gehörs und wird deshalb mit vielen Pathologien des Innenohres in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind der Hörsturz, akute und chronische lärminduzierte sowie die altersbedingte Schwerhörigkeit. (47) Es ist allerdings weiterhin nicht komplett aufgeklärt, in welchen Gefäßabschnitten und über welche Mechanismen der cochleäre Blutfluss reguliert wird und wie diese mit den verschiedenen Pathophysiologien zusammenhängen.

Gut untersucht ist die Rolle der A. spiralis modioli. In dieser Arterie und den nachgeschalteten Arteriolen wird der bis in der A. labyrinthi herrschende systemische Blutdruck gemindert und der pulsierende Fluss in den Arterien hin zu einem konstanten Fluss in den Kapillaren reguliert. (48, 49) Da histologisch gezeigt werden konnte, dass auch die Arteriolen im Ligamentum spirale kontraktile Elemente aufweisen, wird auch ihnen eine regulatorische Wirkung zugesprochen. (50, 51) Im Kapillarbett finden sich wiederum Perizyten, für die bereits in der zerebralen Mikrozirkulation eine regulatorische Wirkung gezeigt werden konnte, die auch für den cochleären Blutfluss diskutiert wird. (52, 53)

Darüber hinaus wurde vielfach versucht, den cochleären Blutfluss zu beeinflussen. (Tabelle 1) Bei diesen Untersuchungen wurden auch mehrfach Hinweise auf eine Autoregulation des cochleären Blutflusses gefunden.

Intervention	Auswirkungen	Quellen
Adrenerge Stimulation, Norepinephrin	Vasokonstriktion; Autoregulations- mechanismus des cochleären Blutflusses durch die Gefäße des Innenohres	(54-56)
Exsanguation	Autoregulationsmechanismus des cochleären Blutflusses durch die Gefäße des Innenohres	(55)
Erhöhter Liquordruck, erhöhter	Autoregulationsmechanismus des	(57, 58)
systemischer Blutdruck	cochleären Blutflusses durch die Gefäße	
	des Innenohres	
Vasodilatation, NO	Vasodilatation der zuführenden Gefäße,	(59)
	Autoregulationsmechanismus des	
	cochleären Blutflusses durch die Gefäße	
	des Innenohres	
Laktat	Zunahme des cochleären Blutflusses	(60)
Knalltrauma	Zunahme des cochleären Blutflusses;	(61, 62)
	erhöhte Gefäßpermeabilität	
Entzündung	Vasokonstriktion der zuführenden Gefäße	(63, 64)

Tabelle 1 Auswirkungen ausgewählter Interventionen auf die Regulation des cochleären Blutflusses

1.3 Physiologie des Hörens

Bis Höreindrücke im Gehirn interpretiert werden können, ist eine umfangreiche Kodierung der Schallwellen aus der Luft in ein über den N. cochlearis ableitbares Signal notwendig. Zuerst muss die über die Luft geleitete Schallwelle zur Wanderwelle in den Scalen der Cochlea umgewandelt werden. Im Corti-Organ muss diese physikalische Welle dann zu einem elektrischen Signal kodiert werden, das über den VIII. Hirnnerv in den Hirnstamm und die Hörbahn des zentralen Nervensystems geleitet werden kann.

1.3.1 Schallübertragung

Der Schall gelangt per Luftleitung über die Ohrmuschel in den äußeren Gehörgang. Hierbei helfen sowohl der Winkel, in dem die Ohrmuscheln physiologisch vom Schädel abstehen, als auch deren Trichterform. Am Ende des äußeren Gehörgangs treffen die Schallwellen auf das Trommelfell. Das Trommelfell ist direkt mit dem Hammer verbunden, der den Schall über die nachgeschalteten Gehörknöchelchen Amboss und Steigbügel weiterleitet. Die Steigbügelfußplatte ist mit der ovalen Fenstermembran verbunden und stellt damit die Verbindung zum häutigen Labyrinth des Innenohres her. (12-14, 18)

Alternativ kann der Schall auch über den Knochen zum Innenohr geleitet werden, wobei die Knochenleitung beim physiologischen Hörvorgang eine untergeordnete Rolle spielt. Das Mittelohr dient der Impedanzanpassung, die notwendig ist, da bei der direkten Übertragung Schallwellen von von Luft auf Wasser aufgrund der Unterschiede des Schallwellenwiderstands in beiden Medien der überwiegende Teil des Schalls, statt aufgenommen zu werden, reflektiert würde. Somit wirken die oben genannten Strukturen des Mittelohres als mechanischer Verstärker. Über Mechanismen wie den Stapediusreflex dient das Mittelohr darüber hinaus dem Schutz des Innenohres. (14, 18, 65)

1.3.2Schallumwandlung

Nach Erreichen des Innenohres muss die Schallwelle als mechanische Welle nun in ein für das Gehirn interpretierbares, elektrisches Signal umgewandelt werden. Außerdem muss für eine ordnungsgemäße Unterscheidung von Tönen die Frequenz-spezifische Aufschlüsselung des auditorischen Inputs bereits im Innenohr und nicht erst im zentralen Nervensystem stattfinden.

1.3.2.1 Wanderwelle

Die von der Stapes-Fußplatte auf die Endolymphe übertragenen Schallwellen setzen sich nun im flüssigen Medium als wellenförmige Auslenkung der Basilarmembran im longitudinalen Verlauf der Cochlea-Windungen fort, die nach ihrem Entdecker Békésy-Wanderwelle benannt wurde. (14, 66-69) Dadurch, dass die Steife der Basilarmembran zum Helicotrema hin kontinuierlich abnimmt, ergeben sich für jeden Abschnitt der Basilarmembran andere physikalische Eigenschaften. Dies sorgt dafür, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wanderwelle und die Eigenfrequenzen von der Cochlea-Basis zur Spitze hin abnehmen, während die Amplitude zunimmt. Die Amplitude erreicht an der Stelle der Basilarmembran ein Maximum, an der Anregungsfrequenz und Eigenfrequenz der Membran übereinstimmen, sodass es somit für jede Frequenz des Hörspektrums einen individuellen Ort im Verlauf der Basilarmembran gibt. Dieses Phänomen wird als Tonotopie der Cochlea bezeichnet. (14, 18)

Grundsätzlich findet dieser Vorgang passiv statt. Er ist allein aber nicht in der Lage, die natürlich beobachtete Trennschärfe von Tonfrequenzen in der Cochlea zu erreichen. Hieraus erschließt sich die Existenz eines weiteren, aktiven Verstärkungsmechanismus. (18)

1.3.2.2 Endocochleäres Potenzial

Das elektrische Potenzial des Innenohres bildet sich maßgeblich durch die konstanten, bereits weiter oben genannten Konzentrationsunterschiede von positiv geladenen Ionen in den beiden Innenohrflüssigkeiten aus. (Abbildung 10) Physikochemisch sind zwei Flüssigkeiten bestrebt, ihre Ionenkonzentrationen anzugleichen, wenn sie über eine Ionen-durchlässige Membran verbunden sind. Da allerdings die luminal gelegenen Membranen der Zellen, die die Scala media auskleiden, unter physiologischen Bedingungen einen Kaliumstrom aus der Endolymphe verhindern, bildet sich an der Membran für Kalium ein etwa 85 mV messendes, positives Potenzial zwischen Endolymphe und Perilymphe aus, das als endocochleäres Potenzial bezeichnet wird. Aufgrund des daneben bestehenden Membranpotenzials der Haarzellen von etwa -70 mV, ergibt sich zwischen Endolymphe und Zytosol der Haarzellen sogar ein elektrisches Potenzial von ca. 155 mV. (14, 70-72)



Abbildung 10 Schematische Darstellung des Corti-Organs innerhalb einer cochleären Windung und des endocochleären Potenzials: Unterschiedliche elektrische Potenziale innerhalb der unterschiedlichen Innenohr-Kompartimente, übernommen von Frings et al. (14)

Durchblutungsstörungen in der Cochlea führen sehr schnell zu einem Zusammenbruch des endocochleären Potenzials. Es konnte gezeigt werden, dass derartige Reduktionen des endocochleären Potenzials zu schwerwiegenden Funktionsstörungen der Haarzellen und des Hörens führen. (73-75)

1.3.3Elektro-mechanische und mechano-elektrische Transduktion

Die Wanderwelle erregt in der Cochlea zuerst hauptsächlich äußere Haarzellen, die dann über ihre kontraktilen Eigenschaften die Bewegung der Basilarmembran lokal nochmals verstärken können und dann auch zu einer vermehrten Anregung der inneren Haarzellen führen, die diese über Transmitter an den Hörnerv weitergeben können. (Abbildung 10)

1.3.3.1 Elektro-mechanische Transduktion

Im Corti-Organ sorgt die Wanderwelle für Scherbewegungen der Tektorialmembran, die im Bereich des frequenzspezifischen Maximums der Wanderwelle ebenfalls maximal sind. Durch die Scherbewegung der Tektorialmembran werden die Stereozilien der äußeren Haarzellen ausgelenkt. (Abbildung 11) Aufgrund ihrer Querverbindungen werden in der Folge auch die weiteren Stereozilien gleichartig bewegt. Eine besondere Rolle kommt den Tip links zu, die mit Kalium leitenden Kanälen verbunden sind. Bei nach außen gerichtetem Abscheren der Tektorialmembran entsteht Zug auf die Tip links und damit kommt es zu einer vermehrten Öffnung der Kanäle. Aufgrund des Kalium-Gradienten erfolgt ein Einstrom von Kalium aus der Endolymphe in die Haarzellen, der zu einer Depolarisation der Zellmembran führt. Gegenläufiges Abscheren führt zum vermehrten Schluss der Kanäle und zu einer Repolarisation der Zelle. (14, 18)

Die periodische Veränderung des Membranpotenzials sorgt in den äußeren Haarzellen zu Konfigurationsänderungen des Motorproteins Prestin. Hierdurch beginnen die äußeren Haarzellen in ihrer Länge zu oszillieren und verstärken lokal im Bereich des Maximums der Wanderwelle die Schwingung von Basilar- und Tektorialmembran. Diese spannungsabhängige Längenänderung der äußeren Haarzellen wird als elektro-mechanische Transduktion bezeichnet und verstärkt das mechanische Signal der Wanderwelle um zusätzliche 50 dB. Außerdem wird durch die örtlich sehr begrenzte Verstärkung der Schwingung die Frequenzselektivität erhöht. (14, 18)



Abbildung 11 Schematische Darstellung des Transduktionsmechanismus: Über die Erregung der äußeren Haarzellen durch die Wanderwelle kommt es zu über Prestin vermittelten Längenänderungen und Oszillationen der äußeren Haarzellen. Hieraus folgt die lokale Verstärkung der Wanderwelle und die Übertragung an die inneren Haarzellen, die Aktionspotenziale an den afferenten Neuronen auslösen können; übernommen von Klinke (18)

1.3.3.2 Mechano-elektrische Transduktion

Die von den äußeren Haarzellen verstärkte Wanderwelle führt zu Endolymphbewegungen, die nun auch die Stereozilien der inneren Haarzellen auslenken. Es kommt nun ebenso wie an den äußeren Haarzellen zu Kalium vermittelten Depolarisationen und Repolarisationen der Membran der inneren Haarzellen. (Abbildung 12 a) Anders als in den äußeren Haarzellen kommt es allerdings nicht zu Längenänderungen der Zellen, sondern in Folge der Depolarisation über einen nachgeschalteten Calcium-Einstrom an der basalen Zellmembran zur Transmitterausschüttung. (Abbildung 12 b und c) Das hierbei freigesetzte Glutamat erregt nun die Ausläufer der Nervenzellen des Ganglion spirale und erzeugt dort ein Aktionspotenzial. Dieser Vorgang wird als mechano-elektrische Transduktion bezeichnet und kennzeichnet die Umformung der mechanischen Wanderwelle zum elektrischen Nervensignal, das im Verlauf der Hörbahn im zentralen Nervensystem verarbeitet werden kann. (13, 14, 18)



Abbildung 12 Aktivierung der inneren Haarzellen und Aktionspotenzial des afferenten Neurons: a Die Auslenkung der Stereozilien ermöglicht den Einstrom von Kalium in die Zelle. b Dies führt zum Calcium-Einstrom in die Zelle über eine Membrandepolarisation c zur Transmittersekretion und zur Veränderung des Aktionspotenzials des afferenten Neurons; übernommen von Frings et al. (14)

1.4 Klinik und Pathophysiologie des Hörsturzes

Der Hörsturz ist eine in der überwiegenden Zahl der Fälle einseitige, akut auftretende Erkrankung der Schallempfindung. Die mit einem Hörsturz einhergehende Schallempfindungsstörung kann hierbei sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Klassischerweise wird die Schwerhörigkeit abhängig von der Frequenz in eine Hochton-, Mittelton-, Tiefton- oder pancochleäre Schwerhörigkeit eingeteilt. Eine besonders schwerwiegende Einschränkung der Schwerhörigkeit wird als Taubheit bezeichnet.

Der Schweregrad der Schwerhörigkeit wird üblicherweise nach der WHO-Graduierung eingeteilt. (Tabelle 2) Diese teilt die Schwerhörigkeit in fünf Grade, jeweils für jedes Ohr gemessen anhand des Mittelwerts der Einschränkung bei den für den menschlichen Sprachbereich typischen Frequenzen 0,5 kHz, 1 kHz, 2 kHz und 4 kHz und der klinischen Symptomatik. (11)

Alternativ wird der Schweregrad der Schwerhörigkeit in Anlehnung an den Vorschlag der europäischen Expertengruppe (EU Concerted Action on Genetics of Hearing Impairements) eingeteilt, ebenfalls jeweils gemessen als Mittelwert der Einschränkung bei den für den menschlichen Sprachbereich typischen Frequenzen 0,5 kHz, 1 kHz, 2 kHz und 4 kHz. Hier teilt sich dieser in eine milde Form mit einem Hörverlust von 20 – 40 Dezibel (dB), eine mittelgradige Form mit 40 – 70 dB Hörverlust und eine schwere Form mit einem Hörverlust von 95 dB. (76)

 Tabelle 2 Einteilung der Schwerhörigkeit nach dem Schweregrad (WHO) und allgemeine klinische Empfehlungen (11)

Grad der Schwerhörigkeit	Mittlerer Hörverlust im Reinton- Audiogramm	Klinischer Befund	Empfehlung
0 – normalhörig	bis 25 dB	keine oder nur leichte Probleme bei der Kommunikation, Patient kann Flüstersprache hören	Beratung, Verlaufskontrolle, bei Schallleitungsschwerhörigkeit OP-Indikation prüfen
1 – geringgradige Schwerhörigkeit	26-40 dB	Umgangssprache wird 1 m vor dem Ohr verstanden	Beratung, Hörgerät gegebenenfalls empfehlenswert, bei Schallleitungsschwerhörigkeit oder kombinierter Schwerhörigkeit gegebenenfalls operative Versorgung
2 – mittelgradige Schwerhörigkeit	41-60 dB	lautes Sprechen wird 1 m vor dem Ohr verstanden	Hörgerät ist zu empfehlen, bei Schallleitungsschwerhörigkeit oder kombinierter Schwerhörigkeit gegebenenfalls operative Versorgung
3 – hochgradige Schwerhörigkeit	61-80 dB	einige Worte werden bei sehr lautem Sprechen auf dem besseren Ohr verstanden	Hörgerät nötig. Falls kein Hörgerät möglich, prüfen, ob andere Hörsysteme in Frage kommen (implantierbares Hörgerät, Cochlea-Implantat); Lippenlesen und Zeichensprache unterstützend
4 – Hörreste oder Taubheit	81 dB oder mehr	keinerlei Sprachverständnis bei maximaler Lautstärke	Hörgerätetrageversuch, bei Scheitern in der Regel heute Indikation zur Cochlea- Implantation, gegebenenfalls auch Hirnstammimplantat-Versorgung; ergänzend gegebenenfalls Lippenlesen/Zeichensprache

1.4.1 Diagnostik

Aufgrund der besonders geschützten anatomischen Lage der Cochlea im Inneren des Felsenbeins ist es anders als beispielsweise bei der Funduskopie der Retina nicht möglich, die cochleäre Durchblutung zu beobachten. (77) Zu den gängigen Diagnostika des Hörsturzes gehören deshalb nicht-invasive Verfahren wie die klinische Anamnese und HNO-ärztliche Untersuchung, subjektive und objektive Audiometrie (Abbildung 13) und bildgebende Verfahren wie zum Beispiel CT, MRT und Angiographie sowie seltener Blutuntersuchungen, die einzeln oder zusammen der Abgrenzung anderer Erkrankungen mit akutem Hörverlust dienen. (78) (Tabelle 3)



Abbildung 13 Befund eines Patienten mit Hörsturz: Ton-Audiogramm mit einseitiger, im Tieftonbereich betonter, mittelgradiger Schallempfindungsstörung am rechten Ohr und ein altersentsprechender Befund am linken Ohr; aus der Audiologie der Klinik für HNO-Heilkunde am Klinikum der Universität München

Während sich die klinische Anamnese und Untersuchung sowie die Audiometrie vor allem der Innenohrfunktion nähern, geben die bildgebenden Verfahren unter Umständen Hinweise auf morphologisch fassbare Krankheitskorrelate. Die klinische Untersuchung kann gegebenenfalls im Gehörgang und Mittelohr gelegene Ursachen akuter Hörverluste aufdecken. Ebenso dienen die bildgebenden Verfahren dem Ausschluss retrocochleärer Ursachen wie intrakraniellen Tumoren und Hirninfarkten, während die lokale Auflösung für eine Begutachtung der cochleären Mikrostrukturen nicht ausreicht. (78)

Zumeist tritt ein Hörsturz ohne klar identifizierbare Ursache auf. In einer kleinen Zahl der Fälle kann eine klare Ursache des Hörsturzes definiert werden. Allerdings werden auch bei unbekannter Ursache häufig bestimmte Pathomechanismen vermutet. Neben diesen spezifischen Pathomechanismen weisen einige Studien auch auf eine multifaktorielle Genese hin. (3, 65, 79, 80)

Diagnostische Methode	Art der Untersuchung	
Anamnese und klinische Untersuchung	Eingehende allgemeine und Fachanamnese (*), HNO-Status (*), Blutdruckmessung (*), Ohrmikroskopie (*),	
	Untersuchung der HWS (**)	
Audiometrie		
- subjektive Tests	Stimmgabel (*), Ton-Audiometrie (*), Sprachaudiogramm (**), Glyceroltest (**)	
- objektive Tests	Tympanometrie (*), OAE (**), BERA (**), Stapediusreflex- Messung (**), ECochG (**), CERA (**), ASSR (**)	
Bildgebende Verfahren	MRT (Ausschluss eines Tumors), CT (Schädel, Felsenbein,	
(**)	HWS), Duplexsonographie	
Laboruntersuchungen	Blutzucker, CRP, Präcalcitonin, kleines Blutbild,	
(**)	Differenzial-Blutbild, Kreatinin, Fibrinogen, Serologie	
	(Borreliose, Lues, HSV-1, VZV, CMV, HIV)	
Sonstiges (**)	Elektronystagmographie/Video-Okulographie,	
	Tympanoskopie (ggf. therapeutisch bei Perilymphfistel),	
	interdisziplinäre Untersuchungen (z.B. Neurologie, Innere Medizin, Orthopädie, Humangenetik)	

 Tabelle 3 Diagnostik bei Hörsturz-Patienten: Methoden, notwendig (*) und im Einzelfall nützlich (**) (81, 82)

1.4.2 Vaskuläre Genese

Die Klinik des Hörsturzes sorgte bereits im 19. Jahrhundert dafür, dass eine vaskuläre Ursache vermutet wurde. Seitdem fokussierte sich die Forschung auf Durchblutungsstörungen in der Cochlea und Störungen der cochleären Mikrozirkulation. Gängige Mechanismen für diese Hypothese sind hier thrombotische beziehungsweise embolische Ereignisse, rheologische Störungen und Dysregulationen der Gefäße wie Vasospasmen. (47, 83, 84)

Es wird angenommen, dass Einschränkungen der lokalen Durchblutung zu einer ungenügenden Versorgung mit Nährstoffen und Entsorgung von Stoffwechselprodukten führen, sobald ein für die Aufrechterhaltung der Funktion notwendiger Grenzwert der Durchblutung unterschritten wird. In tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass bereits ein geringer Abfall des cochleären Blutflusses zu Funktionseinschränkungen führt. (85) Darüber hinaus gelten bestimmte Faktoren als den cochleären Blutfluss einschränkend. So scheinen hohe Blutfett- und Fibrinogen-Werte sowie pro-inflammatorische Mediatoren negative Effekte auf das Innenohr zu haben. (86)

Für ein ungünstiges Blutfett-Profil mit erhöhten LDL- und erniedrigten HDL-Werten konnte über eine verminderte NO-Produktion des Gefäßendothels eine negative Wirkung auf die cochleäre Durchblutung gezeigt werden. Außerdem konnten epidemiologische Zusammenhänge zwischen Gefäß-assoziierten Erkrankungen wie dem Schlaganfall, deren Risikofaktoren wie beispielsweise ein Diabetes mellitus, Rauchen, Parodontitis sowie eine Hyperfibrinogenämie und dem Hörsturz sowie weiteren Innenohr-Pathologien gezeigt werden. (87-91)

Auch Entzündungsreaktionen scheinen negativen Einfluss auf die cochleäre Durchblutung zu haben. Als zentraler Entzündungsmediator zeigte Tumornekrosefaktor (ehemals Tumornekrosefaktor alpha, TNF) über eine Aktivierung des Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Signalwegs vasokonstriktorische Effekte am Innenohr und eine Reduktion des cochleären Blutflusses. Für verschiedene inflammatorische Pathologien wie Autoimmunerkrankungen, Infektionen und andere systemische Entzündungszustände konnte eine TNF-Freisetzung gezeigt werden. Es ist denkbar, dass TNF über diesen Signalweg eine pathophysiologische Endstrecke zu einem Hörsturz mit vaskulärer Pathologie bildet. (63, 64)

1.4.3 Virale Genese

Neben der Theorie, dass vaskuläre Ursachen zum Hörsturz führen, werden auch auf das Innenohr übergreifende virale Infektionen verantwortlich gemacht. Zu den Viren, die mit dem Hörsturz assoziiert werden, zählen verschiedene Herpes-Viren (HSV-1, VZV, CMV), Masern-, Mumps-, Röteln- und Influenzaviren. Die tatsächliche Assoziation von vielen Viren bleibt aber kontrovers, da in vielen kleinen Hörsturz-Studienpopulationen kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu akuten viralen Infektionen hergestellt werden konnte. (92, 93)

