

Neurologische Klinik und Poliklinik Großhadern
Ludwig-Maximilians-Universität München
Leitung: Prof. Dr. med. Dr. hc. Th. Brandt, FRCP

Pathophysiologie des Hörschadens bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Matthias Klein
aus München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Walter Pfister
2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Löscher
- Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Künzle
Prof. Dr. Dr. J. Heesemann
- Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Stefan Kastenbauer
- Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
- Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2004

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie der bakteriellen Meningitis	1
1.2. Therapiekonzepte der bakteriellen Meningitis	2
1.3. Hörverlust: eine häufige Komplikation der Meningitis	3
1.4. Ort der Schädigung bei Meningitis-assoziiertem Hörschaden: die Cochlea	4
1.5. Meningitis-assoziiertes Hörschaden im Tiermodell	5
1.6. Pathophysiologische Untersuchungen bei meningogener Labyrinthitis	7
1.7. Peroxynitrit: ein wichtiger Mediator zerebraler Schädigungen bei bakterieller Meningitis	8
1.8. Kernpunkte der Studie	9
2. Methoden	10
2.1. Versuchsserien	10
2.2. Hörmessung durch akustisch evozierte Potentiale	12
2.3. Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis	14
2.3.1. Klinischer Score	14
2.3.2. Infektion	15
2.3.3. Antibiotika- und adjuvante Therapie	16
2.3.4. Versuchsende	16
2.3.5. Bakteriennachweis im Liquor	19
2.4. Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis	19
2.4.1. Klinischer Score	19
2.4.2. Infektion	20
2.4.3. Versuchsende	20
2.4.4. Bakterielle Titerbestimmung	21

2.5.	Fixierung und Paraffineinbettung der Felsenbeine	21
2.6.	Bestimmung der Blut-Labyrinth-Schrankenpermeabilität	21
2.7.	Histologie	22
2.8.	Quantifizierung der entzündlichen Veränderungen in der Kochlea	23
2.9.	Quantifizierung der Okklusion in den Perilymphräumen	23
2.10.	Neuronendichtebestimmung im Ganglion spirale	23
2.11.	Immunhistochemischer Nachweis von eNOS, iNOS, Nitrotyrosin und PARP p85-Spaltprodukt	24
2.12.	Zelltodnachweis durch TUNEL	26
2.13.	Statistik	27
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Versuchsserie A (Rattenmodell)	28
3.1.1.	Histologische Veränderungen in der Kochlea	28
3.1.2.	Blut-Labyrinth-Schrankenstörung	30
3.1.3.	Immunhistochemischer Nachweis von iNOS	30
3.1.4.	Immunhistochemischer Nachweis von eNOS	30
3.1.5.	Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin	33
3.1.6.	Effekt von Peroxynitrit-Fängern auf die Blut-Labyrinth-Schranke	33
3.2.	Versuchsserie B (Rattenmodell)	34
3.2.1.	Klinische Charakteristik der Meningitis	34
3.2.2.	Akutphase der experimentellen Meningitis: 18, 24 und 48 Stunden nach Infektion	35
3.2.2.1.	Dosisabhängigkeit und Zeitverlauf des Hörschadens	35
3.2.2.2.	Morphologische Veränderungen in der Kochlea	37
3.2.2.3.	Zelluntergang während des Akutstadiums	38
3.2.2.4.	Neuronenverlust im Ganglion spirale	40
3.2.2.5.	Blut-Labyrinth-Schrankenstörung	40
3.2.3.	Stadium nach Genesung: zwei Wochen nach Infektion	43
3.2.3.1.	Charakteristik des Hörschadens	43

3.2.3.2.	Morphologische Veränderungen in der Cochlea	43
3.2.3.3.	Neuronenverlust im Ganglion spirale	44
3.2.3.4.	Blut-Labyrinth-Schrankenstörung	45
3.3.	Versuchsserie C (Rattenmodell)	46
3.3.1.	Klinische Charakteristik der Meningitis	46
3.3.2.	Charakteristik des Hörschadens	47
3.3.3.	Okklusion der perilymphatischen Räume	47
3.3.4.	Neuronenverlust im Ganglion spirale	47
3.3.5.	Blut-Labyrinth-Schrankenstörung	48
3.3.6.	Einfluss der Antioxidantien MnTBAP und NAC auf die Meningitis- assoziierten cochleären Veränderungen	48
3.3.7.	Einfluss des PARP-Inhibitors INO 1001 auf die Meningitis- assoziierten cochleären Veränderungen	52
3.4.	Versuchsserie D (Mausmodell)	54
3.4.1.	Klinische Charakteristik der Meningitis	54
3.4.2.	Charakteristik des Hörschadens	54
3.4.3.	Histologische Veränderungen in der Cochlea	54
4.	Diskussion	57
5.	Zusammenfassung	71
6.	Ausblick	73
7.	Quellenverzeichnis	75
8.	Literaturverzeichnis	77
9.	Vorveröffentlichungen	90
10.	Danksagung	91
11.	Curriculum vitae	92

Abkürzungsverzeichnis

AEP	Akustisch Evozierte Potentiale
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxynukleinsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
ICP	Intrakranieller Druck
INO-1001	PARP Inhibitor
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KBE	Kolonien-bildende Einheiten
MnTBAP	Mangan (III) meso-tetra [4-Benzoessäure] Porphyrin
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NaCl	Natriumchlorid
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PARP	Poly-[ADP-Ribose] Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (pH = 7,4)
TUNEL	terminal transferase-mediated dUTP nick end labelling
WBC	Liquorleukozytenzahl
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie der bakteriellen Meningitis

Mit einer weltweiten Inzidenz von 5-10/100.000 ist die bakterielle Meningitis immer noch eine häufige Erkrankung, die durch unterschiedliche Keime hervorgerufen wird. Die ambulant erworbene Meningitis wird in den USA vor allem durch *Streptococcus pneumoniae* (47 Prozent), *Neisseria meningitidis* (25 Prozent) und *Listeria monocytogenes* (acht Prozent) verursacht, wobei das Erregerspektrum altersabhängig ist: Im Säuglingsalter bis zwei Jahre sind hauptsächlich Gruppe B Streptokokken, *Listeria monocytogenes* und *Streptococcus pneumoniae*, im Alter von zwei bis 18 und 18 bis 59 Jahren vor allem *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis* und im Alter über 60 Jahren insbesondere *Listeria monocytogenes* und *Streptococcus pneumoniae* für die Mehrzahl der Erkrankungen verantwortlich [Schuchat, A. et al., 1997]. Die früher sehr häufigen Meningitiden im Kindesalter durch den Erreger *Haemophilus influenzae Typ B* konnten aufgrund des Impferfolgs Ende der 80er Jahre deutlich eingedämmt werden (USA: 1986: 2,9 Fälle / 100000 Kinder; 1995: 0,2 Fälle / 100000 Kinder)[Schuchat, A. et al., 1997].

Die bakterielle Meningitis ist eine gefährliche Erkrankung mit oft fatalem Ausgang. Trotz modernster intensivmedizinischer Betreuung und gezielter Antibiotikatherapie weist die Pneumokokkenmeningitis immer noch eine Letalität von 20-30 Prozent auf [Bohr, V. et al., 1983; Durand, M. L. et al., 1993; Schuchat, A. et al., 1997]. Neben systemischen Komplikationen, wie beispielsweise septischem Schock und disseminierter intravasaler Gerinnung, kommt es im Akutstadium der bakteriellen Meningitis häufig zu gefährlichen Komplikationen im zentralen Nervensystem: Hirnödemen mit der Gefahr der zerebralen Herniation, arterielle und venöse Gefäßkomplikationen, Enzephalitis oder Hydrozephalus [Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Pfister, H. W. et al., 1993]. Darüber hinaus leiden über dreißig Prozent der Überlebenden unter neurologischen Folgeschäden wie Hörverlust, Schwindel, Sehstörungen, Kopfschmerzen, Gedächtnis- und Konzentrationsstörungen und fokalen neurologischen Defiziten [Kastenbauer, S. und Pfister, H. W., 2003; Smith, A. L., 1988]. Der Hörverlust ist eine der häufigsten Langzeitkomplikationen der Meningitis [Fortnum, H. M., 1992] und wird wie die übrigen Komplikationen von der Art des Erregers stark beeinflusst [Lebel, M. H. et al., 1988; Ozdamar, O. et al.,

1983]. Von 185 Kindern mit Meningitis zeigte sich in 6% der Fälle durch *Haemophilus influenzae*, in 10.5% der Fälle durch *Neisseria meningitidis* und in sogar 31% der Fälle durch *Streptococcus pneumoniae* als Erreger eine Beeinträchtigung des Hörvermögens [Dodge, P. R. et al., 1984]. Diese Ergebnisse wurden in einer retrospektiven Studie an 180 Kinder mit Pneumokokkenmeningitis bestätigt, wo es ebenfalls in 32% der Überlebenden zum Hörschaden kam [Arditi, M. et al., 1998].

1.2. Therapiekonzepte der bakteriellen Meningitis

Der wichtigste Pfeiler der Behandlung der bakteriellen Meningitis ist der Einsatz von Antibiotika. Die Art des Antibiotikums richtet sich nach dem zugrunde liegenden Erreger. Da bei Aufnahme des Patienten der Erreger meistens noch nicht bekannt ist, bestimmen Altersgruppe und Situation des Patienten die initiale Therapie (gesund oder abwehrgeschwächt bzw. ambulant oder nosokomial erworbene Infektion) [Pfister, H. W., 2002]. Ein Grund für die hohe Inzidenz von Folgeschäden trotz frühzeitiger Therapie ist eine massive Immunantwort des Organismus auf die Infektion: Durch die Antibiotikatherapie kommt es zur Freisetzung subkapsulärer bakterieller Bestandteile, wie beispielsweise Lipoteichonsäure, Peptidoglykane oder Lipopolysaccharid. Diese Substanzen initiieren eine verstärkte Immunantwort und es kommt zur Leukozytenmigration aus dem Gefäßsystem in den Subarachnoidalraum mit anschließender Aktivierung der eingewanderten Zellen [Tuomanen, E. et al., 1985]. Aktivierte Leukozyten, aber auch ortsständige Zellen wie Endothel- oder Gliazellen produzieren dann unter anderem freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO), Peroxynitrit (ONOO⁻) und exzitatorische Aminosäuren, was eine Schädigung von Neuronen und Gefäßen sowie der Blut-Hirn-Schranke zur Folge hat [Koedel, U. et al., 1995; Koedel, U. und Pfister, H. W., 1999b; Pfister, H. W. et al., 1999]. Eine Unterdrückung der Immunantwort könnte sich infolgedessen positiv auswirken, zumal die Bakterien durch Antibiotika bereits suffizient bekämpft werden. Daher wurde der adjuvante Einsatz von Dexamethason zur Suppression des Immunsystems, zusätzlich zur adäquaten Antibiotikatherapie, vielfach untersucht: Lebel et al. zeigte 1988 erstmals in einer prospektiven Doppelblindstudie an 200 Kindern mit *Haemophilus influenzae Typ B* Meningitis, dass bei adjuvanter Dexamethasonbehandlung die Inzidenz des Hörschadens geringer als in der Placebogruppe war [Lebel, M. H. et al., 1988]. Dies gilt jedoch nur mit Einschränkungen bei der Pneumokokkenmeningitis. In einer Metaanalyse von 11 prospektiven, randomisierten und kontrollierten Studien an Kindern war

Dexamethason bei Pneumokokkenmeningitis nur dann von Vorteil, wenn es vor oder gleichzeitig mit dem Antibiotikum verabreicht wurde [McIntyre, P. B. et al., 1997]. In einer grossen Plazebo-kontrollierten, randomisierten Doppelblindstudie, die Dexamethason als adjuvantes Therapeutikum bei bakterieller Meningitis an 598 Kindern in Malawi untersuchte, konnte keine Reduktion der Letalität oder neurologischer Folgeschäden, eingeschlossen Hörverlust, nachgewiesen werden [Molyneux, E. M. et al., 2002; Molyneux, E. M. et al., 2003]. Im Gegensatz dazu konnten De Gans et al. in einer multizentrischen Studie an 306 Patienten einen positiven Effekt von Dexamethason zur adjuvanten Meningitistherapie nachweisen, da es die Letalität der Patienten im Vergleich zur alleinigen Antibiotikatherapie senkte [de Gans, J und van de Beek, 2002]. Infolge des signifikanten Effekts ist die Gabe von Dexamethason im initialen Behandlungsstadium der ambulant erworbenen Meningitis neuerdings ein wichtiger Pfeiler [Chaudhuri, A., 2004]. Für fokale neurologische Defizite wie Hörverlust oder Hirnnervenpareesen bei Überlebenden konnte allerdings auch in dieser Studie kein protektiver Effekt für Dexamethason gezeigt werden. Es steht bisher also kein durchschlagendes Therapiekonzept für die Reduktion des Hörschadens bei Pneumokokkenmeningitis zur Verfügung. Nur die Erforschung der zugrunde liegenden Pathologie und Pathophysiologie, sowie die intensive Suche nach neuen Therapien kann helfen, die Inzidenz des Hörschadens bei bakterieller Meningitis zu senken.

1.3. Hörverlust: eine häufige Komplikation der Meningitis

Für das Verständnis der zugrunde liegenden Störungen des Meningitis-assoziierten Hörverlusts ist es wichtig, den Verlauf und die Charakteristik des Hörschadens zu kennen. Der Hörschaden der bakteriellen Meningitis kann entweder vorübergehend oder permanent sein [Richardson, M. P. et al., 1997]: In einer prospektiven Studie an 51 Kindern mit bakterieller Meningitis kam es bei 21,6% der Erkrankten lediglich zu einer vorübergehenden, jedoch in 9,8% der Fälle zu einer über die Krankheitsdauer hinaus andauernden Hörschwäche [Vienny, H. et al., 1984]. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Nadol et al., die bei 110 erwachsenen Überlebenden einer bakteriellen Meningitis in 21% eine Hörschädigung fanden. Dabei handelte es sich in 70% um einen partiellen und in 30% um einen kompletten Hörschaden. Bei den Fällen mit partiellem Hörschaden kam es in 81% zu einer Besserung nach Abklingen der Erkrankung, während die Patienten, die bereits in der Akutphase einen komplett ausgeprägten Hörschaden erlitten, auch nach Genesung taub blieben [Nadol, J. B.,

Jr., 1978]. Keineswegs müssen bei Patienten mit Pneumokokkenmeningitis immer beide Ohren beteiligt sein und die Ausprägung des Hörschadens kann von sehr mild (Hörschwellenveränderung < 30dB) bis zur kompletten Ertaubung variieren [Dodge, P. R. et al., 1984; Rasmussen, N. et al., 1991].

1.4. Ort der Schädigung bei Meningitis-assoziiertem Hörschaden: die Cochlea

Eine Beeinträchtigung des Hörens kann viele Ursachen haben, die an unterschiedlicher Stelle lokalisiert sein können. Der Ort der Schädigung kann präkokchleär, d.h. im äußeren Gehörgang oder dem Mittelohr, er kann in der Cochlea, dem eigentlichen Hörorgan, oder retrokokchleär, auf dem Weg der Hörbahn vom Ganglion spirale bis zur Hörrinde liegen. Neben seltenen, meist reversiblen Veränderungen in der retrokokchleären Reizleitung, die als Folge von erhöhtem Hirndruck und Hirnstammischämien auftreten können [Jiang, Z. D., 1999], zeigten akustisch evozierte Potentiale (AEP) bei Kindern und Erwachsenen, die an bakterieller Meningitis erkrankten und einen Hörschaden entwickelten, dass der vorwiegende Ort der Schädigung in der Cochlea liegt [Brookhouser, P. E. et al., 1988]. Histopathologisch konnten bereits einige Veränderungen in der Cochlea beobachtet werden: In einer Untersuchung an 41 Felsenbeinen von Patienten, die an einer akuten bakteriellen Meningitis verstorben waren, fand sich bei der Hälfte eine eitrig-labyrinthische Labyrinthitis [Merchant, S. N. und Gopen, Q., 1996]. Die Entzündung war am stärksten in der basalen Windung der Scala tympani ausgeprägt und blieb auf die Perilymphräume beschränkt, während die mit Endolymphe gefüllte Scala media frei von Entzündungszellen war. In vier Fällen wiesen Cortisches Organ und Ganglion spirale strukturelle Veränderungen in Form von Zelluntergang auf. Kernspintomographische Untersuchungen zeigten in einer Studie an Patienten, die in Folge einer bakteriellen Meningitis einen schweren permanenten Hörverlust entwickelt hatten, eine kokchleäre Kontrastmittelanreicherung. Patienten mit lediglich geringem oder keinem Hörverlust zeigten keine Kontrastmittelanreicherung in der Cochlea [Dichgans, M. et al., 1999]. Die Ursachen der Kontrastmittelanreicherung sind bisher jedoch nicht bekannt.

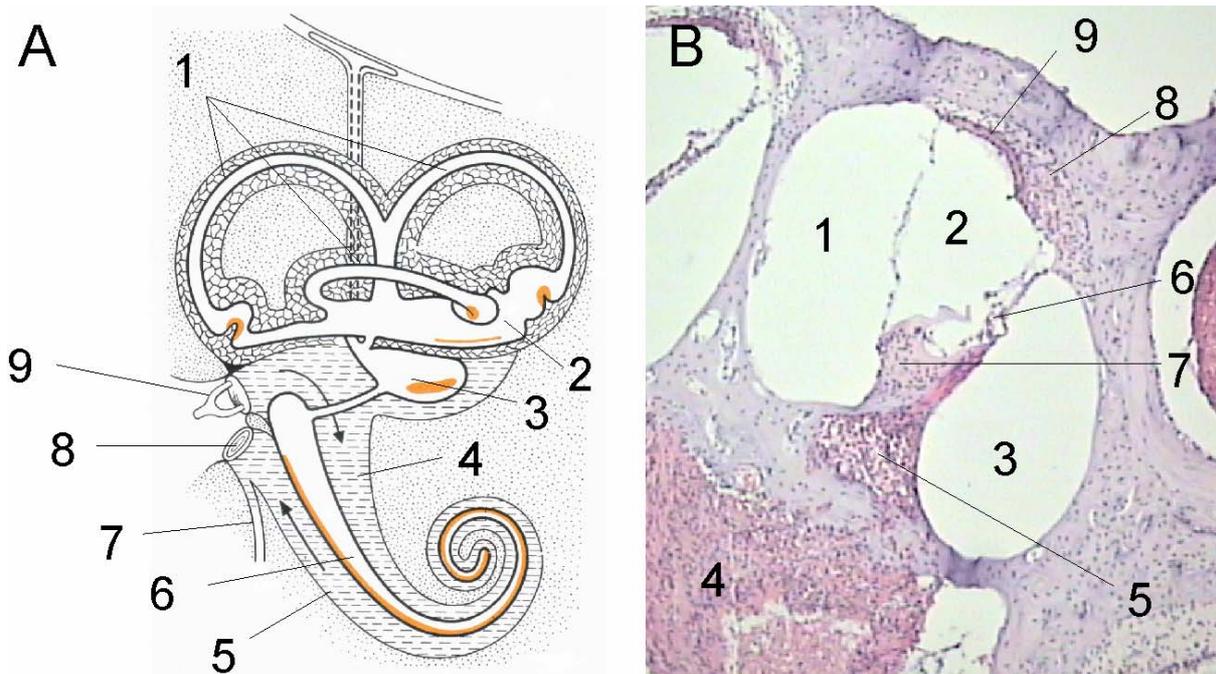


Abbildung 1: Die Kochlea

Bild A: Labyrinth. Bild B: Kochlea einer Ratte (HE-Färbung, x 70). Hör- und Gleichgewichtsorgan liegen in der Pyramide des Felsenbeins. Das Gleichgewichtsorgan besteht aus den drei Bogengängen (A1) und aus Utriculus (A2) und Sacculus (A3). Die Kochlea besteht aus den beiden mit Perilymphe gefüllten Gängen Scala vestibuli (A4) und Scala tympani (A5), sowie der mit Endolymphe ausgefüllten Scala media (A6). Diese drei Gänge winden sich um den Modiolus. Der Ductus perilymphaticus (A7) verbindet die basale Windung der Scala tympani mit der Schädelgrube. Vom Mittelohr wird die Scala tympani durch das runde Fenster (A8) und die Scala vestibuli durch den Steigbügel im ovalen Fenster (A9) abgetrennt. Wird die Kochlea entlang des Modiolus geschnitten, so stellen sich Scala vestibuli (B1), Scala media (B2) und Scala tympani (B3) im Querschnitt dar. Im Modiolus liegt der Nervus cochlearis (B4), welcher vom Ganglion spirale (B5) und den Sinneszellen des Cortischen Organs kommt (B6). Die Haarzellen im Cortischen Organ ragen unter dem Limbus spiralis (B7) in die kaliumreiche Endolymphe der Scala media. Produziert wird die Endolymphe vom Ligamentum spirale (B8) und der Stria vascularis (B9), die beide an der lateralen Wand der Scala media liegen.

1.5. Meningitis-assoziiertes Hörschaden im Tiermodell

Rezidivierende Hörmessungen im Akutstadium lassen sich bei den meist schwer erkrankten Patienten mit Pneumokokkenmeningitis nur eingeschränkt durchführen. Ebenso steht humanes Untersuchungsmaterial zur Erforschung der zu Grunde liegenden Pathologie lediglich sehr begrenzt (nur aus Autopsien) zur Verfügung. Infolgedessen spielen Tiermodelle des Meningitis-assoziierten Hörschadens bei der Erforschung der Pathophysiologie der Erkrankung eine wichtige Rolle. Im Laufe der Zeit sind mehrere Tiermodelle der bakteriellen Meningitis entwickelt worden. Werden Tiere intranasal, intraperitoneal oder intrathekal mit einem Meningitis-typischen Erreger infiziert, entwickeln sie das klinische Bild einer Meningitis und zeigen unter

anderem erhöhte Liquorzellzahlen, Veränderungen der vaskulären Autoregulation und erhöhten Hirndruck [Koedel, U. und Pfister, H. W., 1999a]. Durch den Einsatz im Tiermodell konnten schon einige viel versprechende Substanzen für die adjuvante Therapie der Pneumokokkenmeningitis identifiziert werden [Kastenbauer, S. et al., 2002c; Pfister, H. W. und Scheld, W. M., 1997]. Tiermodelle lieferten auch wichtige Informationen über die dem Meningitis-assoziierten Hörschaden zugrunde liegenden Pathophysiologie. Bhatt et. al stellten 1991 erstmals mittels akustisch evozierter Potentiale eine Ertaubung von Kaninchen 48 Stunden nach Inokulation von *Streptococcus pneumoniae* in die Cisterna magna fest [Bhatt, S. et al., 1991]. Weitere Untersuchungen am Meerschweinchen und der Ratte bestätigten das Auftreten eines Hörschadens bei experimenteller Meningitis [Amaee, F. R. et al., 1995; Kesser, B. W. et al., 1999; Osborne, M. P. et al., 1995; Winter, A. J. et al., 1997]. Außerdem deckten sich die histologischen Beobachtungen in Tiermodellen der bakteriellen Meningitis weitgehend mit den Veränderungen, wie sie von Merchant et al. in menschlichen Kochleae beschrieben wurden: Histologisch zeigte sich eine vorwiegend granulozytäre Entzündung der Perilymphräume, die von Einblutungen begleitet wurde und in der basalen Windung der Scala tympani akzentuiert war [Bhatt, S. et al., 1991; Kesser, B. W. et al., 1999; Osborne, M. P. et al., 1995; Rappaport, J. M. et al., 1999; Winter, A. J. et al., 1996]. Neben der Entzündung wurden bei meningogener Labyrinthitis auch strukturelle Veränderungen in der Cochlea beobachtet: In einem Meerschweinchenmodell der Pneumokokkenmeningitis fanden sich bereits sechs Stunden nach Infektion eine Kraterbildung der apikalen Oberfläche innerer Stützzellen und eine Ablösung der Stereozilien von inneren Haarzellen [Winter, A. J. et al., 1996]. Darüber hinaus zeigte sich in einem Kaninchenmodell der Pneumokokkenmeningitis elektronenmikroskopisch auch eine Schädigung der übrigen Zellen des Cortischen Organs, sowie von terminalen Nervendigungen und Intermediärzellen der Stria vascularis [Rappaport, J. M. et al., 1999]. Im Kaninchenmodell der *Haemophilus influenzae* Meningitis fand man 20 Stunden nach Infektion ebenso strukturelle Schäden am Cortischen Organ, dem Sulcus spiralis und der Stria vascularis [Osborne, M. P. et al., 1995]. Die diesen multiplen kochleären Läsionen zugrunde liegenden Schädigungsmechanismen und deren Auswirkungen auf das Hörvermögen sind bislang jedoch unzureichend geklärt.

1.6. Pathophysiologische Untersuchungen bei meningogener Labyrinthitis

In der Vergangenheit konnten eine Vielzahl pathogener Eigenschaften von Pneumokokken identifiziert werden. Hierzu zählen kapsuläre Polysaccharide, Zellwandbestandteile wie Lipoteichonsäure und Oberflächenproteine wie Pneumolysin oder Neuraminidase [Jedrzejewski, M. J., 2001; Tuomanen, E. I. et al., 1995]. Für den Meningitis-assoziierten Hörschaden wurde die Rolle von Pneumolysin bereits beim Meerschweinchen untersucht. Nach intrazisternaler Infektion mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken kam es zu einer deutlich schwächeren Ausprägung des Meningitis-assoziierten Hörschadens als bei Tieren, die Pneumolysin-produzierende Pneumokokken erhielten [Winter, A. J. et al., 1997]. Dazu passend führte die Perfusion der Scala tympani mit Pneumolysin zu einer Abnahme des Summenaktionspotentials und des kochleären Mikrophonpotentials, sowie zu strukturellen Schädigungen des Cortischen Organs [Comis, S. D. et al., 1993]. Im gleichen Tiermodell konnte durch Vorbehandlung der Cochlea mit dem NO-Antagonisten N-Methyl-L-Arginin (NMLA) der Schaden reduziert werden [Amaee, F. R. et al., 1995], während die Perfusion der Cochlea mit NO-Donoren ebenfalls zur Abnahme des Mikrophonpotentials und zu ähnlichen morphologischen Schäden wie nach Perfusion mit Pneumolysin führte [Amaee, F. R. et al., 1997]. Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle von Pneumolysin und NO für die Entwicklung des Hörschadens bei Pneumokokkenmeningitis hin. Stickstoffmonoxid kann zum einen durch die beiden unter Normalbedingungen in der Cochlea vorhandenen konstitutiven NO-Synthasen produziert werden: die Calcium abhängige endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS III) und die neuronale NO-Synthase (nNOS oder NOS I) [Franz, P. et al., 1996]. Zum anderen kann als Quelle die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS II) dienen, die nach Stimulation durch Chemokine und Zytokine exprimiert wird [Andrew, P. J. und Mayer, B., 1999]. Eine Expression von iNOS konnte in Cochleae von Meerschweinchen drei Stunden nach Lipopolysaccharid-Instillation in die Paukenhöhle von Meerschweinchen beobachtet werden. Diese iNOS Expression ging einem Hörschaden voraus, der sich erst nach 12 Stunden ausbildete [Watanabe, K. et al., 2000]. Bakterielle Toxine scheinen demnach bei eitriger Labyrinthitis über eine Expression von iNOS und eine folgende NO-Produktion zu Schäden zu führen.

1.7. Peroxynitrit: ein wichtiger Mediator zerebraler Schädigung bei bakterieller Meningitis

Stickstoffmonoxid reagiert mit Superoxidanion (O_2^-) zu dem sehr toxischen Molekül Peroxynitrit ($ONOO^-$) [Crow, J. P. und Beckman, J. S., 1995], wenn beide am gleichen Ort produziert werden. Peroxynitrit spielt bei Schock, Reperfusionsschaden nach Ischämie und bei entzündlichen Prozessen eine große Rolle [Cuzzocrea, S. et al., 2001]. Es ist in der Lage, verschiedene lebenswichtige Komponenten von Zellen zu zerstören: Es verändert beispielsweise Membranen durch die Peroxidation von Lipiden [Rubbo, H. et al., 1994], hemmt für die mitochondriale Atmungskette wichtige Enzyme wie die Cytochromoxidase C [Brown, G. C. und Borutaite, V., 1999] oder produziert Brüche der Desoxyribonukleinsäure [Szabo, C., 1996]. Außerdem führt $ONOO^-$ zu einer Verstärkung der Immunantwort, wie durch die Aktivierung der Prostaglandin-Biosynthese [Goodwin, D. C. et al., 1999]. In Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wirkt $ONOO^-$ zytotoxisch auf phagozytierte Bakterien [Zhu, L. et al., 1992]. Im Liquor sind die potentiellen antibakteriellen Eigenschaften von $ONOO^-$ allerdings eingeschränkt, da es aufgrund geringer Konzentrationen opsonierender Substanzen wie Komplement und IgG nicht zu einer effizienten Phagozytose des Erregers kommt [Stahel, P. F. et al., 1997]. Es gibt eine Reihe von Befunden, die darauf hinweisen, dass $ONOO^-$ bei bakterieller Meningitis durch vielfältige Mechanismen eine schädliche Wirkung hat und zur Verstärkung der Entzündung, Schädigung der vaskulären Funktion, Blut-Hirn-Schrankenstörung und Zellschädigung führt (*Abbildung 2*) [Kastenbauer, S. et al., 2002c; Koedel, U. und Pfister, H. W., 1999b]. Bei Patienten, die an einer akuten Pneumokokkenmeningitis verstarben, konnte $ONOO^-$ immunhistochemisch indirekt durch 3-Nitrotyrosin und 4-Hydroxynonenal (einem Lipidperoxidationsprodukt) in den Leptomeningen, sowie infiltrierenden Granulozyten und kortikalen Blutgefäßen nachgewiesen werden [Kastenbauer, S. et al., 2002b; Kastenbauer, S. et al., 2002c]. Hohe Werte für Nitrotyrosin im Liquor waren assoziiert mit einem schlechten Krankheitsausgang [Kastenbauer, S. et al., 2002b] und im Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis wurden durch den Einsatz von Peroxynitritfängern Blut-Hirn-Schrankenstörung, Hirndruck und die Expression proinflammatorischer Chemokine verringert [Kastenbauer, S. et al., 1999; Kastenbauer, S. et al., 2001]. $ONOO^-$ trägt also wahrscheinlich entscheidend zur Entstehung zerebraler Komplikationen bei bakterieller Meningitis bei. Ob bei bakterieller Meningitis auch Schäden im Innenohr durch $ONOO^-$ verursacht werden, wurde erstmals in dieser Studie untersucht.

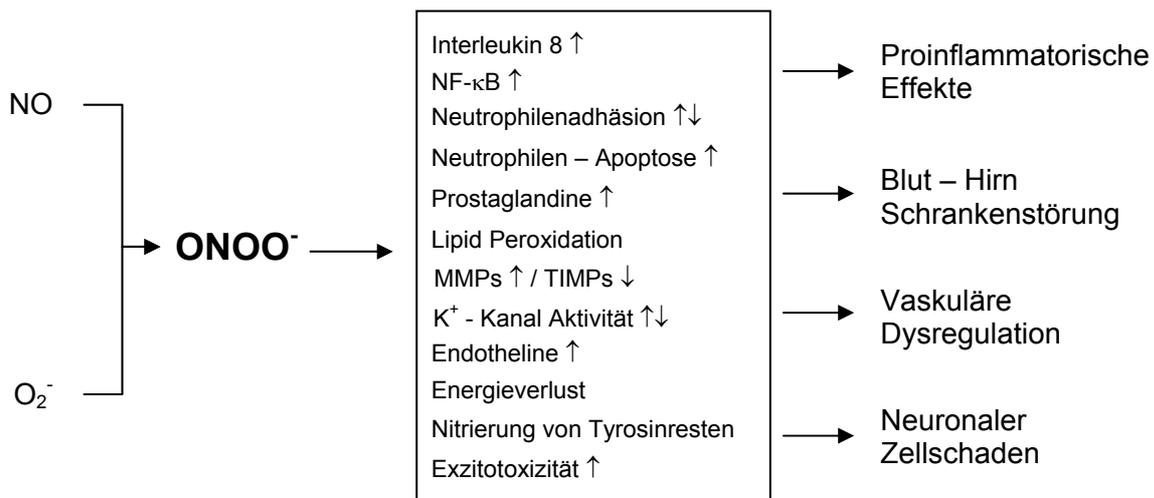


Abbildung 2: Potentielle Effekte von Peroxynitrit bei bakterieller Meningitis

Das aus Stickstoffmonoxid und Superoxidanion entstandene Peroxynitrit kann über eine Vielzahl von Mechanismen, die bereits *in vitro* und an anderen Tiermodellen nachgewiesen werden konnten, zu Schäden bei bakterieller Meningitis führen (Abbildung aus [Kastenbauer, S. et al., 2002c]).