Der Nachweis, dass virale Infektionen zum Hörsturz führen, ist schwer zu erbringen. Dies liegt vor allem daran, dass es kaum möglich ist, einen direkten Virus-Nachweis über beispielsweise eine PCR aus Proben des Innenohrgewebes beziehungsweise der Innenohrflüssigkeiten zu erbringen. Morphologische Korrelate möglicher abgelaufener Infektionen konnten allerdings schon im Felsenbein Verstorbener gefunden werden. (94) Es wurden in der Literatur Hypothesen für drei Mechanismen beschrieben, welche die Entstehung eines Hörsturzes in Folge einer viralen Infektion erklären könnten. Einer der Mechanismen beschreibt ein Übertreten der Virus-Infektion auf die Innenohrstrukturen, im Sinne einer viralen Cochleitis bzw. Neuritis (vestibulo-)cochlearis. Dabei könnten die Viren von benachbarten Räumen wie dem Mittelohr oder dem Liquorraum oder auch hämatogen ins Innenohr gelangen. Da viele der genannten Viren eher mit dem Auftreten im Kindesalter assoziiert werden, gilt als weiterer Pathomechanismus eine Virus-Persistenz im Innenohr bzw. Hörnerven und eine später auftretende Reaktivierung ähnlich der Gürtelrose der Haut, die zum Hörsturz führt. Ein dritter Pathomechanismus vermutet eine Immun-Kreuzreaktion mit Innenohr-Antigenen bei systemischen Virus-Infektionen, bei denen sich die spezifische Virusabwehr fälschlicherweise zusätzlich gegen die körpereigenen Strukturen richtet. (95, 96)

Die Endstrecke vieler viraler Pathologien beim Hörsturz scheint in einer vermehrten Glutamat-Ausschüttung der inneren Haarzellen und einer damit verbundenen Blockade der mechano-elektrischen Transduktion im Hörprozess zu liegen. Die Hörminderung kann anfangs reversibel sein, was insbesondere dann gilt, wenn der ursächliche schädigende Mechanismus unterbrochen werden kann. Bei einer Persistenz der Störung kommt es letztlich zu einem Untergang der Haarzellen und zu einer Atrophie des Hörnerven. (64, 97)

1.4.4 Autoimmunologische Genese

Da das Innenohr einige spezifische Molekülstrukturen enthält, die für die Innenohrfunktion von Bedeutung sind, können Immunreaktionen, die sich gegen diese speziellen Innenohr-Antigene richten, die Hörfunktion einschränken und zu einer Hörsturz-Symptomatik führen. (98-102)

Verschiedene Autoimmun-Reaktionen können das Innenohr hierbei schädigen. So könnten gegen Innenohr-Antigene gerichtete Auto-Antikörper oder T-Zellen mit einer direkten Schädigung genauso für eine Störung der Hörfunktion sorgen wie die Ablagerung von Immunkomplexen auf indirekte Weise mit einer Störung der Mikrozirkulation. (103-106) Es konnten mehrere Innenohrantigene identifiziert werden, von denen in Studien beispielsweise Cochlin und das P0-Antigen mit dem Hörsturz assoziiert wurden. (107, 108)

1.4.5 Endolymphatische Hydrops-Genese

Für einen Teil der Hörstürze wird die Menière-Krankheit verantwortlich gemacht. Ursächlich für den akuten Hörverlust ist in diesen Fällen die Ruptur der Reissner-Membran nach einem vorigen Endolymphstau, der als endolymphatischer Hydrops bezeichnet wird. Hierbei kann dem endolymphatischen Hydrops entweder eine nicht balancierte Zunahme der Endolymph-Produktion oder Abnahme der Endolymph-Resorption zugrunde liegen. (109, 110)

Durch die Zunahme der Endolymphe kann es bereits durch die mechanische Verlagerung der Basilarmembran zu Einschränkungen der Hörfunktion kommen. Beim Menière-Anfall kommt es über die Ruptur der dünnen Reissner-Membran zu einer akuten Entlastung des erhöhten endolymphatischen Drucks. Dies führt zu einer Durchmischung von Endolymphe und Perilymphe mit einem potentiellen Zusammenbruch des endocochleären Potenzials und einer Kalium-Intoxikation des perilymphatischen Gewebes. (111, 112)

1.5 Therapie des Hörsturzes

Gerade mit Blick auf evidenzbasierte Konzepte existieren für diese Erkrankung keine Therapien, die durch große verblindete Studien oder Meta-Analysen solcher Studien mit entsprechend hoher Evidenz belegt wären. Eine große Schwierigkeit liegt bereits darin, echte Therapie-Erfolge von den mit 40-60 Prozent sehr häufigen Spontanremissionen zu unterscheiden. Dies erschwert die Erfassung effektiver Therapiemöglichkeiten durch klinische Studien zusätzlich.

Deshalb wurde und wird in der Therapie des Hörsturzes häufig auf empirische Konzepte zurückgegriffen. Hierbei wird aufgrund der individuell vermuteten Ursache der Erkrankung mit dem jeweiligen Patienten die Therapie erarbeitet. Das Spektrum der Hörsturztherapien reicht dabei von abwartenden Ansätzen und dem Vermeiden von hoher Lautstärke und Anspannung sowie Anpassungen des Lebensstils zu einer Vielzahl medikamentöser Verfahren. Die aktuelle Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) empfiehlt für die medikamentöse Behandlung lediglich den Einsatz von Glucocorticoiden, die entweder systemisch mittels oraler beziehungsweise parenteraler Gabe oder lokal mittels Instillation in das Mittelohr verabreicht werden können. Supportive Behandlungsmaßnahmen sind in der akuten Therapie und im Verlauf häufig anzuraten und können beispielsweise auch Tinnitus-Beratungen und Verhaltenstherapien einschließen. (65, 80, 82, 113)

Grundsätzliche Ziele der angewandten, teils obsoleten Hörsturz-Therapien können zum Einen in einer positiven Beeinflussung der cochleären Durchblutung liegen, die durch eine Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes oder durch eine gefäßregulatorische Verbesserung des Blutflusses erreicht werden kann. Zum Anderen gibt es antiinflammatorische beziehungsweise antiapoptotischen Ansätze.

1.5.1 Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes

Zu den Therapieverfahren, die eine Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes zum Ziel haben, gehören neben verschiedenen Plasma-Expandern, die über ihre molekularen Eigenschaften Flüssigkeit osmotisch innerhalb des Gefäßes halten sollen, die Möglichkeit der Plasma-Apharese und Medikamente, die zusätzlich anti-inflammatorisch wirken.

In der Hörsturztherapie erprobte Plasma-Expander sind HES- und niedermolekulare Dextran-Infusionen. Sie sollten das Blutvolumen insgesamt und damit die Gewebeperfusion erhöhen und gleichzeitig den zellulären Blutanteil (Hämatokrit) und somit die Blutviskosität senken. In klinischen Studien konnte kein Wirksamkeitsnachweis erbracht werden. Die aktuelle AWMF-Leitlinie empfiehlt den Einsatz von HES-haltigen Lösungen deshalb explizit nicht mehr. (82, 84, 114)

Ein weiterer Ansatz liegt in der selektiven Plasma-Apharese, bei der kurz nach einem Hörsturzereignis selektiv die Fibrinogen- und LDL-Spiegel im Blutplasma verringert werden. Durch die Erniedrigung der beiden Plasma-Bestandteile sollen bei gleichbleibendem Hämatokrit und somit erhaltener Sauerstofftransportkapazität des Blutes die Blutviskosität und die Blutgerinnungsneigung erniedrigt sowie die Funktion des Endothels zur NO-Produktion verbessert werden, sodass es zu einer verbesserten Gewebsperfusion kommt. Es vielversprechende Studienergebnisse, die besonders zeigten sich zwar für ein Patientenkollektiv mit hohen Ausgangswerten für die Fibrinogen- und LDL-Spiegel galten, aber gegenüber konventionellen Infusionstherapien keine statistisch signifikanten Vorteile zeigten. (115, 116)

Auch das Antidementivum Piracetam wurde in der Therapie des Hörsturzes untersucht, da neben der Förderung der Durchblutung ebenfalls eine bessere Sauerstoff- und Zuckerverwertung im minderversorgten Innenohr angenommen wurde. (117, 118)

Daneben werden Thrombozyten-Aggregationshemmer wie ASS und Pentoxifyllin eingesetzt. Auch sie sollen die Blutviskosität erniedrigen und außerdem eine Gerinnung des Blutes verhindern und anti-inflammatorisch wirken. ASS ist vor allem in der Akuttherapie und Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen erprobt. Allerdings konnte für ASS in einer kleinen Studienpopulation von Hörsturz-Patienten kein zusätzlicher Nutzen gegenüber einer spontanen Remission festgestellt werden. Außerdem ist für ASS, insbesondere bei Intoxikationen, sogar eine ototoxische Wirkung beschrieben. (116, 119, 120) Das Xanthin-Derivat Pentoxifyllin ist bei einer Vielzahl von Durchblutungsstörungen wie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, degenerativen Gefäßerkrankungen des Auges, Gehirns und Innenohres indiziert. Auch für dieses Medikament fehlt ein Wirksamkeitsnachweis in der Therapie des Hörsturzes. (91, 121, 122) Auch für Ginkgo biloba-Extrakte, die in der Therapie des Hörsturzes und von Ohrgeräuschen eingesetzt werden, sind ein ähnlicher Wirkungsmechanismus und eine umstrittene Wirksamkeit beschrieben. (123, 124)

Allen genannten Wirkstoffen dieses Abschnitts fehlt letztlich eine Therapie-Empfehlung laut AWMF-Leitlinie zum Hörsturz. Therapien wie die Infusion HES-haltiger Lösungen sind sogar kontraindiziert. (82)

1.5.2 Gefäßregulatorische Verbesserung des Blutflusses

Ein weiterer genereller Ansatz in der Hörsturztherapie liegt darin, in die Gefäßregulation einzugreifen, um beispielsweise den Gefäßquerschnitt in zuführenden Gefäßen zu erweitern und damit den Blutfluss zu verbessern. In diesem Zusammenhang wurde eine Vielzahl von Wirkstoffen erprobt, wobei die tatsächliche Wirksamkeit weiterhin umstritten ist. Einige der Medikamente wie Calcium-Kanal-Antagonisten (beispielsweise Nifedipin und Nimodipin) stehen besonders in der Kritik, da sie auch die gesunden Gefäße erweitern und die Durchblutung in minder-perfundiertem Gewebe sogar erniedrigen könnten. Dies wird als Steal-Phänomen bezeichnet. (125-128) Auch die Prostaglandine E1 und I2 wurden als vasoaktive und Gerinnungs-hemmende Substanzen in der Hörsturztherapie untersucht. (129, 130)

Der hyperbaren Sauerstofftherapie werden von einigen Autoren im akuten Stadium des Hörsturzes Therapie-Erfolge in bis zu 50 % der Fälle zugeschrieben. Bei diesem Therapie-Verfahren halten sich die Patienten mehrfach für einige Stunden in einer Überdruckkammer auf und erhalten als Atemluft hoch angereicherten Sauerstoff. Eine weitere Studie konnte zwar mit der Infusionstherapie vergleichbare Erfolge erzielen, jedoch bleibt die tatsächliche klinische Bedeutung der Ergebnisse unklar. (131)

Betahistin findet seine Anwendung hauptsächlich in der Therapie und Anfallsprophylaxe des Morbus Menière. Bei dieser Erkrankung soll es die Zahl der Schwindelzustände und Hörsturzereignisse verringern. In der Therapie sonstiger Hörsturze ist es in der Wirksamkeit nicht belegt. (132-134)

1.5.3 Anti-inflammatorische/anti-apoptotische Therapie

Neben der Beeinflussung der cochleären Durchblutung ist ein vielfach versuchter Ansatz der Hörsturztherapie gegen eine Entzündungsreaktion des Innenohrgewebes und den Untergang der Haarzellen gerichtet. In kleinen Studienpopulationen wurden mehrere Substanzen erprobt, die gegen pro-inflammatorische Radikale wirken sollen, die im geschädigten Gewebe vermehrt vorhanden sein sollen. Unter diesen Substanzen finden sich unter anderem Glutathion, Melatonin, Allopurinol, Magnesium, Selen und die Vitamine A, C und E. Für Vitamin C konnte zuletzt eine frühe klinische Studie signifikante Verbesserungen gegenüber einer Placebo-Therapie zeigen, deren Ergebnisse in größer angelegten Studien noch bestätigt werden müssen. (135-138) Für die Substanz AM-111, ein Ligand der c-Jun N-terminalen Kinase aus der Klasse der so genannten Stress-Kinasen, konnte transtympanal injiziert ebenfalls in kleinen Studienpopulationen eine signifikante Wirkung bei schweren Fällen von akustischen Traumata und Hörstürzen gezeigt werden. (139-142)

Substanzen, deren Effekte nach transtympanaler Injektion ebenfalls untersucht wurden, sind Taurine, Insulin-like Growth Factor 1 und vor allem Glucocorticoide wie Methylprednisolon. Glucocorticoide werden seit langem in der Therapie des Hörsturzes eingesetzt, obwohl der Nutzen der Behandlung teilweise weiterhin bezweifelt wird. Trotzdem sind Glucocorticoide die derzeit einzige von der AWMF-Leitlinie empfohlene, primäre medikamentöse Therapie des Hörsturzes. Nach Abwägung der Nebenwirkungen ist eine systemische hochdosierte oder nach Absprache mit den Patienten auch primär eine lokale, intratympanale Glucocorticoid-Therapie empfohlen. Beide Applikationswege gelten in der primären Therapie als gleichwertig. Bei ungenügendem Erfolg einer systemischen Erstbehandlung kann den Patienten auch noch ein intratympanaler Therapie-Versuch angeboten werden. (82, 116, 143-149)

Zuletzt wurde auch vermehrt die Wirkung von anti-inflammatorischen Medikamenten, die der Therapie rheumatischer und Autoimmun-Erkrankungen entlehnt sind, in der Behandlung von Innenohrerkrankungen getestet. Im Fokus der Forschung sind vor allem Tumornekrosefaktor-Inhibitoren aus der Medikamentenfamilie der Biologika. Bevorzugte Indikation haben diese Medikamente bei Innenohrerkrankungen, in denen eine autoimmunologische oder entzündliche Ursache vermutet wird. (150-156)
1.6 Tumornekrosefaktor, Sphingosin-1-Phosphat und spezifische Inhibitoren

Auch in aktuellen Meta-Analysen wird der Anteil des Auftretens eines Hörsturzes ohne bekannte Ursache noch mit über 70% eingestuft. Daneben gelten vor allem virale Infektionen, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen sowie Durchblutungsstörungen des Innenohres als weitere etablierte Ursachen. (116) Außerdem konnten klinische Untersuchungen Korrelationen zwischen dem Hörsturz und kardiovaskulären Erkrankungen sowie einigen derer Risikofaktoren feststellen. (89, 157)

1.6.1 Tumornekrosefaktor

Eine Gemeinsamkeit der Ursachen ist neben dem Einfluss auf die Durchblutung eine begleitende inflammatorische Antwort, die letztlich auch zur weiteren Schädigung des betroffenen Gewebes beiträgt. (158) Ein zentraler Akteur im Geschehen des Hörsturzes könnte deshalb TNF sein, da es sowohl die entzündliche Reaktion vermittelt als auch Auswirkungen auf die Mikrozirkulation haben kann. So ist TNF ein Zytokin, das als wesentlicher Faktor in der Pathophysiologie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen gilt. (159, 160)

TNF ist stark pro-inflammatorisch und spielt eine wichtige Rolle in der Immunmodulation, Entzündung, Tumorabwehr und Kachexie, Hämatopoese, beim septischen Schock und der viralen Replikation. (159, 161-163) Es wird vor allem von aktivierten Makrophagen als Antwort auf Immunstimulationen hergestellt. Seine zytotoxische Wirkung entfaltet sich vor allem bei transformierten Zellen, wohingegen es in normalen, diploiden Zellen beispielsweise eine Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten, eine Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen oder eine Proliferation von Fibroblasten auslösen kann. Daneben ist TNF auch für seine vasokonstriktorischen Effekte bekannt. (64, 164, 165) In der Zirkulation liegt es als Homotrimer vor. (166) TNF (ehemals TNF- α) und das struktur-verwandte Lymphotoxin- α (ehemals TNF- β) binden beide an die TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. (167)

Für TNF konnte bereits eine Beteiligung an der Pathogenese von Innenohrfunktionsstörungen nachgewiesen werden. (168) Außerdem sind zelluläre Quellen von TNF im Innenohr bekannt, sodass ein direkter Einfluss auf die cochleäre Mikrozirkulation denkbar erscheint. (169)

1.6.2 Etanercept

Der TNF-Inhibitor Etanercept gehört in die Gruppe der biotechnologisch hergestellten Medikamente (Biologika). Das Fusionsprotein besteht aus der Liganden-Bindungsdomäne des Tumornekrosefaktor-Rezeptors 2 und der Fc-Untereinheit des humanen IgG1-Antikörpers. Aufgrund der Liganden-Bindungsdomäne des TNF-Rezeptors 2 ist Etanercept in der Lage TNF und Lymphotoxin- α zu binden. (170)

Etanercept ist von der amerikanischen Medikamenten-Zulassungsstelle FDA (Food and Drug Administration) für die Behandlung der mittelschweren bis schweren Rheumatoiden Arthritis, juvenile idiopathische Arthritis und Plaque-Psoriasis sowie Psoriasis-Arthritis und ankylosierender Spondylitis zugelassen und in der Behandlung dieser Krankheiten eingesetzt. (171-173) Unter der Therapie von TNF-Inhibitoren ist das Wieder-Auftreten einer latenten Tuberkulose-Infektion vermehrt. (174, 175)

1.6.3 Sphingosin-1-Phosphat und JTE-013

Die Wirkungsvermittlung von TNF könnte im Innenohr Sphingosin-1-Phosphat (S1P) übernehmen. TNF ist einer der stärksten Aktivatoren der Sphingosin-Kinase 1, die das prokonstriktive Phospholipid S1P bildet. (176)

Sphingosin-1-Phosphat ist ein bioaktives Lipid, das in vielen Bereichen der Zellbiologie aktiv ist. Beispiele sind die Proliferation, das Zell-Überleben und -Migration, die Zytoskelett-Organisation und die Morphogenese. Es kann an fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (S1P₁/EDG-1, S1P₂/EDG-5, S1P₃/EDG-3, S1P₄/EDG-6 oder S1P₅/EDG-8) binden und auf diese Weise seine Wirkung vermitteln. (177-179) S1P kann den Tonus glatter Muskelzellen erhöhen und damit den Blutfluss senken. (180)

JTE-013 ist ein selektiver Rezeptorantagonist am S1P₂/EDG-5-Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass JTE-013 die von S1P inhibierte Wanderung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen sowie B16 Melanom-Zellen ermöglicht. (181-183) Außerdem verhindert JTE-013 die Akkumulation von cAMP in glatten Muskelzellen der Koronargefäße und deren durch S1P ausgelöste Kontraktion sowie die S1P-induzierte Steigerung des Portalvenendrucks der Leber. (184-186) Für das SK1/S1P-System wurde bereits eine Rolle in der Regulation der cochleären Mikrozirkulation nachgewiesen. (63, 187)

2 Fragestellung und wissenschaftliche Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle von TNF in der Pathogenese des Hörsturzes untersucht werden. Im Verlauf des Projekts soll des Weiteren der Einfluss von spezifischen Inhibitoren auf die Wirkung von TNF getestet werden, um mögliche Ziele für die Therapie des Hörsturzes zu identifizieren.

Als Indikator für die Innenohrfunktion dient der im Tierexperiment beobachtete Blutfluss in Mikrogefäßen der Stria vascularis. Hierfür steht ein etabliertes Innenohrmodell am Meerschweinchen zur Verfügung, das in der Arbeitsgruppe weiter modifiziert und für die Hörsturzforschung angepasst wurde. (188, 189)

Hieraus ergeben sich die folgenden Fragestellungen, die in diesem Projekt evaluiert werden sollen:

1. Besitzt TNF dosisabhängige Wirkungen auf die cochleäre Mikrozirkulation?

2. Kann der TNF-Inhibitor Etanercept eine später erfolgende Wirkung von TNF auf die cochleäre Mikrozirkulation verhindern?

3. Können der TNF-Inhibitor Etanercept und der S1PR2-Antagonist JTE-013 die Wirkung von TNF auf die cochleäre Mikrozirkulation nachträglich umkehren?

3 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sowie die notwendigen Vorversuche fanden im Zeitraum zwischen Oktober 2010 und Juni 2013 im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität statt. Während des Erlernens und der Etablierungsphase wurden die Versuche nach dem Tierschutzgesetz (insbesondere Tierschutzgesetz Artikel 8 und Artikel 7a Satz 1 Nummer 7, 1 und 2) mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531.3-9-10 und für die weiteren Versuche dann unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-1-54-2531-123-10 durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Für das Erlernen und Modifizieren der Methode, Vorversuche zur Superfusion und den kombinierten Einsatz von Intravitalmikroskopie und audiologischen Verfahren sowie die in dieser Arbeit dargestellten Versuchsreihen wurden insgesamt 130 weibliche Albino Hartley Meerschweinchen der Firma Charles River Wiga (97633 Sulzfeld) verwendet.

Die Tierhaltung erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 23 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% sowie einem Hell-Dunkel-Zyklus im Verhältnis 14 zu 10 Stunden in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums der Ludwig-Maximilians-Universität (Marchioninistr. 27, 81377 München). Neben einer standardisierten Futtermischung für die Meerschweinchenhaltung und Einstreu der Firma Altromin (32791 Lage) stand den Tieren Wasser ad libitum zur Verfügung. Es waren jeweils bis zu zehn Tiere in einem Gehege mit Freilauf untergebracht. Nach der Anlieferung durch die Firma Charles River Wiga wurde eine Ruhezeit von mindestens 2 Tagen eingehalten, bevor Tiere in die Versuche eingeschlossen werden konnten.

3.2 Narkose und Monitoring

Zur Narkoseeinleitung wurden die wachen, spontan atmenden Tiere in eine luftdichte Kunststoffkammer gesetzt, in die für zehn Minuten eine kurzwirksame Narkosegasmischung eingeleitet wurde. Diese volatile Narkosemischung bestand aus 1,0 l/min Sauerstoff (O₂), 0,5 l/min Lachgas (N₂O) und 2,5 Volumenprozent Isofluran (Forene 100% (V/V), Abbott, 65205 Wiesbaden). Im direkten Anschluss an die volatile Narkose erfolgte die Umstellung auf eine länger wirksame, Gewichts-adaptierte Intraperitoneal-Narkose und das kontinuierliche Monitoring von Herzfrequenz und peripherer Sauerstoffsättigung mit einem Pulsoxymeter (NONIN SpO₂, HF Messung, mediquip Medizintechnik, 79199 Kirchzarten) am rechten Hinterlauf. Die Narkoselösung bestand aus 85 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Ketavet 100 mg Injektionslösung, Pharmacia, 10785 Berlin), 8,5 mg/kg KG Xylazin (Rompun 2% Injektionslösung, Bayer Vital, 51373 Leverkusen) und 0,25 ml/kg KG physiologische Kochsalzlösung. Zur Erhaltung der Narkose wurde halbstündlich eine intraperitoneale Injektion der Lösung in halber Dosis (42,5 mg/kg KG Ketamin, 4,25 mg/kg KG Xylazin und 0,125 ml/kg KG physiologische Kochsalzlösung) verwendet. Mit diesem Verfahren wurde ein chirurgisches Allgemeinanästhesie-Niveau erreicht. (190-192)

Die Narkosemischung aus Ketamin und Xylazin bietet eine gute Kombination aus Analgesie und Muskelrelaxation. Die sympathomimetischen Wirkungen des Ketamins dämpfen außerdem die Xylazin-induzierte Bradykardie und AV-Blöcke. Dies ist einer der Gründe für die relativ geringen Einflüsse dieser Narkose auf die Vitalparameter Herzfrequenz, Blutdruck, Temperatur und Atemfrequenz. Zusätzlich sind beide Medikamente in der Durchführung von Laborversuchen in verschiedenen Tier-Modellen seit langem erprobt und deren pharmakologische Wirkungen bekannt. (193-197)

Zusätzlich zur intraperitonealen Narkose wurde die Atemluft der Tiere mit einer Maske kontinuierlich mit ca. 2-3 l/min Sauerstoff und 0,5 l/min Lachgas angereichert. Um Flüssigkeitsverluste auszugleichen und einen unveränderten renalen Blutfluss zu gewährleisten wurde den Tieren intravenös kristalloide Lösung zugeführt (NaCl 0,9% (Braun, 34212 Melsungen), ca. 80 µl/kg KG/min). Um die Augen der Tiere während den Versuchen vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Dexpanthenol-haltige Augensalbe appliziert (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, 51373 Leverkusen; 50 mg Dexpanthenol/g).

Das Hautareal um das äußere Ohr und am linken Hals wurde zusätzlich mit ca. 0,2 ml bzw. 0,1 ml Prilocainhydrochlorid-Lösung (Xylonest 1%, AstraZeneca, 22880 Wedel, 10 mg Prilocainhydrochlorid/ml Injektionslösung) lokal anästhesiert, um die besonderen Schmerzreize bei der Hautinzision besser zu kontrollieren und den Verbrauch der Allgemeinanästhesie zu vermindern.

Die gewählte Kombination von verschiedenen Anästhesieformen und supportiven Maßnahmen hat eine sehr gute Anästhesietiefe und Schmerzfreiheit bei möglichst geringer Beeinträchtigung der Vitalfunktionen der Tiere im kompletten Versuchsverlauf gewährleistet. (198)

Nach Abschluss der Messungen beziehungsweise beim Eintritt von Abbruchkriterien wie einem plötzlichen andauernden Abfall der Herzfrequenz oder der Sauerstoffsättigung wurde die Euthanasie der narkotisierten Tiere durch eine intraperitoneale, körpergewichtsadaptierte Injektion von Pentobarbital (3 ml/kg KG, Narcoren, 16 g / 100 ml, Merial, 85399 Hallbergmoos) induziert. (199-201)

3.3 Lagerung

Für die Lagerung der Tiere wurden eine eigens für den Zweck hergestellte Vorrichtung mit Dreipunkt-Kopfhalterung sowie eine Heizplatte verwendet. So konnte die Kopfposition während der Präparation und den Messungen fixiert und die Körpertemperatur während der Narkose konstant bei 37,5-38,5° Celsius rektaler Temperatur gehalten werden. Zur Durchführung der Präparationen am äußeren Ohr, dem Mittelohr und der Fensterung der Cochlea sowie der Messungen unter dem Intravitalmikroskop wurden die Tiere auf dem Bauch gelagert, der Kopf zur linken Seite gedreht und in der Halterung fixiert. Dies ermöglicht die Sicht in die rechte Bulla, die große pneumatisierte Mittelohrhöhle der Tiere, auf die rechte Cochlea durch das Operations- und Intravital-Mikroskop. Die Bulla tympanica, die die Mittelohrhöhle darstellt, ist bei Nagetieren immer pneumatisiert, sodass diese sich besonders als Versuchsmodelle für die Darstellung der Cochlea eignen. (202)

Um den zentralen Venenkatheter in die linke Vena jugularis zu platzieren, wurden die Tiere in einer rechts-seitigen Rückenlage gelagert. Außerdem wurde das linke Vorderbein mit einem Streifen Leukoplast aus dem Sichtfeld des Operationsmikroskops geschwenkt und fixiert.

3.4 Chirurgische Technik

Nach der Umstellung der volatilen auf die intraperitoneale Narkose, dem Beginn des pulsoxymetrischen Monitorings und der Applikation der Augensalbe wurden die Hautareale der Operationsgebiete mit einem Langhaarschneider (Elektra II GH 204, Aesculap, 78532 Tuttlingen) rasiert. Danach wurden die Tiere in der Kopfhalterung fixiert und auf der Heizplatte in Bauchlage platziert. Alle folgenden Operationsschritte wurden unter einem Leica Operationsmikroskops (Leica, Wild Heerbrugg M650, 35578 Wetzlar) durchgeführt.

3.4.1 Präparation des äußeren Ohrs und des Mittelohrs

Nach der Einwirkzeit der lokalen Anästhesie erfolgte die kreisförmige Hautinzision mit einem Einmalskalpell (Feather disposable No. 11, Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan) um das rechte äußere Ohr. Anschließend wurde in der Faszienschicht das äußere Ohr in Richtung des äußeren Gehörgangs knapp außerhalb dessen Austritts aus dem Schädel präpariert. Schließlich wurde der Gehörgang an dieser Stelle durchtrennt und das äußere Ohr entfernt. Nun erfolgte die gezielte Blutstillung der die Ohrmuschel versorgenden Gefäße mit bipolarem Strom (Erbotom T 400 C, Erbe Elektromedizin, 72072 Tübingen). Nach der Durchtrennung des M. temporalis erfolgte die stumpfe Freilegung des die Bulla bedeckenden Knochens am Übergang zum temporalem Hirnschädel und schließlich die mechanische Eröffnung der Bulla über einen Zugang am dorsalen Rand des Gehörgangs.



Abbildung 14 Präparation des Außen- und Mittelohres: Nach der Entfernung der Außenohr- und Mittelohrstrukturen liegt die Cochlea gut sichtbar in der Bulla des Felsenbeins (Ausschnittsvergrößerung).

Im Verlauf werden nun Teile des Gehörgangs, das Trommelfell, die Gehörknöchelchenkette und Teile des M. tensor tympani entfernt und der Zugang so weit erweitert, dass sich die Cochlea innerhalb der Bulla gut dargestellt. (Abbildung 14)

3.4.2 Präparation des zentralen Venenkatheters

Nach der Umlagerung in die rechts-seitliche Rückenlage und lokalen Anästhesie der lateralen Halshaut, erfolgte die Hautinzision. Die linke Vena jugularis interna wurde unter dem Leica Operationsmikroskop im Folgenden frei präpariert (Abbildung 15 A), mit einer Mikroschere (Mikro-Federschere 11cm, Aesculap, 78532 Tuttlingen) eröffnet und einem an eine Einwegspritze angeschlossenen Polyethen-Schlauch (Portex Polythene Tubing, innerer Durchmesser: 0,28 mm, äußerer Durchmesser: 0,61 mm, Smiths Medical International Ltd., London, England; BD Microlance 3, 30G ½, Becton Dickinson, 69126 Heidelberg; BD Plastipak 1 ml Spritze Luer (PP), Becton Dickinson, 69126 Heidelberg) katheterisiert. (Abbildung 15 B) Vor der Katheterisierung wurde das Spritzen-Schlauch-System mit physiologischer NaCl-Lösung luftfrei aufgezogen. Der Katheter wurde mit Ligaturfaden (4/0 Sutupak, Ethicon Perma-Hand Seide, Johnson&Johnson Intl., 41470 Neuss) fixiert und konnte nun auf seine Funktionalität überprüft werden. Schließlich wurden die Hautränder mit Leukoplast-Streifen adaptiert. (Abbildung 15 C)



Abbildung 15 Katheterisierung der linken V. jugularis: A Vorbereitung des Gefäßes, B Katheter in situ, C Katheter fixiert und Hautinzision versorgt

3.4.3 Cochleäre Fensterung

Als letzter operativer Schritt wurde nach Umlagerung in die Bauchlage ein kleines rechteckiges Fenster in der lateralen Wand der zweiten bis dritten cochleären Windung angelegt. (Abbildung 16 A) Mit einem spitzen Skalpell (Feather disposable No. 11, Feather Safety Razor Co, Ltd., Osaka, Japan) wurde die Wand der Cochlea zuerst angeritzt und ausgedünnt, um den entstehenden Knochendeckel möglichst schonend herauslösen zu können.

3.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Floureszenzmikroskopie (Intravitalmikroskopie; IVM) dient der Darstellung von Mikrogefäßen und der Erfassung von unterschiedlichen Mikrozirkulationsparametern. (Abbildung 16) Generell ist es möglich, Gefäße und Durchblutung des Gewebes durch die Bestimmung von Parametern wie der Kapillardichte. Gefäßdurchmessern und Flussgeschwindigkeiten zu erfassen sowie auch funktionelle Blutzellen wie zum Beispiel durch das Endothel wandernde Leukozyten zu quantifizieren. Zur Bestimmung des cochleären Blutflusses ist insbesondere die Erfassung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und des Kapillardurchmessers notwendig. (203, 204)

In der Bildgebung von lebendem Gewebe ist es häufig nötig, den Kontrast in den zu beobachtenden Bereichen zu verbessern. Oft wird die selektive Fluoreszenz markierter Strukturen ausgenutzt. Hierfür können zur besseren Darstellung des Kapillarbettes Fluoreszenzfarbstoffe verabreicht werden. (Abbildung 16 B)

3.5.1 Fluoreszeinisothiozyanat

Den Tieren wurde zur Darstellung der cochleären Mikrogefäße 0,1 - 0,2 ml 5% Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-Dextran (FITC-Dextran, MW 500.000, 5 g/dl gelöst in 0,9% NaCl-Lösung; Sigma Aldrich, 82024 Taufkirchen bei München) über den zentralen Venenkatheter zugeführt. Das Volumen des Kontrastmittels macht deutlich weniger als fünf Prozent des Blutvolumens eines 300 g schweren Tieres aus und hat keinen Einfluss auf die Hämodynamik.

FITC-Dextran dient als Plasma-Marker, sodass das Blutplasma in den Gefäßen während den IVM-Aufnahmen hell und die Erythrozyten dunkel erscheinen. (Abbildung 16 B) Dieser Kontrast ermöglicht die Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. (205, 206)

Dextrane sind nicht-toxische Polymere, die sich durch chemische Stabilität auszeichnen und in verschiedenen Molekülgewichten verfügbar sind. FITC-Substituenten sind bei Raumtemperatur und neutralen pH-Werten stabil und verteilen sich sehr gleichmäßig über die Dextranmoleküle. FITC wird über Thiocarbamyl-Bindungen an das Dextran gebunden, ohne dabei die Dextranmoleküle zu depolymerisieren. Das FITC-markierte Dextran zeigt im Vergleich zu unmarkiertem Dextran unveränderte Permeabilitätseigenschaften, ist in vitro und in vivo gleichbleibend stabil und sehr gut bioverträglich. (205)

Aufgrund des verwendeten, hohen Molekülgewichts verbleibt das FITC-Dextran lange im Gefäßlumen, da erst bei einer Molekülgröße unter 70 kDa mit einer Extravasation über eine Diffusion durch das Endothel zu rechnen ist. Außerdem ist auch die Ausscheidung über die Nieren bei dieser Molekülgröße sehr gering. Die Halbwertszeit hängt direkt vom Abbau über die Amylase im Blut des Tieres ab, die Dextrane spaltet. Bis es vermehrt zu kleinen Spaltprodukten des FITC-Dextrans kommt, vergehen einige Stunden. Da die Versuche ab der Injektion der FITC-Dextran-Lösung kürzer als eine Stunde sind, ist eine relevante Extravasation während der Messungen nicht zu befürchten. (206-208)



Abbildung 16 Cochlea-Fenster: A Schematische Darstellung des chirurgisch etablierten Fensters in der lateralen Cochlea-Wand, modifiziert von Ren et al. (188); B Cochlea-Fenster in der Intravitalmikroskopie mit FITC-Dextranmarkierten Gefäßen der Stria vascularis

3.5.2 Technischer Aufbau

Direkt nach der Fensterung der lateralen Cochlea-Wand und der anschließenden Injektion von FITC-Dextran wurden die Tiere auf einem Präzisions-X-Y-Tisch (Märzhäuser, 35579 Wetzlar) unter dem Mikroskop platziert. (Abbildung 17) Bei dem Mikroskop handelt es sich um ein modifiziertes Zeiss-Mikroskop (Axiotech Vario, Carl Zeiss, 37081 Göttingen), das sein Licht von einer 100 W Quecksilberlampe (HBO, Osram, 80807 München) und einer FluoArc Lichtquelle (Leitz, 35578 Wetzlar) erhält und mit dem die mit FITC-Dextran als Plasma-Marker kontrastierten Gefäße innerhalb des Cochlea-Fensters in Epiilluminationstechnik beobachtet werden können. Hierbei wird das erzeugte Licht durch einen Filterblock geleitet (Anregung: 450-490 nm; Emission: ≥515 nm), der ein zum Fluorochrom FITC passendes Spektrum emittiert.



Abbildung 17 Versuchsaufbau während der Intravitalmikroskopie

Aufgrund des kleinen Zugangs und der mehrere Millimeter messenden Distanz zur Cochlea wurde für die Versuche ein 20x Plan-Fernobjektiv mit einem Arbeitsabstand von 21 mm und einer numerischen Apertur (A_N) von 0,25 verwendet (Olympus SLMPLN20x; 20x, A_N 0,25, ∞ /-, FN 26,5; Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Die Aufnahmen auf Videokassette (S-VHS Videokassetten; Sony, Tokyo, Japan) wurden mit einer Videokamera (C2400-08; Hamamatsu, Hamamatsu, Japan) und einem digitalen Videorekorder (Sony DV Digital Videocasette recorder DSR-45D DV Cam; Sony, Tokyo, Japan) gemacht. Als Hilfe für die spätere Auswertung wurde mit einem in das Videosignal eingeblendeten Videozeitgenerator (For A Video Timer VTG-33; For A Company limited, Tokyo, Japan) das aktuelle Datum und Uhrzeit mit aufgezeichnet und außerdem zur Kontrolle der Bildqualität das Aufnahmebild auf einen separaten Bildschirm (Sony Fernseher 48 cm Bilddiagonale; Sony, Tokyo, Japan) übertragen.

3.5.3 Superfusion

Nach der basalen Messung der Mikrozirkulationsparameter begann das Superfusionsprotokoll entsprechend der Versuchsprotokolle. Es schließen sich drei Zyklen aus jeweils Superfusion mit 0,2 - 0,3 ml der entsprechenden Lösung zum Auffüllen der Bulla, dem Absaugen der Bulla-Flüssigkeit nach der Einwirkzeit und Video-Aufnahme der Mikrozirkulation im Cochlea-Fenster an. Die Verum- und Vehikel-Lösungen wurden vor den Versuchen verblindet. Die Verblindung wurde erst nach der Auswertung aufgehoben.

3.5.4 Parameter der cochleären Mikrozirkulation

Nach Abschluss aller Aufnahmen für eine Versuchsreihe wurden die Video-Sequenzen mit der Bildanalyse-Software Cap Image (Cap Image; Dr. Zeintl, 69115 Heidelberg) ausgewertet. Mit diesem Programm ist es möglich, verschiedene Mikrozirkulationsparameter auszuwerten. (Abbildung 18) Neben der für diese Versuche ausgewerteten Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser können beispielsweise die Gefäßdichte und Extravasation bestimmt werden. (203, 204, 209, 210)



Abbildung 18 Offline-Auswertung: Zwei Gefäße (a+b) sind zur Auswertung der Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit und ein Gefäß in drei Bereichen (1-3) zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers markiert.

Die verwendete Software Cap Image war vor der Auswertung mit einer normierten Schablone für die Mikroskop- und Aufnahme-Einstellungen kalibriert worden.

3.5.4.1 Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit wurde die Line-Shift-Diagramm-Methode benutzt. Hierbei wurde der Gefäßverlauf manuell innerhalb des Lumens nachgefahren und eine Messlinie gezogen. (Abbildung 18 a und b) Diese Messlinie wurde dann im zeitlichen Verlauf (X-Achse) über ca. 10 Sekunden parallel zur Y-Achse des Diagramms abgebildet. (Abbildung 19) Die auf der Messlinie über die Zeit gewonnenen Grauwertdaten wurden nun als Muster abgebildet. Der Kontrast von Plasma und Blutzellen stellte sich so als diagonale Linien dar, wobei das angefärbte Plasma helle und die Blutzellen dunkle Linien erzeugten. (Abbildung 19) Über Mittelwerte der Steigung dieser diagonal verlaufenden Linien, die dem Weg pro Zeit entsprachen, ergaben sich objektive und reliable Werte für die Flussgeschwindigkeit. Pro Gefäß und Messzeitpunkt wurden mindestens drei der ermittelten Geschwindigkeitswerte zu einem Mittelwert zusammengefasst.



Abbildung 19 Bestimmung der Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit mit der Line-Shift-Methode: Die Wanderung des FITC-Dextran-markierten Blutplasmas wird über den Gefäßverlauf für 10 Sekunden verfolgt. Anhand der definierten Strecke und der jeweils benötigten Zeit der Plasmawanderung kann die Geschwindigkeit jeweils errechnet und ein Mittelwert für das jeweilige Gefäß gebildet werden.

Die Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit wurde wie oben beschrieben an mindestens vier Kapillaren des aufgenommenen Gefäßbetts mit der Cap Image-Software ausgewertet und bestimmt. Es wurden bei dem individuellen Tier an allen vier Messzeitpunkten dieselben Gefäße ausgewertet.

3.5.4.2 Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser wurden analog an den bereits für die Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit ausgewerteten Gefäßen bestimmt. Hierzu wurden an den genannten Gefäßen, für die vier Messzeitpunkte je Gefäß im jeweils selben Gefäßabschnitt, der Mittelwert aus drei Gefäßdurchmessern in μ m bestimmt. (Abbildung 18 1-3) Die Durchmesser wurden durch manuelle Markierung der Gefäßwände in einer Senkrechten zur Gefäßtangentiale im Standbild bestimmt.

3.5.4.3 Cochleärer Blutfluss

Um aus den gewonnenen Werten den cochleären Blutfluss zu errechnen, wurde eine Formel nach Baker und Wayland für den Gefäßfluss in Mikrogefäßen benutzt. Hierbei errechnete sich der cochleäre Blutfluss q aus der gemittelten Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit v und dem gemittelten Gefäßdurchmesser d eines Gefäßes zum jeweiligen Messzeitpunkt nach der Formel $q = (\frac{v}{1.6}) \times (\frac{d}{2})^2 \times \pi$. (211) Die Konstante 1,6 in der Formel geht auf die Beobachtung zurück, dass die gemessenen Werte für den Fluss abhängig vom Durchmesser der Kapillaren sind und deswegen einen Anpassungsfaktor benötigen. (212)

3.6 Bei der Superfusion verwendete Lösungen

Die gekühlt gelagerten Superfusionslösungen wurden einige Minuten vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt, um bei den Versuchen Einflüsse aufgrund der Temperatur der Lösungen zu verhindern.

3.6.1 Tumornekrosefaktor

TNF wurde für die Versuche von der Firma Sigma-Aldrich (82024 Taufkirchen bei München) bezogen und entsprechend dem Versuchsprotokoll mit physiologischer Kochsalzlösung (Braun, 34212 Melsungen) verdünnt.

3.6.2 Etanercept

Etanercept ist als Pulver zur Zubereitung für die subkutane Injektion oder als fertige subkutane Injektionsspritze verfügbar. Die subkutane Injektion ist nötig, da bei oraler Bereitstellung die enzymatische, enterale Abbau und der First-Pass-Effekt der Leber den Wirkstoff unwirksam machen würden. (170)

Bei den Versuchen wurde auf Basis der fertigen Injektionslösung (Enbrel 25 mg, Pfizer, 10785 Berlin) eine Superfusionslösung durch Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Als Vehikel-Kontrolle diente entsprechend physiologische Kochsalzlösung.

3.6.3 JTE-013

JTE-013 ist in wässriger Lösung nur schwer löslich. Um trotzdem eine maximale Löslichkeit in wässriger Lösung zu erreichen, wurde JTE-013 (Biomol, 22769 Hamburg) zuerst in reinem Ethanol gelöst und dann mit PBS mit einem pH von 7,2 (Phosphate Buffered Saline pH 7,2, Apotheke Klinikum der Universität München, 81377 München) verdünnt, sodass sich für die Lösung ein 1:3-Verhältnis aus Ethanol und PBS ergab. Aufgrund dieser Maßnahme wurde eine zusätzliche, JTE-013spezifische Vehikel-Gruppe zu den vorher geplanten drei Gruppen in der Versuchsreihe etabliert, die nur Ethanol und PBS im oben beschriebenen Verhältnis erhielt.

Aufgrund der kurzen empfohlenen Lagerungszeit von einem Tag wurden die Versuche einer Gruppe der dritten Versuchsreihe jeweils binnen 24 Stunden durchgeführt. Hierfür wurde die Superfusionslösung verblindet hergestellt und dann für die Operationsreihe bereitgestellt.



Abbildung 20 Kompletter apparativer Aufbau: a Narkose und Ventilation; b Lagerung, Monitoring, Präparation mit OP-Mikroskop und bipolarer Koagulation; c Intravitalmikroskopie und Videoaufnahme

3.7 Versuchsprotokolle

Im Zuge der OP-Vorbereitung wurden die Tiere zuerst gewogen und dann wie weiter oben beschrieben narkotisiert, rasiert, gelagert und das Monitoring angeschlossen. Daraufhin erfolgten die oben beschriebene Präparation und Injektion des Plasma-Markers sowie die basale Aufnahme der Mikrozirkulation unter dem Intravitalmikroskop. (Abbildungen 20 und 21) Hierauf folgte das der jeweiligen Versuchsreihe zugehörige Protokoll aus Superfusionen und weiteren IVM-Aufnahmen. (Abbildung 21-24)



OP-Vorbereitung

Intravitalmikroskopie und Superfusion



Abbildung 21 Allgemeines Versuchsprotokoll: Abschnitt OP-Vorbereitung (blau), Abschnitt Präparation (violett), Abschnitt Intravitalmikroskopie und Superfusionen (grün)

Die folgenden Versuchsreihen wurden einzeln und in der unten dargestellten Reihenfolge chronologisch durchgeführt. In allen Versuchsreihen wurde bei stabilen Vitalparametern zu vier Zeitpunkten wie oben beschrieben der cochleäre Blutfluss bestimmt und über die Zeit aufgetragen. Tiere, bei denen Störungen der Makrozirkulation auffielen oder weniger als drei kapilläre Gefäße bei allen vier Messungen ausgewertet werden konnten, wurden in der Datenauswertung nicht berücksichtigt.