1.8. Kernpunkte der Studie

Um mehr über die Pathophysiologie des Meningitis-assoziierten Hörschadens und insbesondere die Rolle reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen bei meningogener Labyrinthitis zu erfahren, wurde ein Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis erweitert und die Messung von Akustisch Evozierten Potentialen zur Bestimmung des Hörvermögens der Tiere etabliert. Histologische Veränderungen und das Hörvermögen wurden in Abhängigkeit der injizierten Pneumokokkenmenge und im Zeitverlauf erstmals bis zwei Wochen nach Infektion untersucht. Durch den Einsatz verschiedener Antioxidantien zur adjuvanten Therapie wurde die pathophysiologische Rolle von ONOO⁻ bei der Entwicklung des Meningitis-assoziierten Hörschadens und der zugrunde liegenden histopathologischen Veränderungen untersucht.

2. Methoden

2.1. Versuchsserien

Im Laufe der Arbeit wurden vier isolierte Versuchsansätze durchgeführt, die im Folgenden als Versuchsserie A, B, C und D bezeichnet werden. Da zum Teil unterschiedlichen Fragestellungen nachgegangen wurde, wurden je nach Versuchsserie unterschiedliche Methoden eingesetzt (*Abbildung 3 und Tabelle 1*).

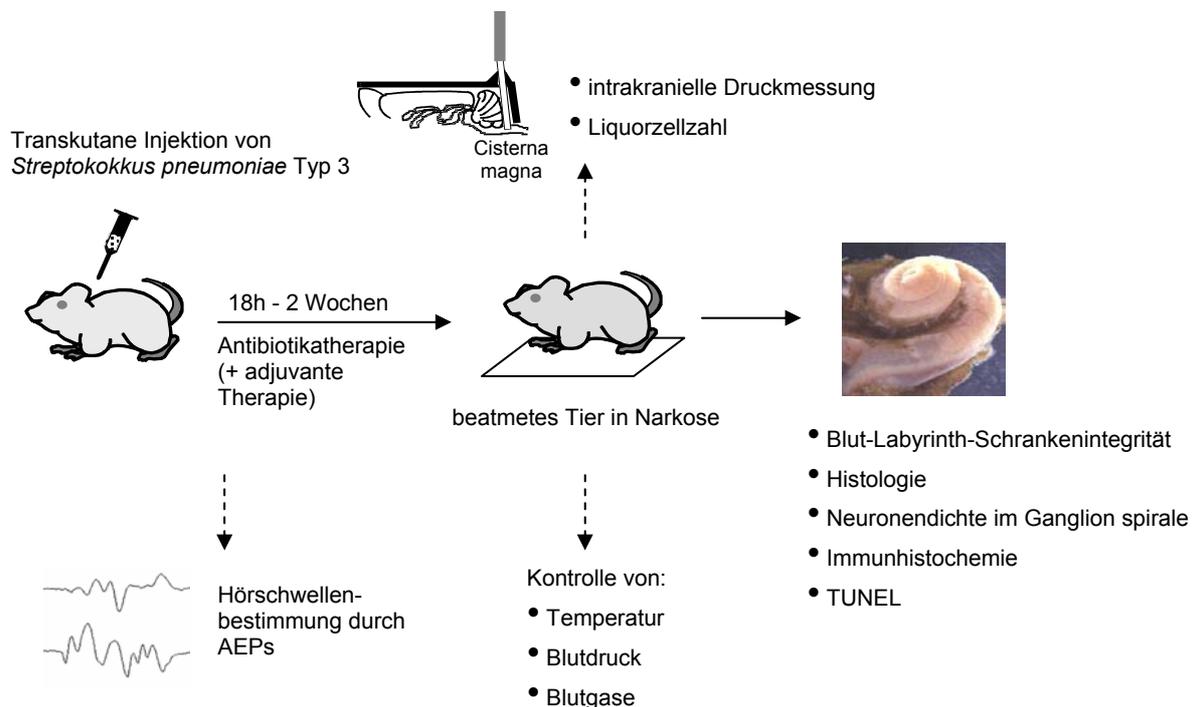


Abbildung 3: Tiermodell und angewandte Untersuchungsmethoden

Nach intrazisternaler Infektion wurden bei den Mäusen und Ratten je nach Gruppenzugehörigkeit unterschiedliche Parameter bestimmt. Nach Versuchsende wurden die Cochleae entnommen, in Paraffin eingebettet und mit unterschiedlichen Methoden untersucht.

In Versuchsserie A wurden Felsenbeine von Tieren aus einer Versuchsreihe evaluiert, die die Rolle von ONOO^- für zerebrale Pathomechanismen bei Pneumokokkenmeningitis untersuchte [Kastenbauer, S. et al., 1999; Kastenbauer, S. et al., 2001; Kastenbauer, S. et al., 2002a]. Die Felsenbeine wurden zunächst histologisch mit der Fragestellung ausgewertet, ob es in diesem Tiermodell der Pneumokokkenmeningitis überhaupt zu einer eitrigen Labyrinthitis kommt. Außerdem wurde immunhistochemisch die Entstehung von ONOO^- in der Cochlea untersucht und die Rolle der Peroxynitritfänger MnTBAP und Harnsäure auf die Permeabilität

der Blut-Labyrinth-Schranke evaluiert. Aufgrund des regelhaften Auftretens einer Labyrinthitis in Versuchsserie A wurde in Versuchsserie B die Messung von akustisch evozierten Potentialen (AEP) zur Bestimmung der Hörschwelle etabliert und Hörverlust, Blut-Labyrinth-Schrankenstörung und Neuronenverlust im Ganglion spirale in Abhängigkeit von Erregermenge und Zeitverlauf evaluiert. Dabei wurde das Tiermodell zur Untersuchung eines Zeitpunkts nach Antibiotikatherapie und Abheilung der Erkrankung modifiziert (zwei Wochen nach Infektion). Anschließend wurden in Versuchsserie C die Substanzen MnTBAP, N-Acetyl-L-Cystein (NAC) und der PARP-Inhibitor INO-1001 erstmals als adjuvante Therapie zur Prävention des Hörschadens bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis getestet. Im Hinblick auf zukünftige Studien mit Knockout Tieren wurde in Versuchsserie D das Modell auf die Maus übertragen.

Versuchsserie	Versuchstiere	Versuchsdauer	Adjuvante Therapie	Eingesetzte Methoden					
				AEP	ICP/WBC	Evans Blue	Histologie	Immunhistochemie	sonstige
A	Ratten	26 h	MnTBAP, Harnsäure	-	x / x	x	x	iNOS, eNOS, Nitrotyrosin	-
B	Ratten	18 h, 24 h, 48 h, 2 Wochen	-	klick	x / x	x	x	PARP p85-Spaltprodukt	TUNEL
C	Ratten	2 Wochen	MnTBAP, NAC, INO 1001	klick 10kHz 1kHz	- / x	x	x	-	-
D	Mäuse	24 h	-	klick 10kHz 1kHz	- / x	-	x	-	Färbung nach Gram

Tabelle 1: Versuchsserien und angewandte Methoden

2.2. Hörmessung durch akustisch evozierte Potentiale

Um die Hörschwellen der Tiere zu bestimmen, wurde die Messung Akustisch Evozierter Potentiale (AEP) an der Ratte und der Maus etabliert. Bei dieser Methode werden die durch einen akustischen Stimulus im Hörnerv und Hirnstamm

hervorgerufenen Summenaktionspotentiale erfasst. Da die einzelnen Potentialänderungen sehr klein sind und von der normalen Hirnaktivität nicht abgegrenzt werden können, wird ein identischer Stimulus mehrfach dargeboten. Im Anschluss an jeden Impuls werden über einen bestimmten Zeitraum die evozierten Potentialveränderungen aufgezeichnet und gemittelt, wobei sich dann die spezifische Reizantwort aus der unspezifischen Hirnaktivität abhebt.

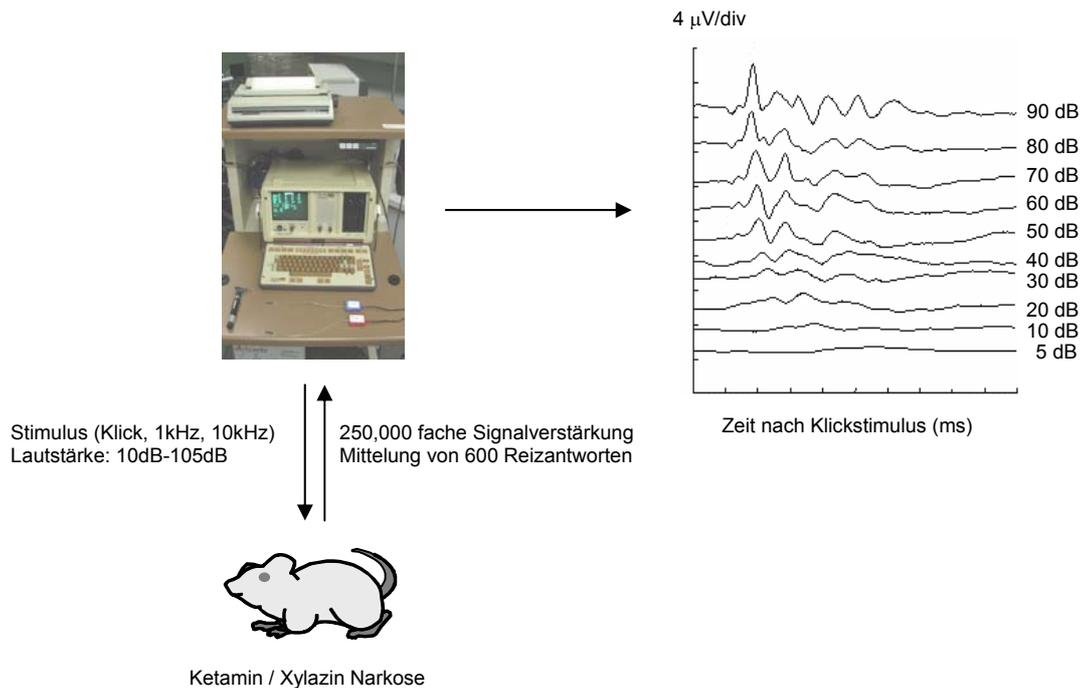


Abbildung 4: Hörschwellenbestimmung bei Ratte und Maus

Bei mit Ketamin und Xylazin narkotisierten Tieren wurde durch akustische Reize eine Erregung der Hörbahn evoziert. Die daraus entstehenden Potentialänderungen wurden mit Nadelelektroden abgeleitet, amplifiziert und gemittelt. Aus den resultierenden Kurven wurde die Hörschwelle bestimmt. Bei der abgebildeten Hörkurve eines gesunden Tiers betrug die Hörschwelle 10dB.

Zur Untersuchung wurden die Tiere durch die intraperitoneale Gabe von 100mg/kg Ketaminhydrochlorid und 5mg/kg Xylazin anästhesiert. Die Kombination aus dem analgetisch und sedierend wirkenden Ketamin und dem α 2-Adrenozeptoragonisten Xylazin wirkt kurz (15-30 Minuten), kann durch wiederholte Gaben verlängert werden, ist nicht atemdepressiv und hebt den Blutdruck. Infolgedessen konnte die Narkose wiederholt auch bei kranken Tieren ohne notwendige Beatmung zu jedem Zeitpunkt des Experiments eingesetzt werden. Ketaminnarkosen haben zudem keinen Einfluss auf die Ableitung von AEPs [Detsch, O. und Kochs, E., 1997]. Um sicher zu stellen, dass keine Verlegungen des äußeren Gehörgangs aufgrund von Cerumen oder Verletzungen des Trommelfells zu einer Verfälschung der Ergebnisse

führen würden, wurde vor jeder Hörmessung eine Otoskopie durchgeführt. Nadelelektroden wurden auf Höhe des linken und rechten Mastoids, am Vertex und im Nackenbereich der Tiere unter das Fell gestochen. Die Ableitung erfolgte zwischen den Mastoidelektroden und der Vertexelektrode, während die Nackenelektrode als Erdung diente. Wenn sich bei der anschließenden Kontrollmessung herausstellte, dass der Widerstand zwischen zwei Elektroden größer als $5k\Omega$ war, wurden die Elektroden neu platziert. Zur Darbietung des akustischen Stimulus wurden Schlauchkopfhörer verwendet, die genau in den äußeren Gehörgang der Tiere passten. Die Untersuchungen wurden in Versuchsserie B mit dem AEP Gerät „Compac Four“ durchgeführt. Um die Frequenzabhängigkeit des Hörschadens bei Meningitis auch in diesem Modell zu erfassen, wurden die Hörschwellen in Versuchsserie C und D mit einem neuen 4-Kanal AEP Gerät bestimmt. Im Gegensatz zu dem in Versuchsserie B verwendeten Gerät, das lediglich Klickimpulse (Dauer: $10\mu\text{sec}$, Reizfrequenz: 24,1Hz) als Stimulus generieren konnte, war es mit dem neuen AEP-Gerät in Versuchsserie C und D möglich, zusätzlich Tonimpulse von 1kHz und 10kHz zu verwenden (Anschwellphase = 1ms, Plateauphase = 2ms, Abschwelphase = 1ms, Reizfrequenz = 23,0Hz). Die durch den Stimulus evozierten Potentialänderungen wurden verstärkt ($\times 250.000$) und jeweils 600 Reizantworten gemittelt. Bei Klickstimuli wurden Wellen mit einer Frequenz unter 150Hz oder über 10kHz, bei der Tonaudiometrie unter 6Hz und über 3000Hz herausgefiltert, da so optimale Hörkurven abgeleitet werden konnten. Um die Hörschwelle zu bestimmen, wurden zunächst 105dB laute Impulse dargeboten und das zugehörige AEP aufgezeichnet. Anschließend wurde die Lautstärke in 10dB Schritten reduziert, bis keine Reizantwort mehr zu erkennen war. Der leiseste Stimulus, welcher messbare AEPs auslösen konnte, wurde als Hörschwelle definiert. Um die Messung zu verifizieren, wurde das AEP bei Hörschwelle und 10dB unter Hörschwelle jeweils zweimal abgeleitet. Bei den Ratten wurde mit einer Lautstärke von maximal 105dB stimuliert, um bei den repetitiven Messungen nicht das Risiko eines Lautstärke-induzierten Hörschadens einzugehen. Da die Mäuse nur kurz vor Ende des Experiments untersucht wurden, konnte in Versuchsserie D mit maximal 130dB Lautstärke stimuliert werden. Die abgeleiteten AEPs waren in höchstem Maße reproduzierbar: Sowohl bei repetitiver Messung gesunder Tiere, als auch im interindividuellen Vergleich gesunder Tiere zeigten sich keine Unterschiede in der Wellenform. Ipsilateral konnten sechs charakteristische Spitzen in 56 AEP Aufnahmen identifiziert werden, deren Latenzen äußerst konstant ausgeprägt waren (*Abbildung 5*). Die mittlere Hörschwelle vor Infektion lag bei $22,310 \pm 6,45\text{dB}$.

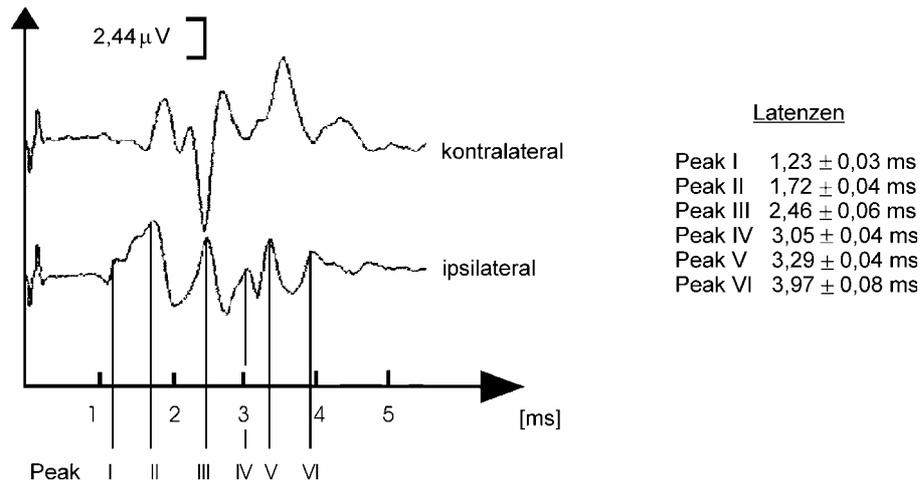


Abbildung 5: akustisch evozierte Potentiale bei gesunden Ratten

Die akustisch evozierten Potentiale von gesunden Tieren waren sowohl intra-, wie auch interindividuell sehr gut reproduzierbar. Bei 56 Ohren gesunder Ratten konnten für Klick-Stimulus 6 konstant vorhandene Peaks festgestellt werden. Stimulusintensität: 90 dB.

2.3. Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis (modifiziert nach [Koedel, U. et al., 2000])

2.3.1. Klinischer Score

Vor Versuchsbeginn und zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuche wurde der klinische Zustand der Tiere bewertet. Dazu wurde ein von Koedel et al. entwickeltes Punktesystem für Ratten mit einer Skala von 0 bis 10 Punkten eingesetzt [Koedel, U. et al., 2000]. Die Punkte wurden wie folgt verteilt:

Vigilanz (maximal 5 Punkte): wach = 0, leicht benommen = 1, benommen = 2, soporös = 3, leicht komatös = 4, schwer komatös = 5.

Motorik (maximal 3 Punkte): Laufen maximal auf Teststab mit 1,2 cm Breite = 0, Laufen maximal auf Teststab mit 1,7 cm Breite = 1, Laufen maximal auf Teststab mit 3,0 cm Breite = 2, Laufen auf Teststab mit 3,0 cm nicht möglich = 3.

Sonstiges (maximal 2 Punkte): Tremor = 1 Punkt, Piloerektion = 1 Punkt.

2.3.2. Infektion

Alle Versuchstiere wurden mit Halothan, das in einem Glastopf verdampft wurde, kurzzeitig anästhesiert und mit einer Insulinspritze durch intrazisternale Injektion von bekapselten *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 infiziert. Dazu wurde der Kopf um 70° flektiert und mit der linken Hand fixiert. Die Spritze wurde auf das Os occipitale aufgesetzt, vorsichtig nach kaudal abtastend die Membrana atlanto-occipitalis gesucht, durchstoßen und die Pneumokokken injiziert. Die Inokulationslösung (150 µl) enthielt je nach experimenteller Gruppen $1,5 \times 10^5$, $7,5 \times 10^5$ oder $1,5 \times 10^6$ Kolonienbildende Einheiten (KBE) in steriler, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH = 7,4) (Tabellen 2, 3 und 4). Kontrolltieren wurde als Placebo 150µl PBS injiziert. In fünf Fällen kam es zum Atemstillstand und in sieben Fällen zu zentralen Paresen, was auf eine Verletzung des Hirnstamms bei Injektion schließen liess. Diese Tiere wurden umgehend euthanasiert und von der Studie ausgeschlossen. Nachdem die Ratten aus der Narkose erwacht waren, wurden sie einzeln in einen Plastikkäfig gesetzt und mit Futter und Wasser *ad libidum* versorgt.

Gruppe (n)	Intrazisternales Inokulum	Adjuvante Therapie	Dosis
Kontrollen (4)	PBS	Plazebo (NaCl)	1 ml
Meningitis (9)	$1,5 \times 10^5$ KBE	Plazebo (NaCl)	1 ml
MnTBAP (6)	$1,5 \times 10^5$ KBE	MnTBAP	15 mg/kg
Harnsäure (8)	$1,5 \times 10^5$ KBE	Harnsäure	300 mg/kg

Tabelle 2: Experimentelle Gruppen in Versuchsserie A

(n) Anzahl untersuchter Ohren

Gruppe (n)	Intrazisternales Inokulum	Versuchsdauer (n_T/n_H)			
		18 h	24 h	48 h	2 Wochen
Kontrollen (7)	PBS	-/14	-/14	6/14	6/8
Niedriges Inokulum (3)	$1,5 \times 10^5$ KBE	-/6	-/6	6/6	-/-
Mittleres Inokulum (9)	$7,5 \times 10^5$ KBE	-/18	-/18	6/18	11/12
Hohes Inokulum (11)	$1,5 \times 10^6$ KBE	5/22	6/16	5/6	-/-

Tabelle 3: Experimentelle Gruppen in Versuchsserie B

n = Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe, n_T = Anzahl der mit akustisch evozierten Potentialen getesteten Ohren, n_H = Anzahl der histologisch untersuchten Ohren

Gruppe (n)	Intrazisternales Inokulum	Adjuvante Therapie	Dosis
Kontrollen (5)	PBS	Plazebo (NaCl)	1 ml, 3 x täglich
Meningitis (7)	$7,5 \times 10^5$ KBE	Plazebo (NaCl)	1 ml, 3 x täglich
MnTBAP (5)	$7,5 \times 10^5$ KBE	MnTBAP	15 mg/kg, 1 x täglich
NAC (5)	$7,5 \times 10^5$ KBE	NAC	300 mg/kg, 3 x täglich
INO-niedrige Dosis (3)	$7,5 \times 10^5$ KBE	INO-1001	3 mg/kg, 3 x täglich
INO-hohe Dosis (4)	$7,5 \times 10^5$ KBE	INO-1001	15 mg/kg, 3 x täglich

Tabelle 4: Experimentelle Gruppen in Versuchsserie C

n = Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe

2.3.3. Antibiotika- und adjuvante Therapie

Tiere in Versuchsserie A wurden 20 Stunden und Tiere in Versuchsserie B oder C 18 Stunden nach Infektion mit in NaCl gelösten 100mg/kg Ceftriaxon intraperitoneal behandelt. Der Behandlungszeitpunkt wurde für Versuchsserie B auf 18 Stunden nach Infektion gelegt, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits signifikant erkrankt waren und teilweise unter einem Hörverlust litten. Je nach Versuchsgruppe erhielten die Tiere in Versuchsserie A 20 Stunden nach Infektion zusätzlich in 1ml NaCl gelöst entweder 15mg/kg MnTBAP, 300mg/kg Harnsäure oder NaCl 0,9% als Plazebo (*Tabelle 2*). Bei den zwei Wochen dauernden Experimenten in Versuchsserie B und C erhielten die Tiere außerdem je 100mg/kg Ceftriaxon zwei, drei und vier Tage nach Infektion. In Versuchsserie C erhielten die Tiere je nach Versuchsgruppe als adjuvante Therapie ab 18 Stunden nach Infektion für vier Tage in je 1ml NaCl gelöst täglich 15mg/kg MnTBAP, achtstündlich 300mg/kg NAC, achtstündlich 3mg/kg oder 15mg/kg INO-1001 oder achtstündlich NaCl 0,9% als Plazebo (*Tabelle 4*).

2.3.4. Versuchsende

Narkose und Beatmung

Bei Versuchsende wurden die Ratten mit Thiopental (Versuchsserie A) oder Ketamin und Xylazin (Versuchsserie B, C und D) anästhesiert. Der Wechsel des Anästhetikums zwischen Versuchsserie A und B wurde vorgenommen, da ab Versuchsserie B bei der vorangehenden Messung der AEPs bereits Ketamin und Xylazin verwendet worden war und ein Wechsel der Medikamente während der Narkose nicht sinnvoll erschien. Alle 5-10 Minuten wurde die Narkosetiefe durch

einen Schmerzreiz am Schwanz des Tieres überprüft und gegebenenfalls zusätzlich Narkotikum intraperitoneal verabreicht. Da die Tiere in Narkose sehr schnell auskühlten, wurde mit einer rektalen Temperatursonde die Körpertemperatur kontinuierlich gemessen und mit einem Heizkissen konstant bei ca. 37,5°C gehalten. Die Trachea wurde präpariert, mobilisiert und mit einer Mikroschere quer eröffnet. Ein Beatmungsschlauch wurde eingeführt und mit einem Faden an der Trachea fixiert. Das freie Ende des Beatmungsschlauchs wurde mit einem Tierbeatmungsgerät verbunden und die Ratte unter Zufuhr von Sauerstoff beatmet (Frequenz = 70/min, Beatmungsvolumen = 3,5ml/Beatmung). Anschließend wurde das Fell des Tieres mit zwei Stichen vernäht.

Arterielle Blutdruckmessung

Um den arteriellen Blutdruck und die arteriellen Blutgase der Tiere während des weiteren Prozedere zu überwachen und um den Farbstoff Evans Blue (zur Erfassung der Integrität von Blut-Hirn- und Blut-Labyrinth-Schranke) zu injizieren, wurde unter einem Dissektionsmikroskop die Arteria femoralis sinister freipräpariert, eröffnet, ein Katheter eingeführt und bis unter das Ligamentum inguinale geschoben. Der Katheterschlauch wurde mit zwei Fäden an der Arterie fixiert, durch eine Infusion mit isotonischer Kochsalzlösung offen gehalten und zur arteriellen Blutdruckmessung an einen Druckumwandler angeschlossen. Im arteriellen Blut wurden die Blutgase bestimmt und Beatmungsfrequenz sowie Sauerstoffzufuhr entsprechend angepasst.

Intrakranielle Druckmessung

Bei den Versuchsansätzen A und B wurde eine intrakranielle Druckmessung über eine intrakranielle Drucksonde durchgeführt. Zunächst wurden die Tiere an drei Punkten fixiert. Dazu dienten zwei Halterungen am linken und rechten Os temporale und eine Schraubklemme am Os nasale. Das Os occipitale wurde freigelegt. Nachdem alle Blutungen gestillt waren, konnte mit Hilfe eines Mikrobohrers ein Loch (im Winkel von ca. 70° in Bezug auf den ventralen Abschnitt des Os occipitale) in den kaudalen Teil des Os occipitale gebohrt werden. Anschließend wurde eine am oberen Ende mit einem Gummischlauch versehene 22G Kanüle als Katheter eingeführt. Die Spalträume zwischen Katheter und Knochen wurden mit Sekundenkleber abgedichtet, der Katheter mit Palladur am Schädeldach fixiert und an einen Druckwandler zur intrakraniellen Druckmessung angeschlossen. Da in

Versuchsserie B bereits gezeigt werden konnte, dass nach zwei Wochen kein erhöhter Hirndruck bei Ratten mit Zustand nach Pneumokokkenmeningitis, konnte in Versuchsserie C auf die aufwendige Platzierung eines intrakraniellen Katheters verzichtet werden.

Verabreichung von Evans Blue

Über den intraarteriellen Katheter wurde 1ml Evans Blue 1% in NaCl langsam appliziert. Evans Blue ist ein Farbstoff, der an Albumin gebunden wird und unter normalen Umständen die Blut-Hirn-Schranke nicht überschreitet [Wolman, M. et al., 1981]. Erst bei Störungen der Blut-Hirn- oder Blut-Labyrinth-Schranke, kann es diese Barrieren übertreten. Anschließend kann Evans Blue im Hirn oder der Cochlea fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden, da es bei Anregung mit grünem Licht rotes Licht emittiert.

Probenentnahme und Perfusion

Eine Stunde nach Injektion von Evans Blue wurden Hirndruck, Blutdruck und Körpertemperatur notiert und Liquorproben über den intrakraniellen Katheter entnommen. In Versuchsserie C wurde Liquor durch subokzipitale Punktion gewonnen. Anschließend wurden die Tiere durch eine Überdosis Thiopental getötet. Um optimale histologische Resultate und nicht durch intravasales Blut verfälschte Werte für die Bestimmung der Blut-Labyrinth-Schranken Integrität mittels Evans Blue zu erfassen, wurden die Tiere mit PBS perfundiert. Dazu wurden die Tiere thorakotomiert und das Herz mobilisiert. Der linke Ventrikel wurde eröffnet, ein Katheter in die Aorta vorgeschoben und mit einem Faden fixiert. Die Aorta descendens wurde in Höhe des Zwerchfells abgeklemmt und der rechte Vorhof eröffnet. Die Tiere wurden dann druckkontrolliert durch einen Perfusor mit 100ml eiskaltem PBS perfundiert.

Sektion der Tiere

Nach erfolgreicher Perfusion wurde das Schädeldach abgenommen und die Dura mater entfernt. Anschließend wurde das Gehirn schonend von der Schädelbasis abgelöst, Zerebellum und Hirnstamm wurden abgetrennt und das Großhirn in Tissue Tec bei -80°C eingefroren (Die Gehirne wurde nicht im Rahmen dieser Dissertation

untersucht, jedoch für weitere Studien asserviert). Die beiden Ossa temporales wurden vorsichtig aus der Schädelbasis präpariert und der Meatus acusticus externus sowie die Paukenhöhle eröffnet. Mit einer Pinzette wurden anschließend Cochlea und Labyrinth freigelegt.

Liquorleukozytenzahl

Von dem gewonnenen Liquor wurden 10µl in einem Verhältnis von 1:1 mit 30% Essigsäure verdünnt, um die Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde mit einer Neubauer Zählkammer die Leukozytenzahl im Liquor bestimmt.

2.3.5. Bakteriennachweis im Liquor

Durch eine Verdünnungsreihe mit sterilem PBS wurden Liquorproben in einer Verdünnung von 1:10⁵ und 1:10⁷ unter sterilen Bedingungen auf Blutagarplatten ausgestrichen. Nach 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank konnte bei allen infizierten Tieren in der Akutphase Pneumokokkenwachstum nachgewiesen werden.

2.4. Mausmodell der bakteriellen Meningitis

2.4.1. Klinischer Score

Für die Versuche mit Mäusen wurde ein durch Koedel et al. modifiziertes Punktesystem zur Bewertung der klinischen Beeinträchtigung der erkrankten Tiere eingesetzt [Garcia, J. H. et al., 1995]. 0 Punkte erhielten Tiere, die gesund waren. Verstorbene Tiere erhielten 20 Punkte. Die Aufteilung der Punkte erfolgte folgendermaßen:

Spontanmotorik (maximal 3 Punkte): Maus bewegt sich und nähert sich in kurzer Zeit mindestens drei Wänden des Käfigs = 0; Maus bewegt sich, exploriert nicht alle Seiten des Käfigs, erreicht aber letztendlich eine Seite = 1; Maus richtet sich nicht auf und bewegt sich fast nicht = 2; Maus bewegt sich überhaupt nicht = 3.

Reflexstatus (maximal 3 Punkte): Maus wird am Schwanz gehoben: Maus bewegt alle Extremitäten symmetrisch = 0; Flexion des Körpers = 1; Drehung um die eigene Achse = 2; keine spontane Reaktion = 3.

Balancieren (maximal 3 Punkte): Maus läuft auf Stab mit 4,5mm Breite = 0; Maus läuft maximal auf Stab mit 9mm Breite = 1; Maus läuft maximal auf Stab mit 13,5mm Breite = 2; Maus läuft nicht mehr auf Stab mit 13,5mm Breite = 3.

Propriozeption(maximal 2 Punkte): Stimulus durch Wattestäbchen am rechten und linken Kopfrand: Maus bewegt den Kopf gleichmäßig schnell auf beide Seiten = 0; Maus reagiert langsam auf die Stimuli = 1; Maus reagiert nicht = 2.

Hypothermie (maximal 2 Punkte): rektale Temperatur: $>36^{\circ}\text{C}$ = 0; 34°C - 36°C = 1; $<34^{\circ}\text{C}$ = 2.

Gewichtsverlust (maximal 2 Punkte): $< 6\%$ = 0; 6 - 12% = 1; $>12\%$ = 2.

Sonstige (maximal 4 Punkte): Tremor = 1, Piloerektion = 1, Anfälle = 1, Maus ist lethargisch = 1.

2.4.2. Infektion

Vor Versuchsbeginn wurden bei allen Tieren AEPs abgeleitet und die Hörschwelle für Klicks und für Töne von 1kHz und 10kHz bestimmt. Anschließend wurde den Tieren $1,5 \times 10^5$ KBE *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 in $15\mu\text{l}$ PBS in die Cisterna magna injiziert (vergleiche Rattenmodell). Nichtinfizierte Kontrolltiere erhielten lediglich $15\mu\text{l}$ steriles PBS. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und bis zum Aufwachen durch ein Heizkissen auf ca. $37,5^{\circ}\text{C}$ konstant gehalten. Im weiteren Verlauf erhielten die Tiere Wasser und Futter *ad libidum*.

2.4.3. Versuchsende

Sektion der Tiere

24 Stunden nach Infektion wurden die Tiere erneut mit Ketamin und Xylazin anästhesiert. Aufgrund des fortgeschrittenen Krankheitsstadiums erhielten die Mäuse lediglich die Hälfte der normalen Dosis. Nach einer weiteren Hörschwellenbestimmung wurden die Mäuse mit einer Überdosis Ketamin getötet. Ein Katheter wurde in der Aorta ascendens fixiert, die Leber durch einige Einschnitte eröffnet und die Maus mit 15ml eiskaltem PBS perfundiert.

Präparation

Das Großhirn wurde freigelegt und bei -80°C eingefroren (zur Verwendung für weitere Studien). Wie bereits im Rattenmodell beschrieben, wurden die Felsenbeine präpariert und entnommen.