3.7.1 Dosisfindung Tumornekrosefaktor

Nach der basalen Aufnahme folgten drei Zyklen aus jeweils zehn Minuten Superfusion und nachfolgender Aufnahme. Die Tiere in 3 Gruppen erhielten bei der Superfusion TNF-Lösung (entweder 5,0 ng/ml, 0,5 ng/ml oder 0,05 ng/ml) und in der Vehikel-Gruppe physiologische NaCl-Lösung. (Abbildung 22)

Aufnahme Basalwerte	a 0,05 Aufnahme I) iel	Superfusion TNF-a (5,0/0,5/0,05 ng/ml) Vehikel	Aufnahme	Superfusion TNF-α (5,0/0,5/0,05 ng/mI) Vehikel	Aufnahme	
------------------------	--	--	----------	--	----------	--

Abbildung 22 Angepasstes Versuchsprotokoll: Auf die Basalwerteaufnahmen folgen wiederholt Superfusionen mit TNF in jeweils einer der drei angegebenen Konzentrationen oder das Vehikel und weitere Aufnahmen der Intravitalmikroskopie.

3.7.2Evaluation protektiver Effekte durch Etanercept

Nach der basalen Aufnahme folgten drei Zyklen aus jeweils zehn Minuten Superfusion und nachfolgender Aufnahme. Die Tiere in der Verum-Gruppe erhielten bei der ersten Superfusion Etanercept (1,0 μ g/ml), die Tiere in der Vehikel-Gruppe physiologische NaCl-Lösung. Bei der zweiten und dritten Superfusion erhielten alle Tiere der Versuchsreihe TNF-Lösung in der Konzentration 5,0 ng/ml. (Abbildung 23)



Abbildung 23 Angepasstes Versuchsprotokoll: Auf die Basalwerte-Aufnahmen folgen eine Superfusion mit Etanercept oder dem Vehikel und wiederholt Superfusionen mit TNF in der angegebenen Konzentration. Auf jede der Superfusionen folgt eine weitere Aufnahme der intravitalmikroskopischen Bilder.

3.7.3Evaluation therapeutischer Effekte durch Etanercept und JTE-013

Nach der basalen Aufnahme wurden die Cochlea bei allen Tieren der Versuchsreihe fünf Minuten lang mit TNF-Lösung in der Konzentration 5,0 ng/ml superfundiert. Danach folgten zwei Zyklen aus jeweils zehn Minuten Superfusion und nachfolgender Aufnahme. Die Tiere in der Etanercept-Verum-Gruppe erhielten bei diesen Superfusionen Etanercept (1,0 μ g/ml), die Tiere in der zugehörigen Vehikel-Gruppe physiologische NaCl-Lösung. Die Tiere in der JTE-013-Verum-Gruppe erhielten bei jenen Superfusionen JTE-013 (10 μ mol/l), die Tiere in der zugehörigen Vehikel-Gruppe Ethanol-PBS-Puffer (1:3-Lösung Ethanol:PBS pH 7,2). (Abbildung 24)

Aufnahme BasalwerteSuperfusion TNF-α (5,0 ng/ml)AufnahmeSuperfusion Etanercept (1,0 µg/ml) Vehikel (Etan.) JTE-013 (10 µmol/l) Veh. (JTE-013)Superfusion Etanercept (1,0 µg/ml) Vehikel (Etan.) JTE-013 (10 µmol/l) Veh. (JTE-013)Aufnahme

Abbildung 24 Angepasstes Versuchsprotokoll: Auf die Basalwerte-Aufnahmen folgen eine Superfusion mit TNF in der angegebenen Konzentration und danach wiederholt Superfusionen mit Etanercept, JTE-013 oder dem zugehörigen Vehikel. Auf jede der Superfusionen folgt eine weitere Aufnahme der intravitalmikroskopischen Bilder.

3.8 Statistische Auswertung

Die in der Datenauswertung gewonnenen absoluten Werte des cochleären Blutflusses variieren zwischen den Tieren stark. Bei der basalen Messung in der NaCl-Gruppe der Versuchsreihe zur Dosisfindung von Tumornekrosefaktor betrugen diese beispielsweise zwischen 0,72 pl/s und 6,18 pl/s. Aufgrund der großen Bandbreite der absoluten Werte für den cochleären Blutfluss wurden die Werte vor der statistischen Auswertung deshalb normiert. Als Indexwert 1 gilt der Wert aus den basalen Aufnahmen vor den Superfusionen. Alle weiteren Werte sind Relativwerte, die sich auf diesen Indexwert beziehen.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software SigmaPlot in den Versionen 9.01 und 12.0 (Systat Software, Erkrath, Deutschland). Alle Werte sind als Mittelwerte (MW) mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Bei der statistischen Auswertung aller hier durchgeführten Untersuchungen wurden Unterschiede mit p < 0.05 bei der Berechnung des α -Fehlers als statistisch signifikant betrachtet.

Aufgrund des Versuchsdesigns aller Versuchsreihen wurde geplant, die statistische Auswertung mit einer Two Way Repeated Measures ANOVA (2-way RM ANOVA) durchzuführen, da es sich um wiederholte Messungen im selben Tier handelte und mit dem Zeitpunkt und der Gruppenzugehörigkeit zwei Faktoren zur Analyse beinhaltete. (213) Falls die Werte die Voraussetzungen im Hinblick auf die Normalverteilung und die Varianz nicht erfüllen konnten, wurde auf eine ANOVA on Ranks zurückgegriffen.

Während bei der Versuchsreihe zur Evaluation therapeutischer Effekte durch Etanercept und JTE-013 eine 2-way RM-ANOVA genutzt werden konnte, wurden bei den Versuchsreihen zur Dosisfindung von Tumornekrosefaktor und zur Evaluation protektiver Effekte durch Etanercept ANOVA on Ranks eingesetzt. Als Post-hoc-Test im balancierten Fall wurde jeweils die Student-Newman-Keuls-Methode für das multiple Testen paarweiser Vergleiche verwendet.

4 Ergebnisse

Das Gewicht der ausgewerteten Tiere lag in der Versuchsreihe zur Dosisfindung von Tumornekrosefaktor zwischen 213 g und 517 g (Mittelwert und Standardabweichung: 335,9 g \pm 87,1 g). Die Pulsfrequenz lag während der Versuche im Mittel bei 222,3 \pm 26,1 pro Minute.

In der Versuchsreihe zur Evaluation protektiver Effekte durch Etanercept lag das Gewicht der ausgewerteten Tiere zwischen 270 g und 397 g (Mittelwert und Standardabweichung: $321,7 \text{ g} \pm 45,3 \text{ g}$). Die Pulsfrequenz lag während der Versuche im Mittel bei $213,7 \pm 17,5$ pro Minute.

Das Gewicht der Tiere lag in der Versuchsreihe zur Evaluation therapeutischer Effekte durch Etanercept und JTE-013 zwischen 268 g und 451 g (Mittelwert und Standardabweichung: 346,4 g \pm 48,3 g). Die Pulsfrequenz lag während der Versuche im Mittel bei 218,9 \pm 14,3 pro Minute.

Bei allen ausgewerteten Tieren lag die periphere Sauerstoffsättigung insbesondere auch während der Messungen dauerhaft bei mindestens 99%. Es zeigten sich sowohl bei dem Gewicht als auch bei der Sauerstoffsättigung keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen der einzelnen Versuchsreihe.

4.1 Dosisfindung Tumornekrosefaktor

Die erste Versuchsreihe zur Dosisfindung der TNF-Wirkung auf den cochleären Blutfluss umfasste vier Gruppen mit jeweils sechs ausgewerteten Tieren. Für das Anästhesie- und Versuchsprotokoll wurden das Gewicht sowie die Pulsfrequenz und Sauerstoffsättigung erhoben.

Der cochleäre Blutfluss blieb in der mit physiologischer NaCl-Lösung superfundierten Vehikel-Gruppe mit $0,993 \pm 0,079$ bei einer Spanne von 0,773 bis 1,141 gegenüber dem Indexwert 1 stabil. Bei der statistischen Testung in der ANOVA on ranks ergab sich mit p = 0,766 kein statistisch signifikanter Unterschied. (Abbildungen 25-27; jeweils schwarze Kurve)

Auch in den Gruppen, in denen TNF in Konzentrationen von 0,5 und 0,05 ng/ml superfundiert wurde, ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. (Abbildungen 25 und 26; rote Kurven) Für die 0,5 ng/ml TNF-Gruppe war in der ANOVA on ranks p = 0,529 bei einem Gruppenmittelwert von $1,191 \pm 0,202$ und einer Spanne von 0,986 bis 1,567. (Abbildung 26) Für die 0,05 ng/ml TNF-Gruppe ergab die ANOVA on ranks p = 0,270 bei einem Gruppenmittelwert von 0,875 $\pm 0,350$ und einer Spanne von 0,627 bis 1,525. (Abbildung 25)

Die erste Superfusion mit 5,0 ng/ml TNF verringerte den cochleären Blutfluss auf 0,759 \pm 0,164 bei einer Spanne von 0,610 bis 0,905. (Abbildung 27; rote Kurve nach 15 Minuten) Nach den weiteren Superfusionen in derselben Konzentration blieb der cochleäre Blutfluss mit 0,746 \pm 0,164 bei einer Spanne von 0,571 bis 0,986 und 0,771 \pm 0,155 bei einer Spanne von 0,627 bis 0,995 vermindert. (Abbildung 27; rote Kurve nach 30 und 45 Minuten) Im Vergleich zur basalen Messung bestand für alle folgenden Messungen ein statistisch signifikanter Unterschied von p < 0,01 in der ANOVA on ranks. (Abbildung 27)



Abbildung 25 Superfusionen mit TNF oder Vehikel-Kontrolle nach Baseline-Messung: Zwischen den mit TNF in einer Konzentration von 0,05 ng/ml behandelten Tieren und der Vehikel-Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung ergeben sich bei allen drei Messungen keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA on Ranks). Angegeben sind die Gruppenmittelwerte ± Standardabweichung, n=6 pro Gruppe.



Abbildung 26 Superfusionen mit TNF oder Vehikel-Kontrolle nach Baseline-Messung: Zwischen den mit TNF in einer Konzentration von 0,5 ng/ml behandelten Tieren und der Vehikel-Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung ergeben sich bei allen drei Messungen keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA on Ranks). Angegeben sind die Gruppenmittelwerte ± Standardabweichung, n=6 pro Gruppe.



Abbildung 27 Superfusionen mit TNF oder Vehikel-Kontrolle nach Baseline-Messung: Zwischen den mit TNF in einer Konzentration von 5,0 ng/ml behandelten Tieren und der Vehikel-Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung ergeben sich bei allen drei Messungen statistisch signifikante Unterschiede (* p < 0,01; ANOVA on Ranks). Angegeben sind die Gruppenmittelwerte \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe.

4.2 Evaluation protektiver Effekte durch Etanercept

Aufgrund der Erkenntnisse der ersten Versuchsreihe zur Dosisfindung wurden die weiteren Versuche mit TNF in der Konzentration 5,0 ng/ml durchgeführt, da diese als einzige der vormals getesteten Konzentration zu einer effektiven, statistisch signifikanten Senkung des cochleären Blutflusses führte. In dieser Versuchsreihe gab es zwei Gruppen mit sechs ausgewerteten Tieren pro Gruppe.

Eine Superfusion mit 1 μ g/ml Etanercept bewirkte keine statistisch signifikante Änderung des cochleären Blutflusses. (Abbildung 28; nach 15 Minuten) Der Mittelwert 1,093 ± 0,192 bei einer Spanne von 0,942 bis 1,375 unterschied sich mit p = 0,167 und p = 0,423 in der ANOVA on ranks weder signifikant von den Basalwerten der Gruppe noch von den Werten der Vehikel-Gruppe nach Superfusion mit physiologischer NaCl-Lösung, deren Mittelwert 1,015 ± 0,125 bei einer Spanne von 0,901 bis 1,258 war.

Die Superfusion mit 5,0 ng/ml TNF sorgte in der Vehikel-Gruppe für eine statistisch signifikante Senkung des cochleären Blutflusses auf $0,828 \pm 0,078$ bei einer Spanne von

0,712 bis 0,921 beziehungsweise nach der wiederholten Superfusion mit 5,0 ng/ml TNF auf 0,768 \pm 0,085 bei einer Spanne von 0,667 bis 0,861 (p < 0,01; ANOVA on ranks). (Abbildung 28; schwarze Kurve) In der Etanercept-Gruppe führte weder die erste noch die zweite Superfusion mit 5,0 ng/ml TNF zu einer statistisch signifikanten Änderung des cochleären Blutflusses (p = 0,327 und p = 0,389; ANOVA on ranks). (Abbildung 28; gelbe Kurve) Der Vergleich beider Gruppen nach beiden TNF-Superfusionen war wiederum mit p < 0,01 in der ANOVA on ranks statistisch signifikant. (Abbildung 28; nach 30 und 45 Minuten)



Abbildung 28 Wirkung von TNF-Superfusionen nach Baseline-Messungen und Vor-Inkubation des Gefäßbetts mit Etanercept oder Vehikel-Kontrolle: Die Vorinkubation mit Etanercept verursacht in der direkt folgenden Messung keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Vehikel-Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung. Die Superfusion von TNF (5,0 ng/ml) deckt in den folgenden Messungen Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Während die Werte der Etanercept-Gruppe sich nicht signifikant von den Baseline-Werten unterscheiden, sinkt der cochleäre Blutfluss in der Vehikel-Kontrollgruppe signifikant ab. Auch die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind bei diesen beiden Messungen signifikant unterschiedlich. (* und $\dagger p < 0,01$; ANOVA on Ranks) Angegeben sind die Gruppenmittelwerte \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe.

4.3 Evaluation therapeutischer Effekte durch Etanercept und JTE-013

Aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Versuchsreihen wurde in dieser Versuchsreihe wiederum TNF in der Konzentration 5,0 ng/ml zur Senkung des

cochleären Blutflusses benutzt. Außerdem wurden neben Etanercept auch der S1PR2-Antagonist JTE-013 sowie dessen Pufferlösung als Kontrollgruppe verwendet. In dieser Versuchsreihe wurden vier Gruppen mit jeweils sieben Tieren ausgewertet.

Die Superfusion mit 5,0 ng/ml TNF führte in allen Gruppen zu seiner Senkung des cochleären Blutflusses im Vergleich zu den Basalwerten. (Abbildungen 29 und 30; nach 10 Minuten) In der Etanercept-Gruppe lag der Mittelwert bei 0,766 \pm 0,067 bei einer Spanne von 0,656 bis 0,844. In der NaCl-Gruppe lag der Mittelwert bei 0,806 \pm 0,050 bei einer Spanne von 0,712 bis 0,858. In der JTE-013-Gruppe lag der Mittelwert bei 0,776 \pm 0,022 bei einer Spanne von 0,749 bis 0,800. In der JTE-013-Gruppe lag der Mittelwert bei 0,791 \pm 0,036 bei einer Spanne von 0,739 bis 0,848. Diese Unterschiede waren mit p < 0,001 in der 2-way RM ANOVA jeweils statistisch signifikant. Zwischen den Gruppen bestanden hingegen keine Unterschiede (p \geq 0,564; 2-way RM ANOVA).

In der NaCl-Gruppe blieb der cochleäre Blutfluss nach dem nach TNF-Superfusion erhobenen Wert 0,806 mit 0,801 \pm 0,058 (Spanne: 0,707 – 0,890) nach der ersten Superfusion und 0,796 \pm 0,065 (Spanne: 0,703 – 0,868) nach der zweiten Superfusion mit physiologischer NaCl-Lösung stabil. (Abbildung 29; schwarze Kurve) Es fanden sich hierbei auch keine Unterschiede zwischen den Werten nach der TNF-Superfusion und den NaCl-Superfusionen (p = 0,811 und p = 0,909; 2-way RM ANOVA).

In der Etanercept-Gruppe erholte sich der cochleäre Blutfluss von dem nach TNF-Superfusion erhobenen Wert 0,766 auf 0,958 \pm 0,126 (Spanne: 0,713 – 1,119) nach der ersten Superfusion mit 1,0 µg/ml Etanercept und blieb dann tendenziell stabil bei 0,991 \pm 0,123 (Spanne: 0,840 – 1,243). Die Unterschiede zwischen den Werten nach der TNF-Superfusion und den Etanercept-Superfusionen waren statistisch signifikant (p < 0,001; 2-way RM ANOVA). (Abbildung 29; gelbe Kurve) Dies gilt gleichermaßen für den Vergleich zwischen NaCl-Gruppe und Etanercept-Gruppe (Differenz der Mittelwerte: 0,158 und 0,195; p < 0,001; 2-way RM ANOVA). (Abbildung 29; nach 25 und 40 Minuten) Der Unterschied nach beiden Etanercept-Superfusionen war mit 0,033 gering und nicht statistisch signifikant (p = 0,168; 2-way RM ANOVA). (Abbildung 29; gelbe Kurve nach 25 und 40 Minuten)



Abbildung 29 Wirkung von Etanercept-Superfusionen oder Vehikel-Kontrolle nach Baseline-Messungen und Vor-Inkubation des Gefäßbetts mit TNF: Die Superfusion mit TNF (5,0 ng/ml) sorgt in beiden Gruppen für eine signifikante Senkung des cochleären Blutflusses. Der Wiederanstieg des cochleären Blutflusses in der Etanercept-Gruppe ist ebenso statistisch signifikant wie die Unterschiede zwischen der Etanercept- und der Vehikel-Kontrollgruppe bei den beiden letzten Messungen. (* und $\dagger p < 0,001$; 2-way RM ANOVA) Angegeben sind die Gruppenmittelwerte \pm Standardabweichung, n=7 pro Gruppe.

In der Puffer-Gruppe blieb der cochleäre Blutfluss mit 0,791 nach der TNF-Superfusion, 0,799 \pm 0,046 (Spanne: 0,727 – 0,867) nach der ersten Superfusion und 0,798 \pm 0,045 (Spanne: 0,761 – 0,893) nach der zweiten Superfusion mit der Pufferlösung (im Verhältnis 1:3 gemischte Ethanol-PBS-Lösung) stabil. (Abbildung 30; schwarze Kurve) Es fanden sich hierbei auch keine Unterschiede zwischen den Werten nach der TNF-Superfusion und den Puffer-Superfusionen (p = 0,950 und p = 0,792; 2way RM ANOVA).

In der JTE-013-Gruppe erholte sich der cochleäre Blutfluss von dem nach TNF-Superfusion erhobenen Wert 0,776 auf 0,986 \pm 0,026 (Spanne: 0,946 – 1,019) nach der ersten Superfusion mit 10 µmol/1 JTE-013 und blieb dann stabil bei 0,985 \pm 0,024 (Spanne: 0,949 – 1,017). Die Unterschiede zwischen den Werten nach der TNF-Superfusion und den JTE-013-Superfusionen waren mit p < 0,001 in der 2-way RM ANOVA statistisch signifikant. (Abbildung 30; grüne Kurve) Dies gilt gleichermaßen für den Vergleich zwischen Puffer-Gruppe und JTE-013-Gruppe (Differenz der Mittelwerte: 0,188 und 0,188; p < 0,001; 2-way RM ANOVA). (Abbildung 30; nach 25 und 40 Minuten) Die Werte nach der zweiten JTE-013-Superfusion zeigten keine weitere relevante Veränderung gegenüber den Werten nach der ersten JTE-013-Superfusion (Differenz der Mittelwerte: 0,001; p = 0,960; 2-way RM ANOVA). (Abbildung 30; grüne Kurve nach 25 und 40 Minuten)



Abbildung 30 Wirkung von JTE-013-Superfusionen oder Vehikel-Kontrolle nach Baseline-Messungen und Vor-Inkubation des Gefäßbetts mit TNF: Die Superfusion mit TNF (5,0 ng/ml) sorgt in beiden Gruppen für eine signifikante Senkung des cochleären Blutflusses. Der Wiederanstieg des cochleären Blutflusses in der JTE-013-Gruppe ist ebenso statistisch signifikant wie die Unterschiede zwischen der JTE-013- und der Vehikel-Kontrollgruppe bei den beiden letzten Messungen. (* und † p < 0,001; 2-way RM ANOVA) Angegeben sind die Gruppenmittelwerte ± Standardabweichung, n=7 pro Gruppe.

Hierauf folgte der Vergleich beider Vehikel-Gruppen, der keine relevanten, signifikanten Unterschiede zeigte. Die Differenzen der Mittelwerte zwischen der NaCl-Gruppe und der Puffer-Gruppe waren mit 0,015 nach der TNF-Superfusion und 0,002 und 0,001 nach den beiden Superfusionen mit der jeweiligen Vehikel-Lösung nicht statistisch signifikant unterschiedlich (p = 0,631; p = 0,948 und p = 0,969; 2-way RM ANOVA).

Daraufhin erfolgte der Vergleich beider Verum-Gruppen, der ebenfalls keine relevanten Unterschiede zeigte. Die Differenzen der Mittelwerte zwischen der Etanercept-Gruppe und der JTE-013-Gruppe waren 0,009 nach der TNF-Superfusion (p = 0,761; 2-way RM ANOVA) sowie 0,028 und 0,006 nach den beiden Superfusionen mit dem jeweiligen Verum (p = 0,363 und p = 0,850; 2-way RM ANOVA).

5 Diskussion

5.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Der Hörsturz ist mit einer Inzidenz von bis zu 300 Erkrankten pro 100.000 Personen pro Jahr in Deutschland eine der häufigsten Erkrankungen des Innenohres. (214) (Abbildung 31) Das abrupte Auftreten ohne charakteristische Krankheits-Prodromi und ein unklares Risiko bleibender Schäden der Innenohrfunktion verleihen der Forschung an der Pathophysiologie eine sehr große Bedeutung. (215) Darüber hinaus ist es wichtig, dass für den Hörsturz neue Therapiekonzepte entwickelt und evaluiert werden, um ein Therapieschema mit hoher Evidenz zu finden. (216)



Abbildung 31 Häufige Ursachen akuter Hörverschlechterung in Bezug auf die Anatomie des Gehörsinns: Der Hörsturz als Ausschlussdiagnose vieler Differentialdiagnosen, modifiziert nach Schiemenz (217)

Die Störung der cochleären Mikrozirkulation und die cochleäre Entzündung werden in der Entstehung vieler Innenohrpathologien diskutiert und gehören zu den gängigsten Theorien in der Pathophysiologie des Hörsturzes. (218, 219) Ein großes Problem bei der Identifikation des vorliegenden Pathomechanismus bei dem individuellen Hörsturz-Patienten besteht in der Diagnosestellung. Einen bedeutenden Teil der Diagnostik macht zuerst der Ausschluss anderer Erkrankungen mit akuter Hörverschlechterung aus. (Abbildung 31)

Die etablierte Diagnostik ist im Akutstadium nur in wenigen Fällen in der Lage, die definitive Ursache eines Hörsturzes zu klären. (Tabellen 3 und 4) Deswegen ist eine aus einem Therapieerfolg rückschließende Bewertung ein weiterer Ansatz, auf die auslösende Ursache zu schließen. So können beispielsweise Erfolge rheologischer oder anti-entzündlicher Therapien auf schlechte Blut-Fließeigenschaften beziehungsweise entzündliche Vorgänge im Innenohr hinweisen. (81)

Tabelle 4 Hörsturz-Ätiologien: Systematische Übersicht für die vermutete Ätiologie des Hörsturzes in Erwachsener
(220)

Anteil an Hörstürzen	Ursache
71,0 %	Idiopathisch
12,8 %	Infektiöse Erkrankungen
4,7 %	Otologische Erkrankungen
4,2 %	Trauma
2,8 %	Vaskulär oder hämatologisch
2,3 %	Neoplastisch
2,2 %	Sonstige

Dies erschwert die Wahl einer passenden Therapie. Wenn empirische Therapien eingesetzt werden, kann deren Wirksamkeit oft nur schwerlich nachgewiesen werden, da zum Einen für die Erkrankung ein hoher Anteil an Spontanremissionen bekannt ist und es zum Anderen denkbar ist, dass es mehrere Wege der Hörsturzentstehung gibt, die über die gängige Diagnostik bisher nicht diskriminiert werden und bestimmte Therapien nur bei einem bestimmten Teil der Hörsturz-Pathogenesen helfen und bei anderen nicht. (221) Für die Evaluation einer Hypothese zu einem Hörsturz-Pathomechanismus sowie einer Hörsturz-Therapie ist die Erhebung möglichst direkter Parameter aus dem Innenohr notwendig. Da dies im Akutstadium des Hörsturzes und der Zeit, in der sich nach dem Ereignis Heilungs- und Adaptationsvorgänge im Innenohr abspielen, unter ethisch vertretbaren Umständen am Menschen nicht möglich ist, mussten für dieses Projekt tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt werden.

5.2 Versuchsmodell

Für das Projekt wurde ein Modell der Intravitalmikroskopie eines Cochlea-Knochenfensters an Meerschweinchen gewählt.

5.2.1 Versuchstier

Zur Auswahl von Meerschweinchen in der vorliegenden Arbeit führte die gute Etablierung dieses Tieres in der Hörforschung. Für die tierexperimentelle Forschung eignen sich vor allem genetische Zuchtlinien und die Benutzung nur eines Geschlechts, um die Zahl von Störfaktoren kleinzuhalten, die Therapie-Effekte künstlich mindern oder zu groß erscheinen lassen könnten. (222) Für die Versuche in dieser Arbeit wurden deshalb ausschließlich weibliche Albino Hartley Meerschweinchen verwendet.

Des Weiteren wurden viele weitere Nagetier-Arten in der Hörforschung eingesetzt, darunter verschiedene Mäuse (223-227) und Rennmäuse (228-230), Chinchillas (231-233), Ratten (234, 235) und Hamster (236, 237). In der Forschung zu Cochlea-Implantaten haben Katzen eine große Verbreitung. (238-240) Im Bereich der cochleären Mikrozirkulationsforschung ist das Meerschweinchen derzeitig noch am Besten etabliert (86, 241-245), wobei vor kurzem ein vielversprechendes Mausmodell zur akuten und chronischen Begutachtung der cochleären Mikrozirkulation vorgestellt werden konnte, das in seiner Präparation und Mikroskop-Technik der in diesem Projekt verwendeten Technik sehr ähnlich ist. (246)

Weitere Vorteile bei der Auswahl von Meerschweinchen liegen in der gut erforschten Hörphysiologie und dem Menschen ähnelnden Spektrum an Hörfrequenzen. (247) Anders als die menschliche Cochlea ist die Meerschweinchen-Cochlea nur von dünnem Knochen umgeben und liegt ansonsten frei im pneumatisierten Mittelohr. Diese Bulla ist nach außen nur mit einer dünnen Knochenlamelle geschützt und damit über einen lateralen Zugang im Bereich des äußeren Ohres leicht darzustellen. (248) Ein weiterer Vorteil gegenüber kleineren Nagetieren liegt in dem genügend großen zirkulatorischen Volumen der Meerschweinchen, das die Injektion von Fluoreszenzfarbstoff, kristalloider Lösung zum Nachspülen und Anästhesielösung erlaubt, ohne maßgebliche Einwirkung auf die Makrozirkulation auszuüben. (249)

Aufgrund des Bildgebungsverfahrens der Intravitalmikroskopie werden Albino-Meerschweinchen verwendet, da bei pigmentierten Tieren im Bereich der Stria vascularis Melanin eingelagert ist, das die Visualisierung der Gefäße unter dem Mikroskop erschwert. In der Beeinflussung der cochleären Mikrozirkulation konnten keine Unterschiede zwischen pigmentierten und apigmentierten Tieren gefunden werden. Es ist jedoch bekannt, dass Melanin ebenfalls als vasoaktive Substanz fungieren kann, sodass der Vergleich absoluter Werte des cochleären Blutflusses zwischen den unterschiedlichen Meerschweinchen-Arten erschwert ist. (250-252)

5.2.2 Mikrochirurgische Technik

Die mikrochirurgische Präparation des Ohres basiert auf der Arbeit von Nuttall et al., die von Canis et al. modifiziert und in der vorliegenden Arbeit angepasst wurde. (189, 248) Um die laterale Wand der Cochlea für die Intravitalmikroskopie bestmöglich darzustellen, wurden die Ohrmuschel, das Trommelfell und Teile des äußeren Gehörgangs sowie die Gehörknöchelchen entfernt.

Für die Darstellung der cochleären Mikrogefäße ist außerdem eine Fenestrierung der lateralen Cochlea-Wand notwendig. Dieses Fenster wurde im Bereich der zweiten oder dritten cochleären Windung angelegt. Die apikale Windung eignet sich aufgrund der hohen Zerbrechlichkeit bei der Präparation und der geringen Anzahl an Gefäßen in einer Mikroskopier-Ebene nicht für die Fenestrierung. Ein für die Mikroskopie unglücklicher Winkel und die wahrscheinlichere Beeinflussung der cochleären Funktion senken zudem die Eignung der basalen Windung. (253)

Insgesamt ist bei der Präparation auf ein vorsichtiges und schonendes Vorgehen zu achten, da die laterale Wand der Cochlea fragil ist und große Traumen sowie Gefäßabrisse und Blutungen die Intravitalmikroskopie sehr schnell unmöglich machen können. Bei korrekter Technik wird der cochleäre Blutfluss nicht beeinflusst. (202)

5.2.3 Visualisierung und Messung der cochleären Mikrozirkulation

In der Hörsturzforschung ist die Visualisierung der cochleären Mikrozirkulation lange etabliert. Die ersten Untersuchungen nutzten histologisch aufbereitete Präparate der Cochlea von Menschen, die zu Lebzeiten einen Hörsturz erlitten hatten, und verglichen diese mit gesunden Kontrollen. Aus dieser Forschung stammen bereits viele Hypothesen zur Rolle der Stria vascularis in Innenohrerkrankungen. (254, 255) Um die cochleäre Mikrozirkulation in einem einheitlichen Protokoll zu beeinflussen und an mehreren Zeitpunkten quantitativ zu erfassen, wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Methoden etabliert.

5.2.3.1 Intravitale Fluoreszenz-Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde die intravitale Fluoreszenz-Mikroskopie gewählt. Die intravitale Fluoreszenz-Mikroskopie des lateralen Cochlea-Fensters erlaubt die direkte Sicht auf das Kapillarnetz der Stria vascularis. (Abbildung 32)



Abbildung 32 Schema-Zeichnung eines Intravitalmikroskops: Technischer Aufbau und Lichtweg; aus Ren et al. (188)

Außerdem ist eine kontinuierliche Aufnahme des mit FITC-Dextran markierten Blutflusses in einzelnen Mikrogefäßen möglich, sodass eine spätere Offline-Analyse der Bilder vorgenommen werden kann. Neben direkten, absoluten Messungen der Gefäßdurchmesser und Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit derselben Gefäße an mehreren Zeitpunkten ist auch eine Beobachtung der Gefäßmorphologie und vaskulärer Effekte wie Gefäßverschlüsse möglich. (188, 253, 256)

Der verwendete Plasmamarker FITC-Dextran dient zur besseren Sichtbarkeit der Kapillargefäße und als Kontrast für die Bestimmung der Flussgeschwindigkeiten in der Mikroskopie. FITC-Dextran hat in der verwendeten Menge und Konzentration keine nachweislichen Auswirkungen auf die Makro- und Mikrozirkulation und zeigt zudem bei der verwendeten Molekülgröße im Versuchszeitraum keine Anzeichen für eine Extravasation. (257)

Ein wichtiger Kritikpunkt an der intravitalen Fluoreszenz-Mikroskopie ist das Trauma der Cochlea bei der Fenestrierung der lateralen Wand. Mit der verwendeten, schonenden Technik konnte in Kontrollmessungen mit der Laser-Doppler-Flowmetrie keine Veränderungen an den Mikrozirkulations-Parametern festgestellt werden. Allerdings zeigte die intravitale Fluoreszenz-Mikroskopie gegenüber der Laser-Doppler-Flowmetrie eine Überlegenheit in der Sensitivität bei der Detektion von Unterschieden in der cochleären Durchblutung nach elektrischer Stimulation. (202)

5.2.3.2 Sonstige Methoden

Eine frühe Methode zur Quantifizierung des cochleären Blutflusses ist die Mikrosphären-Technik, bei der markierte und unmarkierte Teilchen injiziert und der Blutfluss dann einmalig erfasst werden. (258, 259) Ein Problem dieser Methode ist, die korrekte Zahl der Teilchen zu finden, da zum Einen eine Mindestanzahl nötig ist, aber zum Anderen eine zu große Anzahl zur Beeinflussung der Durchblutung bis hin zum Gefäßverschluss führen kann. (260) Es ist außerdem nicht möglich, längere Aufnahmen der Mikrozirkulation anzufertigen.

Eine kontinuierliche Messung des cochleären Blutflusses ist mit der Laser-Doppler-Flowmetrie möglich. Die Methode nutzt den Doppler-Effekt aus, der bei den mit Laser bestrahlten, fließenden Erythrozyten in den cochleären Gefäßen erzeugt wird. Die Detektion der Signale erlaubt Rückschlüsse auf die Zahl der fließenden Zellen und ihre Geschwindigkeit, die proportional zum Volumenstrom sind und somit relative Werte für den Blutfluss liefern. (261) Vorteile der Laser-Doppler-Flowmetrie sind die einfache Handhabung und die Möglichkeit wiederholter Messungen. Außerdem ist das Vorgehen in Bezug auf die Cochlea nicht invasiv. Nachteile der Methode sind dagegen die schlechte örtliche Auflösung sowie die Anfälligkeit bei Bewegungen des Messobjektes und Temperaturveränderungen. (202, 262) Ein weiterer Nachteil der Methode im Vergleich zu der intravitalen Fluoreszenz-Mikroskopie ist, dass die Laser-Doppler-Flowmetrie zwar einen sehr guten Schätzwert für den cochleären Blutfluss liefert, dieser allerdings nicht nur auf den Kapillaren der Stria vascularis, sondern unspezifisch auch auf anderen Gefäßen wie die der knöchernen Kapsel der Cochlea basiert, die der Durchblutung des Mittelohres zugehörig sind. (202, 263, 264)

Zu den vielversprechenden Methoden der Visualisierung und Messung der cochleären Durchblutung gehört die Multiphotonen-Mikroskopie. Die Anregung mit mehreren Photonen einer höheren Wellenlänge bzw. niedrigeren Energie sorgt für die Emission eines detektierbaren Photons. (265)

Zu den Vorteilen dieser Technik gehört die hohe Eindringtiefe in das Gewebe, sodass die Cochlea für die Mikroskopie intakt bleiben kann. Außerdem erreicht die Methode eine hohe Auflösung der Strukturen, teilweise bis auf zelluläres und subzelluläres Niveau. (266, 267) Nachteile sind der derzeit große chirurgische Zugang zur Cochlea und Probleme bei der Stabilität während längerer Aufnahmen, wie sie bei der dynamischen Erfassung von Veränderungen in der Durchblutung angedacht wären. (37) Im Zuge des Superfusionsprotokolls war es in diesen Versuchsreihen nicht möglich, diese Technik zu verwenden.

5.2.4 Weitere Methoden zur Erfassung der cochleären Funktion

Andere Verfahren nutzen die Korrelation von lokalem Metabolismus und cochleärer Durchblutung aus. Zu diesen Methoden gehört die Erfassung der Sauerstoffspannung und anderer Metaboliten mit Mikroelektroden. Aus diesen Parametern kann dann die cochleäre Durchblutung abgeschätzt werden. (266, 268-270)

Darüber hinaus ist ein weiterer Aspekt die cochleäre Funktion, die sich im Tierversuch mit objektiven Methoden der Audiometrie messen lässt. Das Fehlen einer solchen Methodik gehört zu den Limitationen dieser Arbeit. Zu den an Meerschweinchen erprobten Methoden gehören unter anderem die Messung evozierter Potenziale (z.B. BERA und ECochG; Elektrocochleographie). (247, 271, 272)

Bei diesen audiometrischen Methoden werden wiederholt über Ableitungen gewonnene und durch Einzel- oder Mischtöne ausgelöste elektrophysiologische Signale gemessen und gemittelt. Die gewonnenen Kurven ergeben physiologisch charakteristische Muster, da bestimmte Potenziale der Kurven mit anatomisch-morphologischen Strukturen korrelieren. Verringerungen in der Amplitude und Erhöhung der Latenz der elektrischen Antworten können aus diesen Kurven abgelesen werden und stehen in Zusammenhang mit Funktionseinschränkungen der Hörphysiologie. (273, 274) Da in Vorversuchen insbesondere die ECochG durch den piezoelektrischen Effekt eines Knochenleitungs-Sensors beeinträchtigt wurde, wären ein Stimulus über Luftleitung und somit auch ein intaktes Mittelohr nötig gewesen, um diese Methode zu nutzen. Dies war in Kombination mit dem chirurgischen Zugang für die Mikroskopie nicht zu vereinbaren.

5.3 Ergebnisse und klinische Implikation

Es ist bekannt, dass Innenohrgewebe zu einer schnellen und starken Immunantwort in der Lage sind. (107) Gerade auch die Immunantwort wird pathogenetisch für eine Schädigung des Innenohres bei unterschiedlichen Erkrankungen wie auch dem Hörsturz mitverantwortlich gemacht. (275)

Ein Teil dieser Immunantwort ist die lokale, massenhafte Ausschüttung von Zytokinen, beispielswiese unterschiedliche Interleukine und TNF. TNF ist ein zentraler Entzündungsmediator, der von aktivierten Makrophagen, Monozyten, T- und B-Lymphozyten sowie Fibroblasten sekretiert wird. (276) Neben der Rekrutierung weiterer Immunzellen und somit der Verstärkung der Entzündungsreaktion hat TNF eine modulierende Wirkung auf den Gefäßwiderstand und die Gewebsdurchblutung. (160, 168, 277)

5.3.1 Dosisfindung Tumornekrosefaktor

In der Hörsturzforschung wurden die Hypothesen einer inflammatorischen und einer Gefäß-assoziierten Pathogenese traditionell separat diskutiert. Erst jüngere Untersuchungen konnten beide Hypothesen vereinen, indem ein TNF-Signalweg mit der Gefäßpathologie in der Cochlea beim Hörsturz verbunden wurde. (64) So hatten diese Studien gezeigt, dass TNF in der cochleären Mikrozirkulation in vivo und in vitro gefäßverengend wirkt. Dies verursachte einen schnellen Abfall des Blutflusses, der auch mit verkleinerten Kapillar-Durchmessern einherging. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass TNF die Ototoxizität von Cisplatin vermittelt. (278, 279)

Die Konzentrationen der TNF-Lösungen wurden in der vorliegenden Arbeit zwischen 0,05 ng/ml und 5,0 ng/ml gewählt, da die früheren Ergebnisse mit ähnlicher Methode ab 0,5-1,0 ng/ml eine auf den Gefäßtonus wirksame Konzentration fanden. (64) Die vorliegenden Ergebnisse zeigen nur bei der höchsten Konzentration mit 5,0 ng/ml eine
Wirkung auf die cochleäre Mikrozirkulation. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse allerdings auch, dass TNF nicht nur den Gefäßwiderstand, sondern auch den cochleären Blutfluss beeinflusst. Da die wiederholten Superfusionen mit TNF keine weitere Verringerung des cochleären Blutflusses nach sich zogen, ist hier ein Saturationseffekt denkbar.

Es bleibt unklar, in welchem Gefäßabschnitt TNF wirkt und welcher molekulare Mechanismus speziell in der Cochlea abläuft. In den Untersuchungen von Scherer et al. hatte TNF eine Wirkung auf den Gefäßwiderstand sowohl in der A. spiralis modioli, einem Ast der A. labyrinthi, als auch in den Kapillaren der Stria vascularis. Darüber hinaus wurde hierbei eine Beteiligung von Sphingosin-1-Phosphat gezeigt. (64) Da den Kapillaren der Stria vascularis angelagerte, glatte Muskelzellen fehlen, die eine Kontraktion der Kapillaren vermitteln könnten, wäre es möglich, dass Perizyten und Fibrozyten den Effekt erklären könnten. (51, 60, 244) Es konnte kürzlich bereits für zerebrale Kapillaren gezeigt werden, wie Perizyten den zerebralen Blutfluss regulieren. (53) Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung, mit welchem Mechanismus TNF den kapillären Blutfluss beeinflussen könnte.

5.3.2Effekte durch Etanercept und JTE-013 und Ausblick

Etanercept enthält den extrazellulären Anteil des p75 TNF-Rezeptors, der TNF binden kann und mit dem Antigen-unspezifischen Fc-Fragment eines IgG1-Moleküls verbunden wurde, das an Komplementproteine oder zelluläre Fc-Rezeptoren binden kann. (Tabelle 5) Auf diese Weise kann TNF durch Etanercept aus dem entzündlichen Geschehen eliminiert werden. (276, 280)

In einer weiteren Versuchsreihe dieser Arbeit wurde Etanercept superfundiert und verhinderte gegenüber der Vehikel-Gruppe, dass TNF in nachfolgenden Superfusionen den cochleären Blutfluss senken konnte. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass Etanercept die Mikrogefäße in der Cochlea nicht nur über eine unspezifischantiinflammatorische Wirkweise, sondern spezifisch gegen die TNF-Wirkung schützt.

Derzeit ist Etanercept in Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises wie der Rheumatoiden Arthritis als Medikament zugelassen. (173, 280) Hier gehört es zur Klasse der Biologika, biotechnologisch hergestellten Medikamenten. Die TNF-Inhibitoren dieser Medikamentenklasse (Tabelle 5) gehen mit einem erhöhten Risiko vor allem für chronische Infektionen wie eine latente Tuberkulose und Hepatitis B einher. (175, 276)

Name	Handelsname	Тур	Applikation (Rhythmus in der Therapie- Erhaltung)	Indikationen
Adalimumab	Humira®	humaner Antikörper	subkutan (alle 2 Wochen)	Rheumatoide Arthritis, Psoriasis-Arthritis, ank. Spondylitis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Plaque-Psoriasis, juv. idiop. Arthritis
Certolizumab	Cimzia®	humanisierter Antikörper	subkutan (alle 2 Wochen)	Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn
Etanercept	Enbrel®	Fusions- Protein	subkutan (1-2 mal/Woche)	Rheumatoide Arthritis, juv. idiop. Arthritis, Psoriasis-Arthritis, ank. Spondylitis, Plaque- Psoriasis
Golimumab	Simponi®	humaner Antikörper	subkutan (monatlich)	Rheumatoide Arthritis, ank. Spondylitis, Psoriasis-Arthritis, Colitis ulcerosa
Infliximab	Remicade®	chimärer Antikörper	intravenös (meist alle 8 Wochen)	Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, ank. Spondylitis, Psoriasis- Arthritis, Plaque- Psoriasis

 Tabelle 5 Gegen TNF gerichtete Biologika:
 Applikationsweg und zugelassene Indikationen (276, 280)

Es gab im Bereich der klinischen Forschung bereits kleine Studien, in denen die in Tabelle 5 genannten Biologika außer Certolizumab in der Therapie von Schallempfindungsstörungen autoimmuner Genese eingesetzt wurden. Meist waren die Patienten dieser Studien zusätzlich an anderen Autoimmunerkrankungen erkrankt, für welche die einzelnen Wirkstoffe zugelassen sind. (152, 154, 281-283) In der Hörsturztherapie wurde Etanercept in einer kleinen Studienpopulation von 12 Patienten verabreicht, die unter einer systemischen Glucocorticoid-Therapie nicht die erwünschte Erholung der Symptome erreicht hatten. (64) Da Etanercept zumindest teilweise zu einer Hörverbesserung führte, könnte in jenen Patienten das Hörsturzgeschehen durch TNF vermittelt worden sein.

Als einer der Effektor-Signalwege von TNF gilt der Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg. So konnte in der vorgenannten Studie ebenfalls gezeigt werden, dass durch eine Inhibition des S1P-Rezeptors 2 mit JTE-013 eine nachfolgende Senkung des cochleären Blutflusses durch TNF verhindern konnte. (64) Außerdem konnte erst kürzlich die wichtige Rolle des S1P-Rezeptors 2 bei der akuten vaskulären Entzündung gezeigt werden. (284)

Etanercept und JTE-013 zeigten in der vorliegenden Arbeit nach einer durch TNF ausgelösten Senkung des cochleären Blutflusses unabhängig voneinander und in einem ähnlichen Maß die Fähigkeit, den cochleären Blutfluss zu normalisieren. Es erscheint deshalb naheliegend, dass die TNF-Effekte in der Cochlea maßgeblich durch den S1P-Signalweg vermittelt werden. Es erscheint wahrscheinlich, dass sich ein Teil der Hörstürze über einen TNF-vermittelten Pathomechanismus auswirkt.

Welcher Anteil der Hörstürze TNF-vermittelt auftritt und welche Untergruppe der Patienten gegebenenfalls von einer gegen TNF gerichteten Therapie profitieren könnte, ist eine Herausforderung für weitere Forschung der primären Diagnostik. Kürzlich wurde in einer Population mit akutem, autoimmunem Hörverlust der diagnostische Nutzen einer Laboruntersuchung auf TNF im peripheren Blut bei Glucocorticoid-Nonrespondern getestet. Es zeigte sich, dass bei diesen Patienten mit geringem oder fehlendem Ansprechen höhere TNF-Werte gegenüber denen von Patienten mit einem Ansprechen auf Glucocorticoide gemessen werden konnten. (285) Es erscheint möglich, dass auch Hörsturzpatienten nicht-autoimmuner Genese von einer diagnostischen TNF-Messung im peripheren Blut profitieren könnten, um gegebenenfalls eine wenig Erfolgversprechende und Nebenwirkungs-reiche Therapie mit Glucocorticoiden frühzeitig zu beenden.