2.4.4. Bakterielle Titerbestimmung

Zur bakteriellen Titerbestimmung wurde das Kleinhirn in 1ml sterilem PBS homogenisiert. $10\mu\text{l}$ davon wurden 1:100 und 1:10000 mit sterilem PBS weiter verdünnt, sodass mit je $100\mu\text{l}$ Verdünnungen von $1:10^6$ und $1:10^8$ auf Blutagarplatten ausgestrichen wurden. Nach 24 Stunden im Wärmeschrank (37°C) konnten die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die bakteriellen Titer im Kleinhirn errechnet werden.

2.5. Fixierung und Paraffineinbettung der Felsenbeine

Die Felsenbeine wurden sofort nach der Präparation in 3,7% Formaldehyd für vier Tage fixiert und anschließend der Knochen in 10% EDTA Lösung bei 37°C für eine Woche entkalkt. Dann wurden die Felsenbeine mit einem Einbettautomaten in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom geschnitten (Schnittdicke: $7\mu\text{m}$, Schnittwinkel: 15°). Die Schnitte wurden in einem 37°C warmen Wasserbad geglättet und auf Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie mikroskopisch sofort kontrolliert, um möglichst vergleichbare Schnitte der Kochleae anzufertigen. Die Objektträger waren vorher mit Gelatine beschichtet worden, um ein Abschwimmen des Gewebes bei den immunhistochemischen Färbungen zu verhindern: In 250ml auf 53°C erhitztem Aqua dest. wurden 1100mg Gelatine gelöst und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurden 0,13g Chromalaun zugesetzt und die Objektträger zweimal eingetaucht und dazwischen bei 37°C getrocknet. Die beschichteten Objektträger wurden bis zur Verwendung bei -30°C eingefroren.

2.6. Bestimmung der Blut-Labyrinth-Schrankenpermeabilität

Die Evans Blue Extravasation als Indikator für eine Blut-Labyrinth-Schrankenstörung wurde fluoreszenzmikroskopisch ermittelt: Zur Exzitation wurde Licht mit einer Wellenlänge von 545nm verwendet. Emittiertes Licht mit einer Wellenlänge unter

590nm wurde weggefiltert. Die Emission längerwelligen Lichts wurde mit einem Variocam Videosystem digitalisiert. Die als Windows Bitmap gespeicherten Bilder wurden anschließend mit einem digitalen Bildbearbeitungsprogramm (TINA 2,08e) analysiert. Dazu wurden die Stria vascularis, das Ligamentum spirale, der Limbus spiralis, ein Teil des Knochens und ein Teil der Scala media als Referenzhintergrund markiert. Die optische Dichte/mm² der einzelnen Strukturen wurde ermittelt und durch Subtraktion vom Referenzhintergrund ein der Evans Blue Extravasation proportionaler Wert errechnet.

2.7. Histologie

Entparaffinierung

Für alle nachfolgend aufgelisteten Färbemethoden wurden als erstes die Schnitte nach dem in *Tabelle 5* gezeigten Protokoll entparaffiniert.

		Dauer
1.	Wärmeschrank 57 C	10 min
2.	Xylen 100%	10 min
3.	Xylen 100%	5 min
4.	Ethanol 100%	5 min
5.	Ethanol 80%	5 min
6.	Ethanol 70%	5 min
7.	destilliertes Wasser	2x2 min

Tabelle 5: Entparaffinierungsprotokoll

Die Paraffinschritte wurden unmittelbar vor jeder Färbung durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert.

Hämalaunfärbung / HE-Färbung

Zur Hämalaunfärbung wurden die entparaffinierten Schnitte für 3 Minuten in Hämatoxylin (filtriert, 1:10 in Aqua dest.) getaucht. Anschließend wurden sie für 5-10 Minuten in fließendem Leitungswasser gespült. Für eine Hämalaun-Eosin Färbung

wurden sie dann für 30 Sekunden in Eosin getaucht und wiederum mit Leitungswasser für 5-10 Minuten gewässert. Die gewässerten Schnitte wurden dann bei 37°C getrocknet und mit Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

2.8. Quantifizierung der entzündlichen Veränderungen

Der Ort und das Ausmaß der Entzündung im Akutstadium wurden in Versuchsserie B durch ein selbst entwickeltes Punktesystem von 0 bis 4 bewertet, um die unterschiedlichen Zeitpunkte und Gruppen objektiv miteinander vergleichen zu können (*Abbildung 6A-6E*).

2.9. Quantifizierung der Okklusion der Perilymphräume

Die zwei Wochen nach Infektion beobachtete Okklusion der perilymphatischen Räume wurde quantifiziert. Dazu wurde der prozentuale Anteil der okkludierten Fläche an der Gesamtfläche der basalen Scala tympani ermittelt. Mit dem Programm „Image Tool“ wurde die okkludierte Fläche der basalen Windung der Scala tympani in Pixel² ausgemessen und durch die Größe der ebenfalls ausgemessenen Gesamtfläche der Scala tympani dividiert.

2.10. Neuronendichtebestimmung im Ganglion spirale

Die Spiralganglien wurden in der HE-Färbung mit 1000facher Vergrößerung digitalisiert und als Bitmap gespeichert. Die 270x203mm² großen Bilder wurden auf einen Rahmen von 125x180mm² beschnitten, um sicher zu stellen, dass in allen Ausschnitten die Größe des angeschnittenen Ganglions vergleichbar war und keine „nicht-Ganglionstruktur“, wie z.B. Knochen, darauf zu sehen war. Anschließend wurden die Ganglienzellen in den ausgeschnittenen Rahmen gezählt und für jede Windung der Mittelwert aus beiden angeschnittenen Ganglien ermittelt (*Abbildung 6F und 6G*).

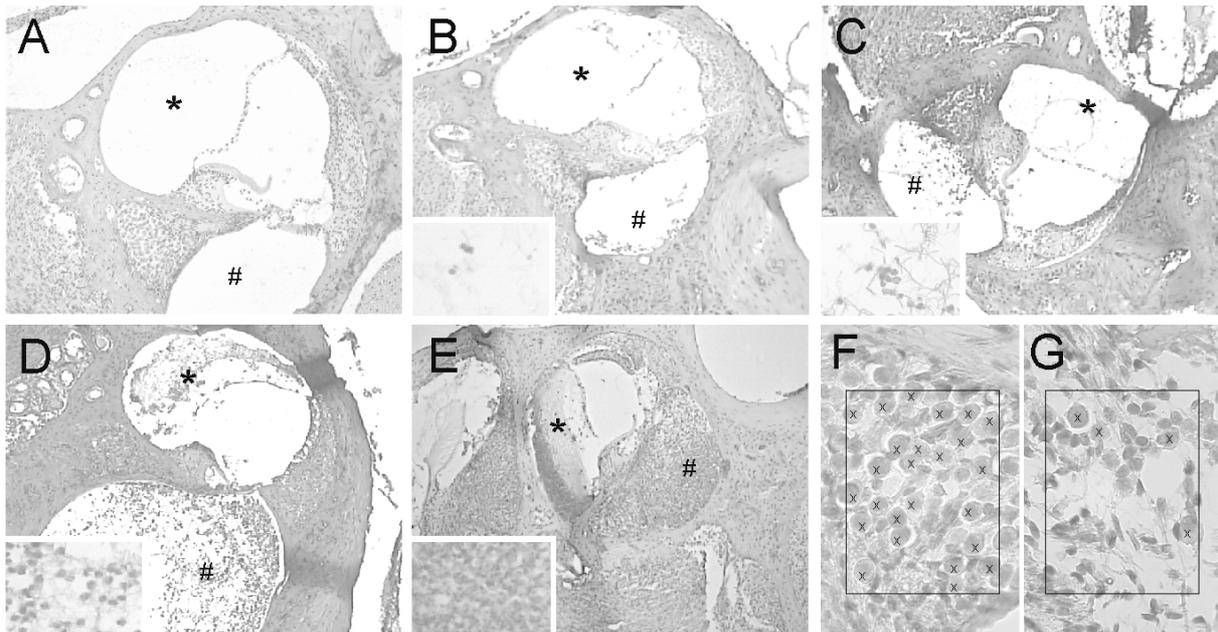


Abbildung 6: Ausprägung von Labyrinthitis und Neuronendichte im Ganglion spirale

(A-E) Skala zur Quantifizierung der entzündlichen Veränderungen (HE-Färbung, x70, Fenster x400). (#) Scala tympani; (*) Scala vestibuli. (A) normal, keine entzündlichen Veränderungen; (B) leicht, vereinzelte entzündliche Veränderungen; (C) mittel, deutliche entzündliche Veränderungen; (D) stark, ausgeprägte entzündliche Veränderungen; (E) sehr stark, exzessive und dichte entzündliche Veränderungen. (F und G) Illustration zu Neuronenzählung im Ganglion spirale (F) eines nicht-infizierten Kontrolltieres und (G) eines infizierten Tieres, zwei Wochen nach Infektion (HE-Färbung, x400).

2.11. Immunhistochemischer Nachweis von eNOS, iNOS, Nitrotyrosin und PARP p85-Spaltprodukt

Immunhistochemisch wurden Primärantikörper gegen folgende Antigenstrukturen eingesetzt: eNOS, iNOS, Nitrotyrosin und PARP p85-Spaltprodukt. Durch Sekundärantikörpern, die gegen den F_c -Teil des Primärantikörpers gerichtet sind, kann eine Verstärkung des späteren Indikatorsignals erreicht werden, da mehrere Sekundärantikörper an einen F_c -Teil des Primärantikörpers binden können. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert und kann deshalb wiederum Streptavidin binden, woran Meerrettich Peroxidase gekoppelt ist. Die Meerrettich Peroxidase katalysiert eine Redoxreaktion von Wasserstoffperoxid und Diaminobenzidin. Diaminobenzidin wird dabei oxidiert, was durch einen Farbumschlag in braun sichtbar wird.

Da das Gewebe mit Formalin fixiert war, mussten zunächst die durch Formalin hervorgerufenen Bindungen gelöst werden. Dazu wurden die entparaffinierten Schnitte in eine Plastikkuvette mit Citratpuffer gegeben, in einer Mikrowelle dreimal bis zum Kochen erhitzt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten abgekühlt. Nach

zweimaligem Spülen in PBS wurden durch ein fünfminütiges Bad in 0,3 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die endogenen Peroxidasen (wie z.B. Myeloperoxidase) abgesättigt, damit diese später die Indikatorreaktion nicht verfälschen konnten. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Da der in Ziegen gewonnene Sekundärantikörper in einigen Fällen auch gegen Strukturen binden kann, die dem F_c-Teil des Primärantikörpers sehr ähnlich sind, wurde das Gewebe mit 10% in PBS verdünntem Ziegenserum für 20 Minuten bei Raumtemperatur gesättigt und geblockt. Um das Gewebe für die Antikörper besser permeabel zu machen, enthielt die Blocklösung 0,3% Triton X-100. Jeder Schnitt wurde dann mit 25µl in Ziegenserum (10% in PBS) verdünntem Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert (*Tabelle 6*). Um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, wurden sie mit Parafilm bedeckt.

Primärantikörper	Konzentration	Inkubationszeit
Anti-iNOS	1:500	1 h, Zimmertemperatur
Anti-eNOS	1:100	1 h, Zimmertemperatur
Anti-Nitrotyrosin	1:100	1 h, Zimmertemperatur
Anti-PARP p85-Spaltprodukt	1:50	über Nacht, 4°C

Tabelle 6: Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten

Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal jeweils 10 Minuten in PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden die Schnitte bei 37°C mit einem in Ziegen gewonnenen, biotinylierter Anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:200 in Ziegenserum) für 30 Minuten inkubiert. Auch hier wurden die Schnitte anschließend dreimal für jeweils 10 Minuten in PBS gegeben. Der Streptavidin-Meerrettich Peroxidase Komplex wurde in einer Konzentration von 1:500 in PBS auf das Gewebe pipettiert und für eine Stunde bei 37°C aufbewahrt. Nach drei weiteren Spülungen in PBS für jeweils fünf Minuten wurden Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid in Pufferlösung gemäß den Angaben des Herstellers (5ml Aqua dest. + 2 Tropfen Pufferlösung + 4 Tropfen Diaminobenzidin + 2 Tropfen Wasserstoffperoxid) für 10 Minuten aufgetragen, die Schnitte für 5 Minuten in fließendem Leitungswasser gewaschen und mit 1:10 in Aqua dest. verdünntem Hämalaun wie oben beschrieben gefärbt, getrocknet und eingedeckelt. Um unspezifische Bindungen des

Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde ein Schnitt pro Färbeserie ohne Primärantikörper behandelt. Zum Spezifitätsnachweis des Anti-Nitrotyrosin Antikörpers wurde bei dieser Färbung bei einem Schnitt pro Serie 1,15mg Nitrotyrosin zu 5µl Primärantikörper in 500µl Ziegen Serum zugegeben und damit der Antikörper abgesättigt.

2.12. Zelltodnachweis durch TUNEL

Allgemein werden zwei Formen von Zelltod unterschieden: Apoptose und Nekrose. Morphologische Merkmale der Apoptose sind kondensierte Zellkerne, geschrumpftes Zytoplasma, verklumptes Chromatin sowie apoptotische Körper. Nekrosen gehen meistens mit einer Schwellung und Vergrößerung der Zelle einher, die Plasmamembran platzt und das Zytoplasma läuft aus der Zelle aus [Martelli, A. M. et al., 2001]. Während die Nekrose ein unkontrollierter Untergang von Zellen ist, wird die Apoptose durch die Aktivierung verschiedener Enzyme gesteuert. Unter anderem führt aktivierte Caspase 3 zur Inaktivierung von ICAD („inhibitor of caspase-activated DNase“) und zur Spaltung von DNS durch CAD („caspase-activated DNase“) [Enari, M. et al., 1998]. Es entstehen DNS-Doppelstrangbrüche, die mit TUNEL („terminal transferase-mediated dUTP nick end labelling“) sichtbar gemacht werden können [Stadelmann, C. und Lassmann, H., 2000]: Mit einer Deoxynukleotidyl-Transferase werden synthetisch biotinylierte Nukleotide an das freie 3'-OH Ende der DNS Fragmente gebunden. Die biotinylierten Nukleotide können anschließend mit an Streptavidin gekoppelter Meerrettich Peroxidase identifiziert werden und damit ein früher Zeitpunkt im Verlauf des zellulären Untergangs festgestellt werden. Da es allerdings auch bei nekrotischem Zelltod und post mortem zu DNS Strangbrüchen kommen kann, wurde hier die Kombination von TUNEL Färbung, morphologischen Kriterien und der immunhistochemische Nachweis von apoptose-typischen Enzymen zur Unterscheidung zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelluntergang verwendet [Stadelmann, C. und Lassmann, H., 2000].

Für die TUNEL Färbung wurde ein handelsüblicher Kit verwendet. Entparaffinierte Schnitte wurden zunächst für 15 Minuten mit Proteinase K behandelt, um das Gewebe vor der TUNEL Färbung zu permeabilisieren. Nachdem die Schnitte für zweimal je zwei Minuten mit Aqua dest. gewaschen wurden, wurde als Positivkontrolle ein Gewebsschnitt pro Färbereihe mit 1µl Nuklease in 50µl Nukleasepuffer für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die restlichen Schnitte wurden in

dieser Zeit mit PBS bedeckt, um ein Austrocknen zu vermeiden. Die Nuklease spaltet DNS gesunder Zellen, die sich bei korrekter Ausführung von TUNEL anfärben. Nach einer dreiminütigen Spülung mit PBS wurden alle Schnitte für fünf Minuten in 3% Wasserstoffperoxid in Methanol gebadet und dann für eine Minute wieder in PBS gewaschen. TdT Labeling Puffer wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt, um darin für fünf Minuten die Schnitte zu baden. Anschließend wurden pro Schnitt 50µl Labelingpuffer mit je 1µl TdT-dNTP, 1µl Mn⁺⁺ Kationen Stocklösung und 1µl TdT Enzyme aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde bei einem Schnitt das Enzym weggelassen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurden die Schnitte für fünf Minuten in Stopppuffer gegeben und für zweimal je zwei Minuten in PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C mit 1:500 in PBS gelöster Streptavidin-Meerrettich Peroxidase inkubiert, zweimal für je zwei Minuten in PBS gewaschen und dann für 10 Minuten mit DAB gefärbt. Nach Spülung in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten, wurden die Schnitte mit 1:10 in Aqua dest. verdünntem Hämalaun gegengefärbt, in Leitungswasser gewässert und mit Gelatine eingedeckelt. Zum Qualitätsnachweis der TUNEL-Färbung wurden in Paraffin eingebettete Rattenhodent Hoden als Positivkontrolle gefärbt, da im Hoden regelmäßig Apoptose auftritt [Blanco-Rodriguez, J. und Martinez-Garcia, C., 1996].

2.13. Statistik

Evans Blue Extravasation, entzündlichen Veränderungen in der Cochlea, Okklusion der Scala tympani und Neuronendichte im Ganglion spirale wurden gebündelt bewertet. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit dem Computerprogramm SYSTAT Version 9 durchgeführt. Daten unterschiedlicher Gruppen wurden mit nichtparametrischen zweiseitigen Varianzanalysen verglichen (Kruskal Wallis und Mann-Whitney U Test). Für multiple Vergleiche wurde eine Alpha-Korrektur durchgeführt. Daten, die innerhalb einer Gruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfasst worden waren, wurden mit einem Rangreihenvergleich nach Wilcoxon verglichen. Korrelationsanalysen wurden nach Spearman durchgeführt. $P < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. In den Abbildungen mit Box Plots finden sich der Median und die 10., 25., 75. und 90. Perzentile. In den übrigen Abbildungen sind die Mittelwerte \pm Standardfehler abgebildet.

3. Ergebnisse

3.1. Versuchsserie A (Rattenmodell)

In Versuchsserie A wurden insgesamt 27 Kochleae untersucht. Davon waren vier Innenohren von drei Kontrolltieren, neun Innenohren von sechs infizierten, nur antibiotisch behandelten Tieren, sechs Innenohren von infizierten Tieren, die mit Antibiotika und Harnsäure behandelt wurden und acht Innenohren von sechs infizierten Tieren, die Antibiotika und MnTBAP erhielten. Alle Tiere waren zum Behandlungszeitpunkt klinisch an Meningitis erkrankt.

3.1.1. Histologische Veränderungen in der Kochlea

Histopathologisch konnte als Korrelat der klinischen Erkrankung bei allen infizierten Tieren eine leptomeningeale Entzündungsreaktion gefunden werden (*Abbildung 7A und 7D*). Während es bei allen infizierten Tieren in der Kochlea zu entzündlichen Infiltraten kam, waren die Scala tympani, Scala vestibuli und Scala media der Kontrolltiere frei (*Abbildung 7B und 7C*). In allen Ohren der infizierten Tiere war die leukozytäre Entzündung in der Scala tympani stärker als in der Scala vestibuli, und dort immer am deutlichsten in der basalen Windung ausgeprägt (*Abbildung 7E und 7F*). Der Abgang des Ductus perilymphaticus, der die basale Windung der Scala tympani mit der mittleren Schädelgrube verbindet, war in den Ohren von infizierten Tieren regelmäßig von entzündlichem Infiltrat ausgefüllt (*Abbildung 7F und 7G*). In der Scala media fanden sich kaum Entzündungszellen. Entzündungszellen waren im Ligamentum spirale und im Limbus spiralis auffindbar, wo sie insbesondere perivaskulär lokalisiert waren. Außerdem infiltrierten Leukozyten den vom Ganglion spirale bis zum Cortisches Organ ziehenden Nervenkanal und das Ganglion spirale selbst. Dabei schienen die Entzündungszellen von der Scala tympani die Lamina spiralis ossea zu penetrieren (*Abbildung 7I*). Einblutungen in den perilymphatischen Raum konnten in sieben von neun Ohren von Tieren mit Meningitis beobachtet werden.

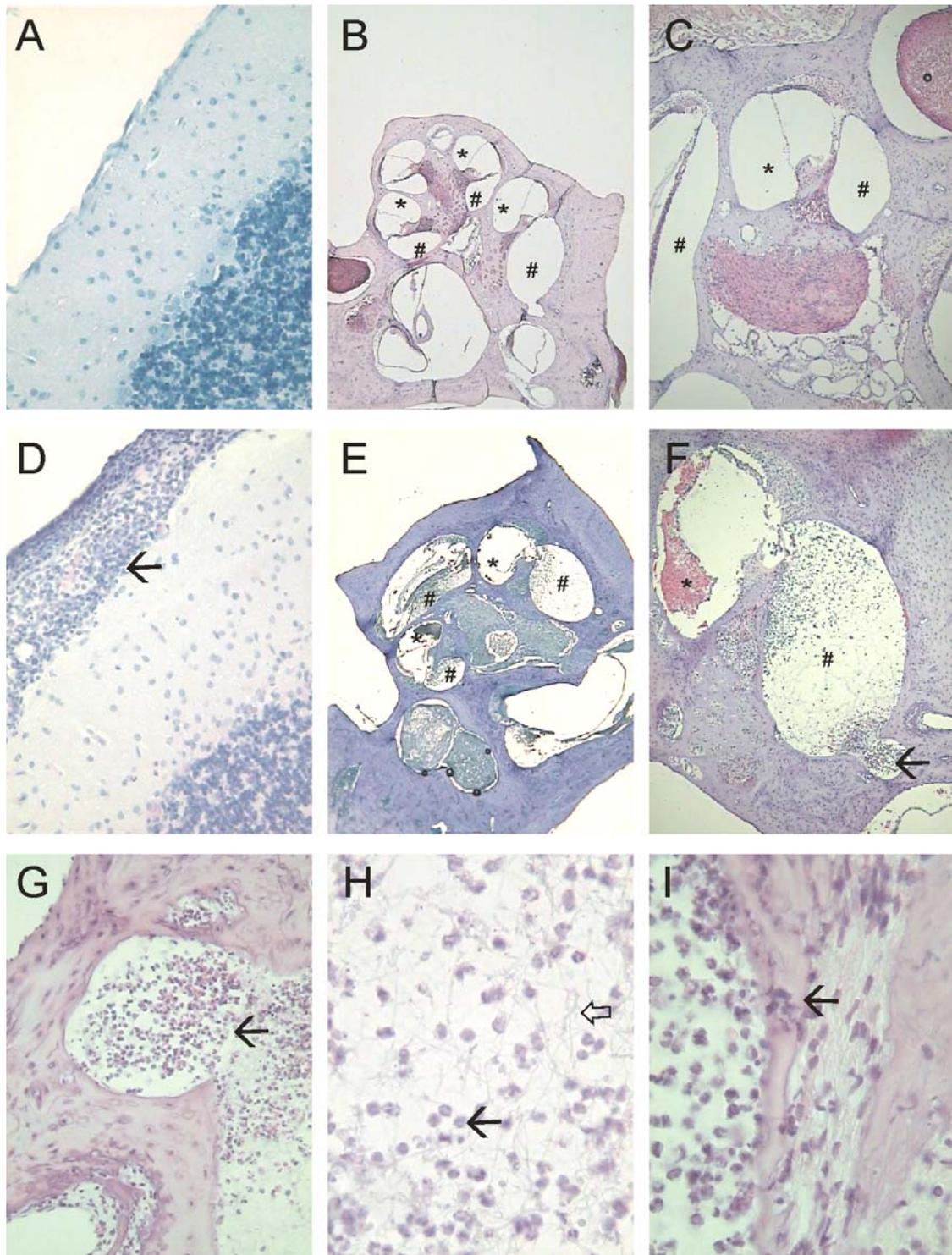


Abbildung 7: Entzündungsmuster bei infizierten Tieren

(A) Bei nicht-infizierten Kontrolltieren zeigte sich kein leptomeningeales Infiltrat (x150) und (B & C) auch die Kochlea war frei von Entzündung (B x25 und C x70). (D) Tiere, die mit Pneumokokken infiziert wurden, erkrankten an Meningitis und es kam zur leptomeningealen Entzündung (x150). (E) In der Kochlea führte die Erkrankung zu einer eitrigen Labyrinthitis (x25), die (F und G) basal und dort in der Nähe des Ductus perilymphaticus (schwarzer Pfeil, F x70 und G x150) akzentuiert war. (#) Scala tympani, (*) Scala vestibuli. (H) Die Entzündung bestand aus Granulozyten (schwarzer Pfeil) und fibrinösem Exsudat (offener Pfeil, x400). (I) Granulozyten aus der Scala tympani infiltrierten die Lamina spiralis ossea (schwarzer Pfeil, x400). (A, D und E) Hämalaunfärbung, (B, C und F-I) HE-Färbung.

3.1.2. Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Verglichen mit nicht-infizierten Kontrolltieren, wurde bei den infizierten Tieren, die nur mit Antibiotika behandelt worden waren, die kochleäre Entzündung von einer starken Erhöhung der Evans Blue Fluoreszenz in Stria vascularis, Ligamentum spirale und Limbus spiralis begleitet (*Abbildung 8A-8C*). Zur Kontrolle von Artefakten wurde auch die Evans Blue Extravasation im Knochen bewertet: Hier zeigte sich keine Erhöhung der Evans Blue Fluoreszenz (*Abbildung 8D*). Die erhöhte Fluoreszenz in den gefäßreichen Peri- und Endolymphen produzierenden Strukturen ist ein Indikator für Evans Blue Extravasation infolge einer Blut-Labyrinth-Schrankenstörung.

3.1.3. Immunhistochemischer Nachweis von eNOS

Tiere, die an Meningitis erkrankten, zeigten im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren eNOS positive Endothelzellen in der Stria vascularis, dem Ligamentum spirale, dem Limbus spiralis und auch dem Ganglion spirale (*Abbildung 9A-9F*). Dies deutet darauf hin, dass eNOS während der meningogenen eitrigen Labyrinthitis in den Strukturen der Blut-Labyrinth-Schranke hochreguliert wird.

3.1.4. Immunhistochemischer Nachweis von iNOS

Bei infizierten Tieren, aber nicht bei nicht-infizierten Kontrolltieren, konnte immunhistochemisch iNOS nachgewiesen werden: iNOS-positiv waren Entzündungszellen, die perilymphatische Räume, Ligamentum spirale, Limbus spiralis und Ganglion spirale infiltrierten (*Abbildung 9G-9M*). Im Limbus spiralis waren iNOS positive Zellen vor allem in der Nähe der Scala vestibuli lokalisiert, und im Ligamentum spirale trat die iNOS positive Färbung insbesondere perivaskulär auf, nahe der perilymphatischen Räume Scala vestibuli und Scala tympani. Im Ligamentum spirale und im Limbus spiralis färbten sich außer den Entzündungszellen auch Endothelzellen und Fibrozyten iNOS positiv (*Abbildung 9I und 9K*). In der Stria vascularis fanden sich keine iNOS positiven Zellen.

Ergebnisse

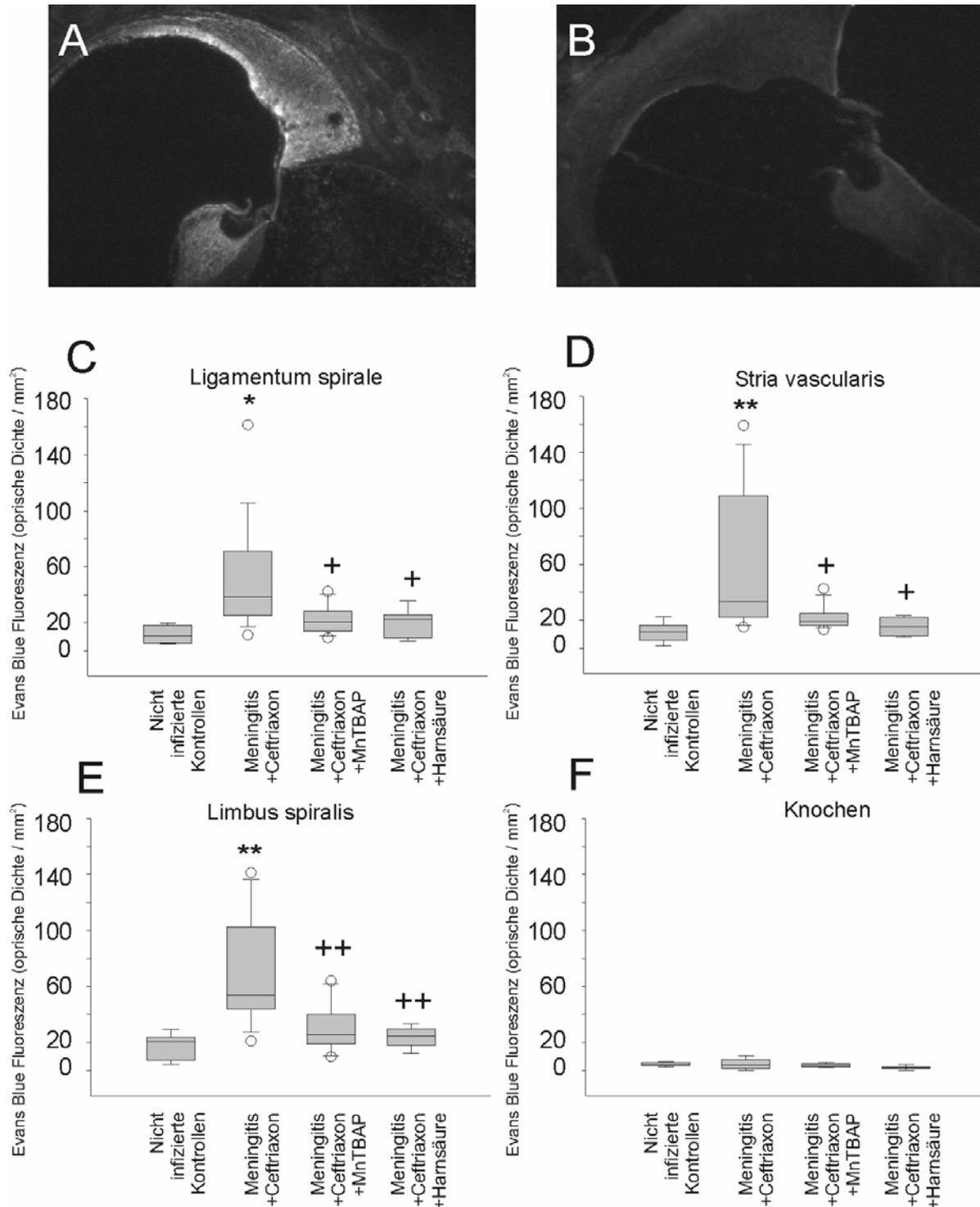


Abbildung 8: Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

(A) Die bei infizierten Tieren aufgetretene Evans Blue Extravasation zeigt eine Störung der Blut-Labyrinth-Schranke, während (B) bei nicht-infizierten Kontrollen die Blut-Labyrinth-Schranke intakt war (x 150). Durch die adjuvante Therapie mit Antioxidantien konnte die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung (C) im Ligamentum spirale, (D) der Stria vascularis und (E) im Limbus spiralis deutlich reduziert werden. (F) Im Knochen kam es zu keiner erhöhten Evans Blue Extravasation (Kontrolle). (*) verglichen mit nicht-infizierten Kontrolltieren, (+) verglichen mit infizierten Tieren, die nur mit Ceftriaxon behandelt wurden. (*) und (+) $p < 0,05$; (**) und (++) $p < 0,001$.