Ob gegen TNF gerichtete Therapien wie die oben genannten Biologika in solchen Fällen hilfreich sind, wäre dann eine Frage für weiterführende Studien. Für Golimumab konnte tierexperimentell bereits die Permeabilität durch das Trommelfell nach intratympanaler Instillation gezeigt werden. (151) Diese Methode könnte das Auftreten der teilweise ernsten Nebenwirkungen der systemischen Gabe gegen TNF gerichteter Therapien seltener machen, ähnlich wie bei der derzeitig durch die AWMF-Leitlinie empfohlenen Glucocorticoid-Therapie. (82, 148, 175, 276)

6 Zusammenfassung

Der Hörsturz ist mit bis zu 300 Neuerkrankungen jährlich pro 100.000 Personen eine der häufigsten Erkrankungen des Innenohres in Deutschland. Derzeit fehlt ein Therapieschema mit hoher Evidenz. Die genaue Ätiologie des Hörsturzes ist weitgehend unbekannt und kontrovers diskutiert. Infektionen, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen sowie Durchblutungsstörungen des Innenohres gelten als auslösend. Gemeinsamkeiten dieser Ursachen sind ein Einfluss auf die Durchblutung und eine inflammatorische Antwort. Ein zentraler Akteur im Geschehen des Hörsturzes könnte das pro-inflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) sein, das entzündliche Reaktionen vermitteln und die Mikrozirkulation beeinflussen kann.

Es konnten für TNF sowohl eine Beteiligung an der Pathogenese von Innenohrfunktionsstörungen als auch zelluläre Quellen im Innenohr nachgewiesen werden. TNF ist ein Aktivator der Sphingosin-Kinase 1 (SK1), die das pro-konstriktive Phospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) bildet. Für TNF gibt es mit Etanercept und für den S1P-Rezeptor 2 mit JTE-013 spezifische Inhibitoren. In Voruntersuchungen konnte JTE-013 den Blutfluss-senkenden Effekt von TNF in der Cochlea verhindern, wenn jenes vor der Inkubation mit TNF verabreicht wurde.

Das Projekt hatte als Ziele, eine wirksame Konzentration von TNF auf den cochleären Blutfluss als Indikator der Innenohrfunktion zu finden und sowohl den protektiven Effekt von Etanercept vor der Inkubation von TNF als auch den therapeutischen Effekt von Etanercept und JTE-013 nach der Inkubation von TNF zu evaluieren.

In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Modell am Meerschweinchen eingesetzt. Hierfür wurde mikrochirurgisch ein kleines Fenster in der lateralen knöchernen Wand der Cochlea etabliert. Die Kapillaren der Stria vascularis wurden intravitalmikroskopisch erfasst, um den cochleären Blutfluss unter dem Einfluss verschiedener Superfusionslösungen zu bestimmen.

TNF senkte als Superfusionslösung in einer Konzentration von 5,0 ng/ml den cochleären Blutfluss signifikant (p<0,01; ANOVA on Ranks). Wiederholte Gaben von TNF senkten den cochleären Blutfluss nicht weiter. Kleinere TNF-Konzentrationen (0,5 ng/ml und 0,05 ng/ml) veränderten den cochleären Blutfluss nicht signifikant.

Etanercept in einer Konzentration von 1 µg/ml konnte den Blutfluss-senkenden Effekt von 5,0 ng/ml TNF in der Cochlea verhindern, wenn jenes vor der Superfusion mit TNF verabreicht

wurde. (p<0,01; ANOVA on Ranks) Sowohl Etanercept (1 μ g/ml) als auch JTE-013 (10 μ mol/l) konnten gegenüber ihren Vehikeln jeweils den cochleären Blutfluss, der durch 5,0 ng/ml TNF signifikant (p<0,001; 2-way RM ANOVA) gesenkt wurde, wieder normalisieren (p<0,001; 2-way RM ANOVA).

Dies geschah bei beiden Wirkstoffen in einem vergleichbaren Maß und könnte somit die Wirkungsvermittlung von TNF durch den SK1/S1P-Signalweg bestätigen. Die Wiederholung der Superfusion sowohl von TNF in den ersten Versuchen als auch von Etanercept und JTE-013 in den späteren Versuchen sorgte für keine zusätzliche signifikante Veränderung, sodass ein Sättigungs-Effekt denkbar ist.

Es ist aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass TNF und der SK1/S1P-Signalweg über spezifische Inhibitoren wie Etanercept therapeutische Zielstrukturen sein können, wenn ein Hörsturz pathogenetisch durch TNF vermittelt wird. Für die Evaluation von solchen Inhibitoren im klinischen Bereich sind weitere Studien notwendig.

7 Abkürzungsverzeichnis

A., Aa.	Arteria (Arterie), Arteriae (Arterien)			
α-Fehler	Fehler erster Art			
A _N	Numerische Apertur			
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis Of Variance)			
ASS	Acetylsalicylsäure			
ATP	Adenosintriphosphat			
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften			
BERA	Hirnstammaudiometrie (Brainstem Evoked Response Audiometry)			
CBF	Cochleärer Blutfluss			
CMV	Cytomegalie-Virus			
СТ	Computer-Tomographie			
DALY	Behinderungsbereinigtes Lebensjahr (Disability-Adjusted Life Year)			
dB	Dezibel			
ECochG	Elektrocochleographie			
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat			
FN	Feldnummer			
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (High Density Lipoprotein)			
HES	Hydroxyethylstärke			
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus			
HMV	Herzminutenvolumen			
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1			
HWS	Hals-Wirbelsäule			
i.p.	intraperitoneal			
i.v.	intravenös			
IVM	Intravitale (Fluoreszenz-)Mikroskopie			
JTE-013	S1P ₂ -Rezeptorantagonist			
KG	Körpergewicht			

LDL	Lipoprotein niederer Dichte (Low Density Lipoprotein)
M.	Musculus
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MW	Mittelwert (mean)
N.	Nervus
NaCl	Natrium-Chlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	(Isotonische) phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
R.	Ramus
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
SSNHL	Sudden Sensorineural Hearing Loss
TNF	Tumornekrosefaktor (ehemals Tumornekrosefaktor alpha)
V.	Vena
VZV	Varizella Zoster Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
YLD	Mit Behinderung gelebte Lebensjahre (Years Lived with Disability)

8 Literaturverzeichnis

1. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, Ezzati M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012;380(9859):2163-96.

2. Nash SD, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE, Nieto FJ, Huang GH, et al. The prevalence of hearing impairment and associated risk factors: the Beaver Dam Offspring Study. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 2011;137(5):432-9.

3. Rauch SD. Clinical practice. Idiopathic sudden sensorineural hearing loss. The New England journal of medicine. 2008;359(8):833-40.

4. Olusanya BO, Neumann KJ, Saunders JE. The global burden of disabling hearing impairment: a call to action. Bulletin of the World Health Organization. 2014;92(5):367-73.

5. Mathers CB, Ties; Ma Fat, Doris. The Global Burden of Disease - 2004 Update. Switzerland: World Health Organization, 2008.

6. Dean AG, West DJ, Weir WM. Measuring loss of life, health, and income due to disease and injury: a method for combining morbidity, mortality, and direct medical cost into a single measure of disease impact. Public health reports (Washington, DC : 1974). 1982;97(1):38-47.

7. Drewett RF, Minns RJ, Sibly TF. Measuring outcome of total knee replacement using quality of life indices. Annals of the Royal College of Surgeons of England. 1992;74(4):286-9; discussion 9-90.

8. Murray CJ. Quantifying the burden of disease: the technical basis for disabilityadjusted life years. Bulletin of the World Health Organization. 1994;72(3):429-45.

9. Murray CJ, Ezzati M, Flaxman AD, Lim S, Lozano R, Michaud C, et al. GBD 2010: design, definitions, and metrics. Lancet. 2012;380(9859):2063-6.

10. Murray CJ, Ezzati M, Flaxman AD, Lim S, Lozano R, Michaud C, et al. GBD 2010: a multi-investigator collaboration for global comparative descriptive epidemiology. Lancet. 2012;380(9859):2055-8.

11. Zahnert T. The differential diagnosis of hearing loss. Deutsches Arzteblatt international. 2011;108(25):433-43; quiz 44.

12. J. K. Ohr - Hör- und Gleichgewichtsorgan. In: Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, et al., editors. Anatomie. 3. Stuttgart

: Georg Thieme Verlag KG; 2014. p. 1074-96.

13. Kaschke O. Ohr. In: Behrbohm H, Kaschke O, Nawka T, editors. Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 2. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. p. 3-70.

14. Frings S, Müller F. Auditorisches System, Stimme und Sprache. In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al., editors. Physiologie. 2. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2012. p. 674-93.

Welsch U, Deller T. Gleichgewichts- und Gehörorgan. In: Welsch U, Deller T, editors.
 Lehrbuch Histologie. 3. München: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH; 2010. p. 486-97.
 Lawrence M. Dynamics of labyrinthine fluids. Archives of otolaryngology (Chicago, Ill: 1960). 1969;89(1):85-9.

17. Smith CA, Lowry OH, Wu ML. The electrolytes of the labyrinthine fluids. The Laryngoscope. 1954;64(3):141-53.

18. Klinke R. Hören und Sprechen: Kommunikation des Menschen. In: Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, editors. Physiologie. 6. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010. p. 676-90.

19. Canis M, Ortner M, Olzowy B, Jahn K, Strupp M, Hemmert W, et al. Subpixel tracking for the analysis of outer hair cell movements. Acta oto-laryngologica. 2008;128(3):228-32.

20. Canis M, Schmid J, Olzowy B, Jahn K, Strupp M, Berghaus A, et al. The influence of cholesterol on the motility of cochlear outer hair cells and the motor protein prestin. Acta oto-laryngologica. 2009;129(9):929-34.

21. Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. Nature. 2000;405(6783):149-55.

22. Otolaryngology Imaging Core SSoM. In: FeaturedImage18_000.jpg, editor. <u>http://otolic.stanford.edu/images/FeaturedImage18_000.jpg</u>: Otolaryngology Imaging Core, Stanford School of Medicine 2015.

23. Trepel M. Hirnnerven. In: Trepel M, editor. Neuroanatomie - Struktur und Funktion. 5 ed. München: Elsevier GmbH; 2012. p. 59-92.

24. Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, et al. Nervous System. Gray's Anatomy. 38th ed. New York - Edinburgh - London: Churchill Livingstone Elsevier; 1995. p. 1225-58.

25. Laine FJ, Smoker WR. Anatomy of the cranial nerves. Neuroimaging clinics of North America. 1998;8(1):69-100.

26. Laine FJ, Underhill T. Imaging of the lower cranial nerves. Neuroimaging clinics of North America. 2004;14(4):595-609.

27. Peng Y, Chen J, He S, Yang J, Wu H. Release of ATP from marginal cells in the cochlea of neonatal rats can be induced by changes in extracellular and intracellular ion concentrations. PloS one. 2012;7(10):e47124.

28. Qiao L, Han Y, Zhang P, Cao Z, Qiu J. Detection of atrial natriuretic peptide and its receptor in marginal cells and cochlea tissues from the developing rats. Neuro endocrinology letters. 2011;32(2):187-92.

29. Takeuchi S, Ando M, Kakigi A. Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. Biophysical journal. 2000;79(5):2572-82.

30. Lang F, Vallon V, Knipper M, Wangemann P. Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney. American Journal of Physiology - Cell Physiology. 2007;293(4):C1187-C208.

31. Mees K. Ultrastructural localization of K+-dependent, ouabain-sensitive NPPase (Na-K-ATPase) in the guinea pig inner ear. Acta oto-laryngologica. 1983;95(3-4):277-89.

32. Haas M. The Na-K-Cl cotransporters. The American journal of physiology. 1994;267(4 Pt 1):C869-85.

33. Anniko M. Surface structure of stria vascularis in the guinea pig cochlea. Normal morphology and atoxyl-induced pathologic changes. Acta oto-laryngologica. 1976;82(5-6):343-53.

34. Smith CA. Structure of the stria vascularis and the spiral prominence. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 1957;66(2):521-36.

35. Maass B. [Quantitative statements on the vascular supply of the stria vascularis in guinea pigs]. Zeitschrift fur Laryngologie, Rhinologie, Otologie und ihre Grenzgebiete. 1969;48(10):733-53.

36. Axelsson A. Comparative anatomy of cochlear blood vessels. American journal of otolaryngology. 1988;9(6):278-90.

37. Ihler F, Bertlich M, Weiss B, Dietzel S, Canis M. Two-photon microscopy allows imaging and characterization of cochlear microvasculature in vivo. BioMed research international. 2015;2015:154272.

38. Hawkins JE, Jr. Microcirculation in the labyrinth. Archives of oto-rhino-laryngology. 1976;212(4):241-51.

39. Kimura RS, Ota CY. Ultrastructure of toe cochlear blood vessels. Acta otolaryngologica. 1974;77(4):231-50.

40. Kimura RS, Schuknecht HF. The ultrastructure of the human stria vascularis. II. Acta oto-laryngologica. 1970;70(5):301-18.

41. Kimura RS, Schuknecht HF. The ultrastructure of the human stria vascularis. I. Acta oto-laryngologica. 1970;69(6):415-27.

42. Axelsson A. The vascular anatomy of the cochlea in the guinea pig and in man. Acta oto-laryngologica. 1968:Suppl 243:3+.

43. Sampaio ALL, Pires de Oliveira CAC. Structure and Ultrastructure of the Mammalian Inner Ear with Emphasis in the Cochlea. International Archives of Otorhinolayrongology. 2006.

44. Perlman HB, Kimura RS. Observations of the living blood vessels of the cochlea. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 1955;64(4):1176-92.

45. Marcon S, Patuzzi R. Changes in cochlear responses in guinea pig with changes in perilymphatic K+. Part I: summating potentials, compound action potentials and DPOAEs. Hearing research. 2008;237(1-2):76-89.

46. Lin CD, Wei IH, Tsai MH, Kao MC, Lai CH, Hsu CJ, et al. Changes in guinea pig cochlea after transient cochlear ischemia. Neuroreport. 2010;21(15):968-75.

47. Nakashima T, Naganawa S, Sone M, Tominaga M, Hayashi H, Yamamoto H, et al. Disorders of cochlear blood flow. Brain research Brain research reviews. 2003;43(1):17-28.

48. Scherer EQ, Wangemann P. ETA receptors in the gerbil spiral modiolar artery. Advances in oto-rhino-laryngology. 2002;59:58-65.

49. Wangemann P. Cochlear blood flow regulation. Advances in oto-rhino-laryngology. 2002;59:51-7.

50. Franz P, Helmreich M, Stach M, Franz-Italon C, Bock P. Distribution of actin and myosin in the cochlear microvascular bed. Acta oto-laryngologica. 2004;124(4):481-5.

51. Dai M, Nuttall A, Yang Y, Shi X. Visualization and contractile activity of cochlear pericytes in the capillaries of the spiral ligament. Hearing research. 2009;254(1-2):100-7.

52. Shi X, Han W, Yamamoto H, Tang W, Lin X, Xiu R, et al. The cochlear pericytes. Microcirculation. 2008;15(6):515-29.

53. Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, et al. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. Nature. 2014;508(7494):55-60.

54. 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. Hearing research. 2005;209(1-2):91-6.

55. Yamamoto K, Kubo T, Matsunaga T. Autoregulation of inner ear blood flow in normal and hydropic guinea pigs. Acta oto-laryngologica. 1991;111(2):312-8.

56. Carrasco VN, Prazma J, Faber JE, Triana RJ, Pillsbury HC. Cochlear microcirculation. Effect of adrenergic agonists on arteriole diameter. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 1990;116(4):411-7.

57. Kawakami M, Makimoto K, Fukuse S, Takahashi H. Autoregulation of cochlear blood flow. A comparison of cerebral blood flow with muscular blood flow. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 1991;248(8):471-4.

58. Quirk WS, Dengerink HA, Harding JW, Bademian MJ, Swanson SJ, Wright JW. Autoregulation of cochlear blood flow in normotensive and spontaneously hypertensive rats following intracerebroventricularly mediated adjustment of blood pressure. Hearing research. 1989;38(1-2):119-23.

59. Brown JN, Nuttall AL. Autoregulation of cochlear blood flow in guinea pigs. The American journal of physiology. 1994;266(2 Pt 2):H458-67.

60. Dai M, Yang Y, Shi X. Lactate dilates cochlear capillaries via type V fibrocyte-vessel coupling signaled by nNOS. American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2011;301(4):H1248-54.

61. Chen W, Wang J, Chen J, Chen J, Chen Z. Relationship between changes in the cochlear blood flow and disorder of hearing function induced by blast injury in guinea pigs. International journal of clinical and experimental pathology. 2013;6(3):375-84.

62. Arpornchayanon W, Canis M, Suckfuell M, Ihler F, Olzowy B, Strieth S. Modeling the measurements of cochlear microcirculation and hearing function after loud noise. Otolaryngology-head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2011;145(3):463-9.

63. Scherer EQ, Lidington D, Oestreicher E, Arnold W, Pohl U, Bolz SS. Sphingosine-1-phosphate modulates spiral modiolar artery tone: A potential role in vascular-based inner ear pathologies? Cardiovascular research. 2006;70(1):79-87.

64. Scherer EQ, Yang J, Canis M, Reimann K, Ivanov K, Diehl CD, et al. Tumor necrosis factor-alpha enhances microvascular tone and reduces blood flow in the cochlea via enhanced sphingosine-1-phosphate signaling. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2010;41(11):2618-24.

65. McGee J, Walsh EJ, Hildebrand MS, Husein M, Smith RJH, Merchant SN, et al. Part 7: Otology, Neuro-otology, and Skull Base Surgery, Section 5: Inner Ear. In: Flint PW, Haughey BH, Lund VJ, Niparko JK, Richardson MA, Robbins KT, et al., editors. Cummings Otolaryngology Head & Neck Surgery. 2+3. 5 ed. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2010. p. 2049-202.

66. von Bekesy G. SIMPLIFIED MODEL TO DEMONSTRATE THE ENERGY FLOW AND FORMATION OF TRAVELING WAVES SIMILAR TO THOSE FOUND IN THE COCHLEA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1956;42(12):930-44.

67. Von Bekesy G. Current status of theories of hearing. Science (New York, NY). 1956;123(3201):779-83.

68. Von Bekesy G. Pendulums, traveling waves, and the cochlea: introduction and script for a motion picture. The Laryngoscope. 1958;68(3):317-27.

69. von Bekesy G. Travelling waves as frequency analysers in the cochlea. Nature. 1970;225(5239):1207-9.

70. Salt AN, Melichar I, Thalmann R. Mechanisms of endocochlear potential generation by stria vascularis. The Laryngoscope. 1987;97(8 Pt 1):984-91.

71. Tasaki I, Spyropoulos CS. Stria vascularis as source of endocochlear potential. Journal of neurophysiology. 1959;22(2):149-55.

72. Von Bekesy G. Resting potentials inside the cochlear partition of the guinea pig. Nature. 1952;169(4293):241-2.

73. Johnstone BM. THE RELATION BETWEEN ENDOLYMPH AND THE ENDOCOCHLEAR POTENTIAL DURING ANOXIA. Acta oto-laryngologica. 1965;60:113-20.

74. Konishi T. Some observations on negative endocochlear potential during anoxia. Acta oto-laryngologica. 1979;87(5-6):506-16.

75. Nuttall AL, Lawrence M. Endocochlear potential and scala media oxygen tension during partial anoxia. American journal of otolaryngology. 1980;1(2):147-53.

76. Streppel M, Walger M, von Wedel H, Gaber E. Hörstörungen und Tinnitus. Berlin: Robert Koch-Institut, 2006.

77. Bedell AJ. The First Ten Years of Ophthalmoscopy, 1851-1861. Transactions of the American Ophthalmological Society. 1950;48:36-47.

78. Kuhn M, Heman-Ackah SE, Shaikh JA, Roehm PC. Sudden sensorineural hearing loss: a review of diagnosis, treatment, and prognosis. Trends in amplification. 2011;15(3):91-105.

79. Strutz J. Innenohr. In: Strutz J, Mann W, editors. Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf-Hals-Chirurgie. 2 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009. p. 286-314.

80. Decot E. Erkrankungen der Ohren. In: Strutz J, Mann W, editors. Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf-Hals-Chirurgie. 2 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009. p. 857-60.

81. Schreiber BE, Agrup C, Haskard DO, Luxon LM. Sudden sensorineural hearing loss. Lancet. 2010;375(9721):1203-11.

82. DGHNO. Hörsturz (Akuter idiopathischer sensorineuraler Hörverlust) - S1-Leitlinie. AWMF online (Reg.-Nr. 017/010); 2014.

83. Seidman MD, Quirk WS, Shirwany NA. Mechanisms of alterations in the microcirculation of the cochlea. Annals of the New York Academy of Sciences. 1999;884:226-32.

84. Michel O, Jahns T, Joost-Enneking M, Neugebauer P, Streppel M, Stennert E. [The Stennert antiphlogistic-rheologic infusion schema in treatment of cochleovestibular disorders]. Hno. 2000;48(3):182-8.

85. Miller JM, Ren TY, Nuttall AL. Studies of inner ear blood flow in animals and human beings. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 1995;112(1):101-13.

86. Ihler F, Strieth S, Pieri N, Gohring P, Canis M. Acute hyperfibrinogenemia impairs cochlear blood flow and hearing function in guinea pigs in vivo. International journal of audiology. 2012;51(3):210-5.

87. 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(1):113-8.

88. Lin HC, Chao PZ, Lee HC. Sudden sensorineural hearing loss increases the risk of stroke: a 5-year follow-up study. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2008;39(10):2744-8.
89. Rudack C, Langer C, Stoll W, Rust S, Walter M. Vascular risk factors in sudden hearing loss. Thrombosis and haemostasis. 2006;95(3):454-61.

90. Wu CS, Yang TH, Lin HC, Sheu JJ, Chu D. Sudden sensorineural hearing loss associated with chronic periodontitis: a population-based study. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2013;34(8):1380-4.

91. Weiss D, Neuner B, Gorzelniak K, Bremer A, Rudack C, Walter M. Platelet glycoproteins and fibrinogen in recovery from idiopathic sudden hearing loss. PloS one. 2014;9(1):e86898.

92. Gross M, Wolf DG, Elidan J, Eliashar R. Enterovirus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus infection screening in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Audiology & neuro-otology. 2007;12(3):179-82.

93. Tarshish Y, Leschinski A, Kenna M. Pediatric sudden sensorineural hearing loss: diagnosed causes and response to intervention. International journal of pediatric otorhinolaryngology. 2013;77(4):553-9.

94. Schuknecht HF, Donovan ED. The pathology of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. Archives of oto-rhino-laryngology. 1986;243(1):1-15.

95. Veltri RW, Wilson WR, Sprinkle PM, Rodman SM, Kavesh DA. The implication of viruses in idiopathic sudden hearing loss: primary infection or reactivation of latent viruses? Otolaryngology-head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 1981;89(1):137-41.

96. Wilson WR. The relationship of the herpesvirus family to sudden hearing loss: a prospective clinical study and literature review. The Laryngoscope. 1986;96(8):870-7.

97. Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. Hearing research. 2002;166(1-2):62-71.

98. Berrocal JR, Ramirez-Camacho R. Sudden sensorineural hearing loss: supporting the immunologic theory. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 2002;111(11):989-97.

99. Bovo R, Aimoni C, Martini A. Immune-mediated inner ear disease. Acta otolaryngologica. 2006;126(10):1012-21.

100. Garcia Callejo FJ, Marco Algarra J, Martinez Beneyto MP, Orts Alborch MH, Morant Ventura A. Autoimmune identification of sudden hearing loss. Acta oto-laryngologica. 2003;123(2):168-71.

101. Greco A, Fusconi M, Gallo A, Marinelli C, Macri GF, De Vincentiis M. Sudden sensorineural hearing loss: an autoimmune disease? Autoimmunity reviews. 2011;10(12):756-61.

102. Veldman JE. Cochlear and retrocochlear immune-mediated inner ear disorders. Pathogenetic mechanisms and diagnostic tools. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 1986;95(5 Pt 1):535-40.

103. Bachor E, Kremmer S, Kreuzfelder E, Jahnke K, Seidahmadi S. Antiphospholipid antibodies in patients with sensorineural hearing loss. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2005;262(8):622-6.

104. Boulassel MR, Deggouj N, Tomasi JP, Gersdorff M. Inner ear autoantibodies and their targets in patients with autoimmune inner ear diseases. Acta oto-laryngologica. 2001;121(1):28-34.

105. Kanzaki J. Immune-mediated sensorineural hearing loss. Acta oto-laryngologica Supplementum. 1994;514:70-2.

106. Platt M, Dilwali S, Elackattu A, Parikh JR, Stankovic KM. Mining immune epitopes in the inner ear. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2014;150(3):460-3.

107. Baek MJ, Park HM, Johnson JM, Altuntas CZ, Jane-Wit D, Jaini R, et al. Increased frequencies of cochlin-specific T cells in patients with autoimmune sensorineural hearing loss. Journal of immunology. 2006;177(6):4203-10.

108. Passali D, Damiani V, Mora R, Passali FM, Passali GC, Bellussi L. P0 antigen detection in sudden hearing loss and Meniere's disease: a new diagnostic marker? Acta oto-laryngologica. 2004;124(10):1145-8.

109. Merchant SN, Adams JC, Nadol JB, Jr. Pathophysiology of Meniere's syndrome: are symptoms caused by endolymphatic hydrops? Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2005;26(1):74-81.

110. Pender DJ. Endolymphatic hydrops and Meniere's disease: a lesion meta-analysis. The Journal of laryngology and otology. 2014:1-7.

111. Minor LB, Schessel DA, Carey JP. Meniere's disease. Current opinion in neurology. 2004;17(1):9-16.

112. Yeh TH, Herman P, Tsai MC, Tran Ba Huy P, Van den Abbeele T. A cationic nonselective stretch-activated channel in the Reissner's membrane of the guinea pig cochlea. The American journal of physiology. 1998;274(3 Pt 1):C566-76.

113. Strutz J. Akute Schwerhörigkeit/Akuter Schwindel. In: Strutz J, Mann W, editors. Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf-Hals-Chirurgie. 2 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009. p. 890-3.

114. Maassen MM, Pfister M, Plontke S, Koitschev A, Vogler A, Lowenheim H. [Recovery of hearing: results of delayed medical treatment in patients with idiopathic sudden hearing loss]. Hno. 2002;50(12):1062-7.

115. Suckfull M. Fibrinogen and LDL apheresis in treatment of sudden hearing loss: a randomised multicentre trial. Lancet. 2002;360(9348):1811-7.

116. Suckfull M. [Up to date: therapy of sudden hearing loss]. Laryngo- rhino- otologie. 2005;84(4):277-82; quiz 83-87.

117. Gutmann R, Mees K. [Piracetam infusions in acute tinnitus and sudden deafness]. Fortschritte der Medizin. 1995;113(18):288-90.

118. Samim E, Kilic R, Ozdek A, Gocmen H, Eryilmaz A, Unlu I. Combined treatment of sudden sensorineural hearing loss with steroid, dextran and piracetam: experience with 68 cases. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2004;261(4):187-90.

119. Curhan SG, Shargorodsky J, Eavey R, Curhan GC. Analgesic use and the risk of hearing loss in women. American journal of epidemiology. 2012;176(6):544-54.

120. Sheppard A, Hayes SH, Chen GD, Ralli M, Salvi R. Review of salicylate-induced hearing loss, neurotoxicity, tinnitus and neuropathophysiology. Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale. 2014;34(2):79-93.

121. Laskawi R, Schrader B, Schroder M, Poser R, von der Brelie R. [Therapy of sudden deafness--naftidrofuryl (Dusodril) and pentoxifylline (Trental) compared]. Laryngologie, Rhinologie, Otologie. 1987;66(5):242-5.

122. Wissen I, Aziz MY. [Experiences in therapy of acute labyrinthine deafness with lowmolecular dextran, pentoxifyllin and nicotinic acid (author's transl)]. Laryngologie, Rhinologie, Otologie. 1981;60(7):361-3.

123. Burschka MA, Hassan HA, Reineke T, van Bebber L, Caird DM, Mosges R. Effect of treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 (oral) on unilateral idiopathic sudden hearing loss in a prospective randomized double-blind study of 106 outpatients. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2001;258(5):213-9.

124. Reisser CH, Weidauer H. Ginkgo biloba extract EGb 761 or pentoxifylline for the treatment of sudden deafness: a randomized, reference-controlled, double-blind study. Acta oto-laryngologica. 2001;121(5):579-84.

125. Arellano B, Garcia Berrocal JR, Gorriz C, Gonzalez FM, Vicente J, Ramirez Camacho R. [Treatment protocol for sudden deafness]. Acta otorrinolaringologica espanola. 1997;48(7):513-6.

126. Arteaga DF, Strother MK, Faraco CC, Jordan LC, Ladner TR, Dethrage LM, et al. The vascular steal phenomenon is an incomplete contributor to negative cerebrovascular reactivity in patients with symptomatic intracranial stenosis. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2014;34(9):1453-62.

127. Poublanc J, Han JS, Mandell DM, Conklin J, Stainsby JA, Fisher JA, et al. Vascular steal explains early paradoxical blood oxygen level-dependent cerebrovascular response in brain regions with delayed arterial transit times. Cerebrovascular diseases extra. 2013;3(1):55-64.

128. Lenarz T. [Treatment of sudden deafness with the calcium antagonist nimodipine. Results of a comparative study]. Laryngo- rhino- otologie. 1989;68(11):634-7.

129. Ogawa K, Takei S, Inoue Y, Kanzaki J. Effect of prostaglandin E1 on idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a double-blinded clinical study. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2002;23(5):665-8.

130. Michel O, Matthias R. [Placebo-controlled double-blind study of the treatment of sudden hearing loss with a stable prostacyclin analog]. Laryngo- rhino- otologie. 1991;70(5):255-9.

131. Bennett MH, Kertesz T, Perleth M, Yeung P, Lehm JP. Hyperbaric oxygen for idiopathic sudden sensorineural hearing loss and tinnitus. The Cochrane database of systematic reviews. 2012;10:Cd004739.

132. James A, Thorp M. Meniere's disease. Clinical evidence. 2005(14):659-65.

133. Norris CH. Drugs affecting the inner ear. A review of their clinical efficacy, mechanisms of action, toxicity, and place in therapy. Drugs. 1988;36(6):754-72.

134. Strupp M, Thurtell MJ, Shaikh AG, Brandt T, Zee DS, Leigh RJ. Pharmacotherapy of vestibular and ocular motor disorders, including nystagmus. Journal of neurology. 2011;258(7):1207-22.

135. Kang HS, Park JJ, Ahn SK, Hur DG, Kim HY. Effect of high dose intravenous vitamin C on idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a prospective single-blind randomized controlled trial. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2013;270(10):2631-6.

136. Mukherjea D, Ghosh S, Bhatta P, Sheth S, Tupal S, Borse V, et al. Early investigational drugs for hearing loss. Expert opinion on investigational drugs. 2014:1-17.

137. Choi YH, Miller JM, Tucker KL, Hu H, Park SK. Antioxidant vitamins and magnesium and the risk of hearing loss in the US general population. The American journal of clinical nutrition. 2014;99(1):148-55.

138. Kaya H, Koc AK, Sayin I, Gunes S, Altintas A, Yegin Y, et al. Vitamins A, C, and E and selenium in the treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2014.

139. Dinh CT, Van De Water TR. Blocking pro-cell-death signal pathways to conserve hearing. Audiology & neuro-otology. 2009;14(6):383-92.

140. Omotehara Y, Hakuba N, Hato N, Okada M, Gyo K. Protection against ischemic cochlear damage by intratympanic administration of AM-111. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2011;32(9):1422-7.

141. Suckfuell M, Canis M, Strieth S, Scherer H, Haisch A. Intratympanic treatment of acute acoustic trauma with a cell-permeable JNK ligand: a prospective randomized phase I/II study. Acta oto-laryngologica. 2007;127(9):938-42.

142. Suckfuell M, Lisowska G, Domka W, Kabacinska A, Morawski K, Bodlaj R, et al. Efficacy and safety of AM-111 in the treatment of acute sensorineural hearing loss: a doubleblind, randomized, placebo-controlled phase II study. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2014;35(8):1317-26.

143. Banerjee A, Parnes LS. Intratympanic corticosteroids for sudden idiopathic sensorineural hearing loss. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2005;26(5):878-81.

144. Parnes LS, Sun AH, Freeman DJ. Corticosteroid pharmacokinetics in the inner ear fluids: an animal study followed by clinical application. The Laryngoscope. 1999;109(7 Pt 2):1-17.

145. Trune DR, Canlon B. Corticosteroid therapy for hearing and balance disorders. Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007). 2012;295(11):1928-43.

146. Nakagawa T, Sakamoto T, Hiraumi H, Kikkawa YS, Yamamoto N, Hamaguchi K, et al. Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial. BMC medicine. 2010;8:76.

147. Lautermann J, Sudhoff H, Junker R. Transtympanic corticoid therapy for acute profound hearing loss. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2005;262(7):587-91.

148. Wei BP, Stathopoulos D, O'Leary S. Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss. The Cochrane database of systematic reviews. 2013;7:Cd003998.

149. Rauch SD, Halpin CF, Antonelli PJ, Babu S, Carey JP, Gantz BJ, et al. Oral vs intratympanic corticosteroid therapy for idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a randomized trial. Jama. 2011;305(20):2071-9.

150. Arpornchayanon W, Canis M, Ihler F, Settevendemie C, Strieth S. TNF-alpha inhibition using etanercept prevents noise-induced hearing loss by improvement of cochlear blood flow in vivo. International journal of audiology. 2013;52(8):545-52.

151. Ghossaini SN, Liu JP, Phillips B. Round window membrane permeability to golimumab in guinea pigs: a pilot study. The Laryngoscope. 2013;123(11):2840-4.

152. Lobo D, Garcia-Berrocal JR, Trinidad A, Verdaguer JM, Ramirez-Camacho R. Review of the biologic agents used for immune-mediated inner ear disease. Acta otorrinolaringologica espanola. 2013;64(3):223-9.

153. Lobo D, Trinidad A, Garcia-Berrocal JR, Verdaguer JM, Ramirez-Camacho R. TNFalpha blockers do not improve the hearing recovery obtained with glucocorticoid therapy in an autoimmune experimental labyrinthitis. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2006;263(7):622-6.

154. Toktas H, Okur E, Dundar U, Dikici A, Kahveci OK. Infliximab has no apparent effect in the inner ear hearing function of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. Clinical rheumatology. 2014.

155. Wang X, Truong T, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Blockage of immunemediated inner ear damage by etanercept. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2003;24(1):52-7.

156. Heywood RL, Hadavi S, Donnelly S, Patel N. Infliximab for autoimmune inner ear disease: case report and literature review. The Journal of laryngology and otology. 2013;127(11):1145-7.

157. Lin RJ, Krall R, Westerberg BD, Chadha NK, Chau JK. Systematic review and metaanalysis of the risk factors for sudden sensorineural hearing loss in adults. The Laryngoscope. 2012;122(3):624-35.

158. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. Cell. 2010;140(6):871-82.

159. Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. Cytokine & growth factor reviews. 2003;14(3-4):185-91.

160. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. Clinical science. 2009;116(3):219-30.

161. Fiers W, Beyaert R, Boone E, Cornelis S, Declercq W, Decoster E, et al. TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis. Journal of inflammation. 1995;47(1-2):67-75.

162. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. Immunology. 2005;115(1):1-20.

163. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochemical pharmacology. 2003;66(8):1403-8.

164. Vicaut E, Hou X, Payen D, Bousseau A, Tedgui A. Acute effects of tumor necrosis factor on the microcirculation in rat cremaster muscle. The Journal of clinical investigation. 1991;87(5):1537-40.

165. Megyeri P, Abraham CS, Temesvari P, Kovacs J, Vas T, Speer CP. Recombinant human tumor necrosis factor alpha constricts pial arterioles and increases blood-brain barrier permeability in newborn piglets. Neuroscience letters. 1992;148(1-2):137-40.

166. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature. 1997;385(6618):729-33.

167. Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. Trends in cell biology. 1995;5(10):392-9.

168. Zou J, Pyykko I, Sutinen P, Toppila E. Vibration induced hearing loss in guinea pig cochlea: expression of TNF-alpha and VEGF. Hearing research. 2005;202(1-2):13-20.

169. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Tumor necrosis factoralpha, an initiator, and etanercept, an inhibitor of cochlear inflammation. The Laryngoscope. 2002;112(9):1627-34.

170. Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM, Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. Journal of immunology. 1995;155(10):5038-45.

171. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. The New England journal of medicine. 1996;334(26):1697-702.

172. van der Poll T, Coyle SM, Levi M, Jansen PM, Dentener M, Barbosa K, et al. Effect of a recombinant dimeric tumor necrosis factor receptor on inflammatory responses to intravenous endotoxin in normal humans. Blood. 1997;89(10):3727-34.

173. Tanaka T, Hishitani Y, Ogata A. Monoclonal antibodies in rheumatoid arthritis: comparative effectiveness of tocilizumab with tumor necrosis factor inhibitors. Biologics : targets & therapy. 2014;8:141-53.

174. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. The New England journal of medicine. 2001;345(15):1098-104.

175. Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R, et al. Antitumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. The Lancet infectious diseases. 2003;3(3):148-55.

176. De Palma C, Meacci E, Perrotta C, Bruni P, Clementi E. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2006;26(1):99-105.

177. Takuwa Y, Takuwa N, Sugimoto N. The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. Journal of biochemistry. 2002;131(6):767-71.

178. Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. Biochimica et biophysica acta. 2002;1582(1-3):72-80.

179. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. Annual review of biochemistry. 2004;73:321-54.

180. Igarashi J, Michel T. Sphingosine-1-phosphate and modulation of vascular tone. Cardiovascular research. 2009;82(2):212-20.

181. Osada M, Yatomi Y, Ohmori T, Ikeda H, Ozaki Y. Enhancement of sphingosine 1phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist. Biochemical and biophysical research communications. 2002;299(3):483-7.

182. Kawata T, Ishizuka T, Tomura H, Hisada T, Dobashi K, Tsukagoshi H, et al. Sphingosine 1-phosphate inhibits migration and RANTES production in human bronchial

smooth muscle cells. Biochemical and biophysical research communications. 2005;331(2):640-7.

183. Arikawa K, Takuwa N, Yamaguchi H, Sugimoto N, Kitayama J, Nagawa H, et al. Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S1P2 G protein-coupled receptor. Requirement of inhibition of cellular RAC activity. The Journal of biological chemistry. 2003;278(35):32841-51.

184. Ohmori T, Yatomi Y, Osada M, Kazama F, Takafuta T, Ikeda H, et al. Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2. Cardiovascular research. 2003;58(1):170-7.

185. Ikeda H, Nagashima K, Yanase M, Tomiya T, Arai M, Inoue Y, et al. Sphingosine 1phosphate enhances portal pressure in isolated perfused liver via S1P2 with Rho activation. Biochemical and biophysical research communications. 2004;320(3):754-9.

186. Damirin A, Tomura H, Komachi M, Tobo M, Sato K, Mogi C, et al. Sphingosine 1phosphate receptors mediate the lipid-induced cAMP accumulation through cyclooxygenase-2/prostaglandin I2 pathway in human coronary artery smooth muscle cells. Molecular pharmacology. 2005;67(4):1177-85.

187. Kono M, Belyantseva IA, Skoura A, Frolenkov GI, Starost MF, Dreier JL, et al. Deafness and stria vascularis defects in S1P2 receptor-null mice. The Journal of biological chemistry. 2007;282(14):10690-6.

188. Ren T, Lin X, Nuttall AL. Polarized-light intravital microscopy for study of cochlear microcirculation. Microvascular research. 1993;46(3):383-93.

189. Canis M, Arpornchayanon W, Messmer C, Suckfuell M, Olzowy B, Strieth S. An animal model for the analysis of cochlear blood flow [corrected] disturbance and hearing threshold in vivo. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2010;267(2):197-203.

190. Buchanan KC, Burge RR, Ruble GR. Evaluation of Injectable Anesthetics for Major Surgical Procedures in Guinea Pigs. Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science. 1998;37(4):58-63.

191. Reuter R, Blaze C. Anaesthesia of guinea pigs. The Veterinary record. 1987;121(9):207.

192. Suckling AJ. Anaesthesia of guinea pigs. The Veterinary record. 1987;120(8a):192.

193. Barzago MM, Bortolotti A, Stellari FF, Pagani C, Marraro G, Bonati M. Respiratory and hemodynamic functions, blood-gas parameters, and acid-base balance of ketamine-xylazine anesthetized guinea pigs. Laboratory animal science. 1994;44(6):648-50.

194. Gilroy BA, Varga JS. Use of ketamine-diazepam and ketamine-xylazine combinations in guinea pigs. Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC. 1980;75(3):508-9.

195. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. Laboratory animals. 1981;15(2):163-70.

196. Dang V, Bao S, Ault A, Murray C, McFarlane-Mills J, Chiedi C, et al. Efficacy and safety of five injectable anesthetic regimens for chronic blood collection from the anterior vena cava of Guinea pigs. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS. 2008;47(6):56-60.

197. Purohit RC, Mysinger PW, Redding RW. Effects of xylazine and ketamine hydrochloride on the electroencephalogram and the electrocardiogram in the horse. American journal of veterinary research. 1981;42(4):615-9.

198. Hart MV, Rowles JR, Hohimer AR, Morton MJ, Hosenpud JD. Hemodynamics in the guinea pig after anesthetization with ketamine/xylazine. American journal of veterinary research. 1984;45(11):2328-30.

199. Donovan J, Brown P. Euthanasia. Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al]. 2006;Chapter 1:Unit 1.8.

200. Feldman DB, Gupta BN. Histopathologic changes in laboratory animals resulting from various methods of euthanasia. Laboratory animal science. 1976;26(2 Pt l):218-21.

201. Schoell AR, Heyde BR, Weir DE, Chiang PC, Hu Y, Tung DK. Euthanasia method for mice in rapid time-course pulmonary pharmacokinetic studies. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS. 2009;48(5):506-11.

202. LaRouere MJ, Sillman JS, Nuttall AL, Miller JM. A comparison of laser Doppler and intravital microscopic measures of cochlear blood flow. Otolaryngology-head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 1989;101(3):375-84.

203. H Z. Analyse stehender und bewegter Videobilder in der klinischen Mikrozirkulationsforschung. In: Mahler FM, Konrad; Hammersen, Frithjof, editor. Methoden der Klinischen Kapillarmikroskopie: Berichte des 5 Bodensee-Symposiums über Mikrozirkulation, Konstanz, Mai/Juni 1985. Basel: Karger Verlag,; 1986.

204. Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation. 1989;8(3):293-302.

205. Hultstrom 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 neuropathologica. 1983;59(1):53-62.

206. Rutili G, Arfors KE. Fluorescein-labelled dextran measurement in interstitial fluid in studies of macromolecular permeability. Microvascular research. 1976;12(2):221-30.

207. Becker MD, Kruse FE, Joussen AM, Rohrschneider K, Nobiling R, Gebhard MM, et al. In vivo fluorescence microscopy of corneal neovascularization. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie. 1998;236(5):390-8.

208. Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. Research in experimental medicine Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie. 1998;198(1):23-35.

209. Klyscz T, Junger M, Jung F, Zeintl H. [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. Biomedizinische Technik Biomedical engineering. 1997;42(6):168-75.

210. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation. 1995;15(5):244-9.

211. Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, et al. Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. International journal of cancer Journal international du cancer. 2004;110(1):117-24.

212. Baker M, Wayland H. On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. Microvascular research. 1974;7(1):131-43.

213. Hinkelmann KK, Oscar. Design and analysis of experiments, 2nd edition; v.1: Introduction to experimental design. New York: Wiley; 2008.

214. Olzowy B, Osterkorn D, Suckfull M. [The incidence of sudden hearing loss is greater than previously assumed]. MMW Fortschritte der Medizin. 2005;147(14):37-8.

215. Chau JK, Cho JJ, Fritz DK. Evidence-based practice: management of adult sensorineural hearing loss. Otolaryngologic clinics of North America. 2012;45(5):941-58.

216. Hesse G, Laubert A. [Pharmacotherapy of acute and chronic hearing loss]. Hno. 2010;58(10):990-8.

217. Schiemenz. Das Ohr. In: schiemenz_web_dasohr.jpg, editor. Gelsenkirchen/Essen: Hörakustik Andrea Schiemenz; 2014.

218. Ryan AF, Harris JP, Keithley EM. Immune-mediated hearing loss: basic mechanisms and options for therapy. Acta oto-laryngologica Supplementum. 2002(548):38-43.

219. Shi X. Physiopathology of the cochlear microcirculation. Hearing research. 2011;282(1-2):10-24.

220. Chau JK, Lin JR, Atashband S, Irvine RA, Westerberg BD. Systematic review of the evidence for the etiology of adult sudden sensorineural hearing loss. The Laryngoscope. 2010;120(5):1011-21.

221. Byl FM, Jr. Sudden hearing loss: eight years' experience and suggested prognostic table. The Laryngoscope. 1984;94(5 Pt 1):647-61.

222. Dohoo IR, Ducrot C, Fourichon C, Donald A, Hurnik D. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. Preventive veterinary medicine. 1997;29(3):221-39.

223. Singh R, Wangemann P. Free radical stress-mediated loss of Kcnj10 protein expression in stria vascularis contributes to deafness in Pendred syndrome mouse model. American journal of physiology Renal physiology. 2008;294(1):F139-48.

224. Macheda ML, Sun WW, Kugathasan K, Hogan BM, Bower NI, Halford MM, et al. The Wnt receptor Ryk plays a role in mammalian planar cell polarity signaling. The Journal of biological chemistry. 2012;287(35):29312-23.

225. Kathiresan T, Harvey M, Orchard S, Sakai Y, Sokolowski B. A protein interaction network for the large conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in the mouse cochlea. Molecular & cellular proteomics : MCP. 2009;8(8):1972-87.

226. Meltser I, Cederroth CR, Basinou V, Savelyev S, Lundkvist GS, Canlon B. TrkB-Mediated Protection against Circadian Sensitivity to Noise Trauma in the Murine Cochlea. Current biology : CB. 2014;24(6):658-63.

227. Shi X, Nuttall AL. Expression of adhesion molecular proteins in the cochlear lateral wall of normal and PARP-1 mutant mice. Hearing research. 2007;224(1-2):1-14.