Ergebnisse

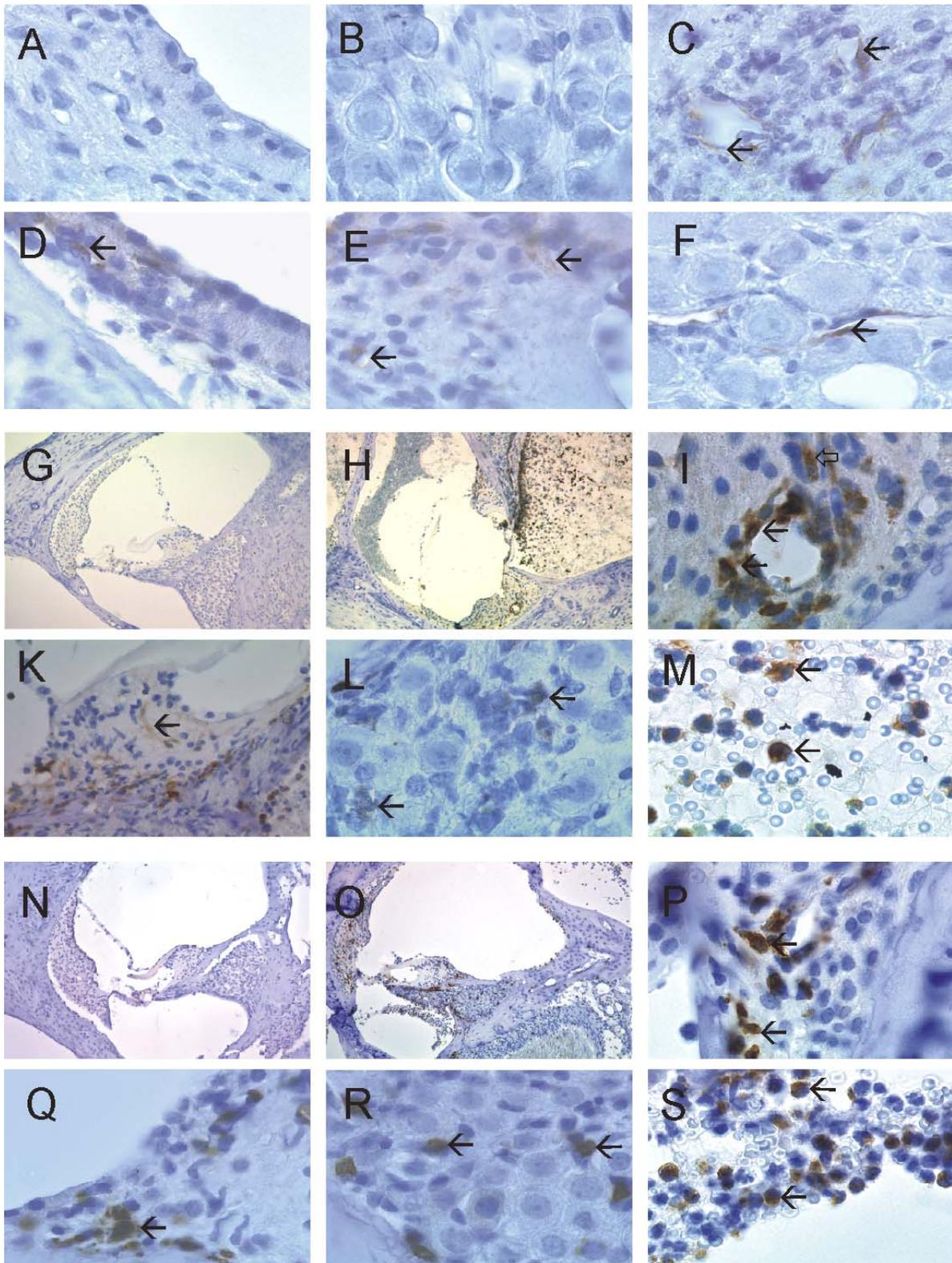


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von eNOS, iNOS und Nitrotyrosin

(A-F) Immunhistochemischer Nachweis von eNOS (x1000). (A) In Kochleae von nicht-infizierten Kontrollen konnte weder im Ligamentum spirale oder der Stria vascularis, (B) noch im Ganglion spirale eNOS nachgewiesen werden. Bei infizierten Tieren färbten sich Endothelzellen (C) im Ligamentum spirale (schwarzer Pfeil), (D) in der Stria vascularis (schwarzer Pfeil), (E) im Limbus spiralis (schwarzer Pfeil) und (D) im Ganglion spirale (schwarzer Pfeil) positiv. (G-M) Immunhistochemischer Nachweis von iNOS. **weiter →**

(G) Bei nicht-infizierten Kontrollen war iNOS nicht nachweisbar, im Gegensatz zu (H) an Meningitis erkrankten Tieren (x100). Hier fanden sich iNOS positive Granulozyten (schwarzer Pfeil) und Fibrozyten (offener Pfeil) im (I) Ligamentum spirale und (K) im Limbus spiralis (x1000). (L) iNOS wurde auch von Zellen im Ganglion spirale exprimiert (schwarzer Pfeil), sowie (M) von Granulozyten in der Scala tympani (x1000). (N-S) Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin, einem Marker für Peroxynitrit. Während Nitrotyrosin (N) bei nicht-infizierten Kontrollen nicht auftrat, (O) konnte Nitrotyrosin deutlich in Kochleae von Tieren mit eitriger Labyrinthitis nachgewiesen werden (x100). Dort trat es ähnlich wie iNOS vor allem (P) perivaskulär im Ligamentum spirale und (Q) im Limbus spiralis auf (schwarzer Pfeil, x1000). Auch (R) im Ganglion spirale gelang der Nachweis von Nitrotyrosin ebenso, (S) wie in der Nähe von Granulozyten, die die Scala tympani infiltrierten (x1000).

3.1.5. Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin

Bei Tieren, die mit Pneumokokken infiziert worden waren, konnte Nitrotyrosin, ähnlich wie iNOS, in Entzündungszellen in den perilymphatischen Räumen, im Ligamentum spirale, im Limbus spiralis und im Ganglion spirale nachgewiesen werden (*Abbildung 9N-9S*). Nitrotyrosin war wie iNOS im Ligamentum spirale und Limbus spiralis vor allem perivaskulär und in der Nähe von Scala vestibuli und Scala tympani lokalisiert. Die Kolokalisation von iNOS und Nitrotyrosin legt den Schluss nahe, dass durch iNOS produziertes NO über ONOO⁻ zu Nitrotyrosin reagiert hat.

3.1.6. Effekt von Peroxynitrit-Fängern auf die Blut-Labyrinth Schrankenstörung

Die Ausprägung der Entzündung war identisch bei infizierten Tieren, die nur mit Antibiotika behandelt wurden, und infizierten Tieren, die zusätzlich Harnsäure oder MnTBAP erhielten. Die adjuvante Therapie reduzierte bei beiden Gruppen die Nitrotyrosinfärbung in der Kochlea, nicht aber die iNOS Färbung. Des Weiteren kam es verglichen mit infizierten Tieren, die nur mit Ceftriaxon behandelt worden waren, zu einem signifikanten Rückgang der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung (*Abbildung 8C und 8D*). MnTBAP und Harnsäure wirkten also hemmend auf die Entstehung von ONOO⁻ und protektiv auf die Blut-Labyrinth-Schranke.

3.2. Versuchsserie B (Rattenmodell)

Die Rolle der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung für den Hörschaden bei bakterieller Meningitis war bis dato noch nicht untersucht worden und es war nicht bekannt, ob die Veränderungen aus Versuchsserie A eine Rolle bei der Entstehung des meningogenen Hörschadens spielten. Deshalb wurde in Versuchsserie B das Tiermodell der bakteriellen Meningitis um die Hörschwellenbestimmung durch AEPs erweitert. In Versuchsserie B sollte im Rattenmodell der Hörschaden und seine morphologischen Korrelaten in der Akutphase und erstmals auch im Langzeitverlauf erfasst und charakterisiert werden.

3.2.1. Klinische Charakteristik der Meningitis

Im Akutstadium der Erkrankung (18, 24 und 48 h nach Infektion) waren intrakranieller Druck und Liquorzellzahl verglichen mit nicht-infizierten Kontrolltieren stark erhöht (*Tabelle 7*). Beide Parameter normalisierten sich im Verlauf der Behandlung und waren zwei Wochen nach Infektion auf Normalniveau.

Gruppe (Versuchsdauer)	Intrakranieller Druck (mmHg)	Liquorzellzahl
Kontrollen (48 h)	5,61 ± 0,4	25 ± 13
Niedriges Inokulum (48 h)	10,97 ± 5,8*	2147 ± 1710*
Mittleres Inokulum (48 h)	10,85 ± 4,9*	2640 ± 1663*
Hohes Inokulum (18 h)	25,13 ± 8,8*	2467 ± 916*
Hohes Inokulum (24 h)	23,73 ± 10,1*	4425 ± 2228*
Hohes Inokulum (48 h)	14,77 ± 1,8*	4240 ± 2669*
Kontrollen (2 Wochen)	4,59 ± 1,27	33 ± 6
Mittleres Inokulum (2 Wochen)	3,71 ± 1,5	42 ± 19

Tabelle 7: intrakranieller Druck und Liquorzellzahl

(*) $p < 0,05$ verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen (48 h).

Auch klinisch zeigten alle infizierten Tiere 18 Stunden nach Infektion Zeichen einer Meningitis, die sich unter Antibiotikatherapie wieder besserte: 96 Stunden nach Infektion waren die infizierten Tiere dann klinisch nicht mehr stärker betroffen als die Kontrollen (*Abbildung 10A*). Die Futter- und Wasseraufnahme waren bei den Tieren

mit Meningitis im Akutstadium reduziert, was zu einer signifikanten Reduktion des Gewichts 48 Stunden nach Infektion führte (mittleres Inokulum: $p = 0,014$, *Abbildung 10B*). Nicht nur bei infizierten Tieren kam es zu einer Reduktion des Gewichts: Auch nicht-infizierte Kontrolltiere verloren innerhalb der ersten 18 Stunden fast 10% des Ausgangsgewichts, jedoch stabilisierte sich das Gewicht dann schnell und die Tiere waren bereits 96 Stunden nach Infektion nicht mehr signifikant leichter als vor Versuchsbeginn (vor Versuchsbeginn: $286,25 \pm 17,50\text{g}$, 96h: $268,75 \pm 9,22\text{g}$; $p = 0,144$). Der Gewichtsverlust bei nicht-infizierten Kontrolltieren kann durch die repetitiven Narkose in den ersten Tagen des Experiments erklärt werden.

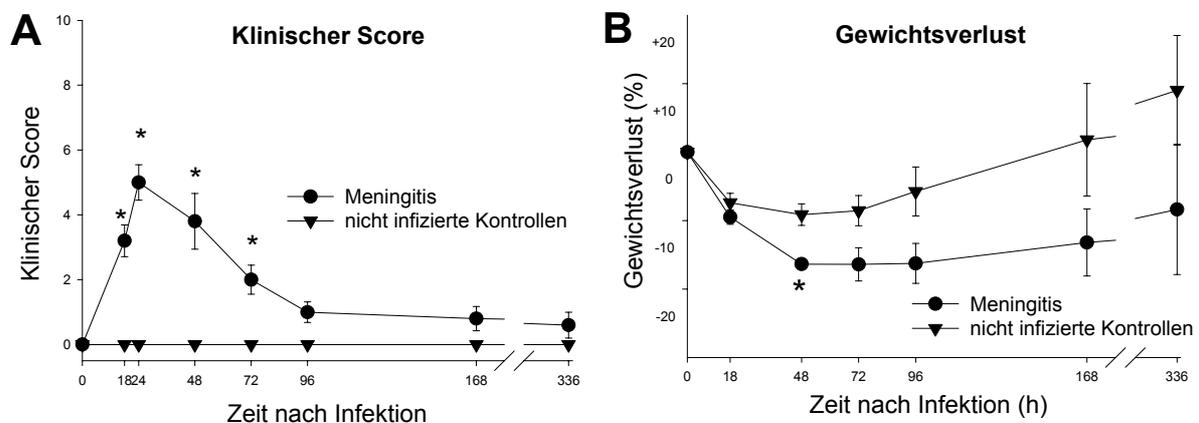


Abbildung 10: Klinischer Score und Gewichtsentwicklung

(A) 18 Stunden nach Infektion waren die Tiere bereits deutlich erkrankt. Unter antibiotischer Therapie besserte sich der Zustand und vier Tage nach Infektion war der klinische Score nicht mehr signifikant erhöht. Infolge einer verringerten Futter- und Wasseraufnahme kam es (B) zu einer Reduktion des Gewichts in der Akutphase. (*) $p < 0,05$.

3.2.2. Akutphase der experimentellen Meningitis: 18, 24 und 48 Stunden nach Infektion

3.2.2.1. Dosisabhängigkeit und Zeitverlauf des Hörschadens

Bei nicht-infizierten Kontrolltieren veränderte sich die Hörschwelle nicht im Laufe des Experiments (*Abbildung 11*). Tiere, die mit dem niedrigen Inokulum infiziert worden waren, erlitten in den ersten 24 Stunden keinen Hörschaden. Bis 48 Stunden nach Infektion trat ein leichter, nicht signifikanter Hörschaden auf (*Abbildung 11*).

Bei Tieren, die mit dem mittleren Inokulum infiziert worden waren, kam es erstmals 24 Stunden nach Infektion zu einer Erhöhung der Hörschwelle (0h vs. 24h; $p = 0,026$). Dieser Hörschaden verschlimmerte sich bis 48 Stunden nach Infektion (24h vs. 48h; $p = 0,026$), allerdings lag in keinem Ohr die Hörschwelle über der Nachweisgrenze (105dB). Der Hörschaden nach 24 und 48 Stunden war stärker als in der Gruppe, die mit dem niedrigen Inokulum infiziert worden war (*Abbildung 11*).

Achtzehn Stunden nach Infektion konnte bei fünf Ohren der Tiere, die mit dem hohen Inokulum infiziert worden waren, ein leichter Hörverlust diagnostiziert werden. Das Hörvermögen der Tiere dieser Gruppe war erstmals 24 Stunden nach Infektion signifikant beeinträchtigt (0h vs. 24h: $p = 0,010$) und verschlechterte sich bis 48 Stunden nach Infektion (24h vs. 48h: $p = 0,041$). Zu diesem Zeitpunkt konnte bei vier von sechs Ohren nicht einmal durch die maximale Stimulusintensität von 105dB eine Reizantwort hervorgerufen werden konnte (*Abbildung 11*).

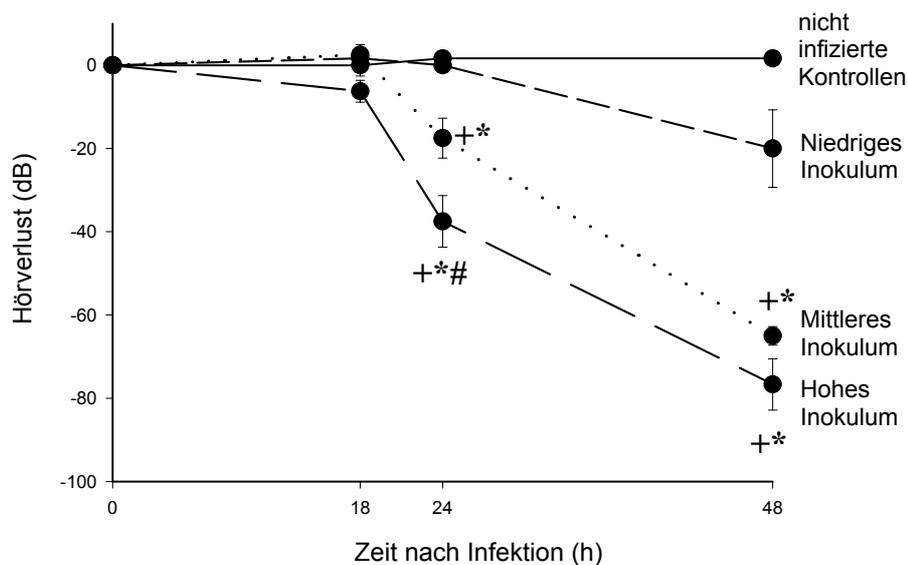


Abbildung 11: Hörschadens in der Akutphase

Der Hörverlust bei infizierten Tieren trat zwischen 18 und 24 Stunden nach Infektion auf und war im weiteren Verlauf progressiv. Die Ausprägung des Hörschadens war abhängig von der Menge injizierter Pneumokokken. Für (*) verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen, (+) verglichen mit Tieren, die das niedrige Inokulum erhielten und (#) verglichen mit Tieren, die das mittlere Inokulum erhielten: $p < 0,05$.

3.2.2.2. Morphologische Veränderungen in der Cochlea

In allen Ohren von Tieren, die mit Pneumokokken infiziert worden waren, kam es 18, 24 und 48 Stunden nach Infektion zu einer leukozytären Entzündung der Cochlea. Das Entzündungsmuster war ähnlich wie in Versuchsserie A: Entzündungszellen waren lediglich in den perilymphatischen Räumen präsent und die Entzündung war in der basalen Windung der Scala tympani akzentuiert. Die Scala media war stets frei. Die Cochleae von nicht-infizierten Kontrolltieren waren unauffällig (*Abbildung 12A-12C*).

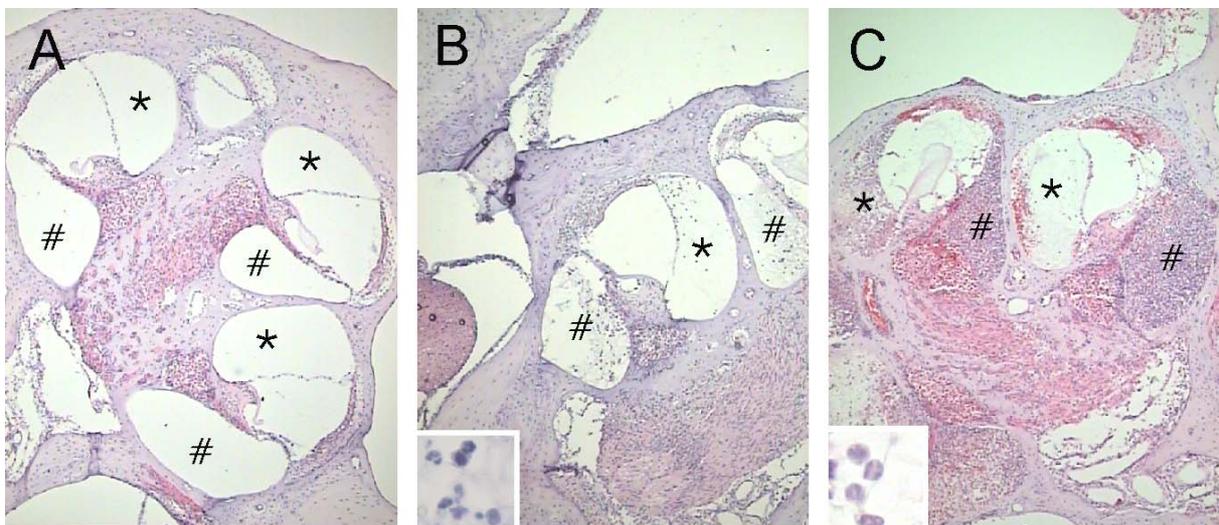


Abbildung 12: Histopathologie im Akutstadium

(A) Bei nicht-infizierten Kontrolltieren kam es zu keiner Entzündung in der Cochlea (HE, x40). Mit Pneumokokken infizierte Tiere zeigten (B) zu Beginn der Therapie (18 h nach Infektion) nur eine leichte granulozytäre Entzündung (HE, x70), (C) die sich dann aber bis 48 Stunden nach Infektion verschlimmerte (HE, x70). (*) Scala vestibuli, (#) Scala tympani. Fenster in B und C: granulozytäre Entzündung in der Cochlea (HE, x400)

Ohren von Tieren, die mit dem niedrigen Inokulum infiziert worden waren, zeigten einen Entzündungsscore von $2,2 \pm 1$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) nach 48 Stunden. Der Entzündungsscore in Ohren von Tieren, die mit dem mittleren Inokulum infiziert worden waren, war etwas höher (48h: $2,7 \pm 0,6$). Bei den mit dem hohen Inokulum infizierten Tieren war die eitrige Labyrinthitis über die Zeit progredient und am schlimmsten nach 48 Stunden (*Abbildung 14E*).

Die Ausprägung der Entzündung korrelierte mit dem Hörverlust bei allen Tieren, die mit dem hohen Inokulum infiziert worden waren (Versuchsende 18, 24 und 48 Stunden nach Infektion, $r = 0,529$, $p = 0,043$) und bei allen Tieren, deren Ohren 48 Stunden nach Infektion gewonnen wurden (alle Inokula, $r = 0,590$, $p = 0,010$).

3.2.2.3. Zelluntergang während des Akutstadiums

Bei der Betrachtung der Neurone im Ganglion spirale fanden sich 24 und 48 Stunden nach Infektion deutliche Zeichen einer neuronalen Schädigung. Die Zellen schienen vergrößert, unregelmäßig begrenzt und der Zellkern war nicht mehr intakt: Bruchstücke des Kerns lagen im Zytoplasma verteilt (*Abbildung 13A*).

TUNEL

Neurone von nicht-infizierten Kontrolltieren färbten sich nicht TUNEL-positiv und auch 18 Stunden nach Infektion mit dem hohen Inokulum fanden sich keine TUNEL-positiven Zellen (*Abbildung 13B*). In drei von sieben Ohren von Tieren, die mit dem hohen Inokulum infiziert worden waren, färbten sich in der TUNEL Färbung 24 Stunden nach Infektion einige Neurone positiv (*Abbildung 13C-13E*). 48 Stunden nach Infektion beinhalteten alle Kochleae von Tieren mit dem hohen Inokulum TUNEL-positive Neurone im Ganglion spirale. Außerdem fanden sich in fünf von sechs Ohren von Tieren, die mit dem mittleren Inokulum infiziert worden waren positiv gefärbte Neurone im Ganglion spirale. Nur in einigen wenigen Fällen war die Färbung auf den Zellkern beschränkt: Meistens färbte sich auch das Zytoplasma (*Abbildung 13D und 13E*). Bei Tieren, die mit dem niedrigen Inokulum infiziert worden waren, waren alle Neurone im Ganglion spirale TUNEL-negativ.

Immunhistochemischer Nachweis von PARP p85-Spaltprodukt

Alle Neurone von allen Tieren färbten sich nicht mit dem Antikörper gegen PARP p85-Spaltprodukt (*Abbildung 13G*), was beim Apoptosevorgang normalerweise entsteht. Lediglich in einigen, die Perilymphräume infiltrierenden Granulozyten konnte PARP p85-Spaltprodukt nachgewiesen werden (*Abbildung 13I*).

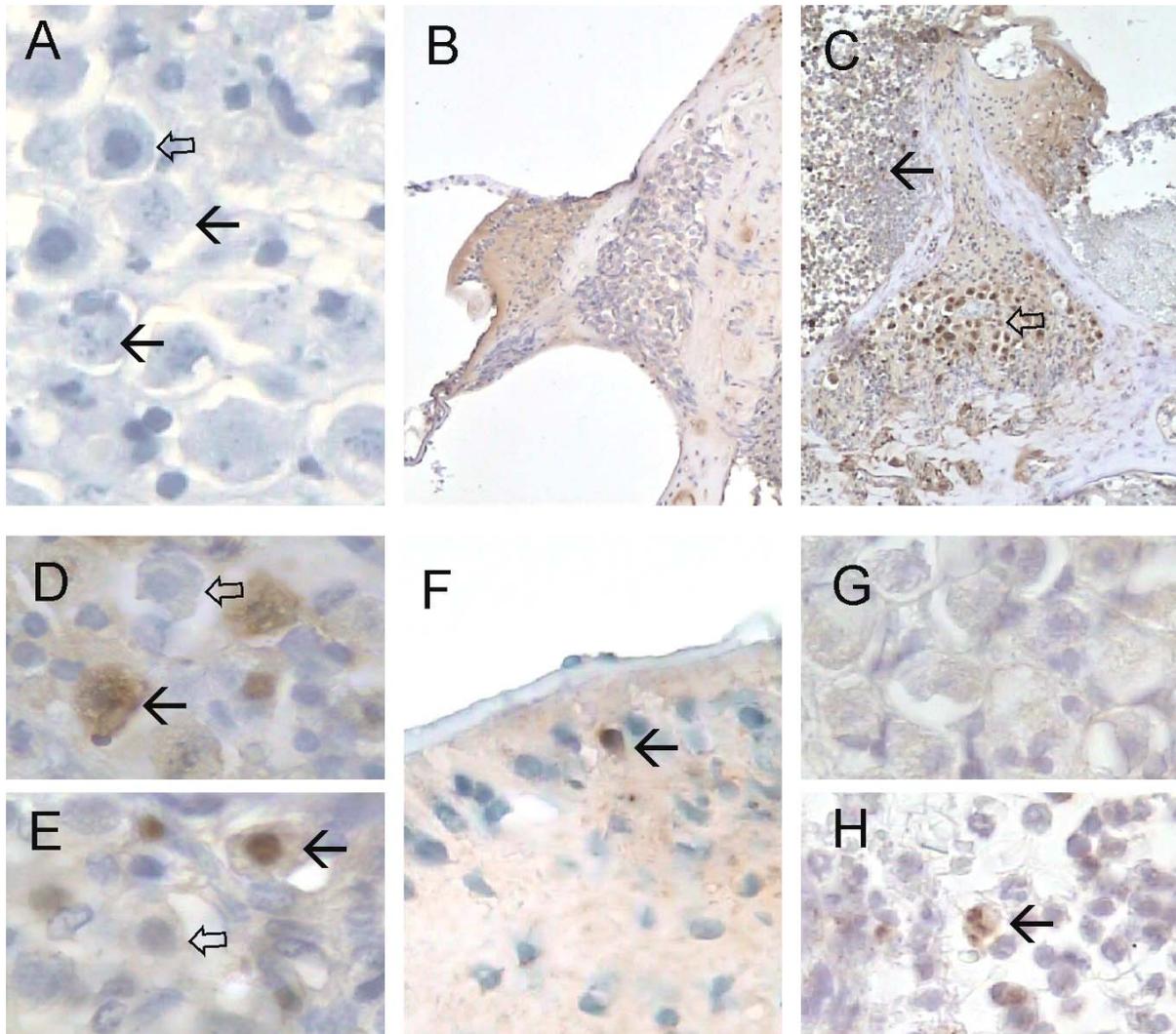


Abbildung 13: Zelluntergang im Ganglion spirale

(A) 24 Stunden nach Infektion waren einige Neurone im Ganglion spirale morphologisch geschädigt (schwarzer Pfeil), während andere noch normal erschienen (offener Pfeil, Hämalaunfärbung, x1000). (B-F) TUNEL-Färbung. (B) Bei nicht-infizierten Kontrollen färbten sich keine Zellen mit TUNEL (x150). (C) Bei Tieren, die mit Pneumokokken infiziert wurden, waren Neurone im Ganglion spirale (offener Pfeil) und Granulozyten in der Scala tympani (schwarzer Pfeil) TUNEL-positiv (x150). (D & E) Bei den Neuronen färbte sich meistens die gesamte Zelle (D, schwarzer Pfeil), oder in einigen Fällen nur der Zellkern (E, schwarzer Pfeil). Einige Zellen färbten sich nicht (offener Pfeil, x1000). Als Positivkontrolle wurde Rattenhoden angefärbt, wo es regelmäßig zu Apoptose kommt. (G-H) Immunhistochemischer Nachweis von PARP p85-Spaltprodukt. (G) Neurone färbten sich nicht mit dem Antikörper gegen PARP p85-Spaltprodukt, während (H) in Zellkernen von Granulozyten in der Scala tympani PARP p85-Spaltprodukt nachgewiesen werden konnte (schwarzer Pfeil, x1000). Im Ganglion scheint es infolgedessen bei Pneumokokkenmeningitis zur Nekrose und im Infiltrat zu Apoptose zu kommen.

3.2.2.4. Neuronenverlust im Ganglion spirale

Der morphologisch und durch TUNEL sichtbare Untergang von Neuronen 24 und 48 Stunden nach Infektion wirkte sich auf die Neuronendichte im Ganglion spirale aus. Im Akutstadium der Erkrankung fand sich 48 Stunden nach Infektion bei den Tieren, die mit dem hohen Inokulum infiziert worden waren, eine Reduktion der neuronalen Zelldichte im Ganglion spirale (nicht-infizierte Kontrollen vs. hohes Inokulum 48h: $p = 0,035$). 18 und 24 Stunden nach Infektion waren die Neuronendichten verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen noch nicht verschieden (nicht-infizierte Kontrollen vs. hohes Inokulum 18h: $p = 0,310$, nicht-infizierte Kontrollen vs. hohes Inokulum 24h: $p = 0,077$). Auch bei mit dem mittleren Inokulum infizierten Tieren kam es zum Neuronenverlust im Ganglion spirale (nicht-infizierte Kontrollen vs. mittleres Inokulum 48h: $p = 0,044$). Die Tiere, die das niedrige Inokulum erhielten, zeigten keinen Unterschied im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen (nicht-infizierte Kontrollen vs. niedriges Inokulum 48h: $p = 0,572$). Die Neuronendichte im Ganglion spirale korrelierte zu diesem Zeitpunkt weder mit der Ausprägung des Hörverlusts (alle Inokula, 48h: $r = -0,327$, $p = 0,128$), noch mit der Stärke der kochleären Entzündung ($r = 0,213$ $p = 0,416$).

3.2.2.5. Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Tiere, die mit dem niedrigen Inokulum infiziert worden waren, zeigten 48 Stunden nach Infektion nur im Limbus spiralis eine leicht verstärkte Evans Blue Extravasation, verglichen mit Ohren von nicht-infizierten Tieren (*Abbildung 14A-14D*).

In den Versuchsgruppen mit Tieren, die das mittlere Inokulum erhielten, war 48 Stunden nach Infektion sowohl im Ligamentum spirale, in der Stria vascularis und auch im Limbus spiralis eine Evans Blue Extravasation nachweisbar (*Abbildung 14A-14D*).

Bei den mit dem hohen Inokulum infizierten Tieren konnte erstmals 24 Stunden nach Infektion eine Evans Blue Extravasation festgestellt werden, die bis 48 Stunden nach Infektion persistierte und sich tendenziell verstärkte (*Abbildung 14A-D und 15A*).

Ergebnisse

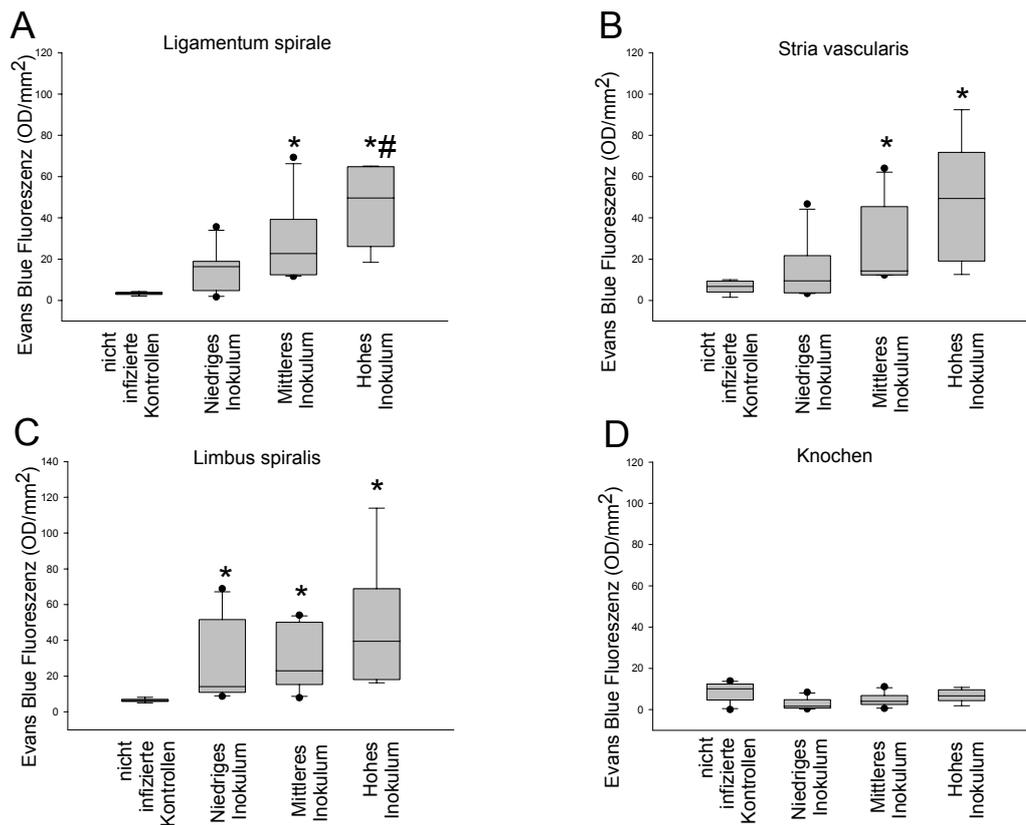


Abbildung 14: Evans Blue Extravasation in der Kochlea im Akutstadium

Die gesteigerte Evans Blue Fluoreszenz 48 Stunden nach Infektion ist Folge einer ausgeprägten Schädigung der Blut-Labyrinth-Schranke (A) im Ligamentum spirale, (B) der Stria vascularis und (C) im Limbus spiralis. (D) Im Knochen war die Evans Blue Fluoreszenz nicht erhöht. Für (*) verglichen mit nicht-infizierten Kontrolltieren und (#) verglichen mit dem niedrigem Inokulum: $p < 0,05$.

Eine Ursache für die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung ist die eitrige Entzündung in der Kochlea, welche bereits nach 18 Stunden auftrat und der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung voraus eilte (Abbildung 15A). Außerdem korrelierte die Evans Blue Extravasation im Ligamentum spirale, der Stria vascularis und im Limbus spiralis mit dem Entzündungsscore der Kochlea (48 Stunden nach Infektion, niedriges, mittleres und hohes Inokulum: Ligamentum spirale: $r = 0,680$, $p = 0,016$; Stria vascularis: $r = 0,559$, $p = 0,013$; Limbus spiralis: $r = 0,644$, $p = 0,010$).

Die Zerstörung der Blut-Labyrinth-Schranke scheint im Akutstadium eine Rolle für das Auftreten des Hörschadens bei der Meningitis zu spielen, da die Evans Blue Extravasation der untersuchten Strukturen aller Tiere, die mit hohem Inokulum infiziert worden (18, 24 und 48 Stunden), mit der Ausprägung des Hörverlusts

zu Versuchsende korrelierte (Abbildung 15B-15D). Hörverlust und Evans Blue Extravasation korrelierten auch in den Ohren von allen an Meningitis erkrankten Tieren (niedriges, mittleres und hohes Inokulum), die 48 Stunden nach Infektion getötet wurden (Ligamentum spirale: $r = 0,449$, $p = 0,062$; Stria vascularis: $r = 0,590$, $p = 0,009$; Limbus spiralis $r = 0,497$, $p = 0,036$).

Zwischen der Evans Blue Extravasation und der Reduktion der Neuronendichte im Ganglion spirale, konnte 48 Stunden nach Infektion keine Korrelation gefunden werden (Ligamentum spirale: $r = -0,137$, $p = 0,564$, der Stria vascularis: $r = -0,207$, $p = 0,381$, oder dem Limbus spiralis: $r = -0,124$, $p = 0,603$).

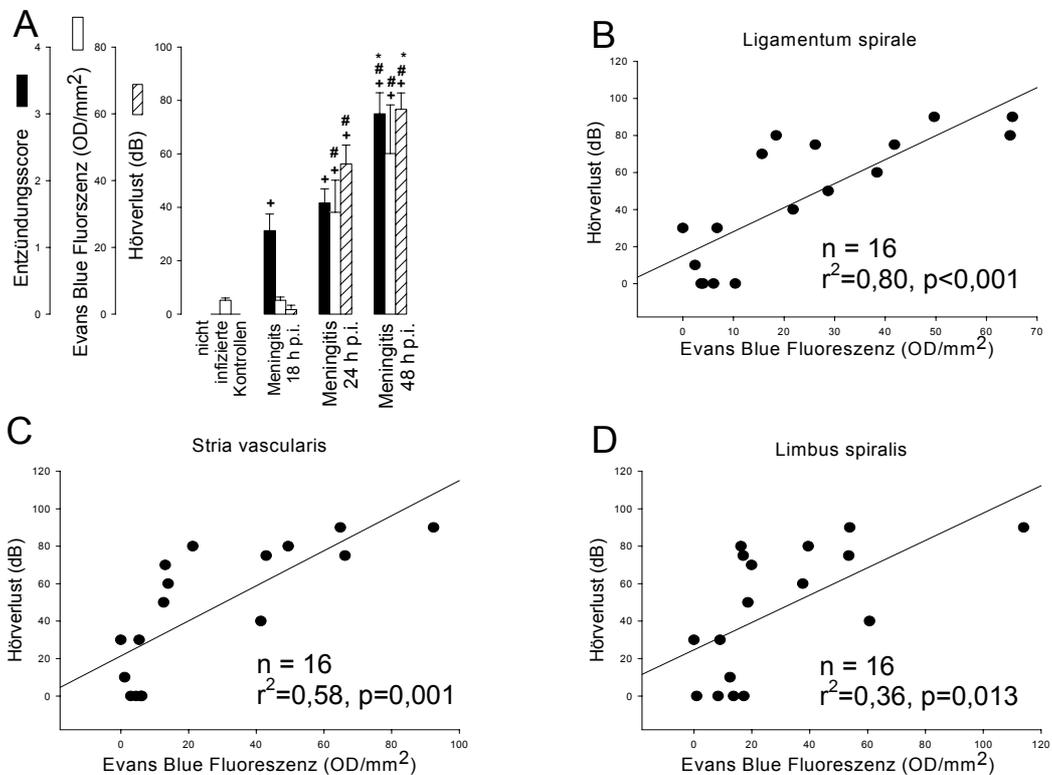


Abbildung 15: Evans Blue Extravasation korreliert mit dem akuten Hörverlust

(A) Die Entzündung in der Cochlea geht der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung (hier abgebildet: Stria vascularis) und dem Hörverlust voraus. Für (+) verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen, (#) verglichen mit 18 h nach Infektion und (*) 24 h nach Infektion: $p < 0,05$. (B-D) Die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung im Ligamentum spirale, der Stria vascularis und dem Limbus spiralis korrelierte stark mit dem Hörverlust (hohes Inokulum; 18, 24 und 48 h nach Infektion).

3.2.3. Stadium nach Genesung: zwei Wochen nach Infektion

3.2.3.1. Charakteristik des Hörschadens

Während der Genesung besserte sich der Hörschaden der Tiere rapide. Bereits 72 Stunden nach Infektion war der Hörverlust signifikant geringer als nach 48 Stunden. Der Hörverlust besserte sich im weiteren Verlauf noch leicht, die Hörschwellen blieben aber bis zwei Wochen nach Infektion signifikant höher als bei nicht-infizierten Kontrollen (*Abbildung 16*).

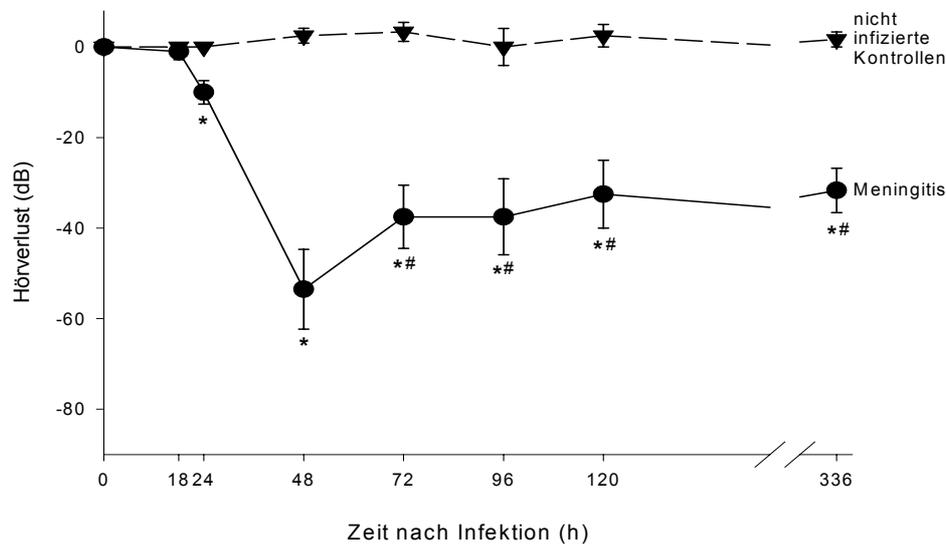


Abbildung 16: Langzeitverlauf des Meningitis-assoziierten Hörschadens

Der Meningitis-assoziierte Hörschaden besserte sich deutlich, nachdem er 48 Stunden nach Infektion seinen Höchstpunkt erreicht hatte, blieb aber bei allen infizierten Tieren bis 2 Wochen nach Infektion bestehen. Infizierte Tiere wurden ab 18h nach Infektion antibiotisch behandelt. Für (*) verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen und (#) infizierten Tieren 48 Stunden nach Infektion: $p < 0,05$. Abgebildet sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.2.3.2. Morphologische Veränderungen in der Cochlea

Zwei Wochen nach Infektion fand sich in den Perilymphräumen kein granulozytäres Infiltrat mehr. Stattdessen war die Scala tympani in sieben von elf Ohren durch eine lockere Ansammlung von Fibrozyten und Fasern teilweise ausgefüllt (Okklusion in der basalen Windung der Scala tympani = $34 \pm 37\%$, *Abbildung 17A-17C*). Die Okklusion war in allen Fällen auf die Scala tympani beschränkt, wobei sie in der

basalen Windung der Kochlea akzentuiert war. Die Scala media war von der Okklusion nicht betroffen. Die Stärke der Okklusion korrelierte tendenziell mit dem Hörschaden ($r = 0,521$, $p = 0,010$).

3.2.3.3. Neuronenverlust im Ganglion spirale

Zwei Wochen nach Infektion war die Neuronendichte im Ganglion spirale deutlich verringert (*Abbildung 17D und 17E und Abbildung 18A*). Die Neuronendichte der basalen Windung war am stärksten betroffen und korrelierte negativ mit dem Hörverlust (*Abbildung 18B*). Außerdem korrelierte die Anzahl der Neuronen pro Gesichtsfeld im basalen Ganglion spirale mit der Okklusion der basalen Scala tympani ($r = -0,657$, $p = 0,028$).

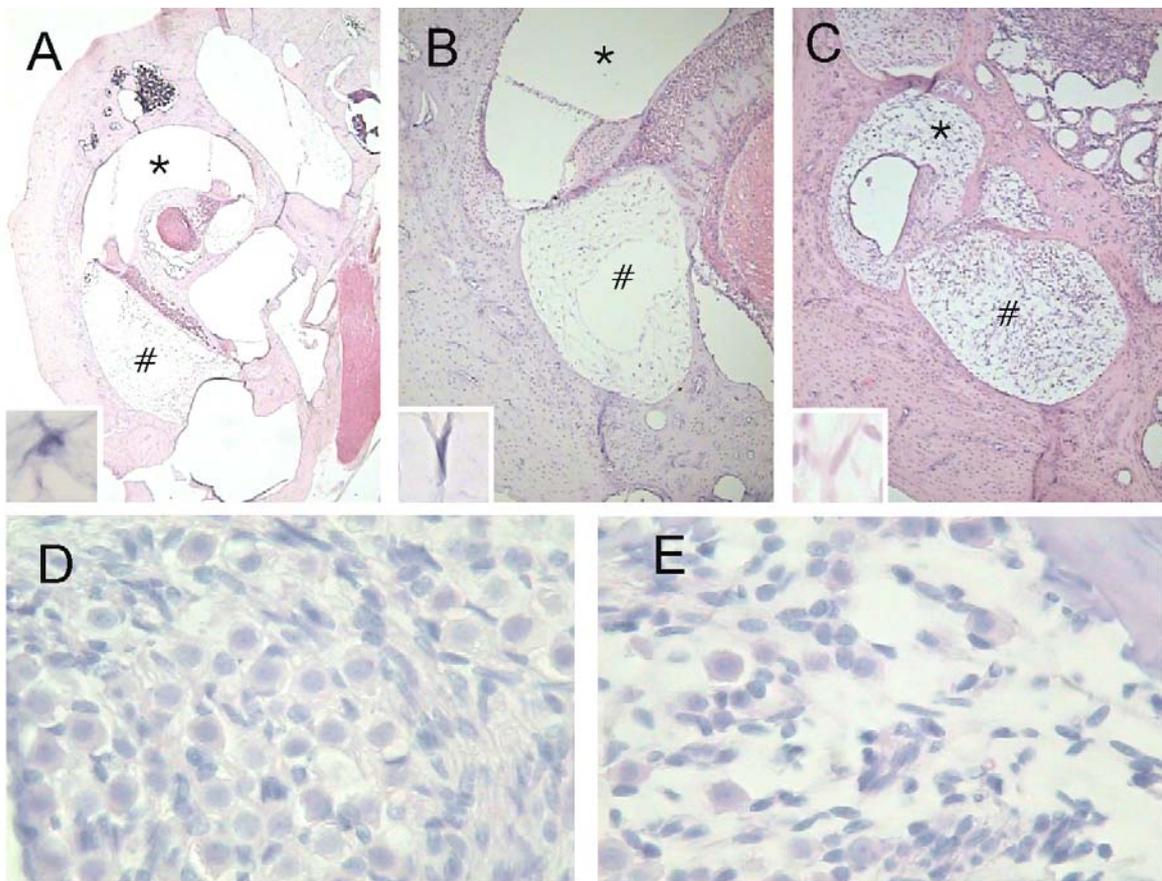


Abbildung 17: Kochleäre histopathologische Veränderungen nach Pneumokokkenmeningitis

(A-C) Zwei Wochen nach Infektion war die Entzündung durch eine fibrozytäre Okklusion (Vergrößerungen) vor allem der Scala tympani ersetzt worden (HE-Färbung; A x40; B und C x70; Vergrößerungen x1000). (#) Scala tympani, (*) Scala vestibuli. Im Vergleich zu (D) nicht-infizierten Kontrollen war die Neuronendichte im Ganglion spirale von (E) infizierten Tieren vermindert (D und E: HE-Färbung; x400).

Ergebnisse

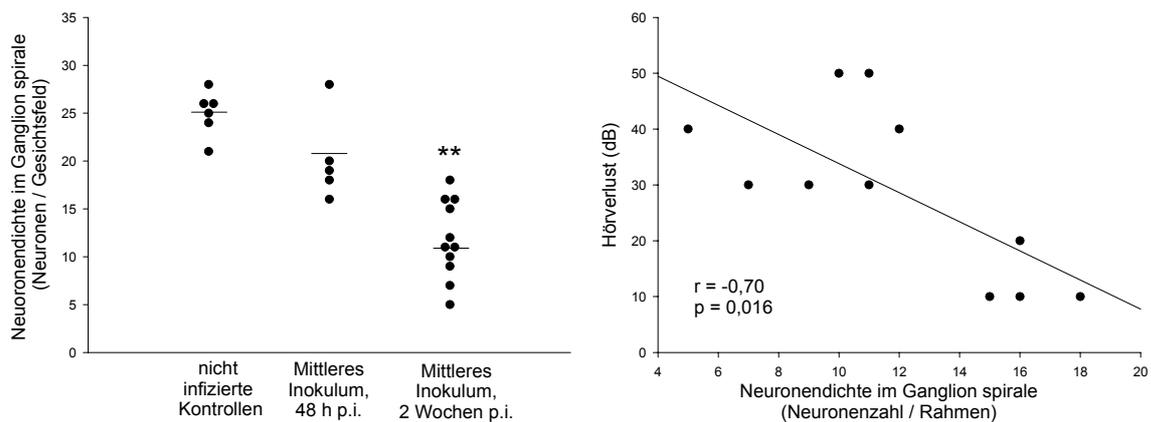


Abbildung 18: Neuronaler Zellverlust im Ganglion spirale

(A) Bereits 48 Stunden nach Infektion war die Neuronendichte im Ganglion spirale leicht und 2 Wochen nach Infektion deutlich vermindert. Strich = Mittelwerte. (**) $p < 0,001$. (B) 2 Wochen nach Infektion korrelierte die Neuronendichte im Ganglion spirale negativ mit dem Hörverlust (mittleres Inokulum).

3.2.3.4. Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Zwei Wochen nach Infektion war die Blut-Labyrinth-Schranke immer noch geschädigt: Die Evans Blue Fluoreszenz in den Kochleae von infizierten Tieren war im Vergleich mit nicht-infizierten Kontrolltieren erhöht (Ligamentum spirale: $p = 0,016$, Stria vascularis: $p = 0,035$, Limbus spiralis: $p = 0,088$). Obwohl es im Vergleich zur Akutphase der Infektion (48 Stunden nach Infektion) zu keiner signifikanten Besserung der Schrankenstörung kam, korrelierte die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung zwei Wochen nach Infektion nicht mehr mit der Höhe des Hörschadens (Ligamentum spirale: $r = 0,268$, $p = 0,426$; Stria vascularis: $r = 0,250$, $p = 0,459$; Limbus spiralis: $r = 0,293$, $p = 0,382$).

3.3. Versuchsserie C (Rattenmodell)

3.3.1. Klinische Charakteristik der Meningitis

Für Versuchsserie C wurde ein Inokulum von $7,5 \times 10^5$ KBE gewählt, da es bei dieser Inokulumsmenge regelmäßig zu deutlichen Hörverlusten kam und der Hörschaden innerhalb des messbaren Bereichs lag. Wie in Versuchsserie B erkrankten alle mit Pneumokokken infizierten Tiere an Meningitis: 18 und 72 Stunden nach Infektion war der klinische Score erhöht (18 Stunden nach Infektion: $4,50 \pm 1,8$), während keines der nicht-infizierten Kontrolltiere klinische Ausfälle zeigte. Die Tiere verloren in der Akutphase der Erkrankung an Gewicht (vor Infektion vs. 18 Stunden nach Infektion: $-9,77 \pm 3,1\%$), erholten sich jedoch anschließend wieder (vor Infektion vs. 2 Wochen nach Infektion: $+8,00 \pm 1,6\%$). Bis zwei Wochen nach Infektion besserte sich auch der klinische Score ($0,83 \pm 1,2$).

3.3.2. Charakteristik des Hörschadens

Die Hörschwellen bei Klickstimulus waren bereits 18 Stunden nach Infektion leicht erhöht (vor Infektion vs. 18h nach Infektion: $p = 0,010$). Der Hörschaden verschlimmerte sich auch in dieser Versuchsserie im weiteren Verlauf (18 Stunden nach Infektion vs. 72h nach Infektion: $p < 0,001$) und wie in Versuchsserie B hörten die Tiere zwei Wochen nach Infektion schlechter als vor Beginn des Experiments und als nicht-infizierte Kontrolltiere (vor Infektion vs. zwei Wochen nach Infektion: $p < 0,001$, *Abbildung 21*). Im Hochfrequenzbereich (Stimulus 10kHz) kam es wesentlich schneller und deutlicher zu einer Hörschädigung als im Tieffrequenzbereich (Stimulus 1kHz): Ein Hörschaden war im Hochfrequenzbereich bereits 18 Stunden nach Infektion evident, während es im Tieffrequenzbereich zu diesem Zeitpunkt zu keiner signifikanten Hebung der Hörschwelle gekommen war. Eine Hörschädigung im Tieffrequenzbereich trat erst später auf und war 72 Stunden nach Infektion nachweisbar. Die Schädigung im Hochfrequenzbereich war zu jedem Messzeitpunkt stärker als im Tieffrequenzbereich (*Abbildung 19*).

Ergebnisse

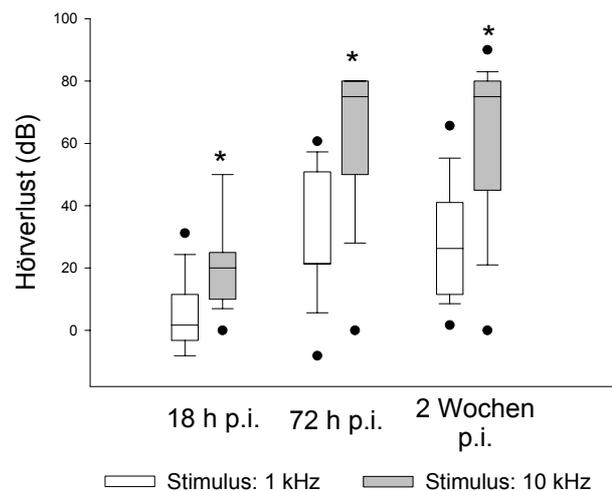


Abbildung 19: Frequenzabhängigkeit des Hörschadens

Zu allen untersuchten Zeitpunkten war der Hörschaden im Hochfrequenzbereich (10kHz) stärker ausgeprägt als im Tieffrequenzbereich (1kHz). (*) $p < 0,05$.

3.3.3. Okklusion der perilymphatischen Räume

Bei allen Ohren infizierter Tiere, die nur mit Ceftriaxon behandelt wurden, war die Scala tympani in der basalen Windung zumindest teilweise okkludiert und bei drei Ohren war die basale Scala tympani komplett verschlossen (*Abbildung 22A und 22B*). Eine Cochlea war sogar bis auf eine kleine Aussparung im Bereich der Scala media vollständig ausgefüllt, ebenso wie alle angeschnittenen Spiralganglien, wo keine Neuronen mehr erkennbar waren. Das okkludierte Lumen beinhaltete Fibrozyten und in einigen Fällen Erythrozyten als Zeichen kleiner Einblutungen. Granulozyten oder andere Entzündungszellen waren nicht mehr nachweisbar. Wie in Versuchsserie B kam es zu Schäden des Cortischen Organs und zu Zellverlust im Limbus spiralis und im Ligamentum spirale. Die Veränderungen waren in der basalen Windung stets am stärksten ausgeprägt. Die Ausprägung der Okklusion der Scala tympani korrelierte mit dem Hörverlust ($r = 0,680$, $p < 0,001$).

3.3.4. Neuronenverlust im Ganglion spirale

Auch der Befund des Neuronenverlustes im Ganglion spirale aus Versuchsserie B bestätigte sich. Die Neuronenzellzahl im basalen Ganglion spirale war bei infizierten

Tieren erniedrigt (*Abbildung 22C und 22D*), insbesondere in der basalen Windung (basalen Windung $9,15 \pm 7,4$ Neurone/Rahmen vs. mittlere Windung $18,77 \pm 9,3$ Neurone/Rahmen, $p = 0,021$). Der Neuronenverlust im Ganglion spirale der basalen Windung korrelierte stark negativ mit dem Hörverlust der Tiere bei Stimulus mit Klick und mit 10 kHz (*Abbildung 20*).

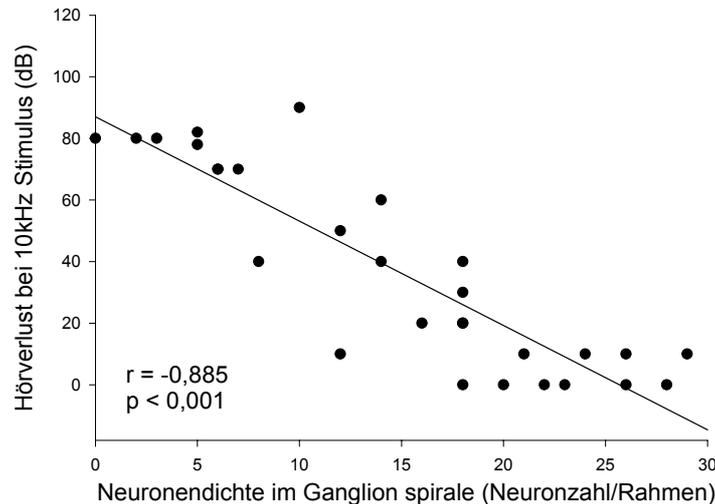


Abbildung 20: Neuronendichte korreliert negativ mit dem Hörverlust

Die Neuronendichte im Ganglion spirale der basalen Windung korrelierte stark mit dem Hörverlust, vor allem im Hochfrequenzbereich (infizierte Kontrollen und adjuvante Therapie mit MnTBAP oder NAC).

3.3.5. Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Die Evans Blue Extravasation war im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen im Ligamentum spirale, in der Stria vascularis (*Abbildung 22C*) und im Limbus spiralis leicht erhöht. Verglichen mit der Neuronendichte im Ganglion spirale und der Okklusion der Scala tympani korrelierte die Evans Blue Extravasation nur sehr schwach mit dem Hörverlust (Ligamentum spirale: $r = 0,412$, $p = 0,029$, Limbus spiralis: $r = 0,613$, $p < 0,001$, Stria vascularis: $r = 0,289$, $p = 0,136$).

3.3.6. Einfluss der Antioxidantien MnTBAP und NAC auf die Meningitis-assoziierten kochleären Veränderungen

Hörschaden

Der Hörverlust nach 72 Stunden und nach zwei Wochen war bei den Tieren, die adjuvant behandelt wurden, signifikant geringer als bei Tieren, die nur das

Antibiotikum erhielten (Abbildung 21). Bei den mit MnTBAP behandelten Tieren waren die Hörschwellen zwei Wochen nach Infektion verglichen mit den Messungen vor Behandlungsbeginn (18 Stunden nach Infektion) sogar weder in der Klickaudiometrie noch in der Tonaudiometrie erhöht (Klickaudiometrie: $p = 0,468$, 1kHz Stimulus: $p = 0,300$, 10kHz Stimulus: $p = 1,000$). Der Effekt von NAC scheint etwas schwächer als der von MnTBAP zu sein: Bei Tieren, die Ceftriaxon und NAC erhielten, waren die Hörverluste noch signifikant stärker ausgeprägt als vor Therapiebeginn 18 Stunden nach Infektion (Klickstimulus: $p = 0,04$, 1kHz Stimulus: $p = 0,027$, 10kHz Stimulus: $p = 0,011$). Allerdings gab es zwischen mit MnTBAP und NAC behandelten Tieren zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Ausprägung des Hörschadens.

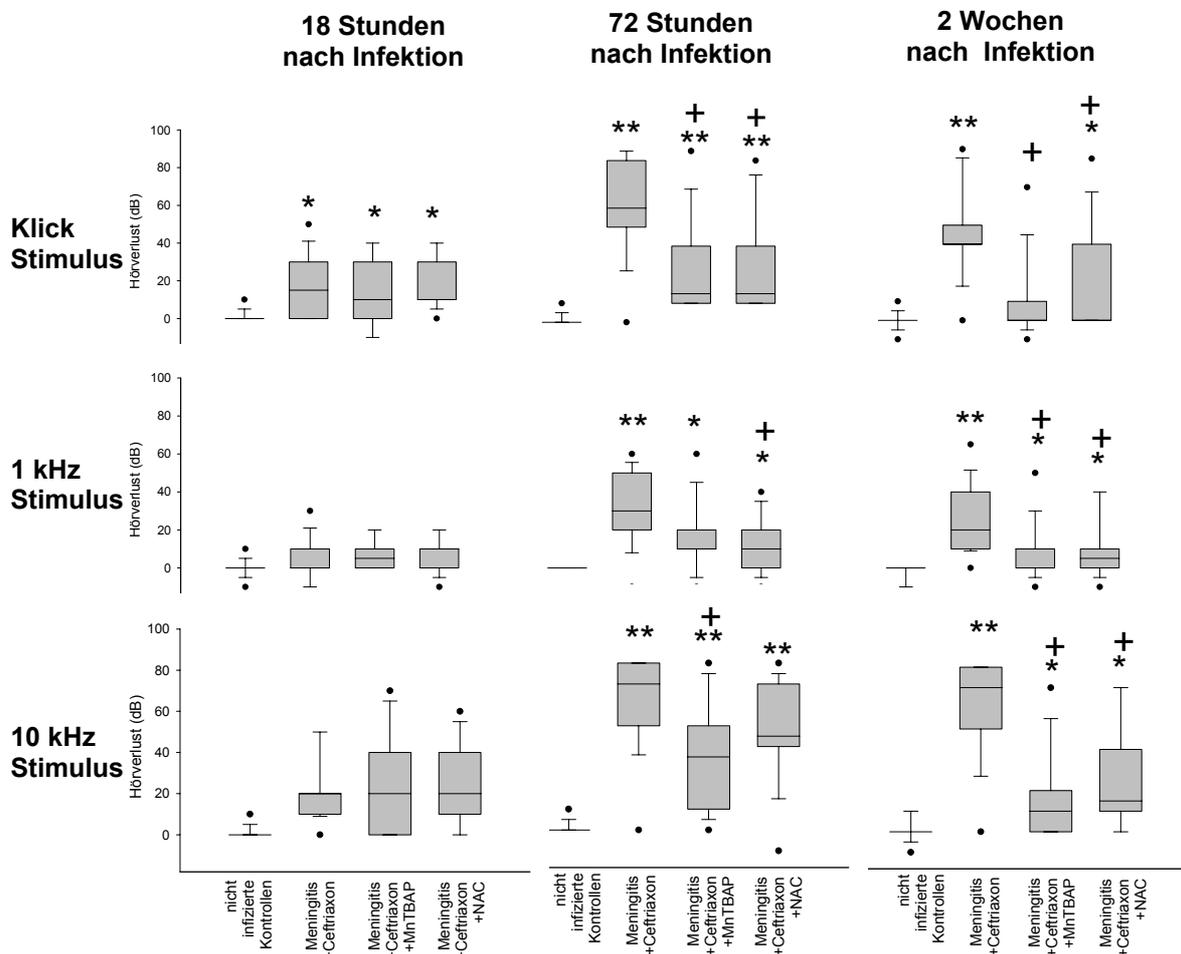


Abbildung 21: Adjuvante Therapie mit Antioxidantien reduziert signifikant den Hörverlust

Infizierte Tiere, die mit MnTBAP oder NAC behandelt wurden, hörten 72 Stunden, und 2 Wochen nach Infektion besser als Tiere, die nur Ceftriaxon erhielten. (*) verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen und (+) verglichen mit nur mit Ceftriaxon behandelten Tieren. (*) und (+) $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$.

Okklusion der perilymphatischen Räume

Die Okklusion der basalen Scala tympani von Tieren, die zusätzlich MnTBAP gespritzt bekamen, war geringer ausgeprägt als bei Tieren, die nur Ceftriaxon erhielten ($p = 0,003$, *Abbildung 22B*). Auch in den Ohren von Tieren, die mit NAC behandelt wurden, war die Okklusion der perilymphatischen Räume geringer als bei Tieren, die keine adjuvante Therapie erhielten ($p = 0,033$, *Abbildung 22B*). Zwischen mit MnTBAP und mit NAC behandelten Tieren gab es diesbezüglich keine Unterschiede ($p = 0,81$).

Neuronenverlust im Ganglion spirale

Obwohl die Neuronendichten in den Spiralganglien der mit Ceftriaxon und MnTBAP oder NAC behandelten Tieren im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen verringert waren, war der neuronale Zelluntergang nicht so stark ausgeprägt wie bei Tieren, die nur Ceftriaxon erhielten (*Abbildung 22D*). MnTBAP und NAC konnten den Verlust von Neuronen im Ganglion spirale also deutlich verringern. Zwischen den mit MnTBAP und NAC behandelten Tieren gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,09$).

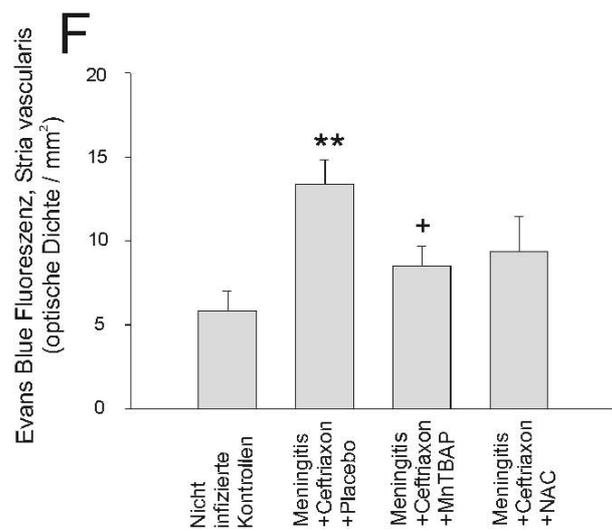
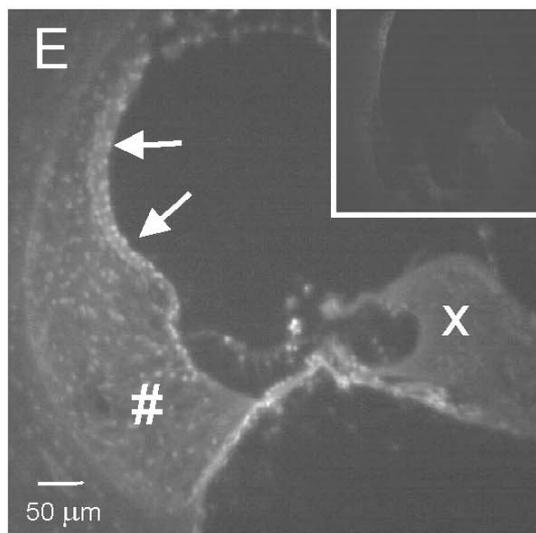
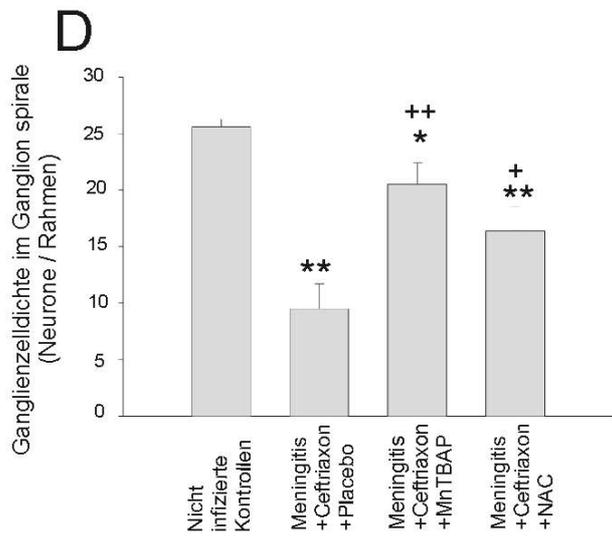
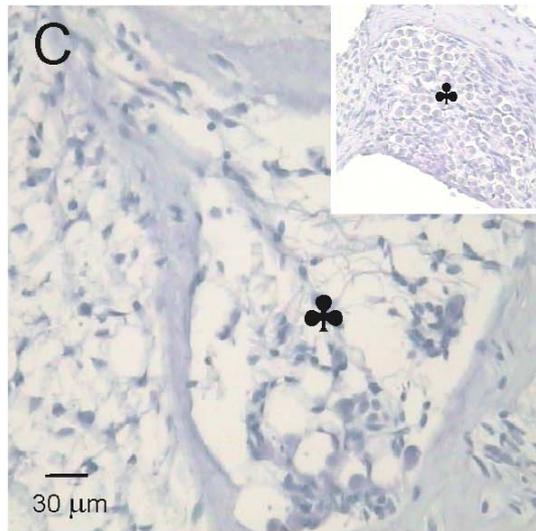
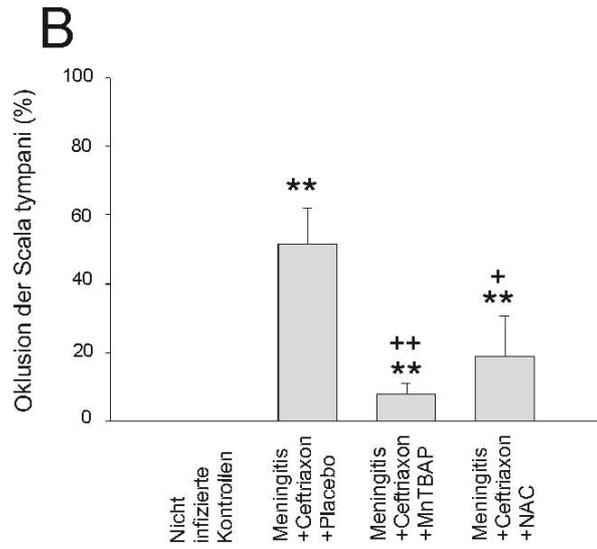
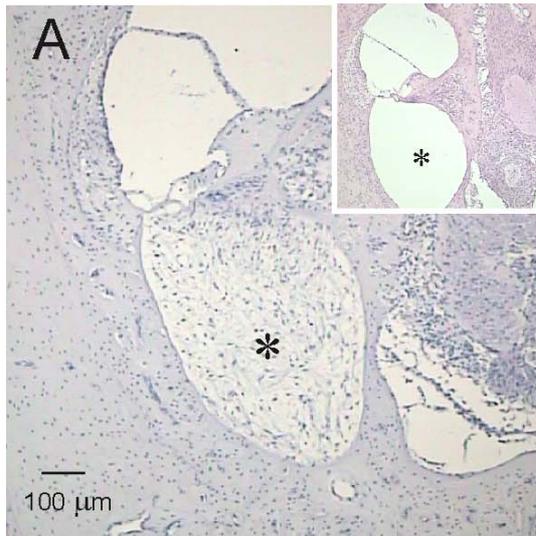
Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Die Blut-Labyrinth-Schranke war bei Tieren, die mit MnTBAP behandelt wurden, nicht ganz so stark geschädigt, wie bei nur mit Ceftriaxon behandelten Ratten (Ligamentum spirale: $p = 0,082$, Stria vascularis: *Abbildung 22F*, Limbus spiralis: $p = 0,002$). Im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen war die Evans Blue Extravasation in der Cochlea nicht unterschiedlich. Ein ähnliches Bild bot sich bei den Tieren, die NAC erhalten hatten: Auch hier war die Blut-Labyrinth-Schranke nicht signifikant geschädigt (*Abbildung 22F*).

Abbildung 22: Antioxidantien verringern morphologische Korrelate des Hörschadens

Durch die adjuvante Therapie mit Antioxidantien gelang es, (A und B) die Okklusion der Scala tympani zu verringern (* = basale Windung), (C und D) den neuronalen Zellschaden im Ganglion spirale (♣) zu vermindern und (E und F) die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung im Ligamentum spirale (#), in der Stria vascularis (Pfeil) und im Limbus spiralis (x) zu verhindern. (*) verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen, (+) verglichen mit nur durch Ceftriaxon behandelten Tieren. (*) und (+) $p < 0,05$; (**) und (++) $p < 0,001$. (A, C und E) Abbildungen von infizierten, nicht behandelten Tieren. Die kleinen Fenster in den Ecken zeigen nicht-infizierte Kontrollen. **→ *Abbildung nächste Seite***

Ergebnisse



← Abbildung 22: Legende vorherige Seite

3.3.7. Einfluss des PARP-Inhibitors INO 1001 auf die Meningitis-assoziierten cochleären Veränderungen

Hörschaden

Der PARP Inhibitor INO hatte weder in der niedrigen, noch in der hohen Dosierung einen Einfluss auf den Meningitis-assoziierten Hörschaden in diesem Tiermodell: Zu keinem Zeitpunkt war der Hörverlust verglichen mit nur antibiotisch behandelten Tieren unterschiedlich. Bei beiden Behandlungsgruppen kam es ebenfalls nach 18 Stunden im Hochfrequenzbereich und unter Klickstimulus zu leichten Hörschäden, die sich im weiteren Verlauf stärker ausprägten. Nach 72 Stunden und 2 Wochen, hörten die Tiere beider Gruppen signifikant schlechter als nicht-infizierte Kontrollen (*Abbildung 23*).

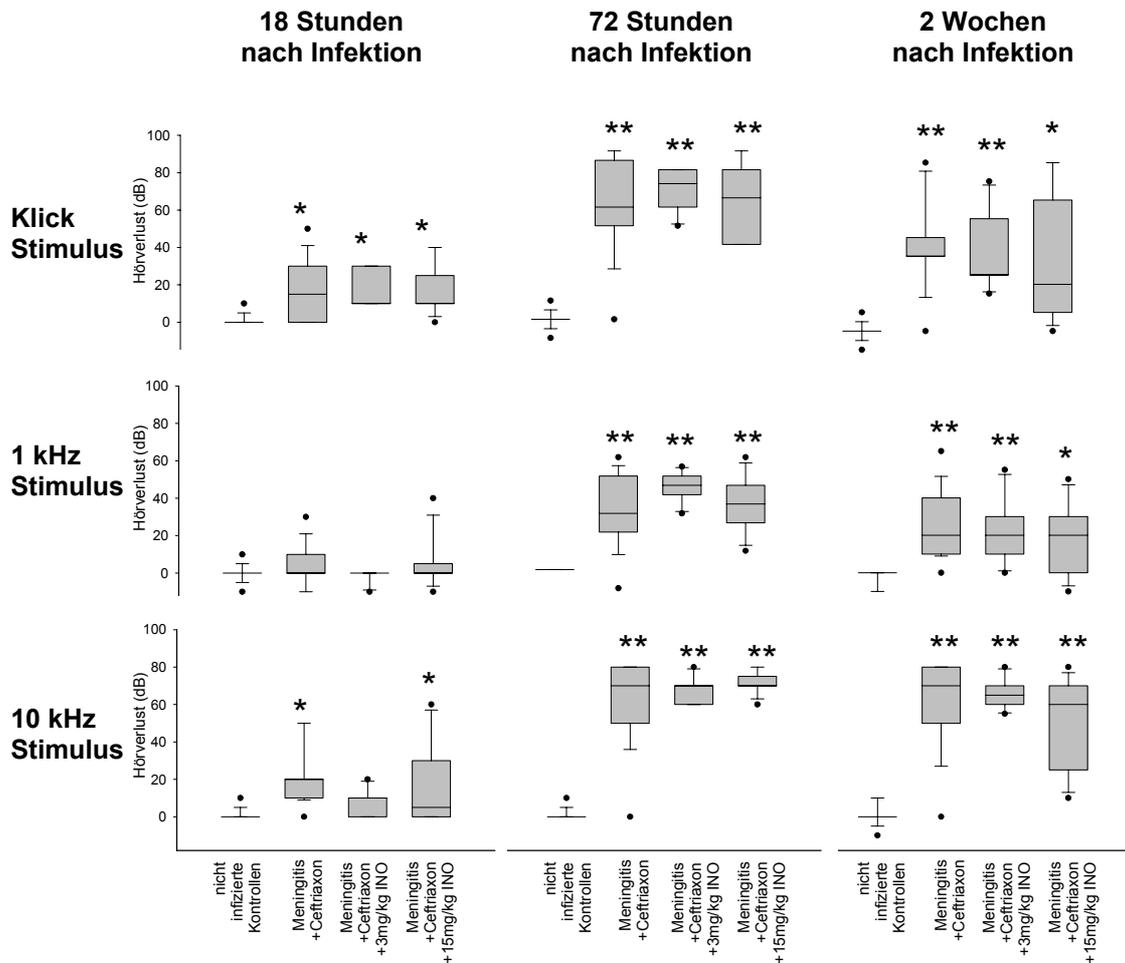


Abbildung 23: PARP-Inhibitor hat keinen Einfluss auf Hörverlust

Der PARP Inhibitor INO konnte in beiden getesteten Konzentrationen weder bei Klickstimulus, noch bei 1kHz oder 10kHz den Hörschaden bei Meningitis verringern. (*) verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen, $p < 0,05$.

Okklusion der perilymphatischen Räume

Die Therapie mit INO hatte keinen Einfluss auf die Ausprägung der Okklusion in der Scala tympani (infizierte Kontrollen = $51,57 \pm 34,9$ % vs. niedrige Dosierung INO = $80,84 \pm 38,3$ %: $p = 0,191$, infizierte Kontrollen vs. hohe Dosierung INO = $41,96 \pm 45,7$ %: $p = 0,449$).

Neuronenverlust im Ganglion spirale

Auch der Neuronenverlust im Ganglion spirale konnte durch die adjuvante Therapie mit INO weder in der hohen, noch in der niedrigen Dosierung verhindert werden (infizierte Kontrollen = $9,15 \pm 7,4$ Neurone/Rahmen vs. niedrige Dosierung INO = $5 \pm 4,2$ Neurone/Rahmen: $p = 0,363$; infizierte Kontrollen vs. hohe Dosierung INO = $7,5 \pm 6,5$ Neurone/Rahmen: $p = 0,836$).

Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung im Ligamentum spirale, im Limbus spiralis und in der Stria vascularis war bei Tieren, die den PARP-Inhibitor erhielten, genauso stark ausgeprägt wie bei Tieren, die nur mit Ceftriaxon behandelt wurden (*Tabelle 8*). Es gab keinen Unterschied zwischen den beiden geprüften Dosierungen von INO.

	Meningitis + Ceftriaxon	Meningitis + Ceftriaxon + INO (niedrige Dosierung)	Meningitis + Ceftriaxon + INO (hohe Dosierung)
Ligamentum spirale	$213,69 \pm 15,30$	$211,52 \pm 7,2$	$215,89 \pm 1,55$
Stria vascularis	$209,56 \pm 5,80$	$212,86 \pm 6,25$	$213,14 \pm 6,33$
Limbus spiralis	$207,53 \pm 12,18$	$211,32 \pm 6,03$	$212,46 \pm 5,43$

Tabelle 8: Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Im Vergleich zu Tieren, die nur mit Ceftriaxon behandelt wurden, war die Blut-Labyrinth-Schranke bei den Tieren, die mit INO behandelt wurden, ähnlich stark gestört.

3.4. Versuchsserie D (Mausmodell)

3.4.1. Klinische Charakteristik der Meningitis

Alle infizierten Mäuse erkrankten regelmäßig an Meningitis. Bei allen Tieren war der klinische Score erhöht (klinischer Score = $11,45 \pm 1,291$), während keines der drei Kontrolltiere klinische Zeichen für eine Erkrankung zeigte (klinischer Score stets null). Zusätzlich waren bei allen infizierten Tieren im Kleinhirnhomogenisat Pneumokokken nachweisbar (bakterieller Titer = $2,1 \times 10^{10} \pm 1,7 \times 10^9$). Bei den Kontrolltieren kam es in der Kultur zu keinem bakteriellen Wachstum. Ein infiziertes Tier verstarb 23 Stunden nach Infektion an der Erkrankung und wurde von der Studie ausgeschlossen.

3.4.2. Charakteristik des Hörschadens

Bei allen infizierten Tieren kam es nach 24 Stunden sowohl in der Klickaudiometrie als auch in der Tonaudiometrie zu einer Erhöhung der Hörschwelle (*Abbildung 24*). Am stärksten betroffen waren die hohen Frequenzen: Bei Stimulation mit 10kHz war der Hörschaden signifikant stärker ausgeprägt als bei Stimulation mit 1kHz (10kHz vs. 1 kHz Stimulus: $p = 0,001$). Bei den nicht-infizierten Kontrollen kam es zu keiner Veränderung der Hörschwelle (Klickstimulus: $0 \pm 6,33$; 1kHz Stimulus: $-3,33 \pm 5,16$; 10kHz Stimulus: $1,67 \pm 4,08$).

3.4.3. Histologische Veränderungen in der Cochlea

Bei nicht-infizierten Kontrollen kam es zu keiner kochleären Entzündung. Die im Mausmodell beobachteten histologischen Veränderungen waren ähnlich wie bei den Rattenexperimenten: Auch bei den infizierten Mäusen war die Entzündung auf die perilymphatischen Räume beschränkt, wo sie in der Scala tympani betont ausgeprägt war (*Abbildung 25*). In der Scala media fanden sich keine Entzündungszellen. Das Infiltrat bestand neben einem dichten Fibrin- und Proteinnetz hauptsächlich aus Granulozyten und einigen Erythrozyten. Die Scala media war stets frei von Protein. Interessanterweise kam es auch bereits bei den Tieren, die lediglich eine gering ausgeprägte granulozytäre Labyrinthitis zeigten, zu einem ausgeprägten fibrinösem Exsudat in der Scala tympani und, etwas weniger, in der Scala vestibuli. Die Granulozyten waren an der Lamina ossis spiralis und am Übergang zum Ligamentum spirale verstärkt zu finden und schienen die Lamina

ossis spiralis teilweise zu penetrieren. Die Entzündung korrelierte, gemessen am entzündlichen Score, mit der Hörschädigung für Klickstimuli ($r = -0,824$, $p = 0,025$), nicht jedoch für 1kHz und 10kHz Stimuli ($r = -0,629$, $p = 0,132$ und $r = 0,117$, $p = 0,803$). Allerdings lag die Hörschwelle für 10kHz Stimuli bei sechs von acht Ohren jenseits der Nachweisgrenze. Da die Mäuse nicht antibiotisch behandelt worden waren, konnten in dieser Versuchsserie Pneumokokken im Innenohr durch eine Gramfärbung sichtbar gemacht werden (*Abbildung 25E und F*). Auch hier war die Verteilung ähnlich wie bei der Entzündung: In den perilymphatischen Räumen lagen massenhaft Pneumokokken vor, während sich in der Endolymph-gefüllten Scala media keine Bakterien fanden.

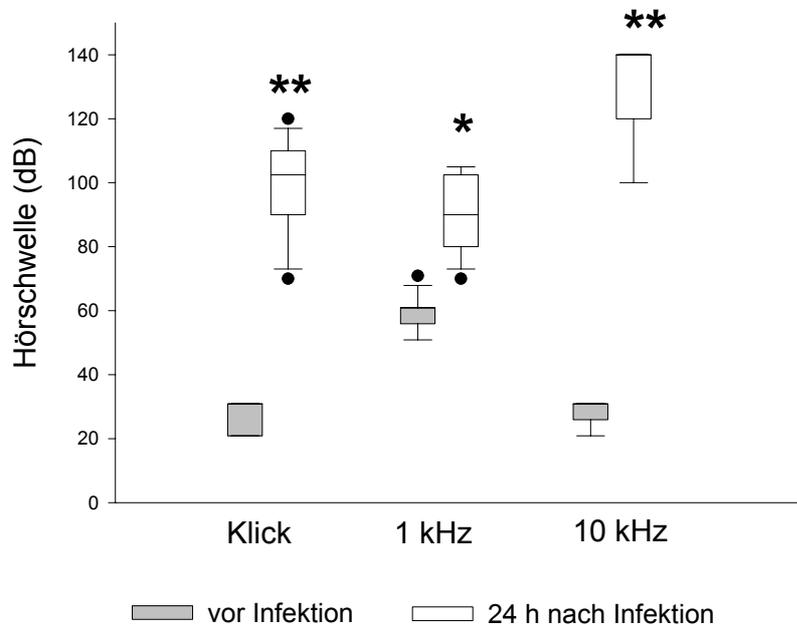


Abbildung 24: deutlicher Hörschaden bei infizierten Mäusen

Mit Pneumokokken infizierte Mäuse zeigten sowohl bei Klickstimulus als auch bei Stimulus mit 1 kHz und mit 10 kHz bereits 48h nach Infektion eine signifikante Erhöhung der Hörschwellen. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

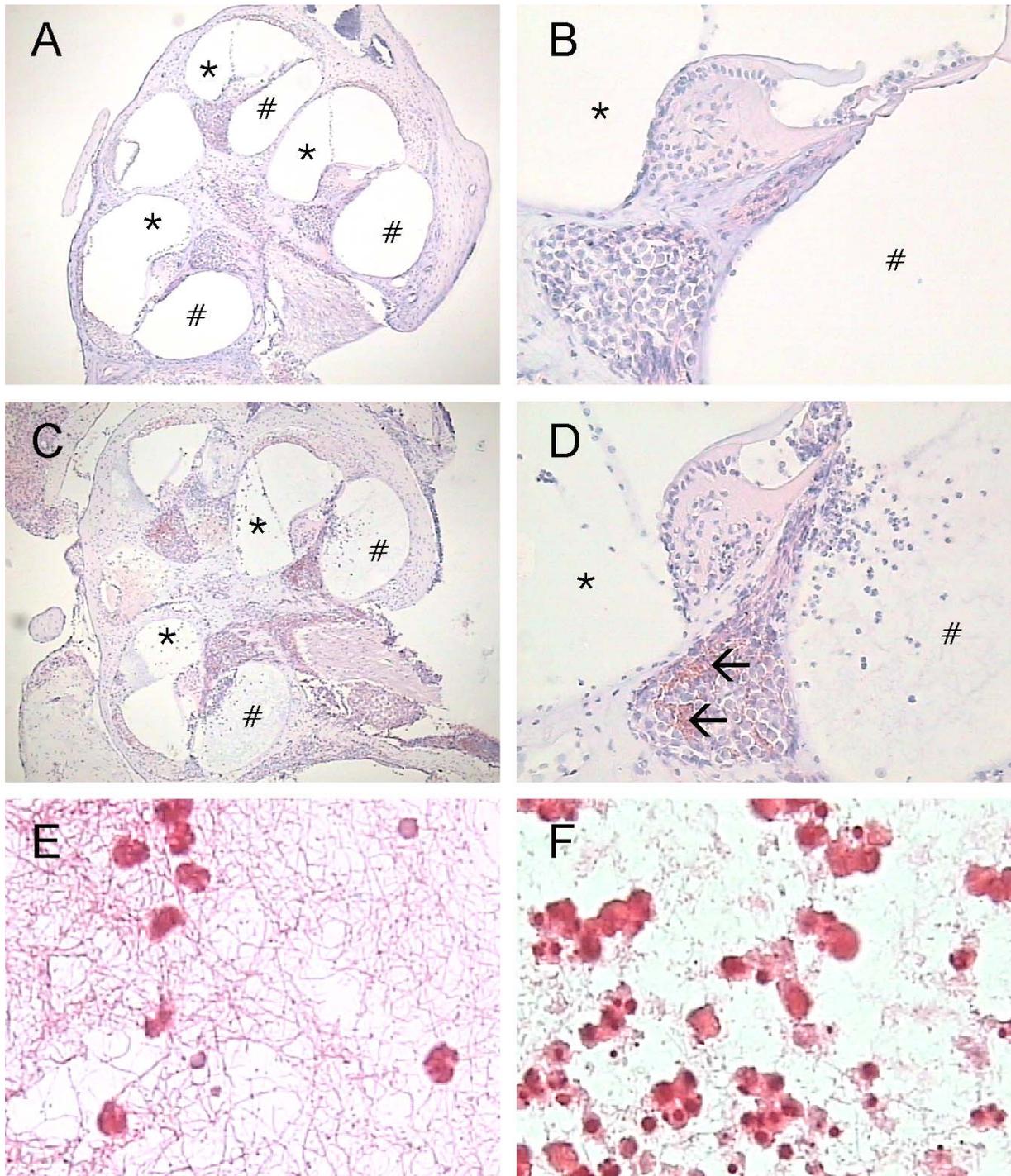


Abbildung 25: Eitrige und fibrinöse Labyrinthitis bei infizierten Mäusen

(A & B) Mäuse, die nicht mit Pneumokokken infiziert wurden, zeigten keine Anzeichen einer Labyrinthitis und es fanden sich keine Entzündungszellen in der Cochlea (A x 40, B x 150). (C & D) Bei infizierten Tieren kam es immer zu einer eitrigen Labyrinthitis, wobei die Entzündung in der Scala tympani (#) stärker als in der Scala vestibuli (*) ausgebildet war. In vielen Fällen konnte bei den infizierten Mäusen außerdem eine massive Blutung im Ganglion spirale nachgewiesen werden (Pfeile, C x 40, B x 150). (E) Neben der granulozytären Entzündung lag in den Perilymphräumen ein fibrinöses Exsudat vor. (E und F) Pneumokokken konnten ebenfalls nur in den Perilymphräumen nachgewiesen werden (x1000). (A-D) HE-Färbung; (E & F) Gramfärbung.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden ein bestehende Ratten- und Mausmodelle der Pneumokokkenmeningitis durch Hörmessungen mit AEPs methodisch erweitert und neurophysiologische sowie histopathologische Charakteristika des Hörschadens bei experimenteller Meningitis untersucht. Zum ersten Mal wurde zudem im Rattenmodell nicht nur das Akutstadium der Erkrankung erfasst, sondern auch das Stadium nach erfolgreicher antibiotischer Behandlung systematisch untersucht. Verschiedene Versuchsansätze bestätigten bereits bekannte und erbrachten darüber hinaus neue histopathologische und pathophysiologische Erkenntnisse der kochleären Beteiligung bei Meningitis: Es zeigte sich, ähnlich wie beim Menschen, ein teilweise reversibler akuter Hörschaden, und ein permanenter Langzeitschaden. Dabei war die Ausprägung des Hörschadens abhängig von der Dosis der injizierten Pneumokokken. Als histopathologisches Korrelat des Hörschadens konnten eine perilymphatische Inflammation, eine Störung der Blut-Labyrinth-Schranke und ein nekrotischer Untergang von Neuronen im Ganglion spirale identifiziert werden. Davon schien vor allem die Störung der Blut-Labyrinth-Schranke entscheidend für den Hörschaden in der Akutphase der Erkrankung zu sein. Der Langzeithörschaden hingegen resultierte vorwiegend aus dem Zelluntergang im Ganglion spirale und der Okklusion der Perilymphräume. Pathophysiologisch konnte ONOO^- als entscheidender Mediator für die Entstehung der kochleären Schädigung identifiziert werden: Zum einen konnte die vermehrte Expression von NO-Synthasen und Bildung von Nitrotyrosin (einem Marker von ONOO^-) in der Cochlea immunhistochemisch nachgewiesen werden, zum anderen reduzierte die adjuvante Therapie mit Antioxidantien und Peroxynitritfängern sowohl den Hörschaden, als auch dessen morphologische Korrelate.

Charakteristik des Hörschadens

Im hier etablierten Modell konnten, ähnlich wie beim Menschen, zwei unterschiedliche Stadien der Hörbeeinträchtigung unterschieden werden [Vienny, H. et al., 1984]: Ein akuter Hörverlust, der in der frühen Phase der Erkrankung progressiv ist und nach ca. 48 Stunden gipfelt und ein Langzeithörverlust nach erfolgreicher Antibiotikatherapie. Wie bei Patienten mit Meningitis waren beide Ohren der Tiere unterschiedlich stark betroffen und ähnlich wie in klinischen Studien kam es nur dann zu einem Langzeithörverlust, wenn bereits in der Akutphase eine Erhöhung

der Hörschwellen nachweisbar war [Richardson, M. P. et al., 1997]. Unter antibiotischer Therapie kam es vorerst zu einer Verschlechterung des Hörschadens. Dies ähnelt der initialen Verschlimmerung zerebraler Komplikationen nach Beginn einer antibiotischen Therapie bei Patienten mit bakterieller Meningitis, wofür ein sogenannter „inflammatory burst“ nach Freiwerden subkapsulärer Bakterienbestandteile verantwortlich zu sein scheint [Tuomanen, E. et al., 1985]. Das in dieser Arbeit etablierte Tiermodell spiegelt den Verlauf des Hörschadens bei Patienten mit Pneumokokkenmeningitis hervorragend wider und eignet sich somit zur Untersuchung der pathophysiologischen Ursachen des Akut- und Langzeithörschadens.

Es konnte gezeigt werden, dass in Tiermodellen der Meningitis ein höheres bakterielles Inokulum zu einer Verstärkung zerebraler Komplikation führt: Bei Infektion von neugeborenen Ratten mit Gruppe B Streptokokken korrelierte die Häufigkeit von epileptischen Anfällen, Vaskulopathien und neuronalem Schaden mit dem Inokulum [Kim, Y. S. et al., 1995], und auch in anderen Meningitismodellen waren höhere bakterielle Titer mit einer stärkeren Ausprägung zerebraler Komplikationen (Vaskulitis, Zerebritis und Abszessbildung) assoziiert [Tauber, M. G. et al., 1992]. Eine Korrelation zwischen der Anzahl intrathekal injizierter Pneumokokken und dem resultierenden Hörverlust wird aber erstmals in dieser Arbeit beschrieben.

Der Weg der Bakterien vom Subarachnoidalraum in die Cochlea

Das Muster der Veränderungen in den Cochleae infizierter Tiere deckt sich mit den Befunden bisheriger Studien [Bhatt, S. et al., 1991; Blank, A. L. et al., 1994; Kay, R., 1991; Merchant, S. N. und Gopen, Q., 1996; Rappaport, J. M. et al., 1999; Rodriguez, A. F. et al., 1991; Winter, A. J. et al., 1997]. Regelmäßig kam es zu einer meist auf die perilymphatischen Räume beschränkten granulozytären Entzündung. Neben dem zellulären Infiltrat lag häufig ein fibrinöses Exsudat vor und in einigen Fällen konnten Einblutungen in Scala vestibuli und Scala tympani festgestellt werden. Der Ausbreitungsweg der Bakterien vom Subarachnoidalraum in die Cochlea wurde bereits vielfach diskutiert [Bhatt, S. et al., 1991; Kay, R., 1991; Merchant, S. N. und Gopen, Q., 1996; Wiedermann, B. L. et al., 1986]. Sie können zum einen bei Bakteriämie hämatogen durch stark vaskularisierte Strukturen, wie die Stria vascularis, in das Innenohr vordringen. Ein zweiter denkbarer Weg wäre

entlang des Nervus cochlearis, der durch den Modiolus zum Ganglion spirale und den Haarzellen zieht. Der dritte mögliche Ausbreitungsweg für Bakterien von den Meningen in die Cochlea führt über den Ductus perilymphaticus („cochlear aqueduct“), der den Subarachnoidalraum der mittleren Schädelgrube mit der basalen Windung der Scala tympani verbindet.

Die Resultate von Merchant et al. lassen diesbezüglich keinen sicheren Schluss zu. Sowohl der Modiolus, als auch der Ductus perilymphaticus kamen bei den untersuchten Felsenbeinen von an Meningitis erkrankten Patienten als Ausbreitungsweg für Bakterien in Frage [Merchant, S. N. und Gopen, Q., 1996], da auch bei fibrozytärer Okklusion des Ductus perilymphaticus eitrige Labyrinthiden beobachtet werden konnten. Der Ductus perilymphaticus ist physiologischerweise in über der Hälfte der Fälle mit einem lockeren Fibrozytennetz ausgefüllt [Gopen, Q. et al., 1997; Merchant, S. N. und Gopen, Q., 1996], das für Flüssigkeiten und kleine feste Bestandteile, wie beispielsweise Erythrozyten und damit sicherlich auch die noch kleineren Bakterien, jedoch durchgängig zu sein scheint [Bachor, E. et al., 1999; Galic, M. und Giebel, W., 1987]. Infolgedessen können die bei fibrozytärer Okklusion des Ductus perilymphaticus aufgetretenen Fälle von Labyrinthitis nicht sicher als Hinweis auf einen anderen Infektionsweg gewertet werden.

Die Verteilung der Entzündung in dieser Studie unterstützt die Theorie, dass die Entzündung zumindest bei der Ratte und der Maus durch den Ductus perilymphaticus in die Cochlea gelangt: Die eitrige Labyrinthitis war in der basalen Windung der Scala tympani akzentuiert und die Öffnung des Ductus perilymphaticus mit Granulozyten ausgefüllt. Das Ausbreitungsmuster der Entzündungszellen in anderen Tiermodellen war ähnlich, wo auch in den meisten Fällen die Scala tympani stärker als die Scala vestibuli betroffen [Kaplan, S. L. et al., 1989; Osborne, M. P. et al., 1995] und die Entzündung basal betont war [Bhatt, S. et al., 1991]. Auch die Betonung des Hörverlustes im hohen Frequenzbereich (hohe Frequenzen werden im basalen Bereich und niedrige Frequenzen im apikalen Bereich der Cochlea wahrgenommen) und der basal stärker ausgeprägte neuronale Zellschaden in diesem Modell unterstützen die These der Ausbreitung über den Ductus perilymphaticus in die Scala tympani, Fortschreiten der Entzündung von basal nach apikal und retrograd über das Helikotrema in die Scala vestibuli. Die perivaskuläre Anhäufung von Entzündungszellen im Ligamentum spirale und im Limbus spiralis könnte dann entweder als Folge eines chemotaktischen Reizes der durch den

Ductus perilymphaticus eingewanderten Bakterien oder aber doch als eine hämatogene Aussaat der Bakterien gewertet werden. Gegen eine hämatogene Aussaat spricht die basale Betonung der Entzündung. In diesem Fall müsste es eher zu einer gleichmäßigen Entzündungsreaktion in allen Windungsabschnitten der Cochlea kommen und es sollte sich kein Unterschied in der Stärke der Entzündung zwischen Scala tympani und Scala vestibuli ausbilden. Außerdem sollte die Scala media mitbetroffen sein, da sie der Stria vascularis und dem Ligamentum spirale benachbart ist. Die Scala media war jedoch immer frei von Granulozyten und Protein. Auch waren bei infizierten Mäusen keine Pneumokokken in der Scala media nachweisbar, während Scala tympani und Scala vestibuli eine dichte Keimzahl aufwiesen. Neben den physikalischen Barrieren ist es möglich, dass die kaliumreiche Endolymphe für Bakterien und / oder Entzündungszellen ein toxisches Umfeld bietet und deshalb nicht infiltriert wurde. Anhaltspunkte für starke entzündliche Veränderungen entlang des Nervus cochlearis im Modiolus, die auf den dritten angesprochenen Ausbreitungsweg hinweisen könnten, gab es in den Cochleae der infizierten Tiere nicht.

Blut-Labyrinth-Schrankenstörung

Zum ersten Mal konnten wir zeigen, dass die Blut-Labyrinth-Schranke im Limbus spiralis, im Ligamentum spirale und in der Stria vascularis bei meningogener Labyrinthitis gestört ist. Diese Störung der Blut-Labyrinth-Schranke trat erstmals 24 Stunden nach Infektion auf. Entzündliche Veränderungen konnten bereits 18 Stunden nach Infektion nachgewiesen werden, zu einem Zeitpunkt als es bei den Tieren weder zu einer Störung der Blut-Labyrinth-Schranke, noch zu einer Veränderung der Hörschwelle gekommen war. Schrankenstörung und Hörschaden scheinen eine Folge der Entzündung im Innenohr zu sein: Der Entzündungsscore in der Cochlea während der Akutphase der Erkrankung korrelierte in dieser Studie mit der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung, welche wiederum mit dem Hörverlust assoziiert war. Die Blut-Labyrinth-Schranke war auch zwei Wochen nach Infektion noch deutlich gestört. Obwohl zu diesem Zeitpunkt die Schrankenstörung nur noch sehr schwach mit dem Hörschaden assoziiert war, könnte sie ein Grund für die von Dichgans et al. im MRT beobachtete Kontrastmittelaufnahme in Cochleae von an Meningitis erlaubten Patienten sein [Dichgans, M. et al., 1999].

Die Blut-Labyrinth-Schranke ist eine sehr wichtige Barriere zwischen Blut und den beiden kochleären Flüssigkeiten, Perilymphe und Endolymphe. Diese Barriere besteht unter anderem aus „tight junctions“ zwischen den Endothelzellen, einem streng regulierten Transport durch pinozytische Vesikel und einer negativ geladenen Basalmembran [Jahnke, K., 1980]. Das Ligamentum spirale, die Stria vascularis und der Limbus spiralis sind stark vaskularisiert und enthalten ein dichtes Kapillarnetz [Kimura, R. S. et al., 1990; Takahashi, T. und Kimura, R. S., 1970]. Während die Perilymphe dem Liquor cerebrospinalis ähnelt, ist die Endolymphe sehr reich an Kalium (140 mmol/l) [Zenner, H. P., 1997]. Kommt es zur Aktivierung der Haarzellen durch einen akustischen Reiz, öffnen sich auf deren apikaler, in der Endolymphe gelegenen Oberfläche K^+ -durchlässige Kanäle. Durch K^+ -Einstrom kommt es zur Depolarisation, zur basalen Transmitterausschüttung und zur Erregung des Nervus cochlearis. Um zu repolarisieren, wird Kalium auf der basolateralen Seite der Haarzellen über Ionenkanäle wieder abgegeben und wahrscheinlich über Gap junctions durch Epithelzellen zurück in das Ligamentum spirale geschleust. Von hier wird es über Fibrozyten weiter in die Stria vascularis befördert, deren marginale Zellen schließlich das Kalium in hoher Konzentration in die Endolymphe abgeben [Kikuchi, T. et al., 2000]. Kommt es durch Läsionen in der Blut-Labyrinth-Schranke zu einer Änderung der Endolymphzusammensetzung, so ist eine Beeinträchtigung des Hörvermögens die Folge [Wu, R. und Hoshino, T., 1999]. Beispielsweise führt eine Mutation im Gap junction Protein „Connexin 26“, das für das Kalium-Recycling in der Blut-Labyrinth-Schranke essentiell ist, zu einem sensorisch-neuronalem Hörschaden [Kikuchi, T. et al., 2000]. Schädigungen im Bereich der Blut-Labyrinth-Schranke scheinen auch für den toxisch induzierten Hörschaden eine Rolle zu spielen, wie er zum Beispiel durch Aminoglykoside und Zytostatika induziert werden kann [Feghali, J. G. et al., 1998] und es gibt Hinweise, dass es auch bei Lärm-induziertem Hörschaden zu Veränderungen im Bereich der Blut-Labyrinth-Schranke kommt [Shi, X. und Nuttall, A. L., 2003]. Bisher war lediglich bekannt, dass es in Modellen der abakteriellen Innenohrentzündung zu einer Blut-Labyrinth-Schrankenstörung kommt: Die Behandlung von Meerschweinchen mit Endotoxin (intraperitoneal und durch Auflage eines mit Endotoxin getränkten Schwamms auf das runde Fenster) führte zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Stria vascularis, wobei Meerrettichperoxidase als Marker verwendet wurde [Watanabe, K. und Tanaka, Y., 1997]. Auch nach Inokulation von „Keyhole Limpet Hämocyanin“ in die Scala tympani von systemisch sensibilisierten Meerschweinchen konnte eine Zerstörung der Blut-Labyrinth-Schranke durch den immunhistochemischen Nachweis von IgG und Albumin im

Ligamentum spirale, dem Limbus spiralis und in kochleären Blutgefäßen nachgewiesen werden [Ichimiya, I. et al., 1998]. Zum ersten Mal konnte hier eine Blut-Labyrinth-Schrankenstörung bei bakterieller, meningogener Labyrinthitis nachgewiesen werden, die wahrscheinlich über Veränderungen in der Zusammensetzung endokochleärer Flüssigkeiten zum Meningitis-assoziierten Hörschaden beitragen könnte.

Möglicherweise resultiert der Hörverlust aber auch aus dem Übertreten exzitatorischer Aminosäuren (z.B. Glutamat) vom Blut über die defekte Blut-Labyrinth-Schranke in die Cochlea. Ähnliches konnte für zerebrale Schädigungen bei experimenteller Meningitis gezeigt werden: Durch die geschädigte Blut-Hirn-Schranke treten bei bakterieller Meningitis exzitatorische Aminosäuren in das ZNS über, die dann neurotoxisch wirken können [Guerra-Romero, L. et al., 1993; Spranger, M. et al., 1996]. Die Behandlung mit Kynureninsäure (einem nicht selektiven Inhibitor der neurotoxischen Effekte von exzitatorischen Aminosäuren) verminderte den neuronalen Schaden im Kortex und Hippocampus von an Gruppe B Streptokokken Meningitis erkrankten Ratten [Leib, S. L. et al., 1996b]. Auch in der Cochlea können exzitatorische Aminosäuren, beispielsweise beim Lärm-induzierten Hörschaden, zur Schädigung des Cortischen Organs führen [Pujol, R. und Puel, J. L., 1999]. Ob es bei meningogener eitriger Labyrinthitis durch die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung zum Übertritt von exzitatorischen Aminosäuren in die Peri- oder Endolymphe und dadurch zur von Rappaport et al. elektronenmikroskopisch beobachteten Schädigung von Haarzellen kommt [Rappaport, J. M. et al., 1999], konnte hier nicht geklärt werden.

Zum ersten Mal konnte in dieser Studie eine Störung der Blut-Labyrinth-Schranke bei meningogener Labyrinthitis und deren hochsignifikante Korrelation mit der Ausprägung des akuten Hörverlusts bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis nachgewiesen werden. Der gleichzeitige Rückgang der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung und des Hörschadens in der Akutphase unter adjuvanter Therapie mit MnTBAP weist ebenfalls auf die Relevanz der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung für die Entwicklung des Meningitis-assoziierten Hörschadens hin.

Okklusion der Perilymphräume

Die Korrelationsanalyse zeigte, dass im Rattenmodell neben der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung vor allem andere histopathologische Veränderungen zum permanenten Hörverlust beizutragen scheinen. Als auffälligste Merkmale fanden sich zwei Wochen nach Infektion die Okklusion der Scala tympani durch ein Fibrozytengeflecht, sowie der Verlust spiraler Ganglienzellen, der hochsignifikant mit dem Hörschaden nach Genesung der Tiere korrelierte. Einige der histopathologischen Veränderungen konnten bereits in Einzelfällen beim Menschen nachgewiesen werden: Paparella et al. beschrieb bei sieben überlebenden Patienten, die an Meningitis erlaubten und erst Jahre später an einer anderen Erkrankung verstarben, signifikante Veränderungen in der Cochlea. Die perilymphatischen Räume waren größtenteils durch Fibrozytengeflecht und Ossifikation ausgefüllt und im Ganglion spirale schien die Neuronendichte reduziert [Paparella, M. M. und Sugiura, S., 1967].

Bei Patienten, die durch bakterielle Meningitis erlauben, kommt es in vielen Fällen zur Labyrinthitis ossificans, wobei die Cochlea komplett oder nur teilweise verknöchern kann [al Shaikh, A. H. und Metwalli, A. A., 2000; Rauch, S. D. et al., 1997]. In Cochleae von Katzen und Eichkätzchen mit Labyrinthitis (Tiere, die durch andere Operationen Innenohrentzündungen entwickelten und unterschiedlich lange überlebten) konnten die Veränderungen histologisch in drei Stadien unterteilt werden: Im Akutstadium kam es zu einem leukozytären Infiltrat in den perilymphatischen Räumen, das dann nach zwei Wochen in ein Fibrozytengeflecht umgewandelt worden war und schließlich nach zwei bis drei Monaten zu ossifizieren begann [Paparella, M. M. und Sugiura, S., 1967]. In der ersten systematischen Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Ossifikation konnten bei 16 von 25 Wüstenrennmäusen, die mit Pneumokokken infiziert worden waren, 3 Wochen nach Infektion erste Verkalkungen in der Cochlea gefunden werden [Nabili, V. et al., 1999]. In einer neueren Arbeit konnte die gleiche Arbeitsgruppe sogar schon 3 Tage nach Infektion bei einigen Tieren Anzeichen für Osteoidproduktion in der Cochlea nachweisen [Tinling, S. P. et al., 2004]. Das hier beobachtete Fibrozytengeflecht zwei Wochen nach Infektion entspricht infolgedessen am ehesten einem Übergangsstadium zwischen eitriger Labyrinthitis und Labyrinthitis ossificans.

Die Okklusion der Scala tympani kann sicherlich primär durch Veränderungen in der Ausbreitung der Wanderwelle zur Hörschädigung beitragen. Von wahrscheinlich größerer Bedeutung für den Hörverlust ist jedoch der mit der kochleären Okklusion korrelierende Neuronenverlust im Ganglion spirale, der bei Patienten *in vivo* technisch nicht nachgewiesen werden kann. Auch bei einer kleinen Studie an sechs Felsenbeinen von an Meningitis ertaubten Patienten, die erst viele Jahre nach der Erkrankung verstarben, korrelierte die Ausprägung der Labyrinthitis ossificans mit dem Zelluntergang im Ganglion spirale [Nadol, J. B., Jr. und Hsu, W. C., 1991]. Diese auch hier beobachtete Korrelation könnte erklären, warum an Meningitis ertaubte Patienten mit computertomographisch nachgewiesener Labyrinthitis ossificans schlechte Erfolgsaussichten haben, durch ein „cochlear implant“ zu profitieren [Incesulu, A. und Nadol, J. B., Jr., 1998; Rauch, S. D. et al., 1997]. Zum ersten Mal konnten wir zeigen, dass nach experimenteller Meningitis die beginnende Labyrinthitis ossificans mit einem Neuronenverlust im Ganglion spirale assoziiert ist, der mit dem Hörverlust korreliert und ein wichtiges morphologisches Korrelat des Langzeithörschadens bei bakterieller Meningitis zu sein scheint.

Neuronenverlust im Ganglion spirale

Obwohl in der Akutphase der experimentellen Erkrankung die Neuronenzellzahl nicht mit der Ausprägung des Hörschadens korrelierte, ist es durchaus möglich, dass bereits ein Teil der Hörschädigung zu diesem Zeitpunkt nicht nur durch die diskutierten Folgen einer Blut-Labyrinth-Schrankenstörung, sondern auch durch Neuronenuntergang im Ganglion spirale bedingt sein könnte. In unserem Modell kam es bereits in der Akutphase der Erkrankung zur Schädigung von Neuronen: 48 Stunden nach Infektion waren die Neuronenzahlen im basalen Ganglion spirale erniedrigt. Beim Menschen konnte in der Akutphase der Meningitis aufgrund fehlenden Untersuchungsmaterials bisher nur schwer neuronaler Zellschaden nachgewiesen werden. Lediglich in der Untersuchung von 41 Felsenbeinen von an akuter Meningitis verstorbenen Patienten durch Merchant et al. fand sich in vier Fällen ein neuronaler Zelluntergang im Ganglion spirale [Merchant, S. N. und Gopen, Q., 1996]. Erstmals wurden in unserer Studie auch die Mechanismen des neuronalen Zelltods bei meningogener Labyrinthitis untersucht. Zellen können entweder durch Apoptose oder durch Nekrose zugrunde gehen, die morphologisch und immunhistochemisch unterschieden werden können: Apoptotische Zellen lösen sich aus dem Zellverband, schrumpfen und werden kleiner. Das Chromatin kondensiert

und legt sich der Kernmembran an, bis diese auseinander bricht und in Fragmente zerfällt, die nur noch von einem kleinen Rand Zytoplasma umgeben werden. Es entstehen die so genannten „apoptotic bodies“ [Loo, D. T. und Rillema, J. R., 1998; Stadelmann, C. und Lassmann, H., 2000]. Nekrotische Zellen schwellen in der Regel an, bis die Plasmamembran ihre Integrität verliert und das Zytoplasma aus der Zelle ausläuft [Martelli, A. M. et al., 2001]. In unserem Tiermodell kam es in der Akutphase zu einer deutlichen Zellschwellung von Neuronen im Ganglion spirale und gleichzeitig aber auch zu einem Zerfall des Zellkerns. Diese histopathologischen und unsere immunhistochemischen Befunde (TUNEL-positive aber PARP p85-Spaltprodukt-negative Neurone) weisen darauf hin, dass im Rattenmodell vor allem Nekrose für den Neuronentod im Ganglion spirale verantwortlich ist. Granulozyten in den Perilymphräumen scheinen hingegen eher durch Apoptose zu Grunde zu gehen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass es vor allem in der Akutphase der Erkrankung zum Untergang spiraler Ganglienzellen kommt. Allerdings ist es durchaus möglich, dass es im weiteren Verlauf der Erkrankung zusätzlich auch aufgrund von Inaktivität zu neuronalem Zelltod kommen kann, wie dies bei anderen Formen des Hörschadens beobachtet wurde: Die Behandlung von Chinchillas mit Carboplatin produzierte einen selektiven Schaden von inneren Haarzellen, der innerhalb von 2 bis 12 Wochen nach Carboplatintherapie zu einem Untergang von Neuronen im Ganglion spirale führte [Takeno, S. et al., 1998]. Der beobachtete elektronenmikroskopische Schaden von Haarzellen bei meningogener Labyrinthitis [Osborne, M. P. et al., 1995] könnte demnach zum akuten Hörverlust beitragen, und anschließend zu einer langsamen Schädigung von Neuronen im Ganglion spirale infolge von andauernder Inaktivität führen.

Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit bei meningogener Labyrinthitis

Als Ursache für die Schädigung der Blut-Labyrinth-Schranke und der Neurone im Ganglion spirale kommt ONOO^- in Frage: Immunhistochemisch konnte Nitrotyrosin als Marker für ONOO^- nachgewiesen werden. Zugleich wirkten MnTBAP, Harnsäure und NAC protektiv auf die histopathologischen Veränderungen und den Hörschaden. Als Quelle für NO kommen die ebenfalls immunhistochemisch detektierten NO-Synthasen iNOS und eNOS in Frage. Die Co-Lokalisation von Nitrotyrosin und iNOS in der Nähe von Granulozyten, Endothelzellen und Fibrozyten des Ligamentum spirale und des Limbus spiralis deutet darauf hin, dass es bei meningogener

Labyrinthitis hauptsächlich durch die Expression von iNOS zur massiven Produktion von NO kommt, das dann zu ONOO^- reagiert. Die Ergebnisse früherer Arbeiten wiesen bereits auf eine Rolle von iNOS bei Labyrinthitis hin. Nach Injektion von Lipopolysaccharid in die Paukenhöhle von Meerschweinchen wurde eine Expression von iNOS vor allem in Kapillaren und andere Zellen des Ligamentum spirale und des Limbus spiralis, in Nervenfasern und Perikaryen von Zellen im Ganglion spirale, sowie auch im Cortischen Organs nachgewiesen [Hess, A. et al., 1999; Watanabe, K. et al., 2000]. Takumida et al. fanden ebenfalls iNOS Expression im Cortischen Organ und im Limbus spiralis nach intratympanaler Injektion von Lipopolysaccharid [Takumida, M. et al., 2000]. In diesen Studien unterschied sich das Expressionsmuster von eNOS bei mit Lipopolysaccharid „behandelten“ Tieren nicht von dem bei Kontrolltieren. Unsere Studie zeigt zum ersten Mal, dass iNOS und eNOS bei meningogener, eitriger Labyrinthitis exprimiert, beziehungsweise hochreguliert werden. Der Unterschied zum eNOS Expressionsmuster in den anderen Arbeiten kann durch die unterschiedlichen Entzündungsstimuli (Lipopolysaccharid vs. Pneumokokken) und die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte hervorgerufen sein.

Die NO-Synthasen produzieren NO durch die Oxidation von L-Arginin zu N-Hydroxy-L-Arginin und dann weiter zu L-Citrullin [Andrew, P. J. und Mayer, B., 1999]. NO hat eine Vielzahl von unterschiedlichen Effekten zur Folge, die völlig unterschiedliche biologische Auswirkungen haben können [Liaudet, L. et al., 2000]. Welche Wirkung im jeweiligen Fall entscheidend ist, hängt maßgeblich von der Menge und dem Produktionsort von NO, den vorliegenden Substraten und dem gegenwärtigen Redox-Status ab [Beckman, J. S. und Koppenol, W. H., 1996]. eNOS und nNOS produzieren picomolare Konzentrationen von NO, das dann meistens als Signalbotenstoff fungiert: NO vermittelt in geringen Mengen direkt zum Beispiel Vasodilatation, reduzierte Plättchen- und Leukozytenadhärenz oder Signaltransduktion im Nervensystem durch die Aktivierung der Guanylatcyclase [Liaudet, L. et al., 2000]. Durch iNOS Expression kommt es hingegen zur Produktion von größeren Mengen NO, was direkt toxische Effekte zur Folge haben kann. Stickstoffmonoxyd führt dann beispielsweise zur Potenzierung der Wasserstoffperoxid-Zytotoxizität durch die Inhibierung von Katalase [Farias-Eisner, R. et al., 1996]. Die meisten negativen Effekte werden allerdings wahrscheinlich durch die Bildung von ONOO^- aus NO und O_2^- vermittelt. In Entzündungsprozessen wird O_2^- von Entzündungszellen wie Granulozyten produziert (zum Beispiel zur

Infektabwehr). Physiologisch schützt sich der Organismus vor O_2^- und entsorgt es durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid und schließlich weiter durch Katalase zu Wasser. Allerdings läuft die Reaktion mit NO etwa sechsmal schneller ab (2×10^{10} vs. 10^8 - $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Beckman, J. S. und Koppenol, W. H., 1996]. Es kommt also unausweichlich zur Produktion von $ONOO^-$ in vivo, wenn beide Substanzen in großer Menge vorhanden sind und Superoxiddismutase nicht in ausreichender Konzentrationen zugegen ist [Groves, J. T., 1999].

Für $ONOO^-$ konnten bereits eine Vielzahl von zentralen Schädigungsmechanismen bei bakterieller Meningitis identifiziert werden (siehe Einleitung). Diese Studie liefert erstmals Daten zu den Effekten von $ONOO^-$ in der Cochlea bei Meningitis. Der protektive Effekt aller drei hier verwendeten Antioxidantien (Harnsäure, MnTBAP und NAC) zeigt, dass $ONOO^-$ in der Entstehung der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung bei bakterieller Meningitis eine zentrale Position einnimmt. MnTBAP ist ein Metalloporphyrin, das die Umwandlung von $ONOO^-$ in Nitrat katalysiert [Arteel, G. E. et al., 1999] und somit als Peroxynitritfänger fungiert. Außerdem ist MnTBAP auch ein Superoxiddismutase-Mimetikum und katalysiert die Umwandlung von Superoxidanion in Wasserstoffperoxid [Gauvan, P. J. et al., 2002]. In Tiermodellen des Paraquat-induzierten und des Bleomycin-induzierten Lungenschadens [Oury, T. D. et al., 2001], sowie bei mitochondrialer Superoxiddismutase-defizienten Tieren verminderte MnTBAP die Ausprägung der pathologischen Veränderungen [Melov, S., 2002]. Harnsäure neutralisiert Hydroxylradikale und Peroxynitrit [Scott, G. S. und Hooper, D. C., 2001] und stellt ca. 30-65% des menschlichen Radikalfängerpotentials im Plasma [Wayner, D. D. et al., 1987]. Durch die Gabe von Harnsäure als Peroxynitritfänger konnte im Tiermodell der Multiplen Sklerose (Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis) ein protektive Wirkung nachgewiesen werden, wo es zu einer Reduktion der Blut-ZNS-Schrankenstörung führte [Hooper, D. C. et al., 2000]. Auch beim Menschen scheint der antioxidative Effekt von Harnsäure bei Meningitis eine Rolle zu spielen, da bei Patienten mit Meningitis niedrige Harnsäurespiegel mit dem Auftreten von Komplikationen assoziiert waren [Kastenbauer, S. et al., 2002b]. Kastenbauer et al. konnte außerdem zeigen, dass Harnsäure im Akutstadium der experimentellen Pneumokokkenmeningitis auch den intrakraniellen Druck, die Liquorleukozytenzahl und die Blut-Hirn-Schrankenstörung reduzierte [Kastenbauer, S. et al., 2002a]. NAC ist ein Medikament, das durch seine Sulfhydrylgruppe in der Lage ist, direkt freie Radikale zu neutralisieren und durch die Steigerung der intrazellulären Glutathion-

Konzentrationen indirekt zur Detoxifikation von Radikalen beiträgt [Aruoma, O. I. et al., 1989; De Vries, N. und De Flora, S., 1993]. NAC wurde bereits von Koedel et al. im Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis in Bezug auf intrakranielle Komplikationen getestet: Die Ausprägung von Hirnödemen, intrakraniellm Druck und Liquorleukozytenzahl konnte durch die Therapie mit NAC vermindert werden [Koedel, U. und Pfister, H. W., 1997]. Zum ersten Mal konnten wir in dieser Studie nachweisen, dass die Antioxidantien MnTBAP, Harnsäure und NAC bei der bakteriellen Meningitis auch kochleäre Komplikationen reduzieren und ONOO⁻ ein entscheidender Mediator des kochleären Schadens bei Meningitis zu sein scheint.

Auch für den neuronalen Schaden im Ganglion spirale spielt die Produktion von ONOO⁻ eine entscheidende Rolle, wie der immunhistochemische Nachweis von iNOS und Nitrotyrosin im Ganglion spirale und die neuroprotektive Wirkung von MnTBAP und NAC zeigen. Es sind verschiedene Mechanismen der neurotoxischen Wirkung von ONOO⁻ bekannt. In vitro wurde beobachtet, dass ONOO⁻ zu Apoptose durch die Aktivierung von Caspase 3 führen kann [Ischiropoulos, H., 1998] und nach Perfusion der Perilymphräume von Wüstenspringmäusen mit einem NO-Donor konnte Apoptose in spiralen Ganglienzellen nachgewiesen werden [Pai, N. et al., 1998]. Nichts desto weniger kann ONOO⁻, wenn es in hohen Konzentrationen vorhanden ist, auch für nekrotischen Zelltod verantwortlich sein [Koedel, U. et al., 2002; Leib, S. L. et al., 1996a; Szabo, C., 1996]: Im Zellkern führt ONOO⁻ zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNS [Halliwell, B., 1999], die dann zur Aktivierung des nukleären Enzyms PARP führen [Weinfeld, M. et al., 1997]. Aktivierte PARP verbraucht exzessive Mengen Adenosintriphosphat und führt sehr schnell zum Energieverlust der Zelle und dadurch zu nekrotischem Zelltod [Ha, H. C. und Snyder, S. H., 2000]. Dieser Schädigungsweg konnte in vitro durch die Inkubation von Zellen mit ONOO⁻ nachgewiesen werden [Szabo, C., 1996]. In vivo waren Mäuse mit einer genetischen Inaktivierung des PARP-Gens vor zerebralem Reperfusionsschaden nach Ischämie geschützt [Endres, M. et al., 1997] und Koedel et al. beobachtete bei PARP-defizienten Mäusen mit Pneumokokkenmeningitis einen Rückgang der Blut-Hirn-Schrankenstörung, der intrakraniellen Hypertension, Liquorpleozytose, der Chemokinkonzentration im Gehirn und einen besseren klinischen Status als bei infizierten Wildtyp Mäusen [Koedel, U. et al., 2002]. Auch durch die medikamentöse Gabe von PARP-Inhibitoren konnte die Leukozytenaktivierung in Carrageenan und Zymosan vermittelten lokalen Entzündungsmodellen vermindert [Szabo, C. et al., 1997] und die pathologischen Veränderungen bei Arthritis [Szabo, C. et al., 1998]

und Peritonitis [Cuzzocrea, S. et al., 2001] reduziert werden. Im Rattenmodell der Pneumokokkenmeningitis war der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzidin protektiv [Koedel, U. et al., 2002]. In diesem Modell konnte durch die intraperitoneale Gabe des PARP-Inhibitors INO 1001 weder eine Reduktion des neuronalen Zellverlusts im Ganglion spirale, noch eine Besserung des Hörschadens nachgewiesen werden. Die Aktivierung von PARP infolge von Doppelstrangbrüchen scheint demzufolge nicht der entscheidende Mechanismus für den Neuronenuntergang bei Meningitis-assoziiertes Labyrinthitis zu sein.

Adjuvante Therapie mit N-Acetyl-L-Cystein

Die Ergebnisse der adjuvanten Therapie mit MnTBAP sind zwar wissenschaftlich interessant, NAC ist allerdings klinisch viel versprechender. NAC ist ein Medikament, das bereits im klinischen Alltag vielfach verwendet wird. Es dient vor allem der Verflüssigung von zähem Bronchialsekret, da es Disulfidbrücken von Mucoproteiden aufbricht und dadurch die Viskosität verringert. Auch als Antidot bei Vergiftungen mit Paracetamol wird NAC eingesetzt. In klinischen Studien konnte ein protektiver Effekt bei einer Vielzahl von Erkrankungen, die mit oxidativem Schaden einhergehen, nachgewiesen werden: Bei fibrosierender Alveolitis konnte die Lungenfunktion verbessert werden, bei HIV-Patienten mit einer CD4 Zellzahl $> 200 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ und niedrigen Plasma Cysteinspiegeln konnte die Abnahme von CD4-Lymphozyten hinaus gezögert werden, und durch die adjuvante Therapie mit NAC zusätzlich zu Nitroglycerin und Streptokinase kam es bei Patienten mit akutem Herzinfarkt zu schnellerer Reperfusion und besserem Erhalt der linksventrikulären Funktion [Kelly, G. S., 1998]. NAC ist außerdem sehr gut verträglich: Durch die intravenöse Gabe hoher Dosen kam es lediglich in wenigen Einzelfällen zu allergischen Reaktionen wie Übelkeit und Erbrechen, gastrointestinalen Störungen, Pruritus, Bronchospasmus, Tachykardie, Hypo- oder Hypertension. Durch Absetzen des Medikaments sind die unerwünschten Wirkungen sofort reversibel. Die Daten dieser Studie zeigten erstmals einen protektiven Effekt von NAC als adjuvantes Therapeutikum des Hörschadens bei Pneumokokkenmeningitis und ergänzen die Befunde der Studien, die einen protektiven Effekt von NAC auf zerebrale Komplikationen der experimentellen Meningitis zeigen konnte [Auer, M. et al., 2000; Christen, S. et al., 2001; Koedel, U. und Pfister, H. W., 1997]. NAC ist daher eine viel versprechende Substanz für die adjuvante Therapie der bakteriellen Meningitis.

Neue Möglichkeiten durch das Mausmodell

Die Übertragung des Modells von der Ratte auf die Maus bestätigt, dass es sich bei der in der Ratte gefundenen Pathologie nicht um artspezifische Veränderungen der Pneumokokkenmeningitis handelt und unterstreicht die Verlässlichkeit des experimentellen Aufbaus. Neben der Bestätigung der durch die Rattenexperimente bekannt gewordenen Fakten eröffnen sich außerdem neue Möglichkeiten, einer Vielzahl von interessanten Fragestellungen nachzugehen. Insbesondere die Möglichkeit, transgener Tiere für Untersuchungen der meningogenen Labyrinthitis zu verwenden, ermöglicht neue Wege um den Einfluss unterschiedlicher, potentiell entscheidender Mediatoren der Pathogenese des Meningitis-assoziierten Hörschadens zu eruieren.

Hypothetisches Modell der Meningitis-assoziierten eitrigen Labyrinthitis

Zusammengefasst lassen unsere Ergebnisse im Kontext mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen die folgende Kette von Ereignissen bei der Meningitis-assoziierten eitrigen Labyrinthitis vermuten: Die Bakterien erreichen die Scala tympani durch den Ductus perilymphaticus und führen dann zur Migration von Entzündungszellen über das Ligamentum spirale und den Limbus spiralis. Die Entzündungsantwort scheint durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite zur Störung der Blut-Labyrinth-Schranke zu führen, die in der Akutphase stark mit dem Hörschaden korreliert. Bei Überlebenden wird im Laufe der Genesung die Entzündung in den Perilymphräumen durch Bindegewebe und später durch Knochen ersetzt. Labyrinthitis ossificans und neuronaler Schaden, der entweder in direkter Folge der Entzündung durch Radikale, sekundär durch über die defekte Blut-Labyrinth-Schranke übergetretene exzitatorische Aminosäuren, oder aber durch Inaktivität aufgrund zerstörter Haarzellen zustande kommt, scheinen für den lebenslang anhaltenden Hörschaden nach Genesung verantwortlich zu sein. Die protektive Wirkung von Antioxidantien in der Akutphase der Erkrankung im Tiermodell ist viel versprechend und lässt auf eine Verbesserung der Therapie des Meningitis-assoziierten Hörschaden beim Menschen hoffen.

5. Zusammenfassung

Der Meningitis-assoziierte Hörschaden ist trotz Antibiotikatherapie und intensivmedizinischer Versorgung der Patienten inakzeptabel hoch. Grund des Hörverlusts bei bakterieller Meningitis ist eine eitrige Entzündung der Cochlea. Die zugrunde liegende Pathophysiologie ist bisher weitgehend unbekannt und sollte im Rahmen dieser Promotion näher untersucht werden.

Dazu wurden ein Ratten- und ein Mausmodell des Hörschadens der Pneumokokkenmeningitis etabliert. Nach intrathekaler Injektion von *Streptococcus pneumoniae Typ 3* wurde das Muster des Hörverlusts mittels AEPs (1kHz, 10kHz und Klickstimulus) im Akutstadium (18, 24 und 48 Stunden nach Infektion) und erstmals auch nach erfolgreicher Antibiotikatherapie (zwei Wochen nach Infektion) systematisch charakterisiert. Als morphologische Korrelate des Hörschadens wurden die Ausprägung der Entzündung, die Neuronendichte im Ganglion spirale und die Okklusion der Perilymphräume histologisch identifiziert und quantifiziert. Fluoreszenzmikroskopisch konnte nach Gabe des Indikatorfarbstoffs Evans Blue die Integrität der Blut-Labyrinth-Schranke beurteilt werden. Immunhistochemisch wurden die cochleäre Expression von iNOS und eNOS, sowie die Produktion von Peroxynitrit untersucht. Durch adjuvante Therapie mit den Antioxidantien MnTBAP, NAC und Harnsäure wurde die Rolle von Peroxynitrit (ONOO^-) für die Pathophysiologie des Meningitis-assoziierten Hörschadens evaluiert.

Die Charakteristik des Hörschadens war ähnlich wie sie bei Patienten mit Meningitis beobachtet wird: Der Inokulum-abhängige Hörschaden war in der Akutphase der Erkrankung teilweise transient, mündete aber meistens in einen permanenten Hörverlust. Hohe Frequenzen waren dabei stärker betroffen als niedrige Frequenzen.

Als morphologisches Korrelat des akuten Hörverlusts fand sich eine granulozytäre Entzündung der Perilymphräume, die in der basalen Windung der Scala tympani akzentuiert war. Neben der eitrigen Entzündung konnte erstmals auch eine Störung der Blut-Labyrinth-Schranke identifiziert werden, die in der Akutphase der Erkrankung sehr stark mit dem Hörschaden korrelierte. Die immunhistochemisch beobachtete starke Expression von iNOS, eNOS und Nitrotyrosin in Cochleae von infizierten Tieren und die protektive Wirkung der ONOO^- Fänger und Antioxidantien

MnTBAP und Harnsäure deuten auf ONOO^- als Mediator der Blut-Labyrinth-Schädigung im Akutstadium hin.

Die im Akutstadium nachweisbare neuronale Nekrose (Histologie, TUNEL, PARP p85-Spaltprodukt Immunhistochemie) mündete in eine verminderte Neuronendichte im Ganglion spirale. Dieser Neuronenverlust war zwei Wochen nach Infektion neben einer fibrozytären Okklusion der perilymphatischen Räume (beginnende Labyrinthitis ossificans) äußerst stark mit dem Hörverlust korreliert und scheint hauptverantwortlich für den Langzeithörschaden nach Pneumokokkenmeningitis zu sein.

Zum ersten Mal konnte in dieser Studie eine otoprotektive Wirkung für die Antioxidantien MnTBAP und NAC bei Meningitis-assoziiertes eitriger Labyrinthitis gezeigt werden: Zwei Wochen nach Infektion waren der Hörverlust und dessen morphologische Korrelate (Neuronenverlust, Okklusion der Perilymphräume und Blut-Labyrinth-Schrankenstörung) bei den adjuvant behandelten Tieren geringer ausgeprägt als bei den nur antibiotisch behandelten Tieren. Vor allem der Therapieerfolg von NAC ist klinisch viel versprechend und lässt auf eine verbesserte Therapie des Meningitis-assoziierten Hörschadens hoffen.

6. Ausblick

Das hier etablierte Tiermodell ist eine hervorragende Basis für weitere Untersuchungen des Meningitis-assoziierten Hörschadens: Sowohl funktionelle, wie auch pathophysiologische und histopathologische Veränderungen lassen sich im Akutstadium und im Langzeitverlauf der Erkrankung verfolgen. Die hier angeführten Ideen könnten helfen, die komplexe Pathophysiologie der kochleären Beteiligung bei bakterieller Meningitis besser zu verstehen. Dies ist die Grundlage, um neue Therapiekonzepte zur Bekämpfung des Meningitis-assoziierten Hörschadens zu entwickeln.

Die beobachtete Blut-Labyrinth-Schrankenstörung könnte Korrelat der von Dichgans et al. im MRT beobachteten Kontrastmittelaufnahme sein [Dichgans, M. et al., 1999]. Kochleae von an Meningitis erkrankten Tieren könnten kernspintomographisch und anschließend histologisch untersucht werden. Durch Korrelationsanalysen ließe sich dann möglicherweise ein Zusammenhang zwischen einer kochleären Kontrastmittelaufnahme im MRT und der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung nachweisen. Wir konnten zeigen, dass Peroxynitrit eine wesentliche Rolle bei der Zerstörung der Blut-Labyrinth-Schranke spielt. Die genauen Pathomechanismen sind jedoch noch unklar. Matrixmetalloproteinasen und Plasminogenaktivatoren, sowie der Permeabilitätsfaktor VEGF sind hier viel versprechende Kandidaten [Gille, H. et al., 2001; Paul, R. et al., 1998]. Im Hinblick auf die Fragestellung, wie die Blut-Labyrinth-Schrankenstörung zur Hörschädigung führt, könnte die Untersuchung der Endo- und Perilymphhomöostase, sowie eine Konzentrationsbestimmung exzitatorischer Aminosäuren in den beiden kochleären Flüssigkeitsräumen bei infizierten Tieren aufschlussreich sein [Leib, S. L. et al., 1996b; Wu, R. und Hoshino, T., 1999]. Ebenfalls interessant wäre die Untersuchung der Auswirkung einer pharmakologischen Inhibition exzitatorischer Aminosäuren auf den Meningitis-assoziierten Hörschaden sowie dessen morphologische Korrelate.

Ein entscheidender Mediator der beobachteten neuronalen Zellschädigung ist ONOO^- . Durch den eingesetzten PARP-Inhibitor konnte der Neuronenverlust und der Hörschaden nicht reduziert werden. Es gibt aber noch andere Möglichkeiten, wie ONOO^- zum beobachteten neuronalen Zelltod im Spiralganglion führen könnte, beispielsweise durch ONOO^- -vermittelte Lipidperoxidation oder mitochondriale Schädigungsmechanismen [Kastenbauer, S. et al., 2002c]. Der Zellverlust im

Ganglion war vor allem für den permanenten Hörschaden entscheidend. Im Hinblick auf eine etwaige Prognoseverbesserung durch den Einsatz von Cochlear Implants wäre es interessant zu wissen [Nadol, J. B., Jr. und Hsu, W. C., 1991], ob durch den lokalen Einsatz von neuronalen Wachstumsfaktoren im Langzeitverlauf die Neuronendichte in der Cochlea wieder erhöht werden kann.

Ein hier untersuchtes Therapiekonzept der bakteriellen Meningitis ist der adjuvante Einsatz von Antioxidantien. NAC, ein bereits zur Therapie anderer Erkrankungen routinemäßig eingesetztes Medikament [Kelly, G. S., 1998], konnte sowohl den Hörschaden, als auch dessen morphologische Korrelate in dieser Studie reduzieren. Eine adjuvante Therapie der bakteriellen Meningitis mit NAC ist infolgedessen ein viel versprechender Therapieansatz und wird sicherlich Ziel zukünftiger klinischer Studien sein.

7. Quellenverzeichnis

Reagenzien	Hersteller
3-Nitro-L-Tyrosin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz Artikel Nr. GA16389
Ceftriaxon	Hoffmann-La Roche, Grenzach, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikel Nr. 10973
Evans Blue	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, Artikel Nr. E2129
Gram-Färbeset	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Halothan	Hochst AG, Frankfurt, Deutschland
Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Harnsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, Artikel Nr. U-0881
Ketaminhydrochlorid	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
MnTBAP	Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland Artikel Nr. 430-069-M010
NAC	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Palladur	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland
PARP Inhibitor INO 1001	Dr. Szabo C., Division of Critical Care, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA
Rattenhoden	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland Artikel Nr. BC-T2434260
Streptavidin – Meerrettichperoxidase	DAKO, Hamburg, Deutschland, Artikel Nr. P0397
Thiopental-Natrium	Byk Gulden, Konstanz, Deutschland
TUNEL Kit	R&D Systems, Minneapolis, Minn, USA Artikel Nr. TA4625
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, Artikel Nr. X-1251

Alle weiteren Reagenzien wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

Antikörper	Hersteller
Anti – eNOS IgG Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA, Artikel Nr. sc-664
Anti – Kaninchen IgG Antikörper (biotinyliert)	Vector Labs, Burlingame, California, USA Artikel Nr. BA 1000
Anti – iNOS IgG Antikörper	Becton Dickinson Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA, Katalog Nr. N320030
Anti – Nitrotyrosin IgG Antikörper	Upstate Biotechnology, USA, Artikel Nr. 05233
Anti – p85 Spaltprodukt IgG Antikörper	Promega Co, Wisconsin, USA, Artikel Nr. G7341

Quellenverzeichnis

Versuchstiere	Hersteller
C57BL/6N Mäuse, männlich	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, Artikel Bezeichnung C57/6-M
Wistar Ratten, männlich	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, Artikel Bezeichnung (WI)BR

Hardware	Hersteller
4-Kanal-AEP Gerät	Neuroscreen Plus, Jaeger-Toennies, Höchberg, Deutschland
Kopfhörer E-A-RTONE 3D	Auditory Systems, Indianapolis, USA
Nadelelektroden	Schwarzer, München, Deutschland
Nicolet Compac Four	Nicolet Biomedical Instruments, Wisconsin, USA
Olympus BX51 Lichtmikroskop	Olympus optical, Hamburg, Deutschland
Tierbeatmungsgerät Model Ap-10	Effenberger, Pfaffing, Deutschland
Videokamera JVC TK1360B	JVC, Friedberg, Deutschland
Videosystem schwarz-weiß	Variocam, PCS CDD Imaging, Kehlheim, Deutschland
Mikrobohrer	Proxxon NG2-E, Proxxon GmbH, Niersbach, Deutschland

Software	Hersteller
Image Tool 3.0	University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA
Sigma Plot 2000	Sigma Plot Inc., USA
SYSTAT Version 9	SPSS Inc., USA
TINA 2.08e	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland

8. Literaturverzeichnis

- (1) al Shaikh, A. H. und Metwalli, A. A. Experience with cochlear implants in postmeningitic cases. *Adv Otorhinolaryngol* 2000; 57:240-242.
- (2) Amaee, F. R., Comis, S. D. und Osborne, M. P. NG-methyl-L-arginine protects the guinea pig cochlea from the cytotoxic effects of pneumolysin. *Acta Otolaryngol* 1995; 115:386-391.
- (3) Amaee, F. R., Comis, S. D., Osborne, M. P., Drew, S. und Tarlow, M. J. Possible involvement of nitric oxide in the sensorineural hearing loss of bacterial meningitis. *Acta Otolaryngol* 1997; 117:329-336.
- (4) Andrew, P. J. und Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43:521-531.
- (5) Arditi, M., Mason, E. O., Jr., Bradley, J. S., Tan, T. Q., Barson, W. J., Schutze, G. E., Wald, E. R., Givner, L. B., Kim, K. S., Yogev, R. und Kaplan, S. L. Three-year multicenter surveillance of pneumococcal meningitis in children: clinical characteristics, and outcome related to penicillin susceptibility and dexamethasone use. *Pediatrics* 1998; 102:1087-1097.
- (6) Arteel, G. E., Briviba, K. und Sies, H. Protection against peroxynitrite. *FEBS Lett* 1999; 445:226-230.
- (7) Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M. und Butler, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:593-597.
- (8) Auer, M., Pfister, L. A., Leppert, D., Tauber, M. G. und Leib, S. L. Effects of clinically used antioxidants in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 2000; 182:347-350.
- (9) Bachor, E., Byahatti, S. und Karmody, C. S. New aspects in the histopathology of the cochlear aqueduct in children. *Am J Otol* 1999; 20:612-620.

- (10) Beckman, J. S. und Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-C1437.
- (11) Bhatt, S., Halpin, C., Hsu, W., Thedinger, B. A., Levine, R. A., Tuomanen, E. und Nadol, J. B. Hearing loss and pneumococcal meningitis: an animal model. *Laryngoscope* 1991; 101:1285-1292.
- (12) Blanco-Rodriguez, J. und Martinez-Garcia, C. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996; 29:13-31.
- (13) Blank, A. L., Davis, G. L., VanDeWater, T. R. und Ruben, R. J. Acute *Streptococcus pneumoniae* meningogenic labyrinthitis. An experimental guinea pig model and literature review. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120:1342-1346.
- (14) Bohr, V., Hansen, B., Jessen, O., Johnsen, N., Kjersem, H., Kristensen, H. S., Nyboe, J. und Rasmussen, N. Eight hundred and seventy-five cases of bacterial meningitis. Part I of a three-part series: clinical data, prognosis, and the role of specialised hospital departments. *J Infect* 1983; 7:21-30.
- (15) Brookhouser, P. E., Auslander, M. C. und Meskan, M. E. The pattern and stability of postmeningitic hearing loss in children. *Laryngoscope* 1988; 98:940-948.
- (16) Brown, G. C. und Borutaite, V. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 1999; 66:17-25.
- (17) Chaudhuri, A. Adjunctive dexamethasone treatment in acute bacterial meningitis. *Lancet Neurol* 2004; 3:54-62.
- (18) Christen, S., Schaper, M., Lykkesfeldt, J., Siegenthaler, C., Bifrare, Y. D., Banic, S., Leib, S. L. und Tauber, M. G. Oxidative stress in brain during experimental bacterial meningitis: differential effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron and N-acetylcysteine treatment. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:754-762.

- (19) Comis, S. D., Osborne, M. P., Stephen, J., Tarlow, M. J., Hayward, T. L., Mitchell, T. J., Andrew, P. W. und Boulnois, G. J. Cytotoxic effects on hair cells of guinea pig cochlea produced by pneumolysin, the thiol activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Otolaryngol* 1993; 113:152-159.
- (20) Crow, J. P. und Beckman, J. S. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 196:57-73.
- (21) Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P. und Salvemini, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001; 53:135-159.
- (22) de Gans, J und van de Beek. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2002; 347:1549-1556.
- (23) De Vries, N. und De Flora, S. N-acetyl-L-cysteine. *J Cell Biochem Suppl* 1993; 17:270-277.
- (24) Detsch, O. und Kochs, E. Effekte von Ketamin auf die ZNS-Funktion. *Anaesthesist* 1997; 46.:S20-S29.
- (25) Dichgans, M., Jager, L., Mayer, T., Schorn, K. und Pfister, H. W. Bacterial meningitis in adults: demonstration of inner ear involvement using high-resolution MRI. *Neurology* 1999; 52:1003-1009.
- (26) Dodge, P. R., Davis, H., Feigin, R. D., Holmes, S. J., Kaplan, S. L., Jubelirer, D. P., Stechenberg, B. W. und Hirsh, S. K. Prospective evaluation of hearing impairment as a sequela of acute bacterial meningitis. *N Engl J Med* 1984; 311:869-874.
- (27) Durand, M. L., Calderwood, S. B., Weber, D. J., Miller, S. I., Southwick, F. S., Caviness, V. S., Jr. und Swartz, M. N. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993; 328:21-28.
- (28) Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391:43-50.

- (29) Endres, M., Wang, Z. Q., Namura, S., Waeber, C. und Moskowitz, M. A. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17:1143-1151.
- (30) Farias-Eisner, R., Chaudhuri, G., Aeberhard, E. und Fukuto, J. M. The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide/hydrogen peroxide and the implications to cell resistance/susceptibility. *J Biol Chem* 1996; 271:6144-6151.
- (31) Feghali, J. G., Lefebvre, P. P., Staecker, H., Kopke, R., Frenz, D. A., Malgrange, B., Liu, W., Moonen, G., Ruben, R. J. und Van de Water, T. R. Mammalian auditory hair cell regeneration/repair and protection: a review and future directions. *Ear Nose Throat J* 1998; 77(4):276, 280, 282-285.
- (32) Fortnum, H. M. Hearing impairment after bacterial meningitis: a review. *Arch Dis Child* 1992; 67:1128-1133.
- (33) Franz, P., Hauser-Kronberger, C., Bock, P., Quint, C. und Baumgartner, W. D. Localization of nitric oxide synthase I and III in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 1996; 116:726-731.
- (34) Galic, M. und Giebel, W. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur des Gewebes in der kochleären Apertur des Aqueductus cochleae. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 1987; 66:1-5.
- (35) Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. und Hu, X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995; 26:627-634.
- (36) Gauvan, P. J., Trova, M. P., Gregor-Boros, L., Bocckino, S. B., Crapo, J. D. und Day, B. J. Superoxide dismutase mimetics: synthesis and structure-activity relationship study of MnTBAP analogues. *Bioorg Med Chem* 2002; 10:3013-3021.
- (37) Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., Pelletier, N. und Ferrara, N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276:3222-3230.

- (38) Goodwin, D. C., Landino, L. M. und Marnett, L. J. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J* 1999; 13:1121-1136.
- (39) Gopen, Q., Rosowski, J. J. und Merchant, S. N. Anatomy of the normal human cochlear aqueduct with functional implications. *Hear Res* 1997; 107:9-22.
- (40) Groves, J. T. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3:226-235.
- (41) Guerra-Romero, L., Tureen, J. H., Fournier, M. A., Makrides, V. und Tauber, M. G. Amino acids in cerebrospinal and brain interstitial fluid in experimental pneumococcal meningitis. *Pediatr Res* 1993; 33:510-513.
- (42) Ha, H. C. und Snyder, S. H. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the nervous system. *Neurobiol Dis* 2000; 7:225-239.
- (43) Halliwell, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999; 443:37-52.
- (44) Hess, A., Bloch, W., Huverstuhl, J., Su, J., Stennert, E., Addicks, K. und Michel, O. Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanical endotoxin-treatment. *Brain Res* 1999; 830:113-122.
- (45) Hooper, D. C., Scott, G. S., Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R. B., Koprowski, H. und Spitsin, S. V. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 2000; 14:691-698.
- (46) Ichimiya, I., Kurono, Y., Hirano, T. und Mogi, G. Changes in immunostaining of inner ears after antigen challenge into the scala tympani. *Laryngoscope* 1998; 108:585-591.
- (47) Incesulu, A. und Nadol, J. B., Jr. Correlation of acoustic threshold measures and spiral ganglion cell survival in severe to profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998; 107:906-911.

- (48) Ischiropoulos, H. Living and dying with reactive species. Focus on "peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease". *Am J Physiol* 1998; 274:C853-C854.
- (49) Jahnke, K. The blood-perilymph barrier. *Arch Otorhinolaryngol* 1980; 228:29-34.
- (50) Jedrzejak, M. J. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65:187-207.
- (51) Jiang, Z. D. Outcome of brain stem auditory electrophysiology in children who survive purulent meningitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108:429-434.
- (52) Kaplan, S. L., Hawkins, E. P., Kline, M. W., Patrick, G. S. und Mason, E. O., Jr. Invasion of the inner ear by *Haemophilus influenzae* type b in experimental meningitis. *J Infect Dis* 1989; 159:923-930.
- (53) Kastenbauer, S., Koedel, U., Becker, B. und Pfister, H. W. Pneumococcal meningitis in the rat: evaluation of peroxynitrite scavengers for adjunctive therapy. *Eur J Pharmacol* 2002a; 449:177-181.
- (54) Kastenbauer, S., Koedel, U., Becker, B. F. und Pfister, H. W. Experimental meningitis in the rat: protection by uric acid at human physiological blood concentrations. *Eur J Pharmacol* 2001; 425:149-152.
- (55) Kastenbauer, S., Koedel, U., Becker, B. F. und Pfister, H. W. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology* 2002b; 58:186-191.
- (56) Kastenbauer, S., Koedel, U. und Pfister, H. W. Role of peroxynitrite as a mediator of pathophysiological alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 1999; 180:1164-1170.
- (57) Kastenbauer, S., Koedel, U. und Pfister, H. W. Oxidative Brain Damage by Peroxynitrite in Bacterial Meningitis: A Target for Adjunctive Therapy? *Curr Med Chem* 2002c; 109-127.
- (58) Kastenbauer, S. und Pfister, H. W. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain* 2003; 126:1015-1025.

- (59) Kay, R. The site of the lesion causing hearing loss in bacterial meningitis: a study of experimental streptococcal meningitis in guinea-pigs. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1991; 17:485-493.
- (60) Kelly, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 1998; 3:114-127.
- (61) Kesser, B. W., Hashisaki, G. T., Spindel, J. H., Ruth, R. A. und Scheld, W. M. Time course of hearing loss in an animal model of pneumococcal meningitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 120:628-637.
- (62) Kikuchi, T., Kimura, R. S., Paul, D. L., Takasaka, T. und Adams, J. C. Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 32:163-166.
- (63) Kim, Y. S., Sheldon, R. A., Elliott, B. R., Liu, Q., Ferriero, D. M. und Tauber, M. G. Brain injury in experimental neonatal meningitis due to group B streptococci. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54:531-539.
- (64) Kimura, R. S., Nye, C. L. und Southard, R. E. Normal and pathologic features of the limbus spiralis and its functional significance. *Am J Otolaryngol* 1990; 11:99-111.
- (65) Koedel, U., Bayerlein, I., Paul, R., Sporer, B. und Pfister, H. W. Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* 2000; 182:1437-1445.
- (66) Koedel, U., Bernatowicz, A., Paul, R., Frei, K., Fontana, A. und Pfister, H. W. Experimental pneumococcal meningitis: cerebrovascular alterations, brain edema, and meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol* 1995; 37:313-323.
- (67) Koedel, U. und Pfister, H. W. Protective effect of the antioxidant N-acetyl-L-cysteine in pneumococcal meningitis in the rat. *Neurosci Lett* 1997; 225:33-36.
- (68) Koedel, U. und Pfister, H. W. Models of experimental bacterial meningitis. Role and limitations. *Infect Dis Clin North Am* 1999a; 13:549-77, vi.

- (69) Koedel, U. und Pfister, H. W. Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathol* 1999b; 9:57-67.
- (70) Koedel, U., Winkler, F., Angele, B., Fontana, A. und Pfister, H. W. Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:39-49.
- (71) Lebel, M. H., Freij, B. J., Syrogiannopoulos, G. A., Chrane, D. F., Hoyt, M. J., Stewart, S. M., Kennard, B. D., Olsen, K. D. und McCracken, G. H., Jr. Dexamethasone therapy for bacterial meningitis. Results of two double-blind, placebo-controlled trials. *N Engl J Med* 1988; 319:964-971.
- (72) Leib, S. L., Kim, Y. S., Chow, L. L., Sheldon, R. A. und Tauber, M. G. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *J Clin Invest* 1996a; 98:2632-2639.
- (73) Leib, S. L., Kim, Y. S., Ferriero, D. M. und Tauber, M. G. Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis. *J Infect Dis* 1996b; 173:166-171.
- (74) Liaudet, L., Soriano, F. G. und Szabo, C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 2000; 28:N37-N52.
- (75) Loo, D. T. und Rillema, J. R. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol* 1998; 57:251-264.
- (76) Martelli, A. M., Zweyer, M., Ochs, R. L., Tazzari, P. L., Tabellini, G., Narducci, P. und Bortul, R. Nuclear apoptotic changes: an overview. *J Cell Biochem* 2001; 82:634-646.
- (77) McIntyre, P. B., Berkey, C. S., King, S. M., Schaad, U. B., Kilpi, T., Kanra, G. Y. und Perez, C. M. Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis. A meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *JAMA* 1997; 278:925-931.
- (78) Melov, S. Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:330-340.

- (79) Merchant, S. N. und Gopen, Q. A human temporal bone study of acute bacterial meningogenic labyrinthitis. *Am J Otol* 1996; 17:375-385.
- (80) Molyneux, E. M., Tembo, M., Kayira, K., Bwanaisa, L., Mweneychanya, J., Njobvu, A., Forsyth, H., Rogerson, S., Walsh, A. L. und Molyneux, M. E. The effect of HIV infection on paediatric bacterial meningitis in Blantyre, Malawi. *Arch Dis Child* 2003; 88:1112-1118.
- (81) Molyneux, E. M., Walsh, A. L., Forsyth, H., Tembo, M., Mweneychanya, J., Kayira, K., Bwanaisa, L., Njobvu, A., Rogerson, S. und Malenga, G. Dexamethasone treatment in childhood bacterial meningitis in Malawi: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360:211-218.
- (82) Nabili, V., Brodie, H. A., Neverov, N. I. und Tinling, S. P. Chronology of labyrinthitis ossificans induced by *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Laryngoscope* 1999; 109:931-935.
- (83) Nadol, J. B., Jr. Hearing loss as a sequela of meningitis. *Laryngoscope* 1978; 88:739-755.
- (84) Nadol, J. B., Jr. und Hsu, W. C. Histopathologic correlation of spiral ganglion cell count and new bone formation in the cochlea following meningogenic labyrinthitis and deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 100:712-716.
- (85) Osborne, M. P., Comis, S. D., Tarlow, M. J. und Stephen, J. The cochlear lesion in experimental bacterial meningitis of the rabbit. *Int J Exp Pathol* 1995; 76:317-330.
- (86) Oury, T. D., Thakker, K., Menache, M., Chang, L. Y., Crapo, J. D. und Day, B. J. Attenuation of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis by a Catalytic Antioxidant Metalloporphyrin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25:164-169.
- (87) Ozdamar, O., Kraus, N. und Stein, L. Auditory brainstem responses in infants recovering from bacterial meningitis. Audiologic evaluation. *Arch Otolaryngol* 1983; 109:13-18.
- (88) Pai, N., Zdanski, C. J., Gregory, C. W., Prazma, J. und Carrasco, V. Sodium nitroprusside/nitric oxide causes apoptosis in spiral ganglion cells. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 119:323-330.

- (89) Paparella, M. M. und Sugiura, S. The pathology of suppurative labyrinthitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1967; 76:554-586.
- (90) Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., Frosch, M. und Pfister, H. W. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. *Ann Neurol* 1998; 44:592-600.
- (91) Pfister, H. W. Meningitis: Klinik - Differentialdiagnose - Pathophysiologie - Therapie. W Kohlhammer GmbH 2002;
- (92) Pfister, H. W., Feiden, W. und Einhaupl, K. M. Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol* 1993; 50:575-581.
- (93) Pfister, H. W., Koedel, U. und Paul, R. Acute Meningitis. *Curr Infect Dis Rep* 1999; 1:153-159.
- (94) Pfister, H. W. und Scheld, W. M. Brain injury in bacterial meningitis: therapeutic implications. *Curr Opin Neurol* 1997; 10:254-259.
- (95) Pujol, R. und Puel, J. L. Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 884:249-254.
- (96) Rappaport, J. M., Bhatt, S. M., Kimura, R. S., Lauretano, A. M. und Levine, R. A. Electron microscopic temporal bone histopathology in experimental pneumococcal meningitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108:537-547.
- (97) Rasmussen, N., Johnsen, N. J. und Bohr, V. A. Otologic sequelae after pneumococcal meningitis: a survey of 164 consecutive cases with a follow-up of 94 survivors. *Laryngoscope* 1991; 101:876-882.
- (98) Rauch, S. D., Herrmann, B. S., Davis, L. A. und Nadol, J. B., Jr. Nucleus 22 cochlear implantation results in postmeningitic deafness. *Laryngoscope* 1997; 107:1606-1609.
- (99) Richardson, M. P., Reid, A., Tarlow, M. J. und Rudd, P. T. Hearing loss during bacterial meningitis. *Arch Dis Child* 1997; 76:134-138.

- (100) Rodriguez, A. F., Kaplan, S. L., Hawkins, E. P. und Mason, E. O. Hematogenous pneumococcal meningitis in the infant rat: description of a model. *J Infect Dis* 1991; 164:1207-1209.
- (101) Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M. und Freeman, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269:26066-26075.
- (102) Schuchat, A., Robinson, K., Wenger, J. D., Harrison, L. H., Farley, M., Reingold, A. L., Lefkowitz, L. und Perkins, B. A. Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. *N Engl J Med* 1997; 337:970-976.
- (103) Scott, G. S. und Hooper, D. C. The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. *Med Hypotheses* 2001 56:95-100.
- (104) Shi, X. und Nuttall, A. L. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress. *Brain Res* 2003; 967:1-10.
- (105) Smith, A. L. Neurologic sequelae of meningitis. *N Engl J Med* 1988; 319:1012-1014.
- (106) Spranger, M., Schwab, S., Krempien, S., Winterholler, M., Steiner, T. und Hacke, W. Excess glutamate levels in the cerebrospinal fluid predict clinical outcome of bacterial meningitis. *Arch Neurol* 1996; 53:992-996.
- (107) Stadelmann, C. und Lassmann, H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000; 301:19-31.
- (108) Stahel, P. F., Nadal, D., Pfister, H. W., Paradisis, P. M. und Barnum, S. R. Complement C3 and factor B cerebrospinal fluid concentrations in bacterial and aseptic meningitis. *Lancet* 1997; 349:1886-1887.
- (109) Szabo, C. DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:855-869.
- (110) Szabo, C., Lim, L. H., Cuzzocrea, S., Getting, S. J., Zingarelli, B., Flower, R. J., Salzman, A. L. und Perretti, M. Inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase

- attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J Exp Med* 1997; 186:1041-1049.
- (111) Szabo, C., Scott, G. S., Virag, L., Egnaczyk, G., Salzman, A. L., Shanley, T. P. und Hasko, G. Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br J Pharmacol* 1998; 125:379-387.
- (112) Takahashi, T. und Kimura, R. S. The ultrastructure of the spiral ligament in the Rhesus monkey. *Acta Otolaryngol* 1970; 69:46-60.
- (113) Takeno, S., Wake, M., Mount, R. J. und Harrison, R. V. Degeneration of spiral ganglion cells in the chinchilla after inner hair cell loss induced by carboplatin. *Audiol Neurootol* 1998; 3:281-290.
- (114) Takumida, M., Anniko, M., Popa, R. und Zhang, D. M. Lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in the guinea pig organ of Corti. *Hear Res* 2000; 140:91-98.
- (115) Tauber, M. G., Kennedy, S. L., Tureen, J. H. und Lowenstein, D. H. Experimental pneumococcal meningitis causes central nervous system pathology without inducing the 72-kd heat shock protein. *Am J Pathol* 1992; 141:53-60.
- (116) Tinling, S. P., Colton, J. und Brodie, H. A. Location and timing of initial osteoid deposition in postmeningitic labyrinthitis ossificans determined by multiple fluorescent labels. *Laryngoscope* 2004; 114:675-680.
- (117) Tuomanen, E., Liu, H., Hengstler, B., Zak, O. und Tomasz, A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis* 1985; 151:859-868.
- (118) Tuomanen, E. I., Austrian, R. und Masure, H. R. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 1995; 332:1280-1284.
- (119) Vienny, H., Despland, P. A., Lutschg, J., Deonna, T., Dutoit-Marco, M. L. und Gander, C. Early diagnosis and evolution of deafness in childhood bacterial meningitis: a study using brainstem auditory evoked potentials. *Pediatrics* 1984; 73:579-586.

- (120) Watanabe, K., Hess, A., Zumegeger, C., Stennert, E., Bloch, W., Addicks, K. und Michel, O. Changes of the compound action potential (CAP) and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea under the inflammatory condition(1). *Hear Res* 2000; 145:149-155.
- (121) Watanabe, K. und Tanaka, Y. Horseradish peroxidase permeation from the capillaries of the stria vascularis after inoculation of endotoxin into the middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106:394-398.
- (122) Wayner, D. D., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R. und Locke, S. J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924:408-419.
- (123) Weinfeld, M., Chaudhry, M. A., D'Amours, D., Pelletier, J. D., Poirier, G. G., Povirk, L. F. und Lees-Miller, S. P. Interaction of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase with radiation-induced DNA strand breaks. *Radiat Res* 1997; 148:22-28.
- (124) Wiedermann, B. L., Hawkins, E. P., Johnson, G. S., Lamberth, L. B., Mason, E. O. und Kaplan, S. L. Pathogenesis of labyrinthitis associated with *Haemophilus influenzae* type b meningitis in infant rats. *J Infect Dis* 1986; 153:27-32.
- (125) Winter, A. J., Comis, S. D., Osborne, M. P., Tarlow, M. J., Stephen, J., Andrew, P. W., Hill, J. und Mitchell, T. J. A role for pneumolysin but not neuraminidase in the hearing loss and cochlear damage induced by experimental pneumococcal meningitis in guinea pigs. *Infect Immun* 1997; 65:4411-4418.
- (126) Winter, A. J., Marwick, S., Osborne, M., Comis, S., Stephen, J. und Tarlow, M. Ultrastructural damage to the organ of corti during acute experimental *Escherichia coli* and pneumococcal meningitis in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1996; 116:401-407.
- (127) Wolman, M., Klatzo, I., Chui, E., Wilmes, F., Nishimoto, K., Fujiwara, K. und Spatz, M. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berl)* 1981; 54:55-61.

- (128) Wu, R. und Hoshino, T. Changes in off-lesion endocochlear potential following localized lesion in the lateral wall. *Acta Otolaryngol* 1999; 119:550-554.
- (129) Zenner, H. P. Die Kommunikation des Menschen: Hören und Sprechen. 1997; 26:259-277.
- (130) Zhu, L., Gunn, C. und Beckman, J. S. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:452-457.

9. Vorveröffentlichungen

Inhalte dieser Arbeit wurden bereits in den folgenden Originalarbeiten und Postern aus Gründen der Aktualität veröffentlicht:

Originalarbeiten:

- S Kastenbauer, M Klein, U Koedel, HW Pfister. Reactive nitrogen species contribute to blood-labyrinth barrier disruption in suppurative labyrinthitis complicating experimental pneumococcal meningitis in the rat. *Brain Res.* 2001; 904(2):208-17.
- M Klein, U Koedel, HW Pfister, S Kastenbauer. Morphological correlates of acute and permanent hearing loss during experimental pneumococcal meningitis. *Brain Pathol.* 2003; 13:1-10.
- M Klein, U Koedel, HW Pfister, S Kastenbauer. Meningitis-Associated Hearing Loss: Protection by Adjunctive Antioxidant Therapy. *Ann Neurol.* 2003; 54:451-458.

Poster:

- S Kastenbauer, M Klein, U Koedel, HW Pfister: Nachweis von oxidativem Schaden, iNOS Hochregulierung und Störung der Gefäßintegrität in der Cochlea bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis. 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), 27.9.-1.10.2000, Aktuelle Neurologie, Supplement 2, Band 27, September 2000, S76
- S Kastenbauer, M Klein, U Koedel, HW Pfister: Pneumokokkenmeningitis im Rattenmodell: pathophysiologische Bedeutung der Blut-Labyrinth-Schrankenstörung für den Hörschaden. 19. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Neurologische Intensiv- und Notfallmedizin (ANIM) in der DGN, 24.-26. Januar 2002, P155
- M Klein, U Koedel, HW Pfister, S Kastenbauer: Experimental pneumococcal meningitis in the rat: the role of blood-labyrinth barrier disruption in meningitis associated hearing loss. *Journal of Neurology* 2002, Supplement

10. Danksagung

Herzlichen Dank insbesondere meinem Betreuer, *Herrn Dr. Stefan Kastenbauer*, der mich exzellent an die experimentelle Arbeit im Labor herangeführt hat. Nach anfänglich intensivster Betreuung auch kleiner Arbeitsschritte, zeigte er mir den Weg zum selbständigen Arbeiten, wobei er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister*, auf dessen große Unterstützung ich immer zurückgreifen konnte. Im Labor war vor allem *Herr PD Dr. Uwe Koedel* jederzeit bereit, durch seine langjährige Erfahrung und sein großes Wissen Tipps zu vermitteln und gegebenenfalls vor allem im tierexperimentellen Bereich „rettend“ einzugreifen. Weiterer Dank gilt *Frau Barbara Angele*, die mir besonders bei histochemischen Färbungen wertvolle Ratschläge geben konnte. Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitgliedern der *neuroinfektiologischen Arbeitsgruppe* von Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister für die freundliche Aufnahme und die durchwegs gute Stimmung bedanken, die die vielen Stunden im Labor wie im Fluge vergehen ließen. Außerhalb des Labors war die gute Kooperation mit dem mikrobiologischen Labor von *Frau Dr. Grabein* (jetzt *Herr PD Dr. Roggenkamp*) für den Erfolg überaus wichtig: Zuverlässig wurden Pneumokokken gezüchtet und zur Verfügung gestellt. Herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeitern von *Herrn Prof. Dr. Müller-Höcker* (Pathologisches Institut), die bei der Paraffineinbettung der Innenohren halfen und dadurch für die gute Qualität der Histologie mitverantwortlich waren. Für die finanzielle Unterstützung während eines Großteils meiner Arbeit gilt ein herzlicher Dank *Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann* (Max von Pettenkofer Institut), der mir durch die Förderung im Graduiertenkolleg „Infektion und Immunität“ half, meine volle Aufmerksamkeit auf die Arbeit im Labor zu konzentrieren. Herzlichen Dank natürlich insbesondere und vor allem *meinen Eltern*, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums und meiner Dissertation durchgehend unterstützten.

11. Curriculum vitae

Geburtsdaten: 27.10.1976 in München

Eltern: Dipl. - biol. Annemarie Klein und Dr. med. Wolfgang Klein; Arzt für Psychiatrie, Neurologie und Neuroradiologie im Bezirksklinikum Gabersee, Wasserburg a. Inn

Geschwister: Margret Klein, geb. 30.4.1979

Schulbildung:

- 1994 American High School Diploma an der TC Williams High School in Alexandria, VA, USA
- 1996 Abitur am Luitpold Gymnasium Wasserburg

Wehrersatzdienst:

- 1996/97 Zivildienst im Krankenhaus Vogtareuth, Neuropädiatrie

Medizinstudium:

- Herbst 1997: Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig - Maximilians Universität München
- 1999 Physikum
- 2000 1. Staatsexamen
- 2003 2. Staatsexamen
- Frühling 2004 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

- 2003 Innere Medizin am Beth Israel Deaconess Hospital und Mount Auburn Hospital, Harvard University, Boston, USA
- 2003 Chirurgie am Kantonsspital Lachen, Lachen, Schweiz
- 2003/04 Neurologie an der Neurologischen Klinik und Poliklinik Großhadern, LMU München

Stipendien:

- 2000/01 Graduiertenkolleg "Infektion und Immunität", Max von Pettenkofer Institut, LMU München
- 2003 Stipendium der „LMU-HMI Alliance for Medical Education“ über ein PJ Tertial in Innere Medizin an der Harvard University, Boston, USA