228. Zampini V, Johnson SL, Franz C, Knipper M, Holley MC, Magistretti J, et al. Fine Tuning of CaV1.3 Ca2+ Channel Properties in Adult Inner Hair Cells Positioned in the Most Sensitive Region of the Gerbil Cochlea. PloS one. 2014;9(11):e113750.

229. Okada M, Kawaguchi AT, Hakuba N, Hyodo J, Hato N, Gyo K. Liposomeencapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia: an experimental study in the gerbil. Neuroscience letters. 2013;553:176-80.

230. Ahmad FI, Choudhury B, De Mason CE, Adunka OF, Finley CC, Fitzpatrick DC. Detection of intracochlear damage during cochlear implant electrode insertion using extracochlear measurements in the gerbil. The Laryngoscope. 2012;122(3):636-44.

231. Pitaro J, Mood ZA, Daniel SJ. Ototoxicity of aluminum acetate/benzethonium chloride otic solution in the chinchilla animal model. The Laryngoscope. 2013;123(10):2521-5.

232. Ding D, Allman BL, Salvi R. Review: ototoxic characteristics of platinum antitumor drugs. Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007). 2012;295(11):1851-67.

233. Claussen AD, Fox DJ, Yu XC, Meech RP, Verhulst SJ, Hargrove TL, et al. Dmethionine pre-loading reduces both noise-induced permanent threshold shift and outer hair cell loss in the chinchilla. International journal of audiology. 2013;52(12):801-7.

234. Surovtseva EV, Johnston AH, Zhang W, Zhang Y, Kim A, Murakoshi M, et al. Prestin binding peptides as ligands for targeted polymersome mediated drug delivery to outer hair cells in the inner ear. International journal of pharmaceutics. 2012;424(1-2):121-7.

235. Bas E, Van De Water TR, Gupta C, Dinh J, Vu L, Martinez-Soriano F, et al. Efficacy of three drugs for protecting against gentamicin-induced hair cell and hearing losses. British journal of pharmacology. 2012;166(6):1888-904.

236. Reuss S, Disque-Kaiser U, Antoniou-Lipfert P, Gholi MN, Riemann E, Riemann R. Neurochemistry of olivocochlear neurons in the hamster. Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007). 2009;292(4):461-71.

237. Jenkins SA, Simmons DD. GABAergic neurons in the lateral superior olive of the hamster are distinguished by differential expression of gad isoforms during development. Brain research. 2006;1111(1):12-25.

238. Dinse HR, Reuter G, Cords SM, Godde B, Hilger T, Lenarz T. Optical imaging of cat auditory cortical organization after electrical stimulation of a multichannel cochlear implant: differential effects of acute and chronic stimulation. The American journal of otology. 1997;18(6 Suppl):S17-8.

239. Fallon JB, Shepherd RK, Irvine DR. Effects of chronic cochlear electrical stimulation after an extended period of profound deafness on primary auditory cortex organization in cats. The European journal of neuroscience. 2014;39(5):811-20.

240. Kretzmer EA, Meltzer NE, Haenggeli CA, Ryugo DK. An animal model for cochlear implants. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 2004;130(5):499-508.

241. Zhao J, Sun J, Liu Y. Effects of carbogen on cochlear blood flow and hearing function following acute acoustic trauma in guinea pigs. Archives of medical research. 2012;43(7):530-5.

242. Waissbluth S, Salehi P, He X, Daniel SJ. Systemic dexamethasone for the prevention of cisplatin-induced ototoxicity. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2013;270(5):1597-605.

243. Shi X. Cochlear pericyte responses to acoustic trauma and the involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor. The American journal of pathology. 2009;174(5):1692-704.

244. Dai M, Shi X. Fibro-vascular coupling in the control of cochlear blood flow. PloS one. 2011;6(6):e20652.

245. Nuttall AL, Lawrence M. Intracellular potential changes of Corti's organ with anoxia. Archives of otolaryngology (Chicago, Ill : 1960). 1979;105(10):574-8.

246. Shi X, Zhang F, Urdang Z, Dai M, Neng L, Zhang J, et al. Thin and open vessel windows for intra-vital fluorescence imaging of murine cochlear blood flow. Hearing research. 2014;313:38-46.

247. Makishima K, Saunders JC, Snow JB, Jr. Evoked responses from inferior colliculus as an index of hearing thresholds in guinea pigs. Acta oto-laryngologica. 1975;80(3-4):238-44.

248. Nuttall AL. Techniques for the observation and measurement of red blood cell velocity in vessels of the guinea pig cochlea. Hearing research. 1987;27(2):111-9.

249. Constable BJ. Changes in blood volume and blood picture during the life of the rat and guinea-pig from birth to maturity. The Journal of physiology. 1963;167:229-38.

250. Conlee JW, Abdul-Baqi KJ, McCandless GA, Creel DJ. Differential susceptibility to noise-induced permanent threshold shift between albino and pigmented guinea pigs. Hearing research. 1986;23(1):81-91.

251. Tolleson WH. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews. 2005;23(2):105-61.

252. Korytowski W, Sarna T, Zar ba M. Antioxidant action of neuromelanin: the mechanism of inhibitory effect on lipid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics. 1995;319(1):142-8.

253. Axelsson A, Nuttall AL, Miller JM. Observations of cochlear microcirculation using intravital microscopy. Acta oto-laryngologica. 1990;109(3-4):263-70.

254. Hawkins JE, Jr., Johnsson LG, Preston RE. Cochlear microvasculature in normal and damaged ears. The Laryngoscope. 1972;82(7):1091-104.

255. Johnsson LG. Vascular pathology in the human inner ear. Advances in oto-rhinolaryngology. 1973;20:197-220.

256. Prazma J, Carrasco VN, Garrett CG, Pillsbury HC. Measurement of cochlear blood flow: intravital fluorescence microscopy. Hearing research. 1989;42(2-3):229-36.

257. Olsson Y, Svensjo E, Arfors KE, Hultstrom D. Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. Acta neuropathologica. 1975;33(1):45-50.

258. Angelborg C, Hillerdal M, Hultcrantz E, Larsen HC. The microsphere method for studies of inner ear blood flow. ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties. 1988;50(6):355-62.

259. Ohlsen A, Hultcrantz E, Larsen HC, Angelborg C. The cochlear blood flow: a comparison between the laser Doppler and the microsphere surface methods. Acta oto-laryngologica. 1994;114(1):4-10.

260. Buckberg GD, Luck JC, Payne DB, Hoffman JI, Archie JP, Fixler DE. Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. Journal of applied physiology. 1971;31(4):598-604.

261. Miller JM, Marks NJ, Goodwin PC. Laser Doppler measurements of cochlear blood flow. Hearing research. 1983;11(3):385-94.

262. Goodwin PC, Miller JM, Dengerink HA, Wright JW, Axelsson A. The laser Doppler: a non-invasive measure of cochlear blood flow. Acta oto-laryngologica. 1984;98(5-6):403-12.

263. Nakashima T, Suzuki T, Iwagaki T, Hibi T. Effects of anterior inferior cerebellar artery occlusion on cochlear blood flow--a comparison between laser-Doppler and microsphere methods. Hearing research. 2001;162(1-2):85-90.

264. Ihler F, Bertlich M, Sharaf K, Strieth S, Strupp M, Canis M. Betahistine exerts a dosedependent effect on cochlear stria vascularis blood flow in guinea pigs in vivo. PloS one. 2012;7(6):e39086.

265. Yang X, Pu Y, Hsieh CL, Ong CA, Psaltis D, Stankovic KM. Two-photon microscopy of the mouse cochlea in situ for cellular diagnosis. Journal of biomedical optics. 2013;18(3):31104.

266. Tiede L, Steyger PS, Nichols MG, Hallworth R. Metabolic imaging of the organ of corti--a window on cochlea bioenergetics. Brain research. 2009;1277:37-41.

267. Yuan T, Gao SS, Saggau P, Oghalai JS. Calcium imaging of inner ear hair cells within the cochlear epithelium of mice using two-photon microscopy. Journal of biomedical optics. 2010;15(1):016002.

268. Haupt H, Scheibe F, Ludwig C. Changes in cochlear oxygenation, microcirculation and auditory function during prolonged general hypoxia. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 1993;250(7):396-400.

269. Nimura Y, Mori Y, Inui T, Sohma Y, Takenaka H, Kubota T. Effects of CO2/HCO3in perilymph on the endocochlear potential in guinea pigs. The journal of physiological sciences : JPS. 2007;57(1):15-22.

270. Shepherd RK, Xu J. A multichannel scala tympani electrode array incorporating a drug delivery system for chronic intracochlear infusion. Hearing research. 2002;172(1-2):92-8.
271. Beagley HA. Progress in objective audiometry. The Journal of laryngology and otology. 1972;86(3):225-35.

272. Beagley HA, Legouix JP, Teas DC, Remond MC. Electrocochleographic changes in acoustic neuroma: some experimental findings. Clinical otolaryngology and allied sciences. 1977;2(3):213-9.

273. Harrison RV. Objective measures of cochlear frequency selectivity in animals and in man. A review. Acta neurologica Belgica. 1984;84(5):213-32.

274. Burkard R, McNerney K, Abbas PJ, Brown CJ, Don M, Kwong B. Handbook of Clinical Audiology. 6th ed. Katz J, editor. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

275. Toubi E, Ben-David J, Kessel A, Halas K, Sabo E, Luntz M. Immune-mediated disorders associated with idiopathic sudden sensorineural hearing loss. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 2004;113(6):445-9.

276. Doss GP, Agoramoorthy G, Chakraborty C. TNF/TNFR: drug target for autoimmune diseases and immune-mediated inflammatory diseases. Frontiers in bioscience (Landmark edition). 2014;19:1028-40.

277. Satoh H, Firestein GS, Billings PB, Harris JP, Keithley EM. Proinflammatory cytokine expression in the endolymphatic sac during inner ear inflammation. Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO. 2003;4(2):139-47.

278. Altun Z, Olgun Y, Ercetin P, Aktas S, Kirkim G, Serbetcioglu B, et al. Protective effect of acetyl-l-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis-related genes and pro-inflammatory cytokines. Cell proliferation. 2014;47(1):72-80.

279. Kim HJ, Oh GS, Lee JH, Lyu AR, Ji HM, Lee SH, et al. Cisplatin ototoxicity involves cytokines and STAT6 signaling network. Cell research. 2011;21(6):944-56.

280. Drugs@FDA [Internet]. U.S. Food and Drug Administration. [cited 12/15/2014]. Available from: <u>http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm</u>.

281. Derebery MJ, Fisher LM, Voelker CC, Calzada A. An open label study to evaluate the safety and efficacy of intratympanic golimumab therapy in patients with autoimmune inner ear disease. Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology. 2014;35(9):1515-21.

282. Gazeau P, Saraux A, Devauchelle-Pensec V, Cornec D. Long-term efficacy of infliximab in autoimmune sensorineural hearing loss associated with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford, England). 2014;53(9):1715-6.

283. Matsuoka AJ, Harris JP. Autoimmune inner ear disease: a retrospective review of forty-seven patients. Audiology & neuro-otology. 2013;18(4):228-39.

284. Zhang G, Yang L, Kim GS, Ryan K, Lu S, O'Donnell RK, et al. Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation. Blood. 2013;122(3):443-55.

285. Svrakic M, Pathak S, Goldofsky E, Hoffman R, Chandrasekhar SS, Sperling N, et al. Diagnostic and prognostic utility of measuring tumor necrosis factor in the peripheral circulation of patients with immune-mediated sensorineural hearing loss. Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 2012;138(11):1052-8.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 7 Gefäßversorgung der Cochlea: A Arterielle Gefäße in Bezug auf die cochleäre Anatomie B Venöse Gefäße in Bezug auf die cochleäre Anatomie, beide modifiziert nach Axelsson et al. (36); 1 Aa. Vertebrales, 2 A. basilaris, 3 A. cerebellaris anterior inferior, 4 A. labyrinthi, 5 A. cochlearis communis, 6 A. spiralis modioli, 7 R. cochlearis, 8 R. vestibularis, 9 A. vestibulocochlearis, 10 A. vestibularis anterior, 11 V. scalae tympani, 12 V. communis modioli, 13 V. scalae vestibuli, 14 Vene des cochleären Aquädukts, 15 Vene des runden

Abbildung 10 Schematische Darstellung des Corti-Organs innerhalb einer cochleären Windung und des endocochleären Potenzials: Unterschiedliche elektrische Potenziale innerhalb der unterschiedlichen Innenohr-Kompartimente, übernommen von Frings et al. (14)

Abbildung 13 Befund eines Patienten mit Hörsturz: Ton-Audiogramm mit einseitiger, im Tieftonbereich betonter, mittelgradiger Schallempfindungsstörung am rechten Ohr und ein

Abbildung 16 Cochlea-Fenster: A Schematische Darstellung des chirurgisch etablierten Fensters in der lateralen Cochlea-Wand, modifiziert von Ren et al. (188); B Cochlea-Fenster in der Intravitalmikroskopie mit FITC-Dextran-markierten Gefäßen der Stria vascularis......36

Abbildung 23 Angepasstes Versuchsprotokoll: Auf die Basalwerte-Aufnahmen folgen eine Superfusion mit Etanercept oder dem Vehikel und wiederholt Superfusionen mit TNF in der

9.1 Bildrechte

Ich möchte den Inhabern der Bildrechte danken, dass ich die in dieser Arbeit verwendeten Abbildungen mit ausdrücklicher beziehungsweise konkludenter Zustimmung für meine Dissertation verwenden darf.

Abbildungen 1, 2, 10, 11, 12:

Die Abbildung 1 (Abbildung 19.4, Seite 680), Abbildung 10 (Abbildung 19.7, Seite 684) und Abbildung 12 (Abbildung 19.8, Seite 685) stammen aus Duale Reihe Physiologie (2., aktualisierte Auflage, erschienen am 05. September 2012; ISBN 9783131384126; herausgegeben von Behrends, Jan et al.). Die Abbildung 2 (Abbildung M-6.1, Seite 1074) stammt aus Duale Reihe Anatomie (3. Auflage, erschienen am 08. Oktober 2014; ISBN 9783131528636; herausgegeben von Aumüller, Gerhard et al.). Die Abbildung 11 (Abbildung 19.9, Seite 683) stammt aus Physiologie (6. Auflage, erschienen am 18. November 2009; ISBN 9783137960065; herausgegeben von Klinke, Rainer et al.). Die Lizenzvereinbarungen mit Georg Thieme Verlag KG zu allen fünf Abbildungen für die nicht-kommerzielle Nutzung wurden von Copyright Clearence Center (CCC) bereitgestellt.

Abbildungen 3, 5, 7, 9 B, 16 A, 32:

Die Abbildung 3 (Abbildung 17.8, Seite 491) und Abbildung 5 (Abbildung 17.9, Seite 491) stammen mit der freundlichen Erlaubnis aus Welsch Sobotta Lehrbuch Histologie (4. Auflage 2014 mit Copyright der Elsevier GmbH, erschienen im Urban & Fischer Verlag München; ISBN 9783437444333). Die Abbildungen 7 und 9 B stammen aus dem American Journal of Otolaryngology (Volume number 9, Issue number 6), von Alf Axelsson mit dem Titel "Comparative anatomy of cochlear blood vessels" (Seiten 278-290) aus dem Jahr 1988, mit der freundlichen Erlaubnis von Elsevier (mittels CCC). Die Abbildungen 16 A und 32 stammen aus Microvascular Research (Volume number 46, Issue number 3), von Tianying Ren et al. mit dem Titel "Polarized-Light Intravital Microscopy for Study of Cochlear Microcirculation" (Seiten 383-393) aus dem Jahr 1993, mit der freundlichen Erlaubnis von Elsevier (mittels CCC).

Abbildung 4 und Abbildung 31:

Die Bilder zu den Abbildungen 4 (OIC, Stanford School of Medicine) und 31 (Schiemenz) im Abbildungsverzeichnis sind in eigenschöpferischer Weise bearbeitet, sodass eine Zustimmungspflicht entfällt. Rein vorsorglich wurden die Rechtsinhaber der Ursprungsgrafiken dennoch von der Verwendung in Kenntnis gesetzt. Ein etwaiger Widerspruch hätte aus Kulanz zur Entfernung der Grafiken geführt, ist aber nicht erfolgt.

Abbildung 6:

Die Abbildung 6 stammt aus "Functional significance of channels and transporters expressed in the inner ear and kidney" von Florian Lang et al. und wurde von The American Physiological Society im American Journal of Physiology-Cell Physiology publiziert. Das Copyright liegt bei The American Physiological Society.

Abbildung 8 A:

Die Abbildung 8 A stammt aus "Two photon microscopy allows imaging and characterization of cochlear microvasculature in vivo" von Friedrich Ihler et al. und wurde in BioMed research international publiziert. Das Copyright liegt bei Hindawi Publishing Corporation.

Abbildungen 8 B, 9 C:

Die Abbildungen 8 B und 9 C stammen aus Archives of oto-rhino-laryngology (16.9.1976, Volume 212, Issue 4, Seiten 241-251; "Microcirculation in the labyrinth") von J. E. Hawkins Jr. mit freundlicher Erlaubnis von Springer Science+Business Media.

Abbildung 9 A:

Die Abbildung 9 A stammt aus "Structure and Ultrastructure of the Mammalian Inner Ear with Emphasis in the Cochlea" von Sampaio et al. und ist in International Archives of Otorhinolaryngology der Fundação Otorrinolaringologia (ISSN 1809-9777) erschienen. Die Abbildung unterliegt der Creative Common Lizenz für einen nicht-kommerziellen Nutzen.

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auswirkungen ausgewählter Interventionen auf die Regulation des cochleären
Blutflusses
Tabelle 2 Einteilung der Schwerhörigkeit nach dem Schweregrad (WHO) und allgemeine
klinische Empfehlungen (11)
Tabelle 3 Diagnostik bei Hörsturz-Patienten: Methoden, notwendig (*) und im Einzelfall
nützlich (**) (81, 82)
Tabelle 4 Hörsturz-Ätiologien: Systematische Übersicht für die vermutete Ätiologie des
Hörsturzes in Erwachsenen (220)
Tabelle 5 Gegen TNF gerichtete Biologika: Applikationsweg und zugelassene Indikationen
(276, 280)

11 Danksagung

Zuerst danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Ulrich Pohl dafür, mich für meine Arbeit im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin aufgenommen und mir hier ein motivierendes Umfeld geboten zu haben.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Alexander Berghaus für die Übernahme der Doktorvaterschaft und Herrn Priv.-Doz. Dr. Christoph Reichel für die Übernahme der Betreuung im Walter-Brendel-Zentrum bedanken, da dies für das Gelingen des Promotionsprojekts in dieser Form wesentlich war.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin Canis, Herrn Priv.-Doz. Dr. Fritz Ihler und Herrn Prof. Dr. Sebastian Strieth für die Begeisterungsfähigkeit für die experimentelle Forschung und das Einführen in die Methoden, auf denen mein Projekt basierte, danken. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Martin Canis ganz herzlich für die allzeitig enge Betreuung und Beratung. Herrn Prof. Dr. Martin Canis und Herrn Priv.-Doz. Dr. Fritz Ihler danke ich zudem für die kritische und konstruktive Auseinandersetzung mit meiner Arbeit sowie deren Korrektur, auch über den Umzug nach Göttingen hinaus.

Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und Frau Petra Kleucker verdanke ich die wertvollen wissenschaftlichen Erfahrungen im Rahmen des Promotionsstudiengangs zur Förderung von Forschung und Lehre.

Für die Hilfe bei der chirurgischen Ausrüstung und Handhabung der Mikroskope danke ich außerdem Frau Dr. Siiri Scheckinger und Frau Dr. Donata Gellrich. Herrn Dr. Michael Thormann danke ich für die Beratung und Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche und Herrn Dr. Jürgen Peters und Herrn Dr. Michael Lauseker für die Hilfe bei dem Umgang mit der Statistik meiner Ergebnisse. Für die warme Aufnahme im Walter-Brendel-Zentrum und sehr gute Zusammenarbeit danke ich insbesondere auch den anderen Doktoranden für die tatkräftige und mentale Unterstützung.

Abschließend danke ich in ganz besonderer Weise meiner Familie und Freunden, die mich während des gesamten Studiums und im Verlauf der Promotion unterstützt haben.

12 Publikationen

Originalarbeiten

<u>Sharaf K</u>, Ihler F, Bertlich M, Reichel CA, Berghaus A, Canis M. (2016) Tumor Necrosis Factor-induced decrease of cochlear blood flow can be reversed by Etanercept or JTE-013. **Otol Neurotol**. (akzeptiert)

Bertlich M, Ihler F, <u>Sharaf K</u>, Weiss BG, Strupp M, Canis M. (2014) Betahistine metabolites, aminoethylpyridine, and hydroxyethylpyridine increase cochlear blood flow in guinea pigs in vivo. **Int J Audiol**. 53(10):753-9.

Ihler F*, <u>Sharaf K</u>*, Bertlich M, Strieth S, Reichel CA, Berghaus A, Canis M. (2013) Etanercept prevents decrease of cochlear blood flow dose-dependently caused by tumor necrosis factor alpha. **Ann Otol Rhinol Laryngol**. 122(7):468-73.

Ihler F, Bertlich M, <u>Sharaf K</u>, Strieth S, Strupp M, Canis M. (2012) Betahistine exerts a dosedependent effect on cochlear stria vascularis blood flow in guinea pigs in vivo. **PLoS One**. 7(6):e39086.

* Geteilte Autorschaft

Vorträge und Poster

<u>Sharaf K</u>, Projekt B3. Role of integrins for interstitial migration of different myeloid leukocyte subsets. Scientific Retreat des IRTG/SFB 914 2014, 3.-6. November, Günzburg, Vortrag.

Ihler F, <u>Sharaf K</u>, Bertlich M, Strieth S, Reichel CA, Berghaus A, Canis M. Die dosisabhängige Verringerung des cochleären Blutflusses durch TNF-alpha kann durch Etanercept aufgehoben werden. ADANO 2012, 13.-14. September, Magdeburg. Vortrag.

<u>Sharaf K</u>, Ihler F, Reichel CA, Canis M, Berghaus A. TNF-alpha in der cochleären Mikrozirkulation. FöFoLe-Statusseminar 2012, 11.-13. Mai, Herrsching. Vortrag.

<u>Sharaf K</u>, Ihler F, Reichel CA, Strieth S, Berghaus A, Canis M. TNF-alpha in der cochleären Mikrozirkulation. DoktaMed 2012, 5. Mai, München. Poster C06 und Vortrag. *Preis für die Präsentation des Posters C06*

<u>Sharaf K</u>, Ihler F, Reichel CA, Canis M, Berghaus A. Zentrale Venenkatheterisierung und Cochlea-Fensterung im Meerschweinchen-Modell. FöFoLe-Promotionsstudiengang, Sommersemester 2011, München. Vortrag.

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Tumornekrosefaktor in der Pathogenese des Hörsturzes – Entwicklung eines neuen Therapiekonzeptes

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Kariem-Noureldin Sharaf

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand