

Aus der
Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde mit Poliklinik Tübingen

**Einfluss von Stress auf die Hörfunktion in Abhängigkeit
der Steroidrezeptor-Subtypen nach einer akustischen
Überstimulation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kasini, Kamyar

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Knipper

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 19.02.2019

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Physiologische Funktion von Stress im gesunden Organismus	3
1.2 Aufbau der HPA-Achse	4
1.3 Glukokortikoide und ihre Signalkaskade	7
1.4 ZNS-Aktivität der Kortikosteroidrezeptoren	9
1.5 Stress und das auditorische System	11
1.6 Zentrale Fragestellung der Arbeit	12
2 Methoden	14
2.1 Versuchstiere	14
2.2 Experimentaldesign und injizierte Substanzen	14
2.3 Anästhesie	18
2.4 Akustische Überstimulation und Scheinexposition	19
2.5 Hirnstammaudiometrische Messungen	20
2.6 Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen	25
2.7 Präparation der Versuchstiere und der Cochlea	26
2.8 Immunhistochemische Untersuchung	27
2.9 Statistische Tests	30

3 Ergebnisse	31
3.1 Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress auf die Hörfunktion in Abhängigkeit von der Aktivität der Kortikosteroidrezeptor-Subtypen	31
3.1.1 Kortikosteron-Behandlung ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung	32
3.1.2 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Hemmung der endogenen Kortikosteron-Produktion	37
3.1.3 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten	42
3.1.4 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten	47
3.2 Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen	53
3.2.1 Kortikosteron-Behandlung ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung	55
3.2.2 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Hemmung der endogenen Kortikosteron-Produktion	57
3.2.3 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten	60
3.2.4 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten	62
3.3 Quantifizierung der Stress-Level durch Messung von Kortikosteron-Urinkonzentrationen	66
3.4 Zusammenfassendes Ergebnis	68
4 Diskussion	70
4.1 Kortikosteron-Behandlung ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung	71
4.1.1 Einfluss auf die hirstammaudiometrisch gemessene Hörfunktion	71

4.1.2 Einfluss auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen	74
4.2 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten	76
4.2.1 Einfluss auf die hirnstammaudiometrisch gemessene Hörfunktion	76
4.2.2 Einfluss auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen	79
4.3 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten	80
4.3.1 Einfluss auf die hirnstammaudiometrisch gemessene Hörfunktion	80
4.3.2 Einfluss auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen	83
4.4 Fazit und Ausblick	85
5 Zusammenfassung	88
6 Literaturverzeichnis	90
7 Erklärung zum Eigenanteil	100

1 Einleitung

Übermäßige Schallbelastung ist ein globaler Umwelteinfluss, der zu schallinduziertem Hörverlust führen und so die Lebensqualität der Betroffenen erheblich beeinträchtigen kann. Eine solche Schwerhörigkeit führt oft in Folge eines Mobilitätsverlustes und einer gestörten Kommunikationsfähigkeit zu erheblicher sozialer Isolation, Depression und vielen weiteren Sekundärerkrankungen (Nelson, Nelson et al. 2005, Mathers, Fat et al. 2008, Mosges, Koberlein et al. 2008). Tinnitus tritt häufig zusammen mit einem Hörverlust auf und stellt für Betroffene eine zusätzliche schwere Belastung dar (Eggermont und Roberts 2004). Schwerhörigkeit ist heute eine der weltweit häufigsten Ursachen von Behinderung, etwa 16% aller erwachsenen Europäer sind nach der „World Health Organization (WHO)“-Definition betroffen (Mathers, Fat et al. 2008). Allein in Deutschland betragen im Jahr 2006 die vor allem durch verminderte Arbeitsproduktivität und medizinische Versorgung entstandenen sozioökonomischen Kosten der Schwerhörigkeit jährlich etwa 30 Milliarden Euro (Shield 2006). Schätzungen zu Folge wird die Anzahl der Menschen mit einem Hörschaden bis zum Jahr 2050 auf etwa 900 Millionen ansteigen (Vio und Holme 2005).

Der chronische („sensorische“) Hörverlust geht hauptsächlich mit einer Schädigung der sogenannten Haarzellen im Sinnesepithel des Innenohres, dem Corti-Organ, einher (Nadol 1993). Schon früh wurde erkannt, dass die Haarsinneszellen der Säuger während des ersten Trimesters der Embryonalentwicklung angelegt, während des gesamten Lebens erhalten und nach einer Schädigung beziehungsweise ihrer Degeneration nicht regeneriert werden können (Ruben 1967). Hierbei ist die Gesamtanzahl der inneren und äußeren Haarzellen im Corti-Organ mit nur etwa 12000 Zellen ziemlich gering (Pujol 1989). So besteht bei der Schädigung von Haarzellen kaum eine Redundanz und der Verlust weniger Haarzellen kann bereits zu einem Hörverlust bei bestimmten Frequenzen führen (Ehret und Frankenreiter 1977, Raphael 2002). In Anbetracht dieser Tatsache und der mit dem demographischen Wandel einhergehenden Erhöhung der

Lebenserwartung des Menschen, steigt auch die erforderliche Lebenszeit dieser Haarsinneszellen (Roberts, Eggermont et al. 2010).

Die regenerative Medizin bietet bisher die einzige biologisch kausale Möglichkeit der Therapie einer chronischen (sensorischen) Schwerhörigkeit mit Haarzellverlust (Löwenheim, Waldhaus et al. 2008), wird jedoch weder kurz- noch mittelfristig als umsetzbare Behandlung für den einzelnen Betroffenen zur Verfügung stehen können (Knipper 2007). Umso wichtiger erscheint aus klinischer Sicht die Protektion der vulnerablen Haarsinneszellen des Corti-Organ. So kommt insbesondere der Prävention eines Hörverlustes eine wesentliche Bedeutung zu. Die einfachste und womöglich auch effektivste Form der Protektion ist die Vermeidung von zu starker Schallexposition. Da diese Form der Protektion oft nicht konsequent eingehalten werden kann, ist die Erforschung von Therapien, die eine dauerhafte Schädigung der Haarsinneszellen nach einer traumatischen Schallexposition im Rahmen einer schadensbegrenzenden Therapie oder Prävention verhindern, von großer klinischer Relevanz.

In vielen Bereichen der Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Heilkunde wurden in den letzten Jahren zunehmend häufiger synthetische Glukokortikoide eingesetzt. So wird in den S1-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde beispielsweise zur Behandlung eines Hörsturzes eine dreitägige Steroid-Hochdosistherapie empfohlen (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S1-Leitlinie: Hörsturz. Stand: 01/2014). Während die Verwendung von Glukokortikoiden gegen entzündliche Prozesse in vielen anderen Disziplinen der Medizin wie beispielsweise in der Pulmologie seit Jahrzehnten hoch evidenzbasiert erfolgt (O'Byrne und Pedersen 1998), ist die heute fast schon ubiquitäre Anwendung von Glukokortikoiden in der HNO-Heilkunde oft nur empirisch belegt (Conlin und Parnes 2007, Cope und Bova 2008, Wei, Stathopoulos et al. 2013). Der Stellenwert der systemischen Glukokortikoidtherapie in der Behandlung von Erkrankungen des auditorischen Systems wird nach dem aktuellem Stand als noch unklar eingeschätzt, wie zuletzt eine Metaanalyse der Cochrane-Collaboration

bestätigen konnte (Wei, Mubiru et al. 2006, Conlin und Parnes 2007, Piccirillo 2011, Wei, Stathopoulos et al. 2013).

Gerade aus diesen Gründen ist ein besseres Verständnis bezüglich der Wirkung von Glukokortikoiden in Abhängigkeit ihrer verschiedenen Steroidrezeptor-Subtypen des Organismus auf Basis des auditorischen Systems beziehungsweise der Haarsinneszellen von besonderer Wichtigkeit.

1.1 Physiologische Funktion von Stress im gesunden Organismus

Schon im Jahr 1915 beschäftigte sich der Physiologe Walter B. Cannon mit der sogenannten „Stressreaktion“ und prägte in seinen Werken als Erstbeschreiber den Begriff „fight-or-flight-response“. Er beobachtete hierbei interindividuell verschieden auftretende, doch in Grundzügen ähnliche körperliche und emotionale Reaktionen von Versuchstieren auf Schmerz, Hunger, Angst und Rage (Cannon 1920, Cannon 1929). Nur wenig später entwickelte Cannon das „Konzept der Homöostase“ als das Aufrechterhalten beziehungsweise Wiederherstellen der Werte diverser physiologischer Parameter in für den jeweiligen Organismus akzeptablen Grenzen. Eine Bedrohung dieser Homöostase könne seiner Theorie nach über physiologische Sensoren wahrgenommen und anschließend über eine körperliche und emotionale Reaktion abgewehrt werden. Demnach sei „Stress“ ein Reiz, der das innere Gleichgewicht des Organismus verletze und zu einer bestimmten biologischen Reaktion führe (Cannon 1932). 1936 beschrieb Hans Selye eine generalisierte Reaktion des Körpers auf verschiedenste Schädigungen des Organismus. Er beobachtete in Tierversuchen wiederkehrende stereotype physiologische Veränderungen als Reaktion auf vollkommen unterschiedliche aversive Reize (Selye 1936).

Heutige Definitionen von Stress gehen hauptsächlich auf diese Konzepte zurück. Sowohl endo- als auch exogene aversive Faktoren, die eine Bedrohung der Homöostase darstellen, werden „Stressoren“ genannt. Sie können physischer

Natur sein, wie zum Beispiel hohe körperliche Anstrengung, Verletzungen oder auch Lärm, aber auch psychogener Art wie beispielsweise eine fordernde Situation (Chrousos 2009).

1.2 Aufbau der HPA-Achse

Nach aktuellem Wissensstand sind die zwei bedeutenden Stresssysteme des Körpers die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (englisch hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA-Achse) und das Sympatho-Adrenomedulläre System (SAM-System). Von diesen beiden Systemen ist die HPA-Achse durch den Ablauf einer komplexen neuroendokrinen Kaskade mit dem Ziel der Glukokortikoid-Synthese wesentlich langsamer in ihrer Wirkung, doch auch zugleich persistenter (De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998). Die vorliegende Arbeit untersucht vor allem den Einfluss von Glukokortikoiden auf das auditorische System, sodass an dieser Stelle die HPA-Achse im Vordergrund stehen wird.

Wesentlicher Bestandteil der physiologischen Stressantwort sind spezifische Neurone im Kerngebiet des Nucleus paraventricularis (PVN) im Hypothalamus. In ihnen werden hauptsächlich die Peptidhormone Oxytocin, Vasopressin und das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) synthetisiert. Oxytocin und Vasopressin werden über axonalen Transport in den Hypophysenhinterlappen (auch Neurohypophyse genannt) transportiert, wo sie bei Bedarf in die Blutbahn abgegeben werden können. Das CRH wird in der Eminentia mediana in den hypophysären Pfortaderkreislauf abgegeben und gelangt über die Blutbahn zum Hypophysenvorderlappen, auch Adenohypophyse genannt. Im Hypophysenvorderlappen stimulieren CRH und Vasopressin die Produktion und Sekretion von Proopiomelanokortin (POMC), das zu dem Adrenokortikotropen Hormon (ACTH), körpereigenen Opioidpeptiden und Melanotropinen prozessiert wird. ACTH gelangt anschließend über den Blutkreislauf zur Nebenniere, wo es in der Nebennierenrinde über spezifische Rezeptoren die Synthese und Freisetzung

von Glukokortikoiden in die Blutbahn anregt. Bei Menschen und Affen wird dabei Kortisol und bei Nagern Kortikosteron (KORT) produziert ¹.

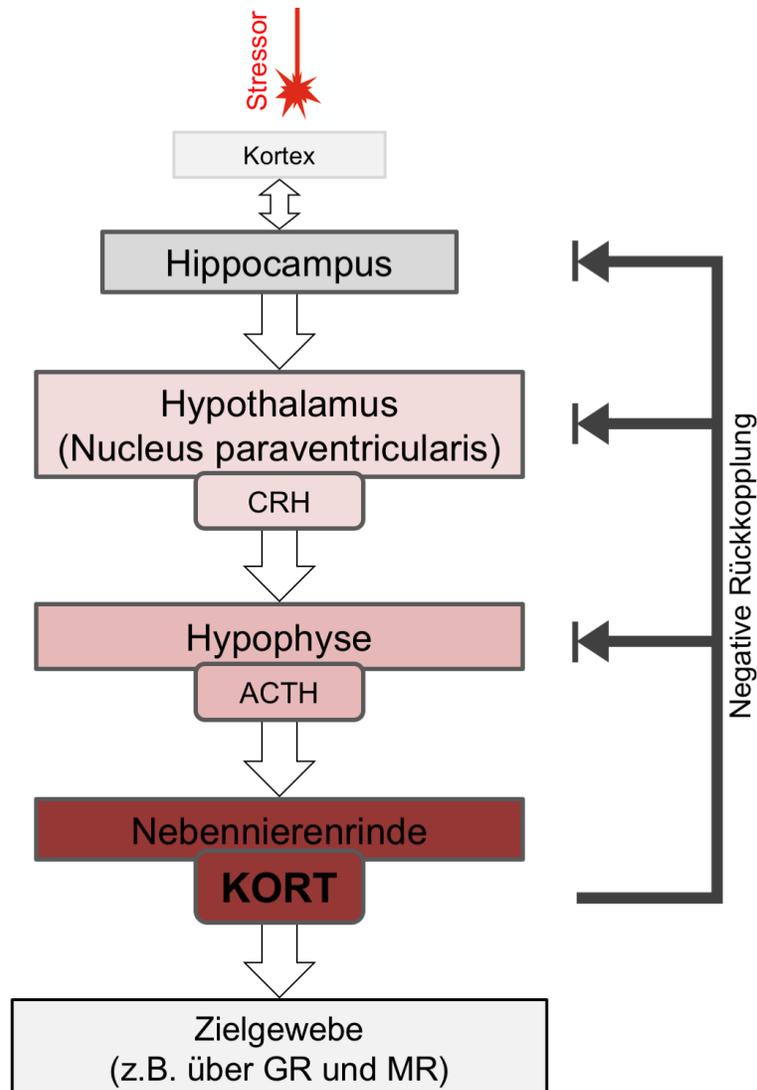


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse). Im Rahmen der physiologischen Stressantwort wird aus spezifischen Neuronen des Nucleus paraventricularis (PVN) im Hypothalamus das Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) freigesetzt. Im Hypophysenvorderlappen stimuliert das CRH die Produktion und Sekretion des Adrenokortikotropen Hormons (ACTH). ACTH gelangt anschließend über den Blutkreislauf zur Nebenniere, wo es in der Nebennierenrinde die Synthese und Freisetzung von Glukokortikoiden anregt. Über die Blutbahn gelangen diese an ihr Zielgewebe, zum Beispiel über Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren (GR und MR). Bei Menschen und Affen wird dabei Kortisol und bei Nagern Kortikosteron (KORT) produziert.

¹ Da die Daten für diese Arbeit in Tierversuchen mit Ratten erhoben wurden, wird im Folgenden zur Vereinfachung nur Kortikosteron genannt. Es ist anzunehmen, dass selbiger Kontext jeweils auch für Kortisol gilt.

In Nagern steigt bereits wenige Minuten nach Einwirken des Stressors die KORT-Konzentration im Blut an, erreicht nach etwa 15-30 Minuten ihr Maximum und sinkt 60-90 Minuten nach Abklingen des Stressors auf ihren basalen Wert ab (Zarrow, Haltmeyer et al. 1966, Chintamaneni, Bruder et al. 2014). Die Aktivierung der PVN-Neurone erfolgt dabei über diverse afferente Bahnen. Hierzu zählt man das limbische System, das wiederum selbst durch psychogene Stressreize aktiviert werden kann, aber auch aufsteigende Hirnstammbahnen, die periphere viszerale und sensorische Stimuli vermitteln (de Kloet, Joels et al. 2005). Beendet wird eine Stressantwort durch die Wirkung der Glukokortikoide selbst im Sinne einer negativen Rückkopplung: hohe Konzentrationen von KORT im Blut nach einer Aktivierung der HPA-Achse bewirken im Hypophysenvorderlappen, im Hypothalamus, im Hippocampus und im präfrontalen Kortex eine Suppression der HPA-Achse (Abbildung 1). Dieser reaktive Mechanismus erfolgt synergistisch mit dem Einfluss von ACTH, das auf die verschiedenen Ebenen der HPA-Achse ebenfalls supprimierend wirken kann (De Kloet und Reul 1987, Jacobson und Sapolsky 1991).

Neben der exogenen Aktivierung weißt die HPA-Achse einen eigenen zirkadianen Rhythmus mit charakteristischem Tagesprofil auf. Innerhalb eines Tages treten mehrere zirkadiane KORT-Sekretionsschübe auf. Ein solcher Sekretionsschub dauert etwa 20 Minuten, die Phasen dazwischen etwa 60-120 Minuten (Young, Abelson et al. 2004, de Kloet, Joels et al. 2005). In der Nacht werden im Blut die niedrigsten KORT-Konzentrationen gemessen. Zum Morgen hin steigen diese jedoch langsam an und erreichen ihr Maximum zum Zeitpunkt des Aufwachens. Über den Tag sinkt die KORT-Konzentration wieder kontinuierlich ab und erreicht in der Nacht erneut ihr Minimum (Fries, Dettenborn et al. 2009).

1.3 Glukokortikoide und ihre Signalkaskade

Philip Hench, Edward Kendall und Tadeus Richtenstein erhielten im Jahr 1950 den Nobelpreis für Medizin oder Physiologie für ihre Entdeckung der Hormone der Nebennierenrinde, ihrer Struktur und ihrer biologischen Wirkungen.

Kortikosteroide wirken auf eine beeindruckende Anzahl physiologischer Funktionen und haben so einen erheblichen Einfluss auf nahezu alle Organe und Parameter des Körpers. Der Großteil der Effekte dient der Protektion des Körpers gegen Stress, hier am ehesten im Sinne einer Anpassung an äußere Gegebenheiten und einer Wiederherstellung des zuvor bestehenden Gleichgewichtes. Dies erfolgt beispielsweise durch die Beeinflussung des Glukosemetabolismus, des Blutdrucks und der neuronalen Funktionen. Einfluss und Sensitivität auf die jeweiligen Organsysteme hängen dabei wesentlich von der Verfügbarkeit ihrer Stressrezeptoren und Liganden ab.

Glukokortikoide sind kleine lipophile Verbindungen, die in der Nebennierenrinde aus Cholesterol als Ausgangssubstanz synthetisiert werden und damit zur Gruppe der Steroidhormone gehören (Aron, Findling et al. 2004). Aufgrund ihrer hydrophoben Struktur werden sie im Blut an das Corticosteroid-binding Globulin (CBG) gebunden und zu ihren jeweiligen Zielorten transportiert. Das CGB ist dabei nicht nur für den Transport von KORT zuständig, sondern reguliert ebenfalls die Diffusion durch die Zellmembran und somit die zytoplasmatische Verfügbarkeit der Hormone (McEwen, Biron et al. 1997, Henley und Lightman 2011). Über den Blutkreislauf erreichen die Glukokortikoide jedes Organsystem des Körpers. Dies ermöglicht ihnen die Koordination von allen Hirn- und Körperfunktionen, die im Zuge der Stressreaktion, -erholung und -adaptation benötigt werden.

Glukokortikoide modulieren hauptsächlich auf genomischer Ebene die Transkriptionsaktivität von Genen (Chrousos und Kino 2005) über die Aktivierung ihrer Rezeptoren, den Glukokortikoid (GR)- und Mineralokortikoidrezeptoren (MR). Dies ist ein Prozess, der mehrere Stunden benötigt und von dauerhafter Natur sein

kann (Joëls, Pasricha et al. 2013). Sowohl GR als auch MR gehören zur Gruppe der nukleären Rezeptoren, die als hormonabhängige Transkriptionsfaktoren agieren können (Kino und Chrousos 2004). Im Zytoplasma liegen die Kortikosteroidrezeptoren zunächst durch Anlagerung verschiedener Hitzeschockproteine (zum Beispiel hsp90 und hsp70) in inaktiver Form vor (Smith und Toft 1993). Erst durch die anschließende Rezeptor-Liganden-Bindung im Zellinneren lösen sie sich von den inaktivierend wirkenden Proteinen, dimerisieren und werden dann in den Zellkern transportiert. Im Zellkern bindet der Rezeptor-Liganden-Komplex an ein sogenanntes Glucocorticoid Response Element (GRE) und greift so in die Regulation der Genexpression ein (Abbildung 2). Auf diese Weise können Glukokortikoide die Transkription eines Gens fördern oder hemmen (Beato, Herrlich et al. 1995, De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998).

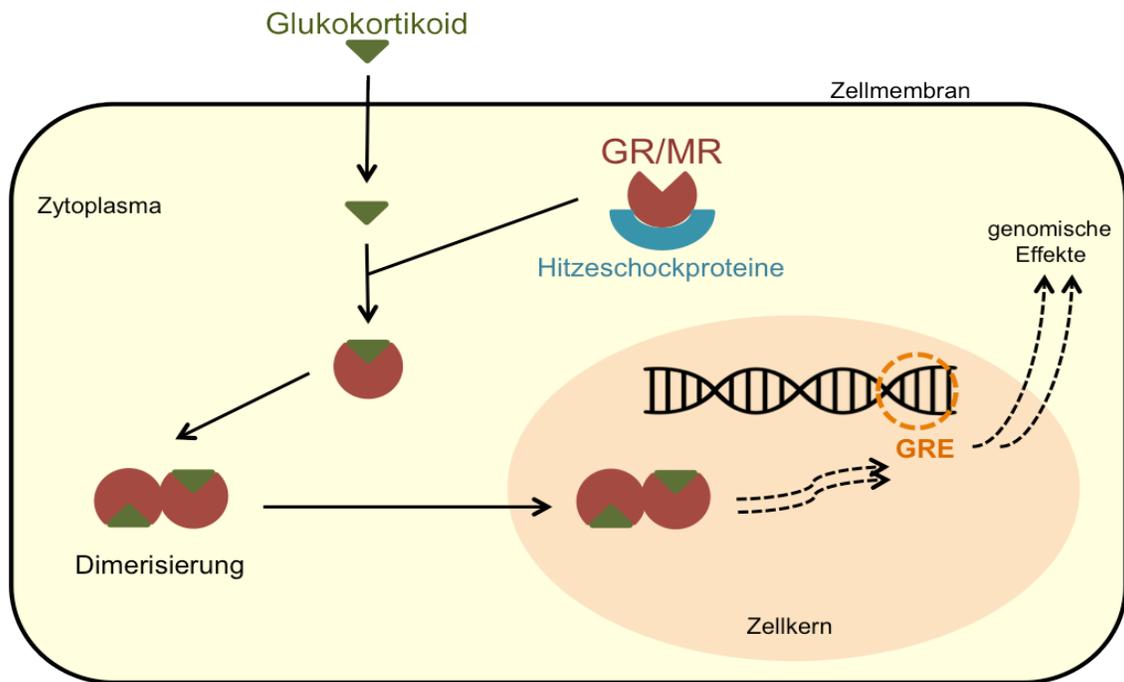


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Kortikosteroid-Signalkaskade. Im Zytoplasma liegen die Kortikosteroidrezeptoren (Gluko- und Mineralokortikoidrezeptoren, GR und MR) durch Anlagerung von Hitzeschockproteinen (HSp) in inaktiver Form vor. Die Bindung von Glukokortikoiden an die GR/MR führt zur Ablösung der HSp, zur Dimerisierung und zum Transport in den Zellkern. Im Zellkern bindet der dimerisierte Rezeptor-Liganden-Komplex an ein sogenanntes Glucocorticoid Response Element (GRE) und greift über diesen Mechanismus in die Regulation der Genexpression ein. Glukokortikoide können somit die Transkription eines Gens fördern beziehungsweise hemmen.

Zusätzlich wird zunehmend häufiger beobachtet, dass Kortikosteroide auch schnelle und kurzfristig Effekte auf neuronale Zellfunktionen im Sinne nicht-genomischer Prozesse ausüben können (Tasker, Di et al. 2006, Joels und Baram 2009). So kann KORT innerhalb weniger Minuten an seinen Rezeptor binden und die Aktivität spannungs- und ligandenabhängiger Ionenkanäle modulieren. Auf diese Weise haben Glukokortikoide beispielsweise Einfluss auf das postsynaptische Membranpotenzial zentraler Neurone (Joels und Baram 2009, Joëls, Pasricha et al. 2013). Weitere Arbeiten diskutieren ähnliche schnelle Effekte von Glukokortikoiden auf die synaptische Signalübertragung an hippocampalen Neuronen, wie zum Beispiel durch Aktivierung membranständiger Rezeptoren und Förderung der präsynaptischen Glutamatausschüttung (Karst, Berger et al. 2005). Über einen solchen Mechanismus könnten Glukokortikoide akute Effekte auf neuronale Kurz- und Langzeitplastizität einschließlich der Gedächtnis- und Lernprozesse besitzen (Liston, Cichon et al. 2013).

1.4 ZNS-Aktivität der Kortikosteroidrezeptoren

Im zentralen Nervensystem (ZNS) sind die zwei hauptsächliche Rezeptorsubtypen für KORT die Glukokortikoid (GR)- und Mineralokortikoidrezeptoren (MR). Dabei sind autoradiografischen und immunhistochemischen Analysen zufolge GR im gesamten Gehirn ubiquitär in Neuronen und Gliazellen mit besonders hoher Dichte im Hippocampus und der Hypophyse zu finden, während MR überwiegend in Strukturen des limbischen Systems, wie zum Beispiel im Hippocampus und der Amygdala, beobachtet wurden (Reul und de Kloet 1986, Cintra, Zoli et al. 1994). Eine Ausnahme bildet die CA3-Region des Hippocampus, in der sich nur MR und keine GR befinden (De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998).

MR und GR sind aus biochemischer Sicht zwar eng verwandte Rezeptorsubtypen, unterscheiden sich jedoch in vielen Eigenschaften erheblich voneinander. Zum einen besitzen MR eine 10-fach höhere Affinität zu KORT im Vergleich

zu GR (Reul und de Kloet 1985, Arriza, Simerly et al. 1988). Gleichzeitig sind MR in allen peripheren Organen (zum Beispiel in Nieren oder Schweißdrüsen) hochspezifisch für Aldosteron, ein Mineralokortikoid, und so nahezu nicht verfügbar für Glukokortikoide. Dies ist vor allem auf die Oxidase 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (11 β -HSD) zurückzuführen, welche Glukokortikoide noch vor der Bindung an den für sie hochaffinen MR in eine inaktive Form überführt. Eine wichtige Funktion dieses Enzymes ist demnach die Kontrolle über die Verfügbarkeit von Glukokortikoiden an den niederaffinen GR durch ein Verhindern der Bindung an den hochaffinen MR. Im Gehirn ist das Vorkommen von 11 β -HSD auf hypothalamische Regionen begrenzt, die für die Steuerung des Salz- und Volumenhaushaltes nötig sind (Gomez-Sanchez 1997, Ma, Itharat et al. 1997). Damit ist die Spezifität der MR für Mineralokortikoide in allen anderen Hirnregionen aufgehoben und Glukokortikoide können aufgrund der 10-fach höheren Affinität verstärkt an die MR binden. Die mit Abstand höchste Expression von MR im Gehirn findet man - abgesehen vom Hypothalamus - im Hippocampus. Durch den Verlust der Aldosteronspezifität und der extrem hohen Affinität zu Glukokortikoiden werden im ZNS bei einem Anstieg der KORT-Konzentration im Blut somit vor allem die MR im Hippocampus aktiviert (Veldhuis, Van Koppen et al. 1982).

Die Affinität der MR zu KORT ist hoch genug, um in zentralen Strukturen eine konstante Rezeptoraktivität zu ermöglichen - trotz der niedrigen KORT-Konzentration in den Intervallen (Dauer: eine Stunde) zwischen den einzelnen KORT-Sekretionsschüben (Dauer: 20 Minuten). Im Gegensatz dazu werden die niederaffinen GR im Basalzustand nur während den KORT-Spitzen im zirkadianen Rhythmus aktiviert (Kitchener, Di Blasi et al. 2004, Young, Abelson et al. 2004). Vereinfacht ausgedrückt: eine niedrige basale KORT-Konzentration im Blut besetzt zentral vorwiegend MR. GR werden nur dann zusätzlich dazu aktiviert, wenn die KORT-Konzentration stark ansteigt. Beispielsweise durch einen zirkadianen Glukokortikoid-Sekretionsschub oder durch die getriggerte Aktivierung der HPA-Achse bei Stress (De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998). Quantitativ, im Rattentiermodell

beschrieben, bedeutet das: MR sind in den Intervallen zwischen den zirkadianen KORT-Minima zu ca. 90% besetzt, GR höchstens zu 10%. Im Intervall eines KORT-Maximums und gleichzeitigem psychosozial induziertem Stress (zum Beispiel durch Immobilisation) sind MR nahezu vollständig besetzt, wohingegen nur 67-75% der GR aktiviert werden (Reul und de Kloet 1985).

In diesem Rahmen wurde nachgewiesen, dass die Aufrechterhaltung der basalen Aktivität der HPA-Achse als Stress-System des Körpers über die konstante Aktivierung der MR im Hippocampus im Sinne eines positiven Feedbacks vermittelt wird, während eine zusätzliche Aktivierung der GR bei höheren KORT-Spiegeln (zum Beispiel nach Aktivierung der HPA-Achse bei akutem Stress) mit einer Suppression der HPA-Achse einhergeht und so für den negativen Feedback-Mechanismus und für die Wiederherstellung des basalen Zustandes („Wiederherstellung der Homöoaste“) verantwortlich ist (De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998).

1.5 Stress und das auditorische System

Verschiedenste Beobachtungen der letzten Jahre sprechen für einen möglichen Einfluss von Stress auf das auditorische System. So wurde beispielsweise erst kürzlich bei Patienten mit einer chronischen Stresserkrankung ein negativer Einfluss auf die Hörschärfe beobachtet (Felmingham, Rennie et al. 2012). In weiteren Tierexperimenten wurde gezeigt, dass chronischer Stress mit der Atrophie von Dendriten im Colliculus inferioris (IC) und dem Corpus geniculatum mediale (MGB) einhergeht (Dagnino-Subiabre, Munoz-Llancao et al. 2009). Außerdem konnte nach chronischer Stressbelastung eine Abnahme der GABAergen synaptischen Effizienz im primären auditorischen Kortex A1 gezeigt werden, womit eine essentielle Region für die Höraufmerksamkeit betroffen ist (Perez, Perez-Valenzuela et al. 2013). Neben den negativen Einflüssen von Stress auf das auditorische System wurden auch positive Effekte beschrieben. Beispielsweise kann eine Geräuschanreicherung

über die Projektionsbahnen des MGB oder über eine mit Reizen angereicherte Umgebung die Frequenzdiskrimination und Antwortlatenz im auditorischen Kortex (Weinberger 2003) als auch die Sensitivität gegenüber sehr leisen Tönen verbessern (Engineer, Percaccio et al. 2004, Centanni, Engineer et al. 2013). Geräuschanreicherung nach einem akustisch traumatischen Ereignis kann sogar protektiv auf die kortikale Reorganisation der Frequenzkarte im auditorischen Kortex wirken und verringert so den Hörverlust (Norena und Eggermont 2005).

Singer et al. konnten im Jahr 2013 zeigen, dass unterschiedliche KORT-Konzentrationen in Ratten, induziert durch ein psychosoziales Stressmodell, erhebliche Auswirkungen auf die Integrität der Haarzellsynapse (der ersten afferenten Synapse der Hörbahn), auf die Amplituden der hirstammaudiometrischen Messungen und auf die Expression aktivitäts-regulierter Zytoskelett-Proteine (wie zum Beispiel das activity regulated cytoskeletal-associated protein, Arc) besitzen (Singer, Zuccotti et al. 2013). Da die Expression von GR und MR in ausgereiften Haarsinneszellen und Spiralganglion-Neuronen des Innenohres erst kürzlich bestätigt wurde (Yao und Rarey 1996, Terakado, Kumagami et al. 2011), sollten direkte Effekte von KORT in Abhängigkeit dieser Rezeptorsubtypen auf die Vulnerabilität der ersten afferenten Synapse der Hörbahn in Betracht gezogen und untersucht werden.

1.6 Zentrale Fragestellung der Arbeit

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Untersuchung des differentiellen Einflusses von Stress auf das auditorische System und seine Abhängigkeit von unterschiedlichen Stressrezeptor-Aktivierungsmustern.

Auf experimenteller Ebene waren folgende Fragestellungen für die durchgeführten Versuche und für den Versuchsaufbau entscheidend:

- I. Hat pharmakologisch induzierter Stress durch Kortikosteron-Behandlung einen Einfluss auf die **unmittelbare Hörfunktion** nach einer Schallexposition und damit auf die **Schallvulnerabilität** der Versuchstiere?
↘ Ist dieser Einfluss von der Aktivität verschiedener Kortikosteroidrezeptor-Subtypen (Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptor, MR und GR) abhängig?

- II. Hat pharmakologisch induzierter Stress durch Kortikosteron-Behandlung einen Einfluss auf die **Remissionsfähigkeit** der Hörfunktion nach einer Schallexposition sowie auf die **Integrität** afferenter synaptischer Strukturen der Inneren Haarsinneszellen?
↘ Ist dieser Einfluss von der Aktivität verschiedener Kortikosteroidrezeptor-Subtypen (MR und GR) abhängig?

- III. Sollte die ubiquitäre Anwendung von Kortikosteroiden in der klinischen Audiologie aufgrund der auch in der vorliegenden Arbeit beobachteten, komplexen Kortikoid-vermittelten Effekte auf die Hörfunktion reevaluiert werden?

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Eine Gesamtzahl von 29 weiblichen Wistar Ratten wurde in dieser Arbeit verwendet. Die Versuchstiere wurden von Charles River Laboratories bezogen (Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld) und waren zu Beginn der Experimente durchschnittlich 8.5 Wochen alt. Die Wistar Ratten wurden gemäß der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und Rates und der Tierschutzkommission in Tübingen (Regierungspräsidium des Landes Baden-Württemberg) sowie unter Kontrolle des tierärztlichen Dienstes der Universität Tübingen in einem 12-stündlich wechselnden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Während der Haltungsphase sowie den Versuchspausen erhielten die Ratten Wasser und Futter ad libitum. Die Habituationsphase zwischen Eintreffen der Ratten in der Tierhaltung des Universitätsklinikums und Beginn der Versuche betrug zwei Wochen. Zu den Versuchstagen wurden die Ratten am Morgen aus ihren Haltungskäfigen in Transportkäfige umgesetzt und in die Versuchsräume überführt, wo sie maximal neun Stunden verbrachten. Der Rücktransport in die Tierhaltung und die Umsetzung in die Haltungskäfige erfolgte am selben Abend (vor 19.00 Uhr). Die Ratten zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten, die auf Stress während der Umsetzung beziehungsweise des Transports oder sonstige Beeinträchtigungen hindeuten könnten.

2.2 Experimentaldesign und injizierte Substanzen

Die Versuchstiere wurden randomisiert in sechs Versuchsgruppen aufgeteilt. Fünf Versuchsgruppen wurden einer Schalleexposition (Englisch: acoustic trauma, AT) ausgesetzt. Von diesen exponierten Versuchstieren wurden vier Versuchsgruppen 90 Minuten vor der Schalleexposition mit verschiedenen GR- und MR-potenten Substanzen wie unten beschrieben vorbehandelt (Versuchsgruppe 3: Kortikosteron + Vehikel-Substanz, Versuchsgruppe 4:

Kortikosteron + Mifepriston, Versuchsgruppe 5: Kortikosteron + Spironolacton und Versuchsgruppe 6: Kortikosteron + Metyrapon). Eine der schallexponierten Versuchsgruppen erhielt nur die Vehikel-Substanz (Versuchsgruppe 2). Fünf Ratten dienten als nicht schallexponierte Kontrollgruppe (Versuchsgruppe 1: kein AT + Vehikel-Substanz).

Es ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

- | | | |
|------------|---|-------|
| 1) Kein AT | Vehikel-Substanz | (n=5) |
| 2) AT | Vehikel-Substanz | (n=5) |
| 3) AT | Kortikosteron + Vehikel-Substanz | (n=5) |
| 4) AT | Kortikosteron + Mifepriston (GR-Antagonist) | (n=5) |
| 5) AT | Kortikosteron + Spironolacton (MR-Antagonist) | (n=5) |
| 6) AT | Kortikosteron + Metyrapon (Kortikosteron-Syntheseblocker) | (n=4) |

Nach der Injektion wurden die Versuchstiere bis zur Schallexposition beziehungsweise Kontrollbehandlung wieder in ihre Heimkäfige gesetzt, wo sie freien Zugriff auf Wasser und Nahrung hatten. Die Gabe der Wirkstoffe erfolgte bei allen Tieren zum jeweils gleichen Zeitpunkt der zirkadianen Rhythmik, um den tageszeitlichen Einfluss in Bezug auf Kortikosteron so gering wie möglich zu halten.

Kortikosteron

Es wurde bereits mehrfach bestätigt, dass der Kortikosteronspiegel im Blut und Urin weiblicher Versuchstiere sowohl durch soziale Stressinduktion als auch durch eine Kortikosteron-Injektion signifikant ansteigt (Thorpe, Rajabi et al. 2012, Singer, Zuccotti et al. 2013, Tass, Adamchic et al. 2013). Kortikosteron wurde jeweils allein und parallel zu GR- und MR-inhibierenden Substanzen als „pharmakologisch erzeugte Stresskomponente“ injiziert. Hierzu wurde Kortikosteron (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in einer Lösungsmittelmischung aus Polyethylenglycol (PEG, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und Ethanol (1:10 Verhältnis) gelöst

(1 mg Kortikosteron in 0,33 ml Lösung) und mit einer Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert (Tass, Adamchic et al. 2013).

Metyrapon

Metyrapon (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde in einer Lösungsmittelmischung aus Polyethylenglycol (PEG, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und Ethanol (1:10 Verhältnis) gelöst (1 mg Metyrapon in 0,1 ml Lösung) und intraperitoneal mit einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht injiziert (Tahera, Meltser et al. 2006). Metyrapon ist ein 11 β -Hydroxylase-Inhibitor, welcher in der Nebenniere die Umwandlung von Desoxykortikosteron und Kortikosteron katalysiert (Daynes, Araneo et al. 1990, Zhou, Zhu et al. 2011). Dabei hat Metyrapon keinen akuten Effekt auf den basalen Kortikosteronspiegel, sondern verhindert vor allem eine stressinduzierte Produktion und Sekretion von Kortikosteron in den Blutkreislauf (Cox und Shield 1999, Yang und Shield 2000). Metyrapon erreicht seine maximale Serumkonzentration etwa eine Stunde nach Gabe und seine Konzentration sinkt nach vier Stunden schon auf ein Achtel. Daher erfolgte die Gabe 90 min vor Beginn der akustischen Überstimulation (Tahera, Meltser et al. 2006).

Spirolacton

Die MR-Antagonisten-Gruppe wurde mit je 100 mg/kg Körpergewicht Spirolacton (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) behandelt. Spirolacton wurde hierzu in einer Lösungsmittelmischung aus Polyethylenglycol (PEG, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und Ethanol (1:10 Verhältnis) gelöst (1 mg Spirolacton in 0,03 ml Lösung) und 90 Minuten vor Beginn der akustischen Überstimulation intraperitoneal injiziert (Tahera, Meltser et al. 2006).

Mifepriston

Mifepriston (RU-486) wird im klinischen Alltag der Gynäkologie seit bereits über 30 Jahren routinemäßig für induzierte Aborte eingesetzt (Bygdeman und Van Look 1988). RU-486 ist ein spezifischer Antagonist des GR, ohne starke Affinität zum MR zu besitzen. Dabei kann bereits eine in-vivo Dosis von 0.25 mg/kg Körpergewicht

den GR effektiv inhibieren (Daynes, Araneo et al. 1990, Pierson, Wang et al. 2000, Zhao, Chua et al. 2001, Trune und Kempton 2009). RU-486 erreicht seine maximale Serumkonzentration nach 1,5 - 2 Stunden und seine Wirksamkeit kann bis zu 90 Stunden anhalten kann (Foldesi, Falkay et al. 1996, Tahera, Meltser et al. 2006). Die Versuchsgruppe erhielt je eine Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht RU-486 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die hier gewählte Dosierung ist somit 400-fach so hoch wie die nachgewiesene effektive Dosis. Mifepriston wurde in einer Lösungsmittelmischung aus Polyethylenglycol (PEG, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und Ethanol (1:10 Verhältnis) gelöst (1 mg Mifepriston in 0,03 ml Lösung). Die intraperitoneale Injektion erfolgte 90 Minuten vor Beginn der akustischen Überstimulation (Tahera, Meltser et al. 2006).

Vehikel-Substanz

Die Vehikel-Substanz bestand parallel zur Lösung der oben genannten Wirkstoffe aus Polyethylenglycol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und Ethanol (1:10 Verdünnung). Die intraperitoneale Injektion der Substanz erfolgte mit je 2 ml/kg Körpergewicht.

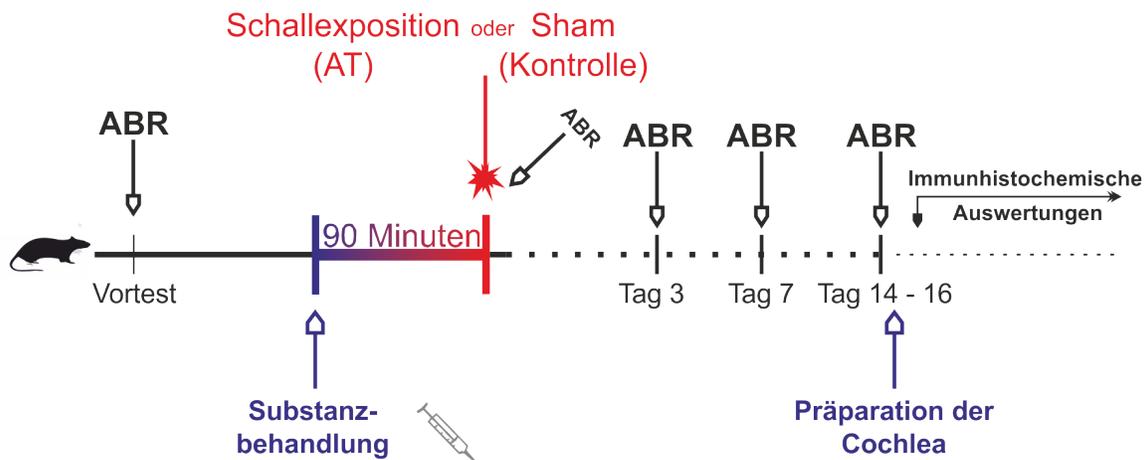


Abbildung 3. Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Experimentes. 90 Minuten vor der Schallexposition wurde Kortikosteron (KORT) zeitgleich mit einer Vehikel-Substanz (Ethanol/PEG 1:10) beziehungsweise einem Mineralokortikoid/Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten (MR-/GR-) intraperitoneal verabreicht. Die Hörfunktion der Versuchstiere wurde über einen Zeitraum von 14 - 16 Tagen kontrolliert. Vortests erfolgten 7 Tage vor der Schall- bzw. Scheinexposition. Das Cochlea-Gewebe wurde nach Beendigung des elektrophysiologischen Abschnittes präpariert. Es folgte anschließend die immunhistochemische Auswertung des gewonnenen Gewebes.

Die Hörfunktion der Versuchstiere wurde über einen Zeitraum von 14-16 Tagen kontrolliert (wie unter 2.5. beschrieben). Die Vormessungen erfolgten sieben Tage vor der Schall- beziehungsweise Scheinexposition (Abbildung 3). Das Cochlea-Gewebe für die immunhistochemischen Auswertungen wurde nach Beendigung des elektrophysiologischen Abschnittes der Experimente (und somit 14 - 16 Tage nach der Substanzbehandlung und Schallexposition) gewonnen und präpariert (siehe 2.7 und 2.8. bezüglich des methodischen Vorgehens).

Zur quantitativen Analyse der KORT- und Kreatinin-Konzentrationen wurde von narkotisierten Versuchstieren Urin während der akustischen Überstimulation, der Scheinexposition sowie im Rahmen der ersten audiometrischen Verlaufskontrolle am dritten Tag gesammelt. Um den Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf die endogene KORT-Konzentration zu minimieren, wurden alle Urinentnahmen zwischen 9.00 Uhr und 14.00 Uhr durchgeführt.

Die Quantifizierung der KORT- und Kreatinin-Konzentrationen in den Urinproben sowie die Berechnung der KORT-Kreatinin-Quotienten erfolgte mithilfe eines standardisierten Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) durch das externe Labor „IDEXX Laboratories in Ludwigsburg“ (Singer, Kasini et al. 2018).

2.3 Anästhesie

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mittels intraperitonealer Kombinationsnarkose (1 ml/kg Körpergewicht) aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht; Ketavet®, Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe) und Xylazinhydrochlorid (5 mg/kg Körpergewicht; Rompun® 2%, Bayer Health Care, Leverkusen). Zur Beurteilung der Narkosetiefe wurde 15 Minuten nach Injektion des Narkotikums die Auslösbarkeit des Zwischenzehenreflexes der Ratten überprüft und bei Bedarf bis zu einem Drittel der Initialdosis nachinjiziert.

Während und bis vier Stunden nach der Narkose wurde die Körperkerntemperatur der Tiere mithilfe eines digitalen Thermometers regelmäßig überprüft und gegebenenfalls durch Kühl- und Wärmemethoden (Kühlpads bzw. Infrarotlicht und beheizbaren Unterlagen) konstant zwischen 35,5°C und 37,0°C gehalten.

Um die Augen der Versuchstiere vor dem Austrocknen zu schützen, wurde in regelmäßigen Abständen Polyacrylsäure-Augengel (Vidisic®, Bausch&Lomb GmbH, Dr. Mann Pharma, Berlin) aufgetragen.

2.4 Akustische Überstimulation und Scheinexposition

Im Rahmen der akustischen Überstimulation wurden die Versuchstiere 60 Minuten lang akustischen Stimuli (Frequenz von 10 kHz, bei einem Schalldruck von 116 dB SPL rms) ausgesetzt.

Hierzu wurde eine Beschallungsbox aus MDF-Platten eingesetzt. Die Box war mit sechs seitlich montierten Lautsprechern (Soundcraft piezo, Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland) und einem großen Lautsprecher im Dach der Box (DR45N, 8 Ω, Visaton, Haan, Deutschland) ausgestattet. Die Kalibrierung erfolgte über ein Mikrofon (Brüel & Kjaer, Typ 2670, 1/4", 5mV/Pa; Naerum, Dänemark). Die Signale wurden computergesteuert generiert und der gewünschte Schalldruck über einen speziell angefertigten Verstärker/Abschwächer (Wulf Elektronik, Frankfurt, Deutschland) reguliert.

Die Versuchstiere wurden narkotisiert und in die vorgewärmte Beschallungskammer auf einen Drehteller gelegt. Nach der Hälfte der Beschallungszeit (30 Minuten) wurde die Liegeposition der Versuchstiere von vorwärts nach rückwärts der Rotationsrichtung geändert. Auf diese Weise konnte eine möglichst gleichmäßige Schallexposition beider Ohren erreicht werden.

Die Scheinexposition (Englisch: Sham) für die nicht exponierten Versuchsgruppen erfolgte ebenso in einer zweiten Beschallungsbox bei ausgeschaltetem Ton beziehungsweise Lautsprecher.

Die Vitalparameter sowie die Narkosetiefe wurden 15 Minuten vor und mindestens zwei Mal während der Exposition kontrolliert und nach Bedarf Narkotikum appliziert. 15 – 20 Minuten nach Ende der Exposition folgten die Postmessungen (ABR und Messung der DPOAE).

Die Ratten wurden nach den Messungen bis zum Aufwachen aus der Narkose einzeln in Aufwachkäfigen gehalten und beobachtet. Die Körpertemperatur wurde mithilfe von feinen Temperatursonden kontinuierlich registriert und bei Bedarf Wärme zugeführt oder zu hohe Körpertemperaturen mit Kühlkissen reguliert. Der Rücktransport in die Tierhaltung und die Umsetzung in die Haltungskäfige erfolgte am selben Abend (vor 19.00 Uhr).

2.5 Hirnstammaudiometrische Messungen

Akustische Stimuli generieren im Innenohr Nervenimpulse, die durch den Nervus cochlearis über das Stammhirn zum auditorischen Kortex geleitet werden. Diese resultierenden elektrischen Potentialänderungen im auditorischen System werden bei der Hirnstammaudiometrie (Auditory Brainstem Response, ABR) aufgezeichnet.

Die ABR ist eine häufig angewandte Methode zur objektiven Untersuchung der Hörfähigkeit von Menschen und Versuchstieren und beruht primär auf der neuronalen Ableitung von frühen akustisch evozierten Potentialen (AEP) im auditorischen System. Den Versuchstieren wurden breitbandige Klickgeräusche („click-ABR“) oder Töne einer spezifischen Frequenz über Lautsprecher präsentiert und die Antwortpotentiale auf Hirnstammebene im Rahmen eines Elektroenzephalogramms (EEG) über subkutane Elektroden für die ersten 10 ms nach Stimulation aufgezeichnet und aufsummiert.

Auf diese Weise kann man zum einen objektiv die Hörschwelle der Tiere bestimmen (derjenige Schalldruckpegel, ab dem eine reizkorrelierte Hirnstammantwort registriert wird) und zum anderen das frequenzabhängige Hörvermögen der Tiere differenziert analysieren.

Vor Beginn der Hörmessungen wurden die Versuchstiere wie unter 2.3 Anästhesie beschrieben narkotisiert. Die Ableitung der akustisch evozierten Hirnstammpotentiale erfolgte in einer schalldichten Messkabine (IAC 400-A, Industrial Acoustics Company GmbH, Niederkrüchten, Germany). Um dabei die Auskühlung der Versuchstiere während der Messung zu vermeiden, wurde eine beheizbare Unterlage verwendet. Außerdem wurden Vitalparameter (Puls und Atmung) akustisch und visuell durch einen an die Elektroden angeschlossenen Audiomonitor und Oszillographen außerhalb der Messkammer überwacht.

Die Generierung der Stimuli und die Aufzeichnung der ABRs erfolgte computergesteuert (Computerprogramm CAP/ABR, AG Knipper, HNO-Universitätsklinik Tübingen; IBM) mithilfe von Multifunktions I/O-Karten (PCI-6032E und PCI-MIO-16E1, National Instruments, Austin, Texas, USA).

Der Schalldruckpegel der erzeugten Stimuli wurde durch einen Verstärker und Potentiometer automatisch gesteuert (Wulff Elektronik, Frankfurt, Deutschland). Die generierten Stimuli wurden den Versuchstieren schließlich über einen Lautsprecher (Beyerdynamic DT-911, Heilbronn, Deutschland) präsentiert (Abbildung 4). Dabei wurde das zu messende Ohr in drei Zentimeter Entfernung zur Mitte des Lautsprechers platziert. Zur Erfassung der Hirnstammpotenziale wurden mithilfe einer Kanüle subkutan drei Silberelektroden gesetzt (Durchmesser 0,25 mm; Goodfellow, Cambridge, UK): eine Elektrode auf dem Vertex, etwa fünf Millimeter kranial der Augen (Referenzelektrode), eine weitere ventrolateral des zu messenden Ohres (aktive Elektrode) und eine dritte am Rücken des Tieres (Masseelektrode). Zur Ermittlung der tatsächlichen Stimuluslautstärke wurde zusätzlich ein 1/4“ Präzisionsmikrofon mit Vorverstärker (Brüel&Kjaer, Typ 2670, 3,5mV/Pa;

Naerum, Dänemark) über dem messenden Ohr der Versuchsratte platziert. Dieses Mikrofon wurde zuvor akustisch kalibriert (AcousticCalibrator, Typ 4231; 94 dB SPL bei 1kHz).

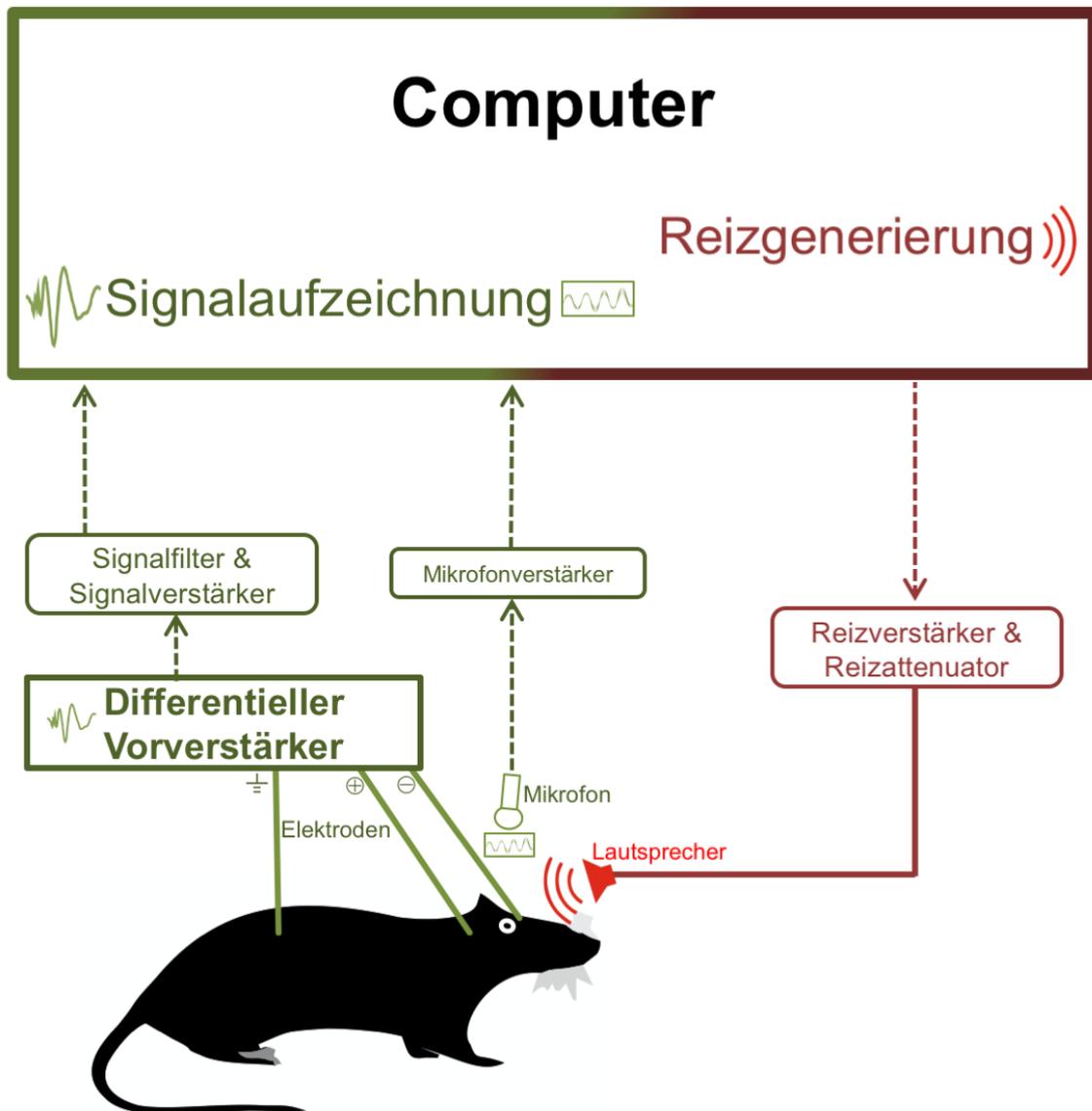


Abbildung 4. Schematischer Aufbau der Hirnstammaudiometrie (ABR). Der Reiz wurde computergesteuert generiert und über einen Verstärker und Potentiometer über einen Lautsprecher ausgegeben (rot). Das ABR-Signal wurde über drei Messelektroden (hellgrün), einem Signalverstärker und dem Signalfilter abgeleitet (dunkelgrün) und mithilfe des Computers aufgezeichnet.

Nicht-frequenzspezifische Hörschwellenbestimmung (click-ABR)

Im Zuge der nicht-frequenzspezifischen Hörmessungen (click-ABR) zur Beurteilung der Hörschwelle der Versuchstiere wurden breitbandige Klickgeräusche (100 μ s lang) verschiedener Polarität verwendet. Diese begannen bei einem Schalldruckpegel von 0 dB SPL und stiegen in 5 dB-Stufen auf bis zu 105 dB SPL an. Dabei wurden die Klickgeräusche für jeden Schalldruckpegel 64-256 Mal wiederholt (in Abhängigkeit von dem Signal/Rausch-Verhältnis).

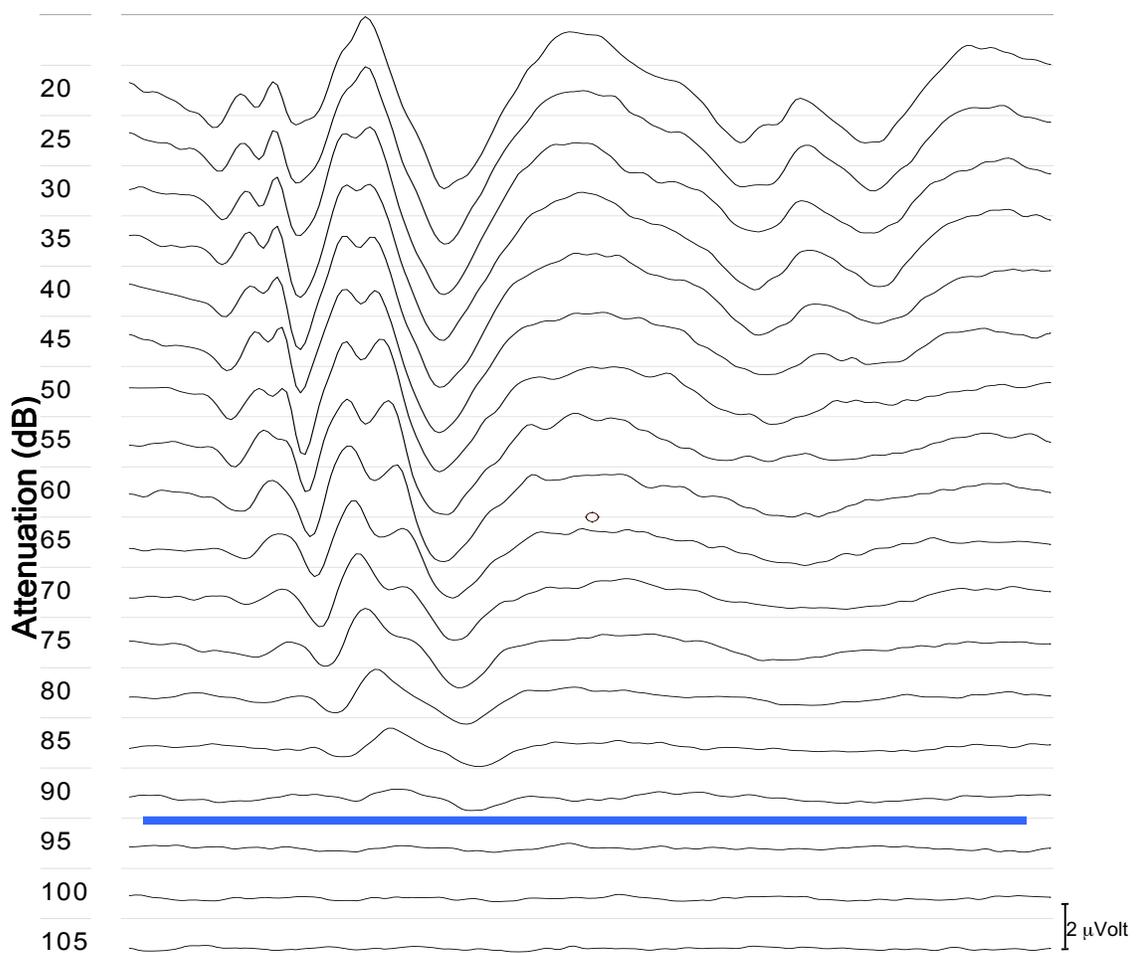


Abbildung 5. Beispiel einer click-ABR einer normalhörenden Ratte. Die Spannungsänderung der ABR-Funktion wurde im Zeitverlauf (10 ms) in aufsteigender Lautstärke (Attenuation (dB)) aufgetragen. Die Hörschwelle dieser Ratte liegt bei 90 dB attenuation (blaue Linie).

Das ausgegebene Signal ergab sich aus einer Mittelung der Messwerte aller Wiederholungen je präsentem Schalldruckpegel und wurde bei einer Frequenz von 10 kHz aufgezeichnet (Abbildung 5). Die Hörschwelle ergab sich aus dem niedrigsten Schalldruckpegel, bei dem eindeutig sichtbare akustisch evozierte Potentiale abgeleitet werden konnten.

Frequenzspezifische Hörschwellenbestimmung (f-ABR)

Für die Analyse des frequenzabhängigen Hörvermögens (f-ABR) und damit für die Bestimmung der frequenzspezifischen Hörschwellen wurden Reintöne verwendet (3 ms lang; 1 ms ein- und 1 ms ausgeblendet), von 10-110 dB SPL in 5 dB-Schritten ansteigend mit 32 – 128 Wiederholungen.

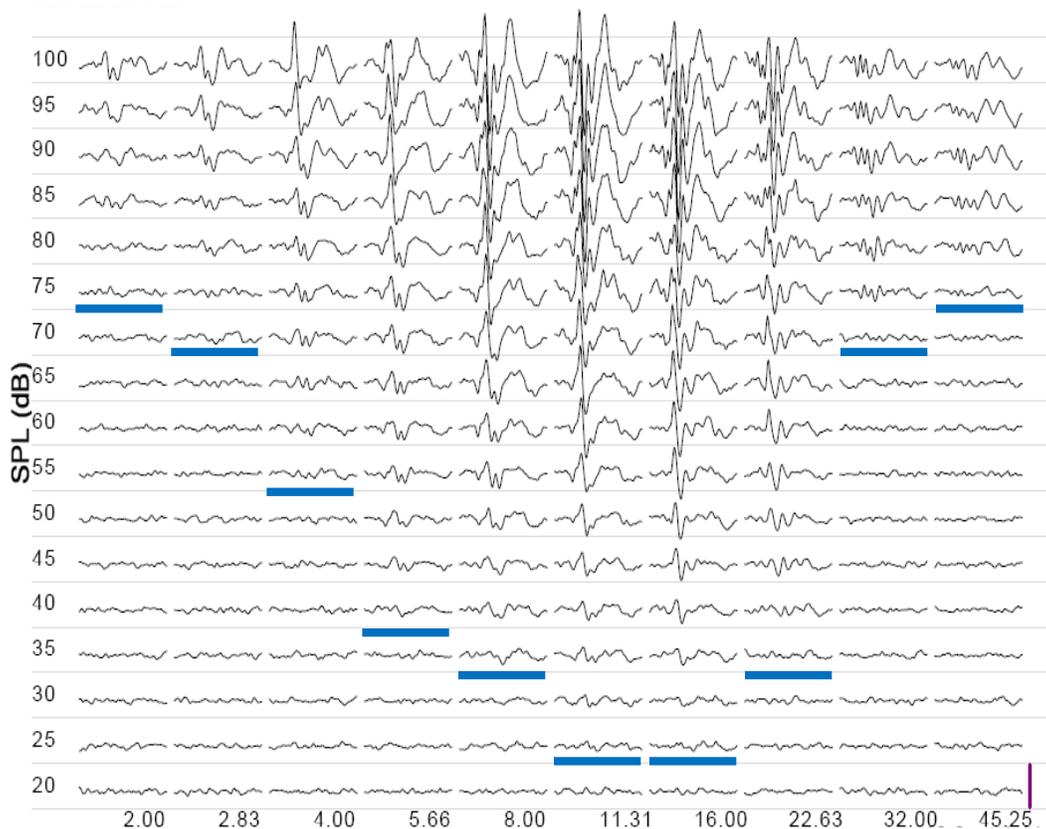


Abbildung 6. Beispiel der f-ABR einer normalhörenden Ratte. Die Spannungsänderung der ABR-Funktion wurde im Zeitverlauf (10 ms) in aufsteigender Lautstärke (SPL (dB)) bei 2.00 - 45.25 kHz aufgetragen. Die Hörschwelle bei der jeweiligen Frequenz ist durch blaue Linien markiert.

Dies erfolgte für Frequenzen zwischen 1.0 kHz und 45.25 kHz, mit einer Auflösung von zwei Schritten pro Oktave (Abbildung 6). Auf diese Weise konnte der Frequenzbereich der Hörfähigkeit von Ratten (0.25 kHz - 80 kHz), bis auf die nur sehr schwierig messbaren Randbereiche untersucht werden (Lobarinas, Salvi et al. 2013, Rucker und Antes 2013). Die Signale wurden mit einer Wiederholungsrate von etwa 40 Hz für 10 ms aufgezeichnet, 50000-fach amplifiziert (Neuron1; Wulf Elektronik), gefiltert (F1; Wulf Elektronik) und ebenfalls gemittelt. Die Software ließ Signale, die nach Verstärkung eine Amplitude von über circa 1.5 V aufwiesen, automatisch unberücksichtigt und konnte so Artefakte von Herzschlag, Atemgeräuschen (und weiteren nicht auditorisch neuronalen Aktivitäten) ausschließen. Auch hier ergab sich die Hörschwelle für jede der untersuchten Frequenzen aus dem niedrigsten Schalldruckpegel, bei dem sich ein Potentialverlauf noch deutlich vom Hintergrundrauschen unterscheiden ließ.

2.6 Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen

Die Messung distorsiv produzierter otoakustischer Emissionen (DPOAE) dient der spezifischen Untersuchung der Funktion äußerer Haarzellen (ÄHZ). Die ÄHZ sind ein Teil eines nichtlinearen Verstärkungssystems, welches bei Anregung mit zwei reinen Tönen einen dritten erzeugt, das Distorsionsprodukt. Distorsionsprodukte entstehen somit durch aktive Bewegung der ÄHZ.

Für die Messungen der DPOAE wurden die Versuchstiere wie unter 2.3 Anästhesie beschrieben narkotisiert. Die ÄHZ-Funktion wurde anhand des Wachstumsverlaufs (I/O-Funktion) und der maximalen Antwort des kubischen Distorsionsproduktes der otoakustischen Emissionen im DP-Gramm ($L_1 = 50$ dB SPL) bei der jeweiligen Distorsionsfrequenz $2f_1-f_2$ ermittelt (Knipper, Bandtlow et al. 1998). So wurden zunächst Frequenzpaare von Tönen (Verhältnis $f_2/f_1 = 1.25$, für Schalldruck L_1 bei f_1 gilt: $L_1 = L_2 + 10$ dB SPL) zwischen $f_2 = 4$ kHz und $f_2 = 32$ kHz präsentiert und das entstehende Distorsionsprodukt aufgezeichnet. Die Schwelle der

I/O-Funktion des Distorsionsproduktes 2f1-f2 wurde als derjenige Schalldruck L1 definiert, der ein eindeutig über dem Rauschen liegendes Distorsionsprodukt (> 5 dB) erzeugte.

2.7 Präparation der Versuchstiere und der Cochlea

Nach Beendigung des elektrophysiologischen Teils der Experimente wurden die Versuchstiere gemäß ethischer Leitlinien der Universität Tübingen und des Tierschutzgesetzes (BGBl. I S. 1206, §4) durch Inhalation von Kohlenstoffdioxid-Gas getötet und dekapitiert.

Anschließend wurden die Schädelhälften aller Versuchstiere für die immunhistologische Auswertung in RNAlater (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Germany, Ulm) überführt und die Cochleae unverzüglich isoliert und präpariert.

Die Fixierung der Cochleae erfolgte in einer 2% Paraformaldehyd- und 125mM Saccharose in 100 mM phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline; pH 7,4) für 2 Stunden. Nach der Fixierung wurden die Cochleae dekalzifiziert. Hierzu wurden die Präparate zunächst 90 Minuten in Rapid Bone Decalcifier (Eurobio, Les Ulis Cedex, France) und darauffolgend über Nacht in 25% Succrose in Hanks' buffered saline inkubiert (Müller 1991).

Letztlich wurden aus den präparierten, fixierten und dekalzifizierten Cochleae Kryostatschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt und auf SuperFrost Plus Objektträger (Thermo Fisher Scientific GmbH, Germany, Ulm) aufgezogen. Bis zur weiteren Auswertung beziehungsweise bis zur immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt (Müller 1991).

Die Colliculi inferiores (IC), auditorischen Cortices (AC) und Hippocampi (HC) wurden für die PCR-Auswertung gemäß des Atlases für Ratten

(Yang und Shield 2001) identifiziert, mit einer feinen Pinzette abgegriffen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.8 Immunhistochemische Untersuchung

Zur immunhistochemischen Auswertung wurden die Schnitte aufgetaut und nach standardisiertem Protokoll bearbeitet. Hierbei erfolgte zunächst eine Permeabilisierung des Gewebes mit 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren, war vor seiner Zugabe das Blockieren aller unspezifischen Epitope des Gewebes und damit die Absättigung dieser nötig. Als Blockierungslösung wurde 4% Normalserum aus der Ziege („normal goat serum“, NGS) in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer verwendet.

Anschließend erfolgte über Nacht die Inkubation des behandelten Gewebes mit zwei spezifischen Primärantikörpern. Diese wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen in 2% NaCl, 0,1% Triton X-100 in PBS und 1% NGS verdünnt, beide zeitgleich auf die Objektträger gegeben (jeweils 100 µl) und über Nacht in einer Feuchtekammer bei 4°C inkubiert.

Tabelle 1. Verwendete Primärantikörper zur immunhistochemischen Untersuchung der Cochlea-Schnitte.

Bezeichnung	Verdünnung	Bezugsquelle
mouse monoclonal anti-CtBP2/RIBEYE	1:50	BD Transduction Laboratories, CA, USA
rabbit polyclonal anti-otoferlin1	1:8000	Generiert für die AG Knipper (Schug, Braig et al. 2006)

Als Primärantikörper wurden monoklonale Maus Antikörper gegen CtBP2 („anti-CtBP2/RIBEYE“ - 1:50 verdünnt; BD Transduction Laboratories, CA, USA) und

polyklonale Kaninchen Antikörper gegen Otoferlin1 (1:8000 verdünnt; generiert für die AG Knipper (Peden, McGee et al. 2002, Schug, Braig et al. 2006)) verwendet (Tabelle 1).

Diese Primärantikörper wurden mit Cyanin 3-konjugierten Ziegen anti-Kaninchen IgG (1:1500 verdünnt; Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) und Alexa Fluor 488-konjugierten Ziegen anti-Maus (1:500 verdünnt Molecular Probes, USA) IgG detektiert und dargestellt. Hierfür wurden die Kryostatschnitte am nächsten Tag zunächst drei Mal mit PBS jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper in 2% NaCl, 0,1% Triton X-100 in PBS und 1% NGS verdünnt, beide zeitgleich auf die Objektträger gegeben (jeweils 100 µl) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die behandelten Schnitte wieder drei Mal mit PBS (für 30 Minuten, bei Raumtemperatur) gewaschen und mit Vectashield Mounting Medium (Molecular Probes, USA) mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) eingedeckelt.

Die immunhistochemische Auswertung erfolgte mit einem Olympus BX61 Mikroskop, ausgestattet mit einem 100x Objektiv (NA=1,35), einer motorisierten z-Achse und Epifluoreszenzbeleuchtung. Aufnahmen der inneren Haarsinneszellen (IHZ) wurden mit einer CCD Kamera (XM10, Olympus) und der Software cellSens Dimension (Olympus Soft Imaging Solutions OSIS GmbH, Münster, Deutschland) erstellt.

Für die Auswertung wurden von den IHZ in den Cochleae-Schnitten sogenannte „z-Stacks“ erstellt. Z-Stacks sind Bildserien entlang der z-Achse des Mikroskops und damit eine mehrschichtige Aufnahme über wenige Mikrometer in die Tiefe der Cochleae-Kryostatschnitte. Dazu wurden in unterschiedlichen Fokusebenen der Schnittpräparate Aufnahmen erstellt und später die maximale Intensitätsprojektion der Stapel ausgewertet (Abbildung 7).

Ein z-Stack bestand dabei aus 18 - 20 einzelnen Bildebenen mit einer Dicke von $0,49 \mu\text{m}$ (in z-Richtung). Damit konnten die IHZ auf den Kryostatschnitten in axialer Richtung über eine Distanz von mindestens $8,0 \mu\text{m}$ abgebildet und so die kompletten IHZ (einschließlich der Zellkerne und synaptischen Regionen) über ihre gesamte Breite und Länge erfasst werden.

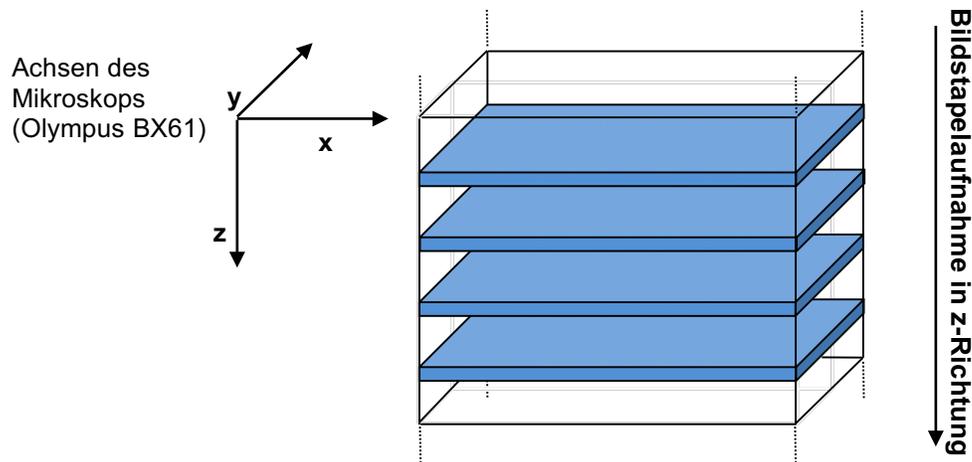


Abbildung 7. Schematische Darstellung eines z-Stacks. Es wurden in unterschiedlichen Fokusebenen der Schnittpräparate Aufnahmen gesichert (zur Vereinfachung sind in dieser Abbildung nur vier Bildebenen dargestellt) und in maximaler Intensitätsprojektion ausgewertet.

Diese z-Stacks wurden anschließend mithilfe der Software cellSens Dimension durch den „Nearest Neighbour“-Algorithmus (OSIS GmbH, Münster, Deutschland) dreidimensional dekonvolviert und in maximaler Intensitätsprojektion dargestellt.

In der 3D-Dekonvolution wurde gleichzeitig das störende Streulicht zum ursprünglichen Ort unter- und oberhalb der Fokusebene berücksichtigt und so die ursprüngliche Form der Objekte in der Bildebene rekonstruiert. Durch diese Werkzeuge wirkten die Aufnahmen weniger verzerrt und das dargestellte Bild erschien in erhöhter Schärfe und Auflösung (Biggs 2010).

2.9 Statistische Tests

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Statistikprogramm Prism Version 6 (Graph Pad Software, Inc.; La Jolla, USA) verwendet. Werte in dieser Arbeit sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt, wenn nicht explizit anders angegeben.

Absolute Hörschwellen für nicht-frequenzspezifische Hörmessungen (Click-ABR) und maximale Antworten der Distorsionsprodukte wurden mit der 1-Way ANOVA (Alpha-Niveau von 0,05) auf statistisch relevante Unterschiede überprüft. Im Fall von Signifikanz wurden mit dem Sidak Post-Test Paarvergleiche durchgeführt. Frequenzspezifische Hörschwellen (f-ABR), frequenzspezifische Distorsionsproduktschwellen sowie die Anzahl der Ribbon-Synapsen der Inneren Haarsinneszellen wurden mit der 2-Way ANOVA (Alpha-Niveau von 0,05) auf signifikante Unterschiede bezüglich der Behandlung überprüft und diese mit dem Post-Test nach Holm-Sidak auf Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen verglichen.

Waren die Bedingungen für die Anwendbarkeit statistischer Verfahren bei Nichterfüllung der Mindestanzahl oder Streuungsungleichheit nicht erfüllt, wurden für die jeweiligen Versuchsgruppen Mittelwerte mit Standardabweichung (wenn nicht explizit anders angegeben) deskriptiv dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress auf die Hörfunktion in Abhängigkeit von der Aktivität der Kortikosteroidrezeptor-Subtypen

Der Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress durch Kortikosteron (KORT)-Behandlung auf die Hörfunktion nach einer Schallexposition (Englisch: acoustic trauma, AT) bzw. Scheinexposition (Kontrolle, Sham) wurde in Abhängigkeit von der Aktivität verschiedener Kortikosteroidrezeptor-Subtypen in einem Rattentiermodell untersucht.

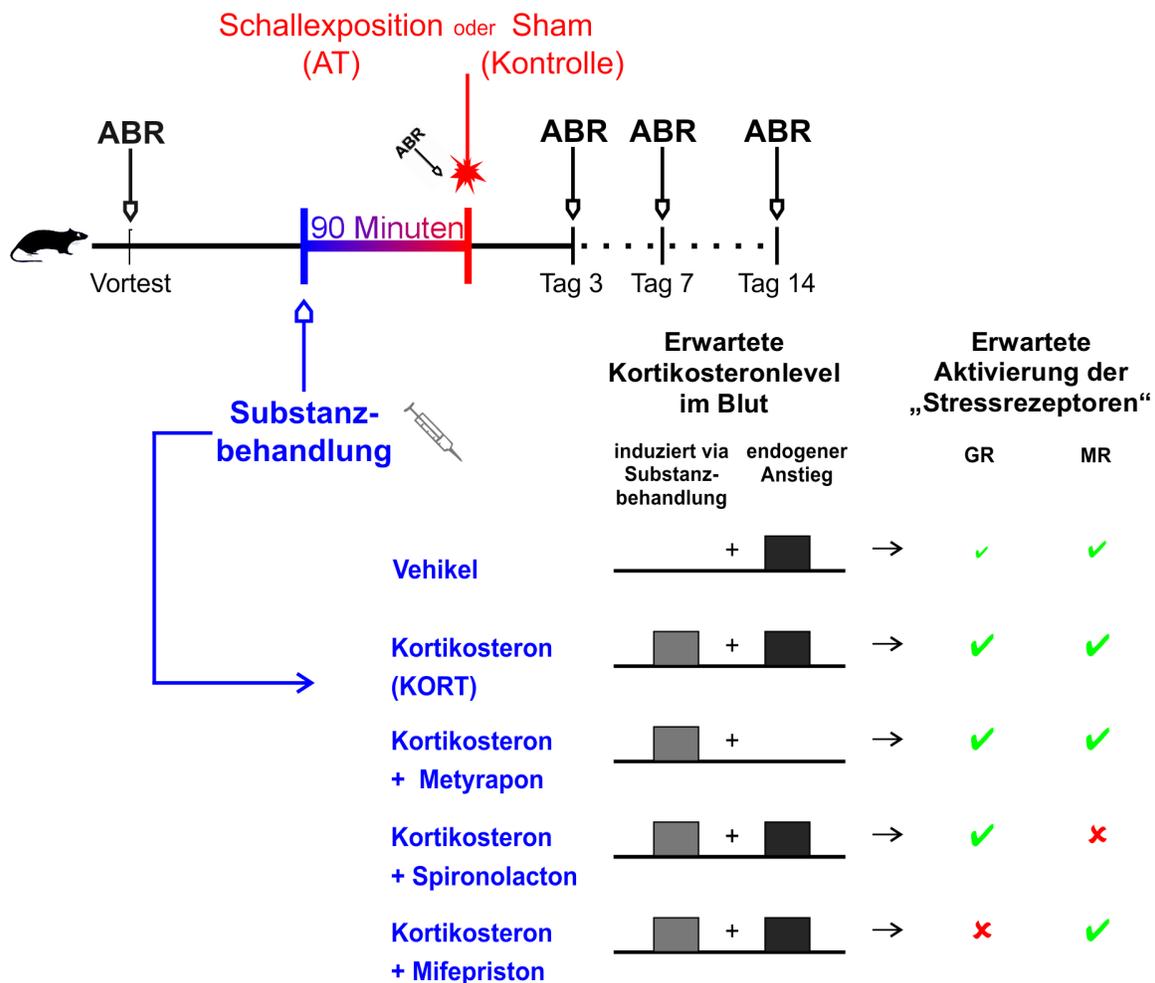


Abbildung 8. Experimentaldesign. 90 Minuten vor der Schallexposition wurde Kortikosteron (KORT) zeitgleich mit einer Vehikel-Substanz (Ethanol/PEG 1:10) beziehungsweise eines Mineralokortikoid/Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten (MR-/GR-) intraperitoneal verabreicht. Die Hörfunktion der Versuchstiere wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen kontrolliert. Vortests erfolgten 7 Tage vor der Schall- bzw. Scheinexposition.

Hierzu wurde 90 Minuten vor einer akustischen Überstimulation (116 dB SPL, 10 kHz, 60 Minuten) Kortikosteron (3 mg/kg Körpergewicht) zeitgleich mit einer Vehikel-Substanz (Ethanol/PEG 1:10, 2 ml/kg Körpergewicht) beziehungsweise eines Mineralokortikoid/Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten (MR-/GR-) intraperitoneal verabreicht. Die Hörfunktion der Versuchstiere wurde über einen Zeitraum von 14-16 Tagen kontrolliert. Die Vormessungen erfolgten 7 Tage vor der Schallbeziehungsweise Scheinexposition (Abbildung 8).

3.1.1 Kortikosteron-Behandlung ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung

Der Frage nachgehend, ob Kortikosteron (KORT) alleine einen ototoxischen oder sogar otoprotektiven Effekt auf die Hörfunktion nach einer Schalleexposition besitzt, wurde vor der Schalleexposition KORT intraperitoneal (3 mg/kg Körpergewicht) appliziert.

Im gruppeninternen Vergleich, Vortest zu direkt nach Trauma, verzeichnete sowohl die Vehikel als auch KORT behandelte Versuchsgruppe eine statistisch signifikante Hörschwellenabwanderung, welche sich in click- als auch in frequenzspezifischen ABR-Messungen zeigte (Abbildung 9A, Vehikel+AT: Vortest 6.3 dB SPL \pm 2.98 dB, post AT 51.5 dB SPL \pm 20.40 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, KORT+AT: Vortest 6.1 dB SPL \pm 2.56 d, post AT 75.80 dB SPL \pm 18.33 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$; Abbildung 9B/Abbildung 9C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$). In der Kontrollgruppe kam es durch die Scheinexposition zu keiner Veränderung der gemessenen Hörfunktion (Abbildung 9A, Kontrolle: Vortest 5.3 dB SPL \pm 2.04 dB, post Sham 6.3 dB SPL \pm 2.1 dB).

In Vormessungen konnte kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und KORT+AT bezüglich der Hörfunktionen festgestellt werden (Abbildung 9A Vortest und Abbildung 9B). Es wurde ein KORT vermittelter ototoxischer Effekt durch click- und frequenzspezifische ABR-Messungen direkt

nach der Schallexposition beobachtet. In den KORT behandelten Versuchstieren kam es unmittelbar nach der Schallexposition zu einer statistisch signifikant stärkeren Schwellenabwanderung im Vergleich zu den Vehikel behandelten Versuchstieren (Abbildung 9A post AT, Vehikel+AT: 51.50 dB SPL \pm 20.40 dB, KORT+AT: 75.80 dB SPL \pm 18.33 dB, t-test: $p < 0.05$; Abbildung 9C, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$). Sieben und vierzehn Tage nach der Schallexposition konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gemessen werden (Abbildung 9A Tag 7 Vehikel+AT 23.00 dB SPL \pm 8.80 dB, KORT+AT 25.30 dB SPL \pm 11.73 dB, t-test: $p = 0.6192$; Tag 14 Vehikel+AT 20.70 dB SPL \pm 6.80 dB, KORT+AT 21.8 dB SPL \pm 7.7 dB, t-test: $p = 0.754$; Abbildung 9E, 2way-ANOVA: $p = 0.1890$; Abbildung 9F, 2way-ANOVA: $p = 0.2918$).

Eine nahezu vollständige Remission der Hörschwelle zeigten die Ergebnisse der ABR-Messungen im Verlauf von 14 Tagen sowohl für Vehikel als auch für KORT behandelte Versuchstiere in tiefen und mittleren Frequenzen relativ zu den Vormessungen (Abbildung 9B/Abbildung 9F 1-4 kHz, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p = 0.0925$, KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p = 0.1347$), während - wie zu erwarten analog zum verwendeten Frequenzbereich der Schallexposition (116 dB SPL bei 10 kHz, 60 Minuten) - in beiden Gruppen bei höheren Frequenzen weiterhin eine starke Schwellenabwanderung existierte (Englisch: permanent threshold shift, PTS; Abbildung 9B/Abbildung 9F 8-45 kHz, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$).

DPOAE-Messungen zeigten im gruppeninternen Vergleich, Vortest zu direkt nach Trauma, eine statistisch signifikante Reduktion der DPOAE Amplituden (Abbildung 10A, Vehikel+AT: Vortest 19.40 dB SPL \pm 6.26 dB, post AT -4.50 dB SPL \pm 8.33 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.001$, KORT+AT: Vortest 18.60 dB SPL \pm 7.00 dB, post AT -5.10 dB SPL \pm 4.36 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, Kontrolle: Vortest 16.10 dB SPL \pm 4.28 dB, post Sham 16.4 dB SPL \pm 4.26 dB) und DPOAE Schwellen (Abbildung 10B/Abbildung 10C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$,

KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$). Selbst nach drei, sieben und 14 Tagen war diese Reduktion noch deutlich zu sehen (Abbildung 10D-F, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$). Vergleich man jedoch zwischen diesen beiden beschallten Versuchsgruppen, konnte während des gesamten Messzeitraumes kein statistisch signifikanter Unterschied der DPOAE Amplituden und Schwellen beobachtet werden (Abbildung 10A post AT-Tag 14 und Abbildung 10C-F).

Zusammenfassend führte die pharmakologische Induktion von Stress durch Kortikosteron-Injektion (3 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung 90 Minuten vor der Schalleexposition initial zu einer signifikant stärkeren Hörschwellenabwanderung im Vergleich zur Vehikel-Behandlung und stellte sich mit einem deutlicheren Temporären Threshold Shift (TTS) dar. Die Kortikosteron-Injektion erhöhte die kurzfristige Vulnerabilität der Hörfunktion. Im Verlauf von zwei Wochen zeigte sich jedoch das initiale deutliche Defizit im Vergleich zur Vehikel-Gruppe nicht mehr, sodass verglichen kein signifikant stärkerer Permanent Threshold Shift (PTS) zu sehen war. Die Kortikosteron-Injektion hatte keinen Einfluss auf das ABR/DPOAE-Profil in Hörmessungen 14 Tage nach der Schalleexposition im Vergleich zur Vehikel-Behandlung.

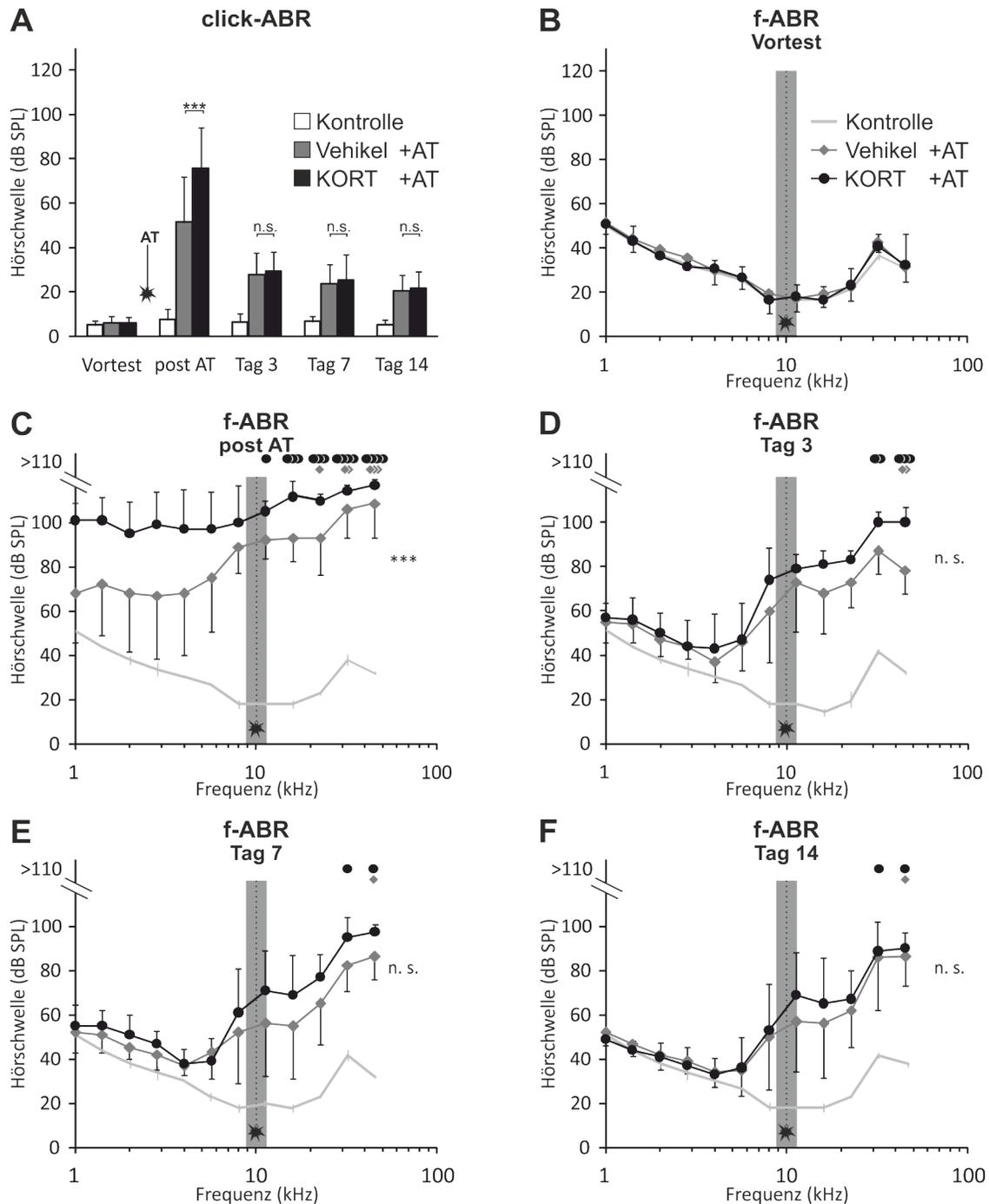


Abbildung 9. Audiometrische Untersuchungen des Effektes von KORT auf die Hörschwellenremission nach Schalleexposition. **(A)** Click-ABR-Hörschwellen für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und KORT + AT (schwarzer Balken, n=5) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf von vor der Schalleexposition (Vortest) bis zwei Wochen nach Schalleexposition (Tag 3, 7 und 14). Im Detail sind die frequenzspezifischen ABR-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), KORT + AT (Kreise) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Schalleexposition dargestellt. Der Hauptfrequenzbereich der zur Vertäubung verwendeten Schalleexposition ist in (B-D) als grauer Balken abgebildet. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt. Rauten und Kreise > 110 markieren Einzelohren in der jeweiligen Versuchsgruppe, für die keine Hörschwelle bestimmbar war (da Hörschwelle > 110 dB SPL).

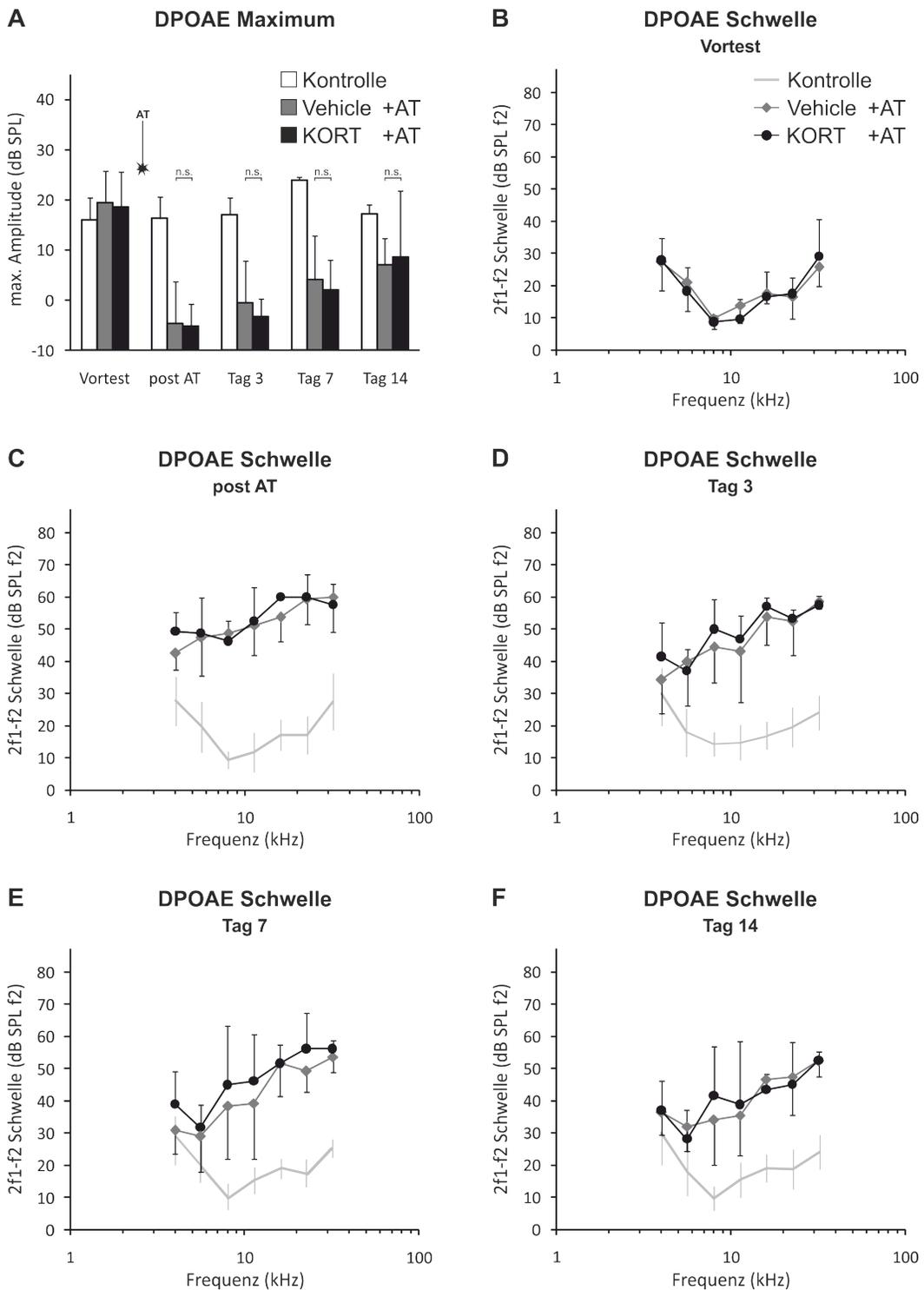


Abbildung 10. Untersuchungen des Effektes von KORT auf die DPOAE nach Schallexposition. **(A)** DPOAE Maximum-Amplituden für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und KORT + AT (schwarzer Balken, n=5) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf. Im Detail sind die frequenzspezifischen DPOAE-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), KORT + AT (Kreise) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Exposition dargestellt. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt.

3.1.2 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Hemmung der endogenen Kortikosteron-Produktion

Nachdem ein initialer ototoxischer Effekt von pharmakologisch induziertem Stress durch KORT-Gabe auf die Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation festgestellt wurde, erfolgte im nächsten Schritt zusätzlich zur pharmakologischen Stressinduktion die Hemmung der endogenen KORT-Produktion in der Nebennierenrinde durch Metyrapon-Behandlung (10 mg/kg Körpergewicht, i.p.). Metyrapon hat als Wirkstoff keinen Einfluss auf die basale KORT-Serumkonzentration, inhibiert jedoch einen akuten endogenen Anstieg der KORT-Serumkonzentration als Antwort auf akuten exogen erfahrenen Stress (Cox und Shield 1999, Yang und Shield 2000).

Im gruppeninternen Vergleich, Vortest zu direkt nach Trauma, zeigte sich in Vehikel und Metyrapon/KORT behandelten Versuchstieren eine statistisch signifikante Hörschwellenabwanderung (Abbildung 11A, Vehikel+AT: Vortest 6.3 dB SPL \pm 2.98 dB, post AT 51.5 dB SPL \pm 20.40 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, Metyrapon/KORT+AT: Vortest 6.2 dB SPL \pm 2.54 dB, post AT 64.9 dB SPL \pm 30.14 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$; Abbildung 11B/Abbildung 11C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, Metyrapon/KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$). In der Kontrollgruppe kam es durch die Scheinexposition zu keiner Veränderung der gemessenen Hörfunktion (Abbildung 9A, Kontrolle: Vortest 5.3 dB SPL \pm 2.04 dB, post Sham 6.3 dB SPL \pm 2.1 dB).

In Vormessungen konnte kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und Metyrapon/KORT+AT bezüglich der Hörfunktionen beobachtet werden (Abbildung 11A Vortest und Abbildung 11B). Es wurde in den Metyrapon/KORT behandelten Versuchstiere direkt nach der Schalleexposition ein ähnlich starker Hörverlust wie in Vehikel behandelten Tieren verzeichnet. So konnte keine statistisch signifikant verschiedene Schwellenabwanderung im Vergleich zu den Vehikel behandelten Versuchstieren festgestellt werden (Abbildung 11A post AT, Vehikel+AT: 51.5 dB SPL \pm 20.40 dB,

Metyrapon/KORT+AT: 64.9 dB SPL \pm 30.14 dB, t-test: $p=0.2783$; Abbildung 11C, 2way-ANOVA: $p=0.0961$). Nach sieben und vierzehn Tagen war kein statistisch signifikanter Unterschied der Hörfunktion Metyrapon/KORT und Vehikel behandelte Versuchstiere zu beobachten (Abbildung 11A Tag 7 Vehikel+AT 23.00 dB SPL \pm 8.80 dB, Metyrapon/KORT+AT 24.80 dB SPL \pm 10.53 dB, t-test: $p=0.6859$; Tag 14 Vehikel+AT 20.70 dB SPL \pm 6.80 dB, Metyrapon/KORT+AT 21.7 dB SPL \pm 9.39 dB, t-test: $p=0.8082$; Abbildung 10E, 2way-ANOVA: $p=0.2965$; Abbildung 11F, 2way-ANOVA: $p=0.3832$).

Eine Remission der Hörschwelle wurde in Vehikel und Metyrapon/KORT behandelten Tieren zwei Wochen nach der Schallexposition in tiefen und mittleren Frequenzen relativ zu den Vormessungen festgestellt (Abbildung 11B/Abbildung 11F 1-4 kHz, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p=0.0925$, Metyrapon/KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p=0.1053$), wohingegen im Frequenzbereich von über 8 kHz weiterhin eine starke Schwellenabwanderung verzeichnet wurde (Abbildung 11B/Abbildung 11F 8-45 kHz, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Metyrapon/KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$).

Ein vergleichbares Bild stelle sich für die DPOAE-Messungen zur Prüfung der ÄHZ-Funktion dar. Es konnte im gruppeninternen Vergleich, Vortest zu direkt nach Trauma, eine statistisch signifikante Verminderung der DPOAE Amplitude (Abbildung 12A, Vehikel+AT: Vortest 19.4 dB SPL \pm 6.26 dB, post AT -4.5 dB SPL \pm 8.33 dB, 2way-ANOVA: $p<0.001$, Metyrapon/KORT+AT: Vortest 13.70 dB SPL \pm 6.08 dB, post AT -5.30 dB SPL \pm 4.49 dB, 2way-ANOVA: $p<0.001$) und DPOAE Schwelle (Abbildung 12B/Abbildung 12C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Metyrapon/KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p<0.0001$) beobachtet werden. Diese Reduktion der DPOAE Amplitude und Schwelle war bis zu vierzehn Tage nach der Schallexposition noch vorhanden (Abbildung 12F, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Metyrapon/KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$). Demgegenüber

konnte im Gruppenvergleich über den gesamten Beobachtungszeitraum von zwei Wochen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Vehikel und Metyrapon/KORT behandelten Tieren festgestellt werden (Abbildung 12A Tag 3-Tag 14 und Abbildung 12C-F). Die Vulnerabilität der ÄHZ-Funktion wurde durch pharmakologische Stressinduktion bei zeitgleicher Inhibition der endogenen KORT-Synthese nicht beeinflusst.

Zusammenfassend hatte die pharmakologische Induktion von Stress durch Kortikosteron-Injektion (3 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) bei zeitgleicher Hemmung der endogenen Kortikosteron-Synthese durch Metyrapon-Behandlung (10 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) 90 Minuten vor einer akustischen Überstimulation keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Schallvulnerabilität beziehungsweise das ABR/DPOAE-Profil im Vergleich zur Vehikel- und isolierten Kortikosteron-Behandlung. Die Remission der Hörfunktion blieb ebenfalls über den gemessenen Zeitraum von 14 Tagen parallel zur reinen Kortikosteron-Behandlung unbeeinflusst.

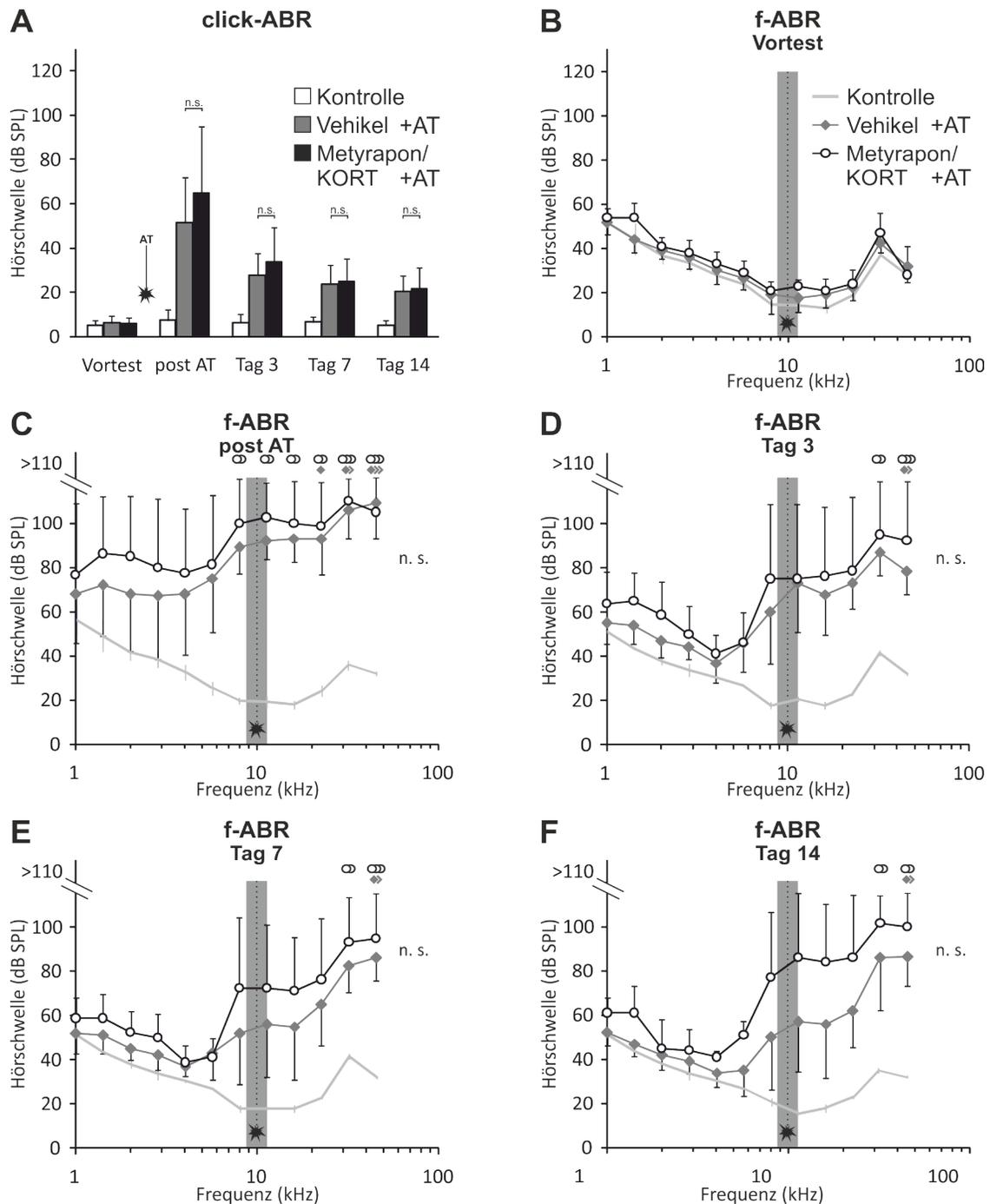


Abbildung 11. Audiometrische Untersuchungen des Effektes von Metyrapon/KORT auf die Hörschwellenremission nach Schallexposition. **(A)** Click-ABR-Hörschwellen für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und Metyrapon/KORT + AT (schwarzer Balken, n=4) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf von vor der Schallexposition (Vortest) bis zwei Wochen nach Schallexposition. Im Detail sind die frequenzspezifischen ABR-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), Metyrapon/KORT + AT (Kreise) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Schallexposition dargestellt. Der Hauptfrequenzbereich der zur Vertäubung verwendete Schallexposition ist in (B-D) als grauer Balken abgebildet. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt. Rauten und Kreise > 110 markieren Einzelohren in der jeweiligen Versuchsgruppe, für die keine Hörschwelle bestimmbar war (da Hörschwelle > 110 dB SPL).

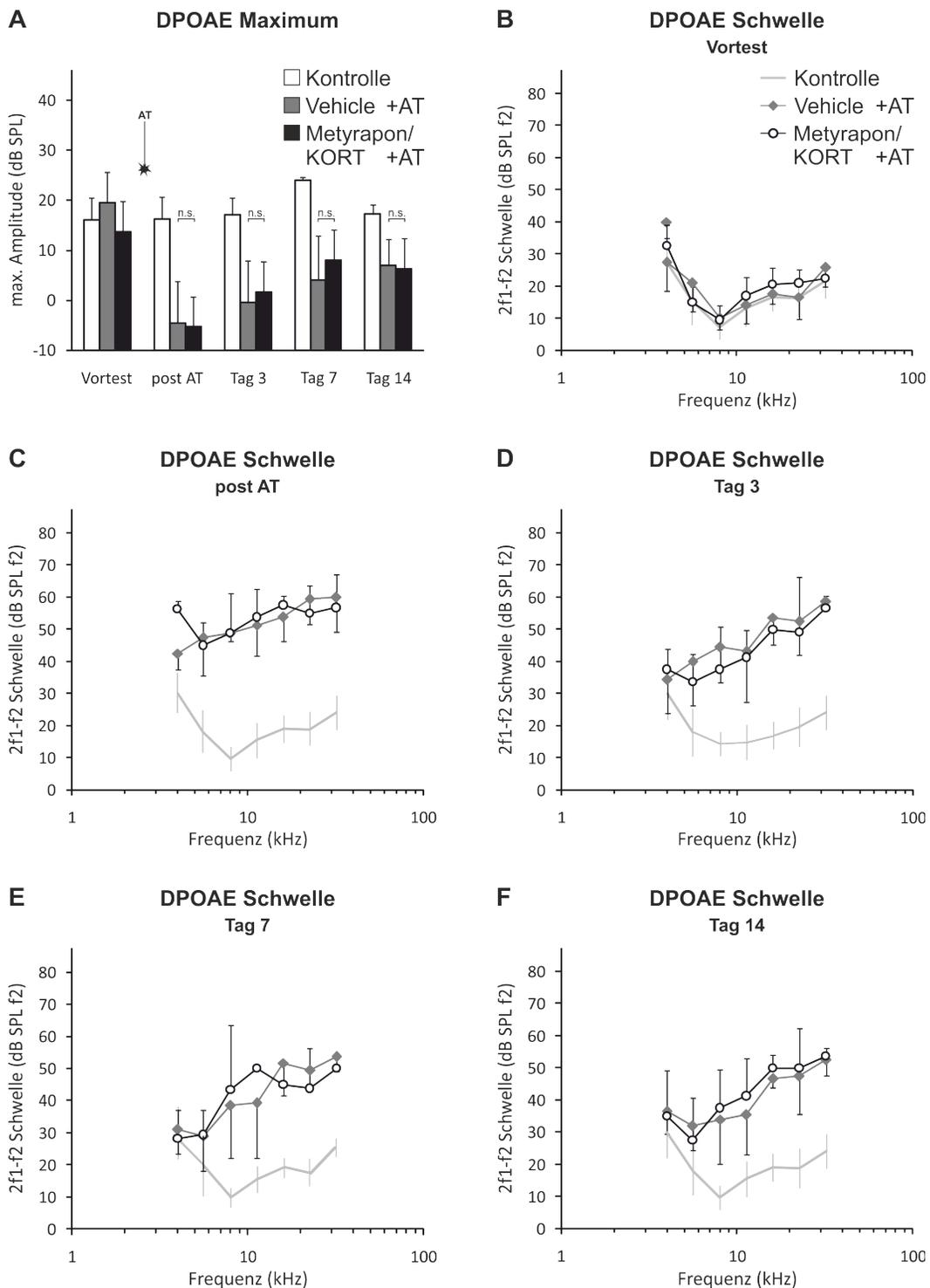


Abbildung 12. Untersuchungen des Effektes von Metyrapon/KORT auf die DPOAE nach Schallexposition. **(A)** DPOAE Maximum-Amplituden für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und Metyrapon/KORT + AT (schwarzer Balken, n=4) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf. Im Detail sind die frequenzspezifischen DPOAE-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), Metyrapon/KORT + AT (Kreise) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Schallexposition dargestellt. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt.

3.1.3 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten

Um der Frage nachzugehen, über welchen Rezeptor pharmakologisch induzierter Stress durch KORT-Gabe die beobachteten Effekte auf die Hörfunktion nach einer Schallexposition vermittelte, wurden die Versuchstiere im Folgenden zusätzlich zu KORT mit dem MR-Antagonisten Spironolacton behandelt. Auf diese Weise konnten vor allem Effekte untersucht werden, die durch Aktivierung dieser Rezeptorsubtypen über KORT vermittelt wurden.

Im gruppeninternen Vergleich, Vortest zu direkt nach Trauma, zeigte sich sowohl in Vehikel als auch Spironolacton/KORT behandelten Versuchstieren ein statistisch signifikanter Hörverlust (Abbildung 13A, Vehikel+AT: Vortest 6.3 dB SPL \pm 2.98 dB, post AT 51.5 dB SPL \pm 20.40 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, Spironolacton/KORT+AT: Vortest 5.0 dB SPL \pm 1.15 dB, post AT 65.5 dB SPL \pm 26.87 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$; Abbildung 13B/Abbildung 13C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$).

In Vormessungen konnte kein Unterschied bezüglich der Hörfunktionen zwischen den Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und Spironolacton/KORT+AT festgestellt werden (Abbildung 13A Vortest und Abbildung 13B). In den Spironolacton/KORT und Vehikel behandelten Versuchstieren wurde direkt nach der Schallexposition eine ähnlich große Schwellenabwanderung beobachtet (Abbildung 13A post AT, Vehikel+AT: 51.5 dB SPL \pm 20.40 dB, Spironolacton/KORT+AT: 65.5 dB SPL \pm 26.87 dB, t-test: $p = 0.2059$; Abbildung 13C, 2way-ANOVA: $p = 0.1669$). In Messungen drei, sieben und 14 Tage nach der Schallexposition erholte sich die Hörfunktion der beiden Versuchsgruppen gleichermaßen, sodass in Spironolacton/KORT behandelten Tieren an Tag 14 weiterhin ein ähnlich starker Hörverlust wie in den Vehikel behandelten Tiere verzeichnet wurde. Somit waren keine statistisch signifikanten Unterschiede der Hörschwelle über den kompletten gemessenen Zeitraum von 14 Tagen in click- und frequenzspezifischer ABR zu

beobachten (Abbildung 13A Tag 7 Vehikel+AT 23.00 dB SPL \pm 8.80 dB, Spironolacton/KORT+AT 28.60 dB SPL \pm 12.68 dB, t-test: $p=0.2666$; Tag 14 Vehikel+AT 20.70 dB SPL \pm 6.80 dB, Spironolacton/KORT+AT 24.40 dB SPL \pm 10.92 dB, t-test: $p=0.8082$; Abbildung 12E, 2way-ANOVA: $p=0.3165$; Abbildung 13F, 2way-ANOVA: $p=0.3633$).

Eine Remission der Hörschwelle zeigten die Ergebnisse der ABR-Messungen im Verlauf von zwei Wochen sowohl für Vehikel als auch für Spironolacton/KORT behandelte Versuchstiere in tiefen und mittleren Frequenzen relativ zu den Vormessungen (Abbildung 13B/Abbildung 13F 1-4 kHz, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p=0.0925$, Spironolacton/KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p=0.0736$), wohingegen in höheren Frequenzbereichen weiterhin eine starke Schwellenabwanderung verzeichnet wurde (Abbildung 13B/Abbildung 13F 8-45 kHz, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Spironolacton/KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$).

DPOAE-Messungen zeigten im gruppeninternen Vergleich, Vortest zu direkt nach Trauma, eine statistisch signifikante Reduktion der DPOAE Amplitude (Abbildung 14A, Vehikel+AT: Vortest 19.4 dB SPL \pm 6.26 dB, post AT -4.5 dB SPL \pm 8.33 dB, 2way-ANOVA: $p<0.001$, Spironolacton/KORT+AT: Vortest 14.50 dB SPL \pm 3.80 dB, post AT -3.90 dB SPL \pm 2.71 dB, 2way-ANOVA: $p<0.0001$) und DPOAE Schwelle (Abbildung 14B/Abbildung 14C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Spironolacton/KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p<0.0001$). Diese Reduktion der DPOAE Amplitude beziehungsweise Schwelle blieb über den weiteren gemessenen Zeitraum von 14 Tagen weiterhin erhalten (Abbildung 14C-F, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Spironolacton/KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$). Wurden die DPOAE Amplituden und Schwellen Vehikel und Spironolacton/KORT behandelter Ratten verglichen, konnte zu den Zeitpunkten „post AT“, „Tag 3“ und „Tag 7“ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 14A

post AT-Tag 7, Vehikel+AT Tag 7: 4.1 dB SPL \pm 8.76 dB, Spironolacton/KORT+AT Tag 7: 0.2 dB SPL \pm 4.28 dB, t-test: $p=0.3978$ und Abbildung 14F, Tag 14, 2way-ANOVA: $p=0.2416$).

14 Tage nach der akustischen Überstimulation zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der DPOAE-Amplitude zwischen diesen beiden Versuchsgruppen, bei der sich die Reduktion der maximalen Amplitude in Spironolacton/KORT behandelten Versuchstiere stärker ausgeprägt darstellte (Abbildung 14A Tag 14, Vehikel+AT: 7.9 dB SPL \pm 5.23 dB, Spironolacton/KORT+AT: -0.9 dB SPL \pm 5.31 dB, t-test: $p<0.05$). In den Messungen der DPOAE Schwelle 14 Tage nach Schallexposition hingegen war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Vehikel und Spironolacton/KORT behandelten Versuchstieren zu erkennen (Abbildung 14F, 2way-ANOVA: $p=0.0774$).

Zusammenfassend führte die pharmakologische Induktion von Stress durch Kortikosteron-Injektion (3 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) bei zeitgleicher Inhibition der Mineralokortikoidrezeptoren durch Spironolacton-Behandlung (100 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) 90 Minuten vor einer akustischen Überstimulation zu keiner statistisch signifikant stärkeren Hörschwellenabwanderung im hochfrequenten Bereich im Vergleich zur Vehikel-Behandlung. Damit hatte die Stressinduktion bei zeitgleicher Hemmung der Mineralokortikoidrezeptoren keinen wesentlichen Einfluss auf den akuten und permanenten Trauma-induzierten Hörschwellenverlust im Vergleich zu anderen Versuchsgruppen. Die Vulnerabilität und Erholung der Hörfunktion nach der Schallexposition hing nicht von der Aktivierung der Mineralokortikoidrezeptoren ab.

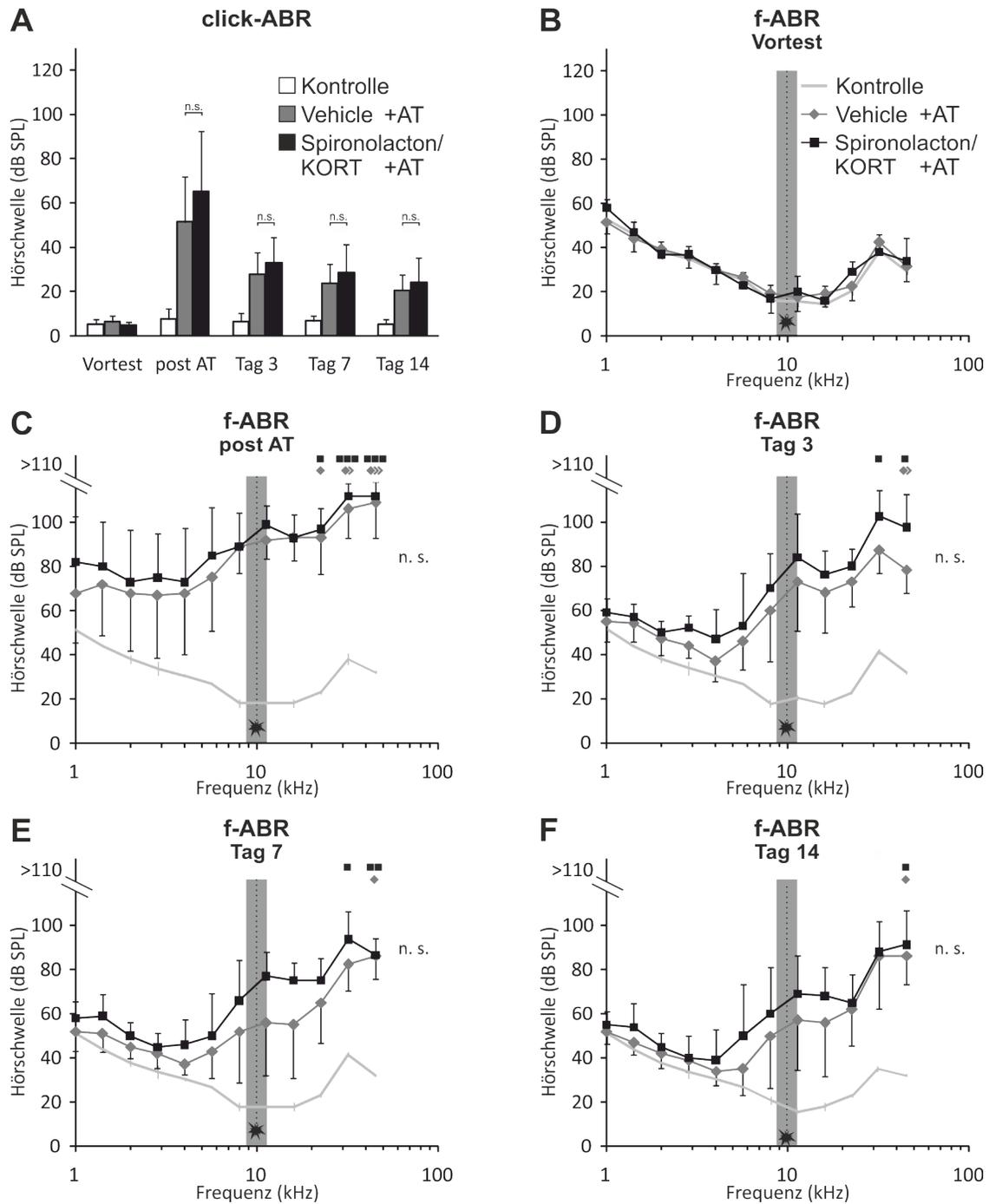


Abbildung 13. Audiometrische Untersuchungen des Effekts von Spironolacton/KORT auf die Hörschwellenremission nach Schallexposition. **(A)** Click-ABR-Hörschwellen für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und Spironolacton/KORT + AT (schwarzer Balken, n=5) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf von vor der Schallexposition (Vortest) bis zwei Wochen nach Schallexposition (Tag 3, 7 und 14). Im Detail sind die frequenzspezifischen ABR-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), Spironolacton/KORT + AT (Vierecke) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Schallexposition dargestellt. Der Hauptfrequenzbereich der zur Vertäubung verwendeten Schallexposition ist in (B-D) als grauer Balken abgebildet. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Rauten und Vierecke > 110 markieren Einzelohren in der jeweiligen Versuchsgruppe, für die keine Hörschwelle bestimmbar war (da Hörschwelle > 110 dB SPL).

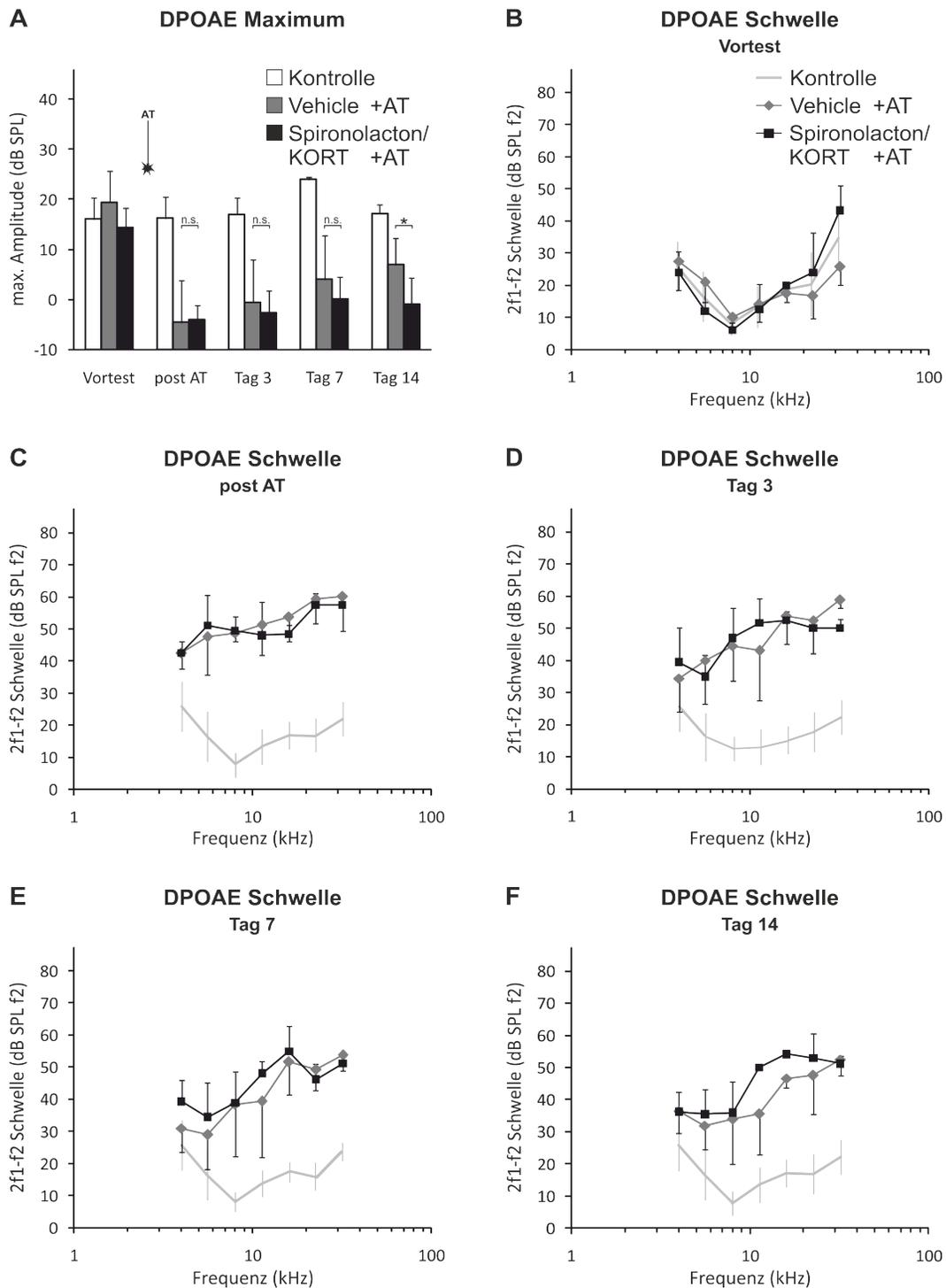


Abbildung 14. Untersuchungen des Effekts von Spironolacton/KORT auf die Hörschwelle nach Schallexposition. **(A)** DPOAE Maximum-Amplituden für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und Spironolacton/KORT + AT (schwarzer Balken, n=5) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf. Im Detail sind die frequenzspezifischen DPOAE-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), Spironolacton/KORT + AT (Quadrate) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Schallexposition dargestellt. Alle Daten als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt.

3.1.4 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten

Die Inhibition der MR bei zeitgleicher pharmakologischer Stressinduktion zeigte im Gegensatz zur reinen KORT-Behandlung keine negativen Effekte auf die Schallvulnerabilität der Versuchstiere. Weiterhin der Frage nachgehend, über welche Kortikosteroidrezeptor-Subtypen pharmakologisch induzierter Stress die Hörfunktion der Versuchstiere modulieren konnte, wurde in einem letzten Schritt der Einfluss von Glukokortikoidrezeptoren (GR) auf die Hörfunktion nach einer Schallexposition untersucht. Hierzu wurden die Versuchstiere gleichzeitig zu KORT mit dem GR-Antagonisten Mifepriston 90 Minuten vor Beginn der akustischen Überstimulation behandelt.

Im gruppeninternen Vergleich, Vortest zu direkt nach Trauma, verzeichneten beide Gruppen eine statistisch signifikante Hörschwellenabwanderung (Abbildung 15A, Vehikel+AT: Vortest 6.3 dB SPL \pm 2.98 dB, post AT 51.5 dB SPL \pm 20.40 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, Mifepriston/KORT+AT: Vortest 6.4 dB SPL \pm 3.90 dB, post AT 87.7 dB SPL \pm 7.67 dB, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$; Abbildung 15B/Abbildung 15C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$, Mifepriston/KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$).

In Vormessungen konnten innerhalb der Versuchsgruppen „Kontrolle“, „Vehikel+AT“ und „Mifepriston/KORT+AT“ keine Unterschiede bezüglich der Hörfunktionen festgestellt werden (Abbildung 15A Vortest und Abbildung 15B). Eine statistisch signifikant stärkere Schwellenabwanderung wurde in den Mifepriston/KORT behandelten Versuchstieren im Vergleich zur Vehikel-Behandlung direkt nach der Schallexposition beobachtet (Abbildung 15A post AT, Vehikel+ AT: 51.5 dB SPL \pm 20.40 dB, Mifepriston/KORT+AT: 87.7 dB SPL \pm 7.67 dB, t-test: $p < 0.0001$; Abbildung 15C, 2way-ANOVA: $p < 0.0001$).

Drei, sieben und auch 14 Tage nach der Schallexposition bestand zwischen den Mifepriston/KORT und Vehikel behandelten Versuchstieren weiterhin ein statistisch

signifikanter Unterschied der Hörschwelle im Bereich höherer Frequenzen (Abbildung 15A, Tag 3 Vehikel+AT 27.90 dB SPL \pm 9.88 dB, Mifepriston/KORT+AT 43.00 dB SPL \pm 8.41 dB, t-test: $p=0.0017$; Tag 7 Vehikel+AT 23.00 dB SPL \pm 8.80 dB, Mifepriston/KORT+AT 29.50 dB SPL \pm 4.07 dB, t-test: $p=0.0401$; Tag 14 Vehikel+AT 20.70 dB SPL \pm 6.80 dB, Mifepriston/KORT+AT 29.60 dB SPL \pm 4.52 dB, t-test: $p=0.0030$; Abbildung 15D-F, 2way-ANOVA: $p<0.0001$).

DPOAE-Messungen zeigten im gruppeninternen Vergleich direkt nach der Schallexposition eine statistisch signifikante Reduktion der DPOAE Amplituden (Abbildung 16A, Vehikel+AT: Vortest 19.4 dB SPL \pm 6.26 dB, post AT -4.5 dB SPL \pm 8.33 dB, 2way-ANOVA: $p<0.001$, Mifepriston/KORT+AT: Vortest 14.90 dB SPL \pm 3.34 dB, post AT -6.60 dB SPL \pm 1.21 dB, 2way-ANOVA: $p<0.0001$) und DPOAE Schwellen (Abbildung 16B/Abbildung 16C, Vehikel+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Mifepriston/KORT+AT Vortest/post AT, 2way-ANOVA: $p<0.0001$). Diese Reduktion der DPOAE Amplitude beziehungsweise Schwelle blieb über den weiteren gemessenen Zeitraum von 14 Tagen weiterhin erhalten (Abbildung 16B/Abbildung 16F, Vehikel+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$, Mifepriston/KORT+AT Vortest/Tag 14, 2way-ANOVA: $p<0.0001$).

In den DPOAE-Messungen wurde im Gruppenvergleich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Vehikel und Mifepriston/KORT behandelten Versuchstieren direkt und bis zu sieben Tage nach der Schallexposition bezüglich der Amplituden und Schwellen verzeichnet (Abbildung 16A post AT Vehikel+AT -4.5 dB SPL \pm 8.33 dB, Mifepriston/KORT+AT -6.60 dB SPL \pm 1.21 dB, t-test: $p=0.5977$; Tag 3 Vehikel+AT -0.40 dB SPL \pm 8.35 dB, Mifepriston/KORT+AT 3.60 dB SPL \pm 5.67 dB, t-test: $p=0.4019$; Tag 7 Vehikel+AT 4.10 dB SPL \pm 8.76 dB, Mifepriston/KORT+AT 2.20 dB SPL \pm 8.07 dB, t-test: $p=0.7308$; Abbildung 16D, 2way-ANOVA: $p=0.1987$; Abbildung 16E, 2way-ANOVA: $p=0.2229$).

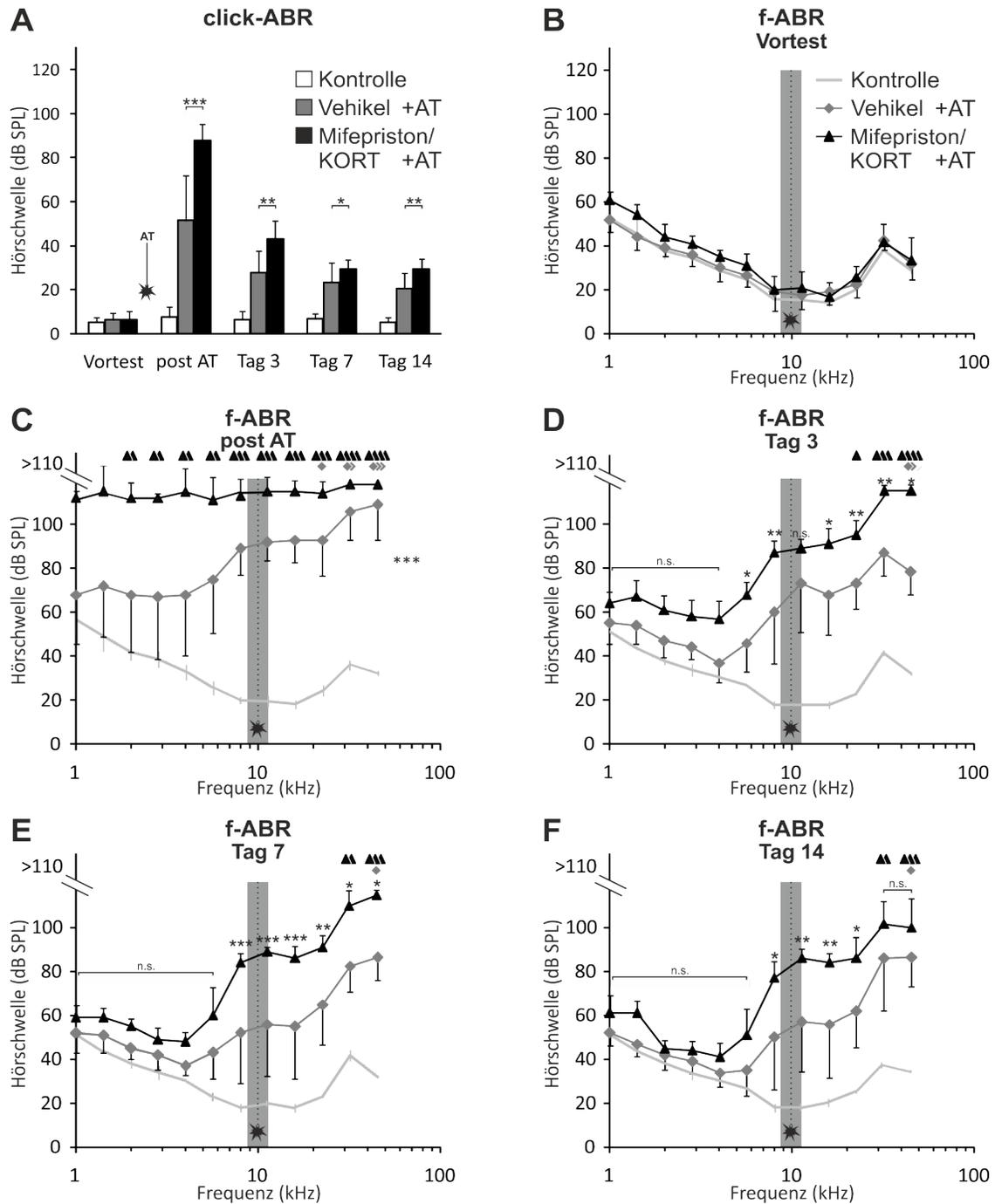


Abbildung 15. Audiometrische Untersuchungen des Effektes von Mifepriston/KORT auf die Hörschwellenremission nach Schallexposition. **(A)** Click-ABR-Hörschwellen für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und Mifepriston/KORT + AT (schwarzer Balken, n=5) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf von vor der Schallexposition (Vortest) bis zwei Wochen nach Schallexposition. Im Detail sind die frequenzspezifischen ABR-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), Mifepriston/KORT + AT (Dreiecke) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Schallexposition dargestellt. Der Hauptfrequenzbereich der Schallexposition ist in (B-D) als grauer Balken abgebildet. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt. Rauten und Dreiecke > 110 markieren Einzelohren in der jeweiligen Versuchsgruppe, für die keine Hörschwelle bestimmbar war (da Hörschwelle > 110 dB SPL).

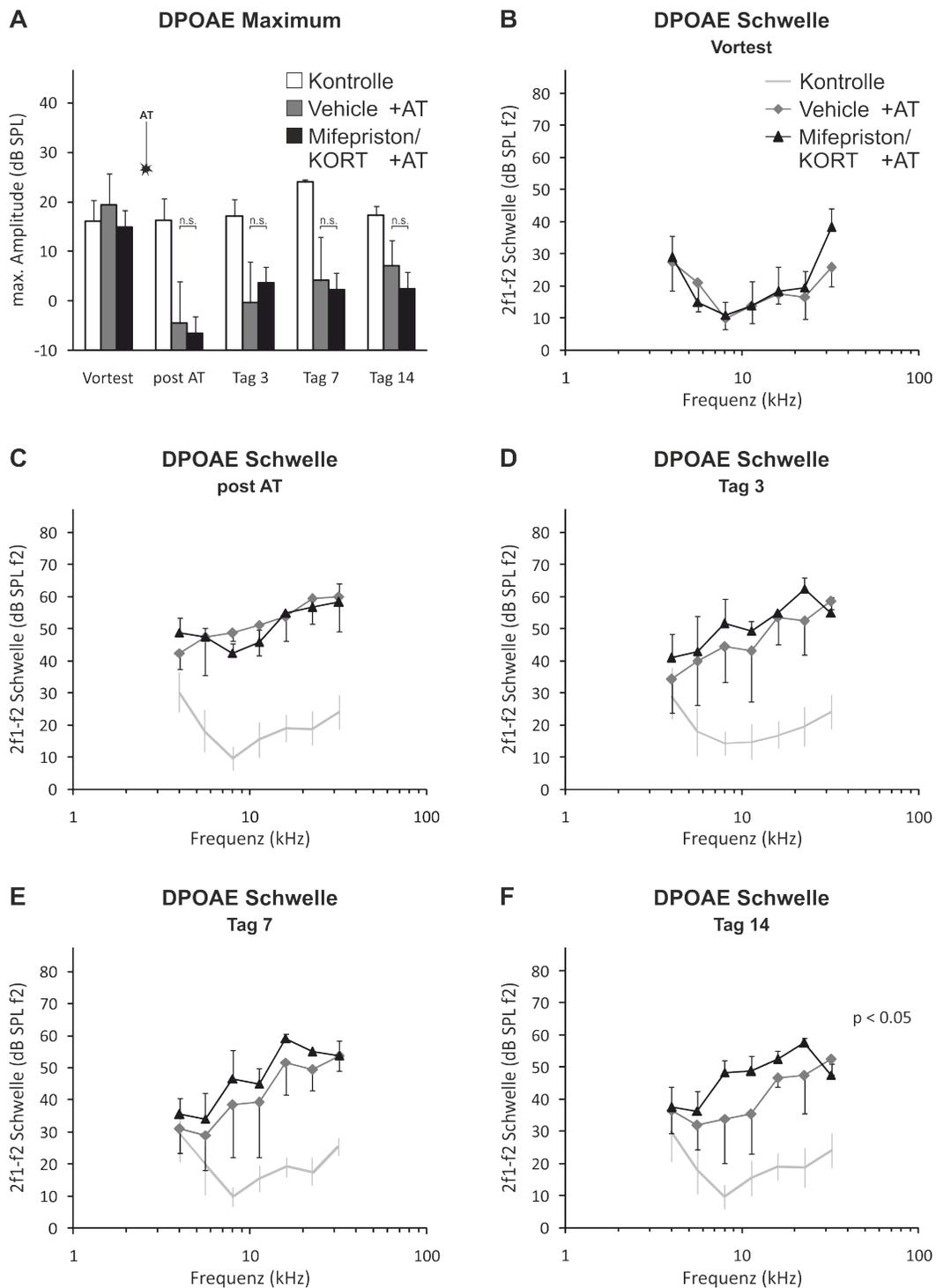


Abbildung 16. Audiometrische Untersuchungen des Effektes von Mifepriston/KORT. **(A)** DPOAE Maximum-Amplituden für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5) und Mifepriston/KORT + AT (schwarzer Balken, n=5) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf. Im Detail sind die frequenzspezifischen DPOAE-Schwellen für Vehikel + AT (Rauten), Mifepriston/KORT + AT (Dreiecke) und Kontrolle (hellgraue Kurve) zu den Zeitpunkten **(B)** Vortest, **(C)** direkt nach Trauma, **(D)** Tag 3, **(E)** Tag 7 und **(F)** Tag 14 nach Schallexposition dargestellt. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt.

14 Tage nach der akustischen Schallexposition wurde durch Mifepriston/KORT-Behandlung relativ zur Vehikel-Behandlung eine statistisch signifikante Erhöhung der DPOAE Schwelle und eine allerdings statistisch nicht signifikante Reduktion DPOAE Amplitude verzeichnet (Abbildung 16A Tag 14 Vehikel+AT 7.00 dB SPL \pm 5.23 dB, Mifepriston/KORT+AT -7.40 dB SPL \pm 4.60 dB, t-test: $p=0.1726$; Abbildung 16F, 2way-ANOVA: $p=0.0201$).

Da DPOAE-Signale Auskunft über die Funktionalität der ÄHZ geben, ist die Beteiligung der ÄHZ an dem zuvor beschriebenen signifikant stärkeren Hörverlust der mit Mifepriston behandelten Versuchstiere naheliegend.

Vergleicht man die click- und frequenzabhängigen ABR-Schwellen der Versuchsgruppen KORT + AT (reine pharmakologische Stressinduktion) und Mifepriston/KORT + AT (zusätzliche GR-Inhibition), zeigt sich unmittelbar nach der Schallexposition eine nicht signifikante, dennoch deutlich stärkere Schwellenabwanderung in GR-inhibierten Versuchstieren (Abbildung 17A post AT, KORT+AT: 75.38 dB SPL \pm 18.33 dB, Mifepriston/KORT+AT: 87.70 dB SPL \pm 7.67 dB SPL, t-test: $p=0,0745$; Abbildung 17B, KORT+AT/Mifepriston/KORT+AT 2way-ANOVA: $p=0,0846$). Dieser hörfunktionell gemessene durch GR-Rezeptorinhibition vermittelte Schaden zeigt sich über den gesamten Verlauf der 14 Tage stärker als bei isolierter KORT-Behandlung (Abbildung 17C Vehikel+AT/Mifepriston/KORT+AT, 2way-ANOVA: $p=0.0747$).

Zusammenfassend verstärkte die pharmakologische Induktion von Stress (3 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) bei zeitgleicher Inhibition der Glukokortikoidrezeptoren durch Mifepriston-Behandlung (100 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) 90 Minuten vor der Schallexposition deutlich die Schwellenabwanderung im hochfrequenten Bereich im Vergleich zur Vehikel- und isolierten Kortikosteron-Behandlung. Es zeigte sich eine erhöhte Vulnerabilität der Hörfunktion. Auch der Remissionsverlauf verzeichnete im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen ein deutliches Defizit. Die Vulnerabilität und Erholung der

Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation wurde somit wesentlich von der Aktivierung der Glukokortikoidrezeptoren beeinflusst.

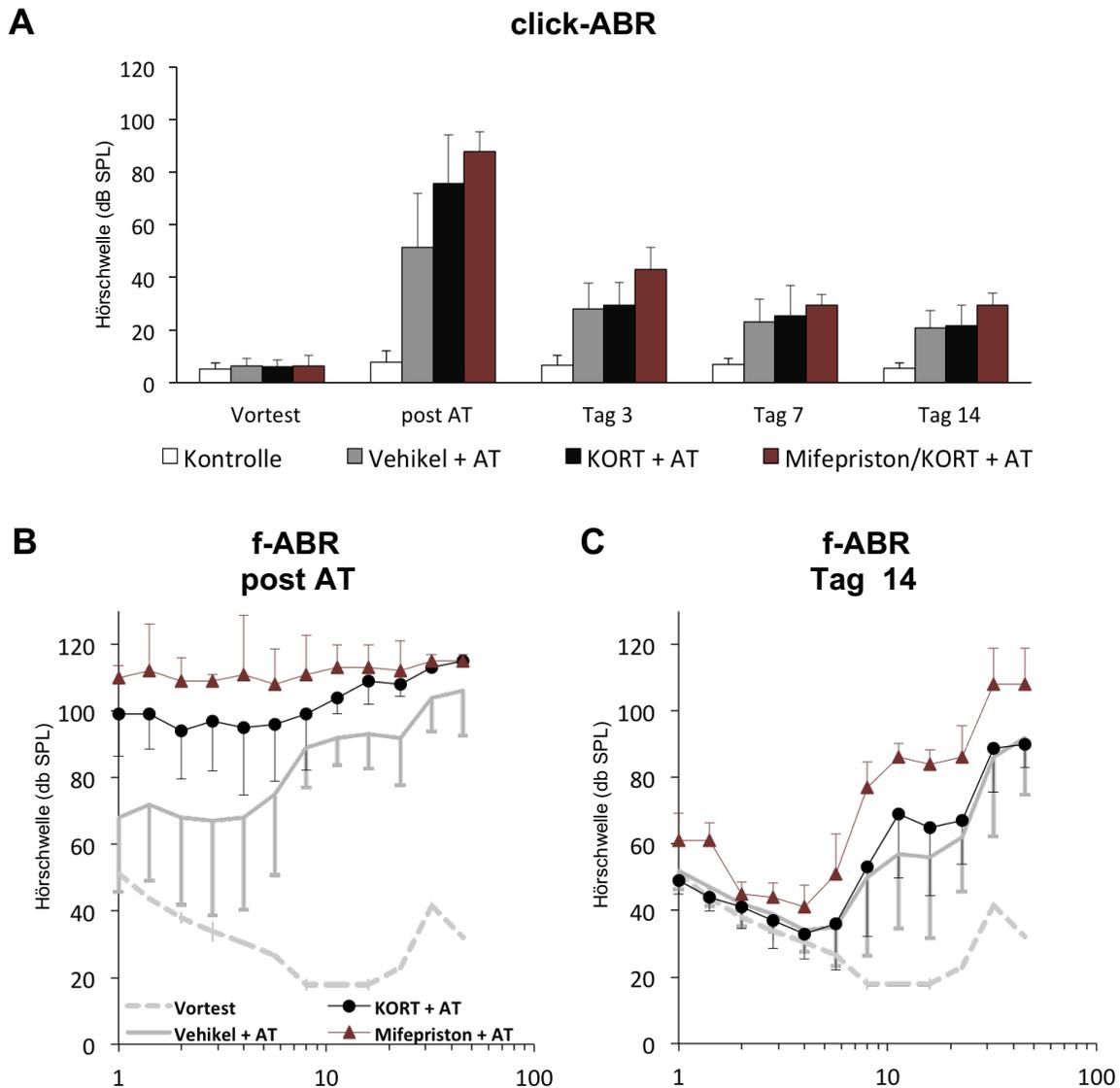


Abbildung 17. Untersuchungen der Versuchstiere bei Stressinduktion durch KORT-Behandlung und zeitgleicher GR-Inhibition im direkten Vergleich. **(A)** Click-ABR-Hörschwellen für Kontrollen (weißer Balken, n=5), Vehikel + AT (grauer Balken, n=5), KORT + AT (schwarzer Balken, n=5) und Mifepriston/KORT + AT (brauner Balken, n=5) behandelte Ratten im zeitlichen Verlauf von vor der Schallexposition (Vortest) bis zwei Wochen nach Schallexposition (Tag 14). Im Detail sind die frequenzspezifischen ABR-Schwellen für gemittelte Vortests (graue gestrichelte Linie), Vehikel + AT (graue durchgezogene Linie), KORT + AT (Kreise) und Mifepriston/KORT + AT (Dreiecke) zu den Zeitpunkten **(B)** direkt nach Trauma und **(C)** Tag 14 nach Schallexposition dargestellt.

3.2 Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen

Als Maß für die Integrität der synaptischen Signalübertragung an der IHZ kann die Anzahl der Ribbon-Synapsen verwendet werden (Kujawa and Liberman 2009).

Um den Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress auf den Phänotyp Innerer Haarsinneszellen (IHZ) in Abhängigkeit verschiedener Kortikosteroidrezeptor-Subtypen zu überprüfen, wurde Versuchstieren 90 Minuten vor akustischer Überstimulation (116 dB, 10 kHz, 60 Minuten) Kortikosteron (KORT; 3mg/kg Körpergewicht) zeitgleich mit einer Vehikel-Substanz (Ethanol/PEG 1:10, 2 ml/kg Körpergewicht) beziehungsweise einem Mineralokortikoid oder Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten (Spironolacton, 100 mg/kg Körpergewicht, oder Mifepriston, 100 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht.

Dazu wurden afferente synaptische Strukturen der IHZ mittels immunhistochemischer Methoden untersucht. Als Primäantikörper wurden monoklonale Maus Antikörper gegen CtBP2 (anti-CtBP2/RIBEYE) und polyklonale Kaninchen Antikörper gegen Otoferlin1 verwendet (Tabelle 1). Es erfolgte die Bestimmung der Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Strukturen in einer repräsentativen Menge aktiver Zonen verschiedener Cochlea-Windungen (apikal: 2–7 kHz, medial: 8–16 kHz, midbasal: 17-24 kHz und basal:>25 kHz (Müller 1991)) anhand von mikroskopisch erstellten Z-Stacks (Abbildung 18). Das Cochlea-Gewebe für diese Analyse wurde 14 Tage nach der Substanzbehandlung und Schallexposition gewonnen und präpariert.

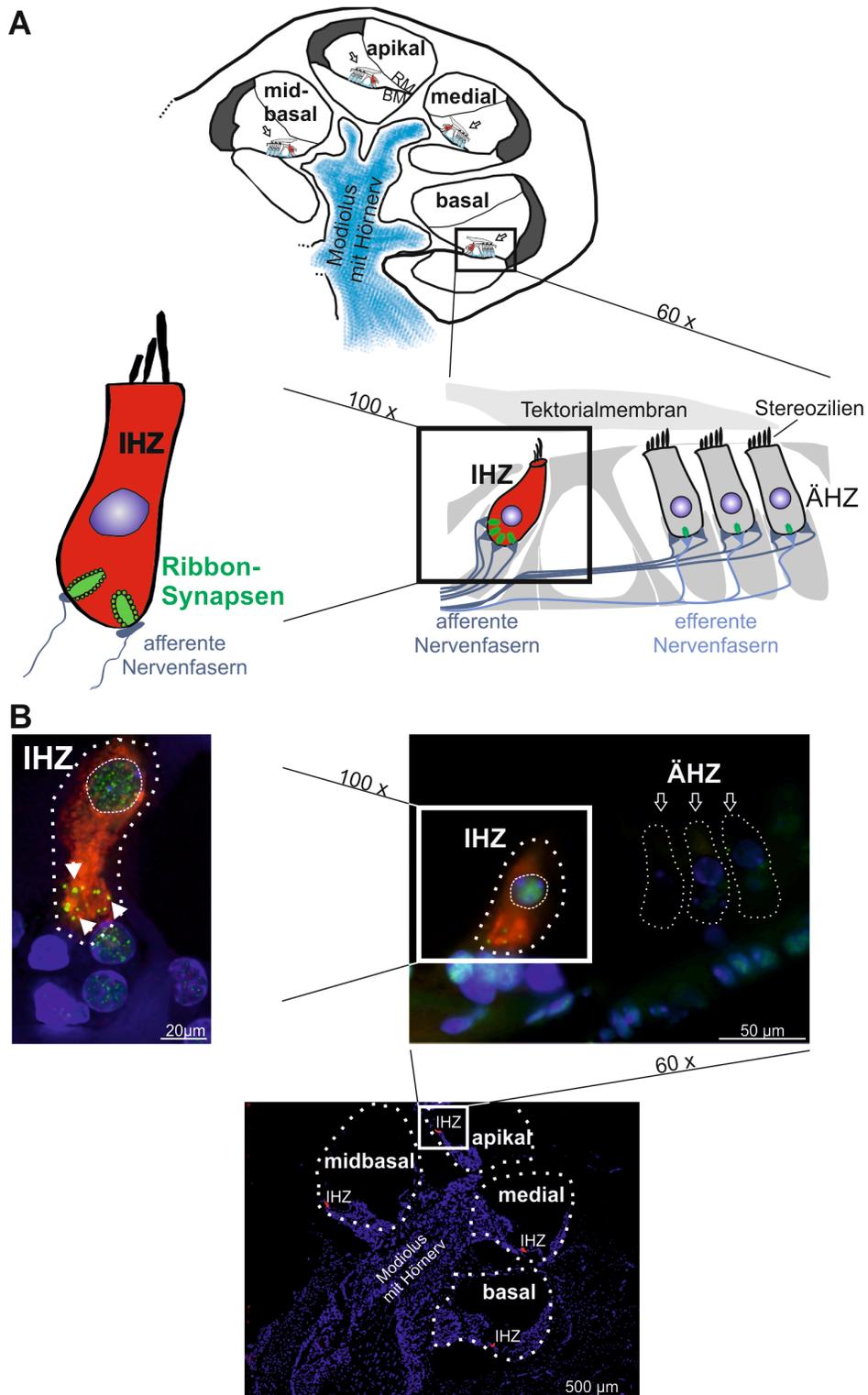


Abbildung 18. Immunhistochemische Analyse der Ribbon-Synapsen. **(A)** Schematische Darstellung und **(B)** immunhistochemische Aufnahmen. Mithilfe von Z-Stapeln wurde die Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Strukturen in einer repräsentativen Menge aktiver Zonen verschiedener Cochlea-Windungen ermittelt. Rote Zellen: IHZ, grüne Punkte am basalen Zellpol: CtBP2/RIBEYE-positive Ribbon-Synapsen.

3.2.1 Kortikosteron-Behandlung ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung

Aktive Zonen wurden in apikaler, medialer, midbasaler und basaler Windung in Kontrolle, Vehikel und KORT behandelten Tieren nach Schallexposition gezählt.

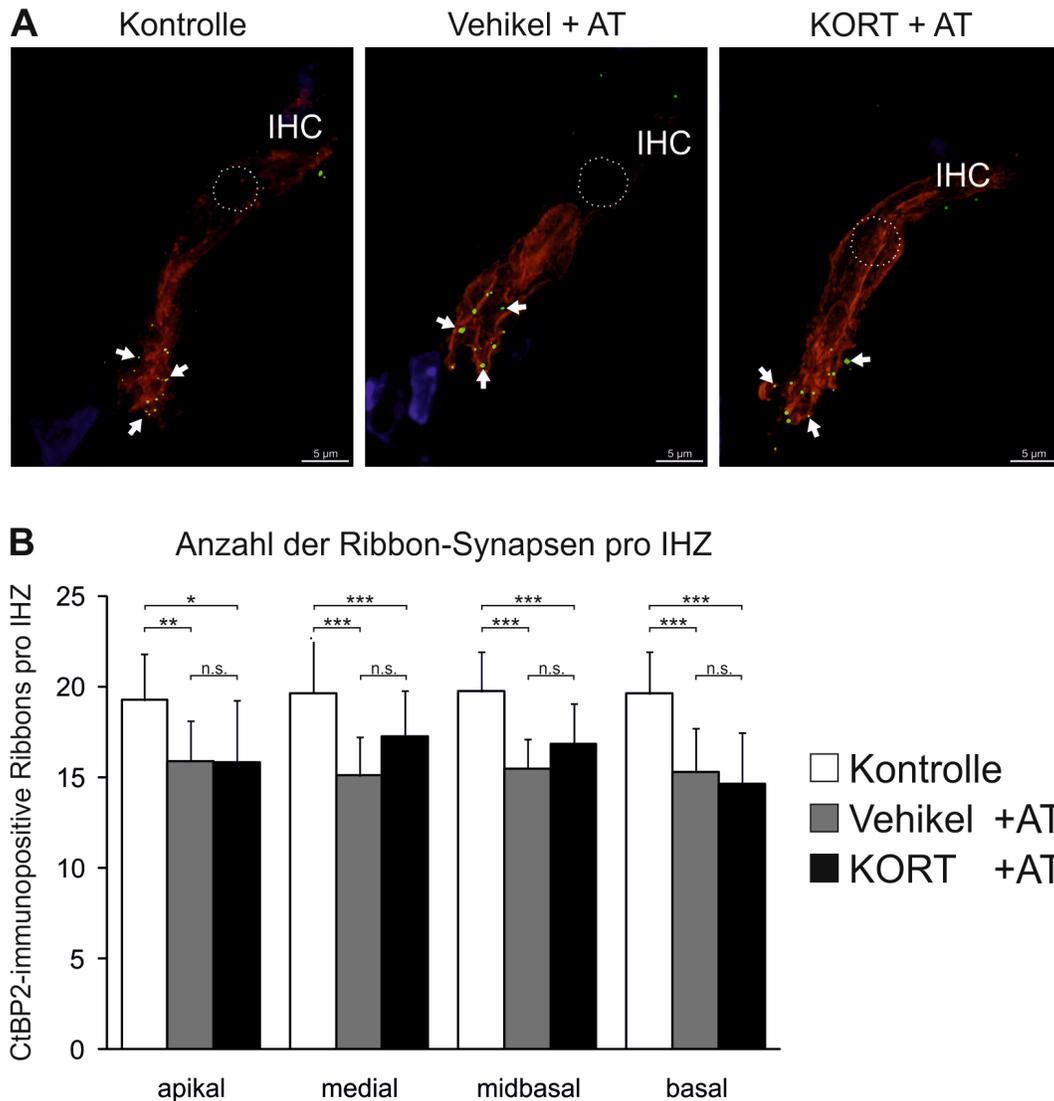


Abbildung 19. Immunhistochemische Untersuchung des Effektes von KORT auf den IHZ Phänotyp nach Schallexposition. **(A)** zeigt exemplarisch Färbungen im basalen Abschnitt der Cochlea für Tiere der Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und KORT+AT. CtBP2/RIBEYE-positive Ribbon-Synapsen (grüne Punkte) sind durch weiße Pfeile beispielhaft hervorgehoben. Maßstab: 5 μ m. **(B)** Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHZ von Kontrolle (weiße Balken), Vehikel+AT (graue Balken) und KORT+AT (schwarze Balken) in der apikalen, medialen, midbasalen und basalen Windung der Cochlea. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanz (t-test) ist mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt.

Abbildung 19A zeigt eine repräsentative CtBP2-immunhistochemische Aufnahme von IHZ im basalen Teil der Cochlea von Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und KORT+AT.

Es kam in allen ausgewerteten Windungen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von CtBP2-immunpositiven Ribbon-Synapsen an den IHZ von Vehikel und KORT behandelten Versuchstieren nach der Schallexposition im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tabelle 2 und Abbildung 19B, Vehikel + AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.01$, medial: $p < 0.0001$, midbasal: $p < 0.0001$, basal: $p < 0.0001$, KORT+AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.05$, medial: $p < 0.05$, midbasal: $p < 0.0001$, basal: $p < 0.0001$). Zwischen den Vehikel und KORT behandelten Versuchstieren konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Verlustes der Ribbon-Synapsen festgestellt werden (Tabelle 2 und Abbildung 19B, Vehikel+AT/KORT+AT, t-test, apikal: $p = 0.9509$, medial: $p = 0.0561$, midbasal: $p = 0.0543$, basal: $p = 0.2944$).

Tabelle 2. Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHZ (Mittelwert \pm SD)

	apikal	medial	midbasal	basal
Kontrolle	19.25 \pm 2.55, n=5	19.64 \pm 3.20, n=5	19.72 \pm 2.19, n=5	19.62 \pm 2.27, n=5
Vehikel + AT	15.91 \pm 2.21, n=5	15.09 \pm 2.13, n=5	15.48 \pm 1.63, n=5	15.28 \pm 2.42, n=5
KORT + AT	15.83 \pm 3.43, n=5	17.23 \pm 2.53, n=5	16.81 \pm 2.27, n=5	14.64 \pm 2.82, n=5

Abbildung 19B zeigt die zugehörige graphische Darstellung.

Zusammenfassend wurde die Integrität der synaptischen Strukturen an den IHZ durch eine pharmakologische Stressinduktion (Kortikosteron, 3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) vor einer akustischen Überstimulation nicht signifikant beeinflusst. So konnte kein statistisch signifikanter Unterschied

bezüglich des Verlustes der Ribbon-Synapsen an den IHZ zwischen Vehikel+AT- und KORT+AT-Behandlung festgestellt werden.

3.2.2 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Hemmung der endogenen Kortikosteron-Produktion

Nachdem durch pharmakologische Stressinduktion über reine KORT-Gabe kein Effekt auf den IHZ Phänotyp festgestellt werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt die Anzahl der Ribbon-Synapsen nach pharmakologisch induziertem Stress und zeitgleicher Hemmung der endogenen KORT-Produktion analysiert. Hierfür wurden die Versuchstiere 90 Minuten vor der akustischen Überstimulation zeitgleich mit Metyrapon und KORT behandelt.

Abbildung 20A zeigt repräsentative CtBP2-immunhistochemische Aufnahmen des basalen IHZ-Pols im basalen Teil der Cochlea eines Kontrolle, Vehikel und KORT/Metyrapon behandelten Tieres nach Schalleexposition.

Die immunhistochemische Auswertung bestätigte eine signifikante Reduktion der Anzahl CtBP2-immunpositiver Ribbon-Synapsen in allen untersuchten Cochlea-Windungen der Vehikel+AT und Metyrapon/KORT+AT behandelten Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tabelle 3 und Abbildung 20B, Vehikel+AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.01$, medial: $p < 0.0001$, midbasal: $p < 0.0001$, basal: $p < 0.0001$, Metyrapon/KORT+AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.05$, medial: $p < 0.01$, midbasal: $p < 0.001$, basal: $p < 0.0001$).

Zwischen Vehikel und Metyrapon/KORT behandelten Versuchstieren konnte kein Unterschied in der apikalen, medialen und midbasalen Windung bezüglich der Anzahl der Ribbon-Synapsen festgestellt werden (Tabelle 3 und Abbildung 20B, Vehikel+AT/Metyrapon/KORT+AT, t-test, apikal: $p = 0.4312$, medial: $p = 0.0599$, midbasal: $p = 0.2899$).

Im Gegensatz dazu wurde in den IHZ aus basalen Windungen von Metyrapon/KORT behandelten Versuchstieren im Vergleich zur Vehikel-Gabe eine stärkere, statistisch signifikante, Reduktion der Anzahl von Ribbon-Synapsen verzeichnet (Tabelle 3 und Abbildung 20B, Vehikel+AT/Metyrapon/KORT+ AT, t-test, basal: $p < 0.05$).

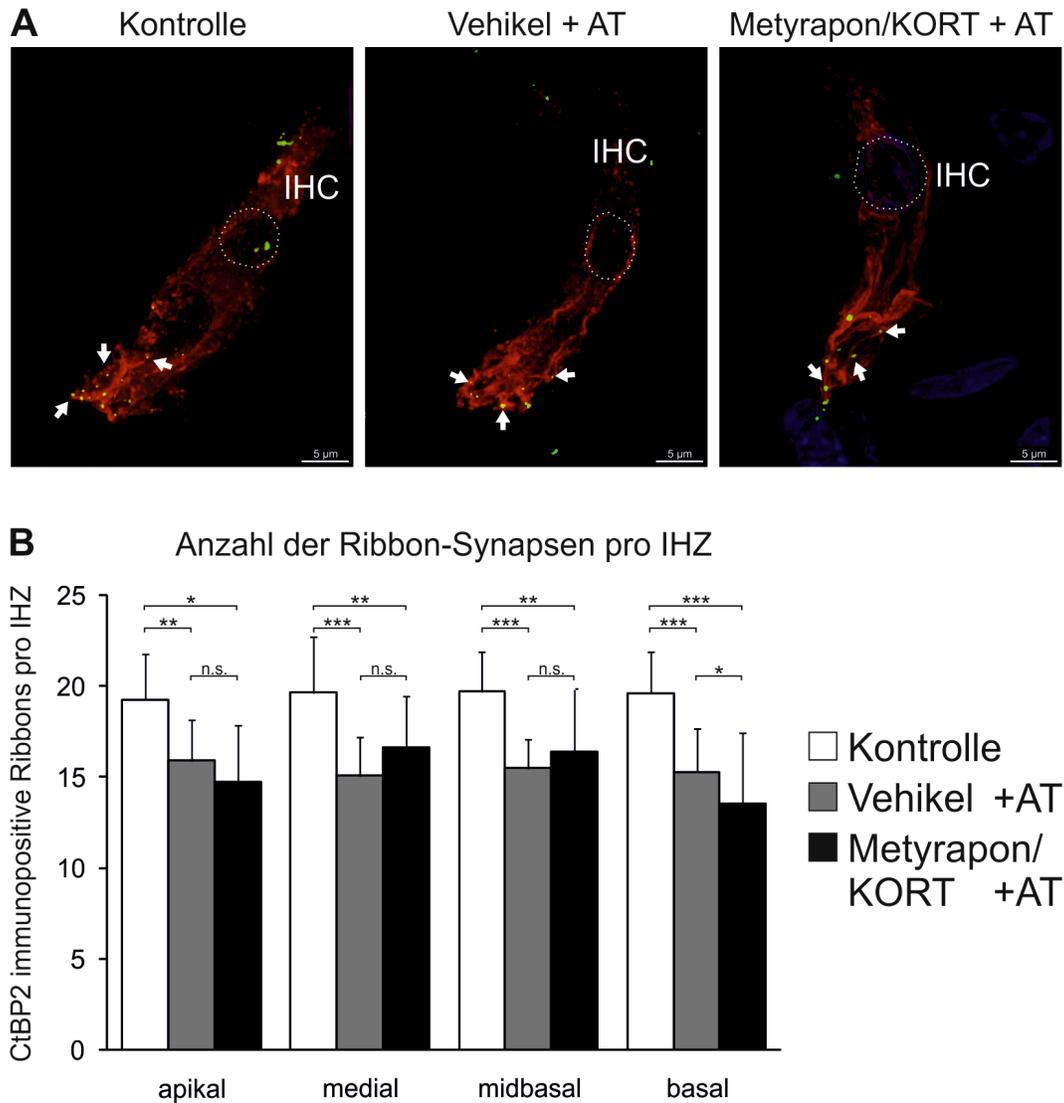


Abbildung 20. Immunhistochemische Untersuchung des Effektes von Metyrapon/KORT auf den IHZ Phänotyp nach Schallexposition. **(A)** zeigt exemplarisch Färbungen im basalen Abschnitt der Cochlea für Tiere der Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und Metyrapon/KORT+AT. CtBP2/RIBEYE-positive Ribbon-Synapsen (grüne Punkte) sind durch weiße Pfeile beispielhaft hervorgehoben. Maßstab: 5 μ m. **(B)** Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHZ von Kontrolle (weiße Balken), Vehikel+AT (graue Balken) und Metyrapon/KORT+AT (schwarze Balken) in der apikalen, medialen, midbasalen und basalen Windung der Cochlea. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanz (t-test) ist mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt.

Die basale Region der Ratten-Cochlea repräsentiert nach Frequenzkarte vor allem den Perzeptionsbereich für höhere Frequenzen ab 25 kHz (Müller 1991) und entsprach demnach - analog zur Schallexposition mit einer Zentrumsfrequenz von 10 kHz – dem Bereich mit einem großem zu erwartenden Schaden.

Tabelle 3. Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHZ (Mittelwert \pm SD)

	apikal	medial	midbasal	basal
Kontrolle	19.25 \pm 2.55, n=5	19.64 \pm 3.20, n=5	19.72 \pm 2.19, n=5	19.62 \pm 2.27, n=5
Vehikel + AT	15.91 \pm 2.21, n=5	15.09 \pm 2.13, n=5	15.48 \pm 1.63, n=5	15.28 \pm 2.42, n=5
Metyrapon/ KORT + AT	14.75 \pm 3.09 n=5	16.66 \pm 2.82, n=5	16.36 \pm 3.53, n=5	13.53 \pm 3.90, n=5

Abbildung 20B zeigt die zugehörige graphische Darstellung.

Zusammenfassend wurde die Integrität der synaptischen Strukturen an den IHZ in Cochlea-Regionen hoher Frequenzen im Vergleich zur Vehikel-Behandlung statistisch signifikant stärker bei pharmakologischer Stressinduktion durch KORT-Gabe (3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) und zeitgleicher Hemmung der endogenen KORT-Synthese (Metyrapon, 10 mg/kg Körpergewicht, i.p.) beeinflusst. Die endogene KORT-Synthese könnte in diesem Zusammenhang einen bedeutenden Einfluss auf die Integrität der Ribbon-Synapsen hochfrequenter IHZ und den Remissionsverlauf dieser nach einer Schallexposition besitzen.

3.2.3 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten

Um den Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress in Abhängigkeit von verschiedenen Kortikosteroidrezeptor-Subtypen zu überprüfen, wurden die Versuchstiere vor der Schallexposition zusätzlich zu KORT mit dem Mineralokortikoidrezeptor (MR)-Antagonisten Spironolacton behandelt und deren Cochleae bzw. IHZ Phänotyp 14 Tage darauf mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert.

Eine repräsentative CtBP2/RIBEYE-Färbung basaler IHZ der einzelnen Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und Spironolacton/KORT+AT ist in Abbildung 21A dargestellt.

Die Untersuchung der Ribbon-Synapsen zeigte eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl der Ribbon-Synapsen in allen Windungen der Vehikel und Spironolacton/KORT behandelten und beschallten (AT) Versuchstiere im Vergleich zu Kontrolltieren (Tabelle 4 und Abbildung 21B, Vehikel+AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.01$, medial: $p < 0.0001$, midbasal: $p < 0.0001$, basal: $p < 0.0001$, Spironolacton/KORT+AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.01$, medial: $p < 0.0001$, midbasal: $p < 0.0001$, basal: $p < 0.0001$).

Tabelle 4. Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHZ (Mittelwert \pm SD).

	apikal	medial	midbasal	basal
Kontrolle	19.25 \pm 2.55, n=5	19.64 \pm 3.20, n=5	19.72 \pm 2.19, n=5	19.62 \pm 2.27, n=5
Vehikel + AT	15.91 \pm 2.21, n=5	15.09 \pm 2.13, n=5	15.48 \pm 1.63, n=5	15.28 \pm 2.42, n=5
Spironolacton/ KORT + AT	13.67 \pm 4.27 n=4	14.56 \pm 3.13, n=4	14.54 \pm 3.58, n=4	11.58 \pm 3.20, n=4

Abbildung 21B zeigt die zugehörige graphische Darstellung.

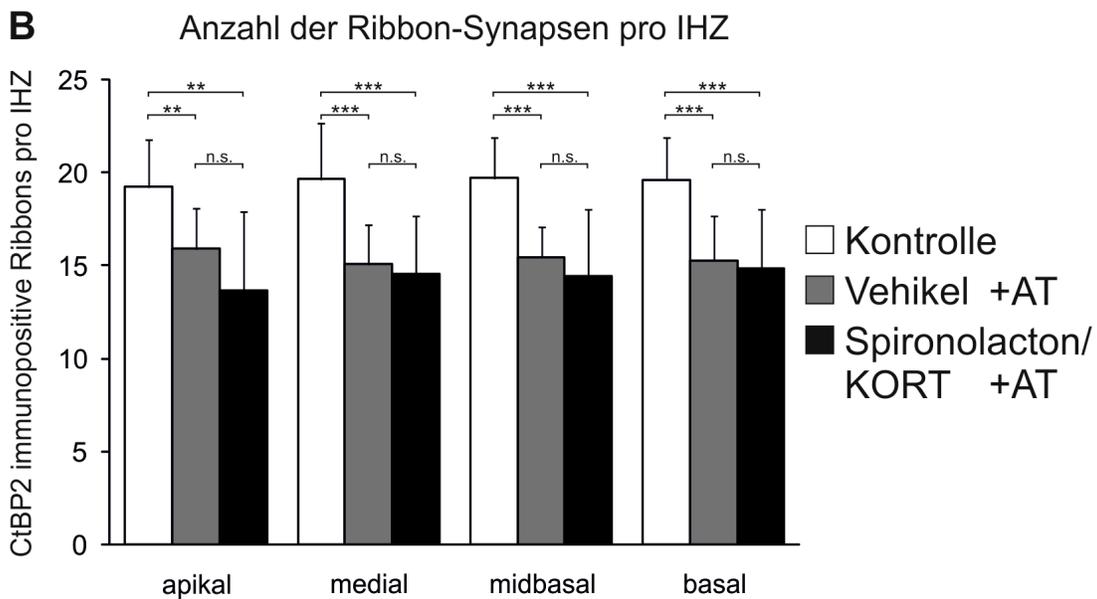
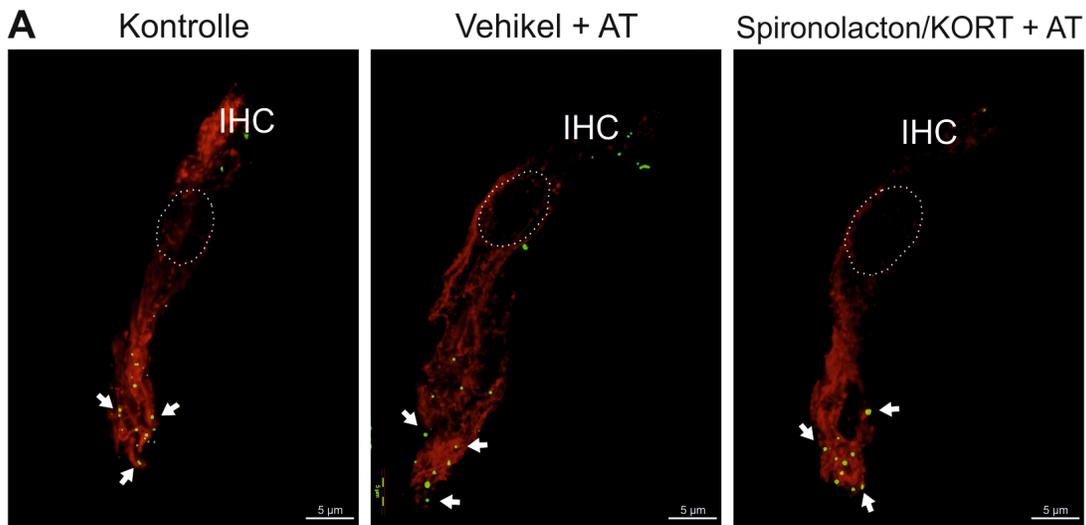


Abbildung 21. Immunhistochemische Untersuchung des Effektes von Spironolacton/KORT auf den IHZ Phänotyp nach Schallexposition. **(A)** zeigt exemplarisch Färbungen im basalen Abschnitt der Cochlea für Tiere der Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und Spironolacton/KORT+AT. CtBP2/RIBEYE-positive Ribbon-Synapsen (grüne Punkte) sind durch weiße Pfeile beispielhaft hervorgehoben. Maßstab: 5μm. **(B)** Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHZ von Kontrolle (weiße Balken), Vehikel+AT (graue Balken) und Spironolacton/KORT+AT (schwarze Balken) in der apikalen, medialen, midbasalen und basalen Windung der Cochlea. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanz (t-test) ist mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt.

Dagegen wurde zwischen den behandelten Versuchsgruppen Vehikel+AT und Spironolacton/KORT+AT kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Ribbon-Verlustes verzeichnet (Tabelle 4 und Abbildung 21B,

Vehikel+AT/Spirolacton/KORT+AT, t-test, apikal: $p=0.1690$, medial: $p=0.3059$, midbasal: $p=0.2394$, basal: $p=0.5237$).

Zusammenfassend wurde die Vulnerabilität synaptischer Strukturen an den IHZ durch pharmakologische Stressinduktion mit KORT-Injektion (3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) bei zeitgleicher Inhibition der MR (Spirolacton, 100 mg/kg Körpergewicht, i.p.) im Vergleich zur Vehikel-Behandlung nicht signifikant verändert. Es konnte zwischen Vehikel und Spirolacton/KORT behandelten und schallexponierten Versuchstieren an den IHZ kein Unterschied bezüglich des Verlustes von Ribbon-Synapsen festgestellt werden. Somit war die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen der IHZ nach Schallexposition in der hier vorgestellten Versuchsdurchführung nicht von der Aktivierung der MR abhängig.

3.2.4 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten

Nachdem in Versuchstieren die Inhibition der Glukokortikoidrezeptoren (GR) bei zeitgleicher KORT-Gabe vor der Schallexposition die Vulnerabilität der Hörfunktion im Vergleich zur Vehikel- und reinen KORT-Behandlung deutlich erhöhte (siehe unter 3.1.4) und auch der Remissionsverlauf ein Defizit aufwies, wurden die Cochleae dieser Versuchstiere im Folgenden mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht.

Abbildung 22A zeigt repräsentative CtBP2-immunhistochemische Aufnahmen basaler IHC der einzelnen Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und Mifepriston/KORT+AT.

Eine statistisch signifikante Reduktion der Anzahl von CtBP2-immunpositiven Ribbon-Synapsen zeigte die immunhistochemische Auswertungen der Windungen Vehikel und Mifepriston/KORT behandelter Versuchstiere nach der Schallexposition im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tabelle 5 und Abbildung 22B,

Vehikel+AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.01$, medial: $p < 0.0001$, midbasal: $p < 0.0001$, basal: $p < 0.0001$, Mifepriston/KORT+AT/Kontrolle, t-test, apikal: $p < 0.01$, medial: $p < 0.0001$, midbasal: $p < 0.0001$, basal: $p < 0.0001$).

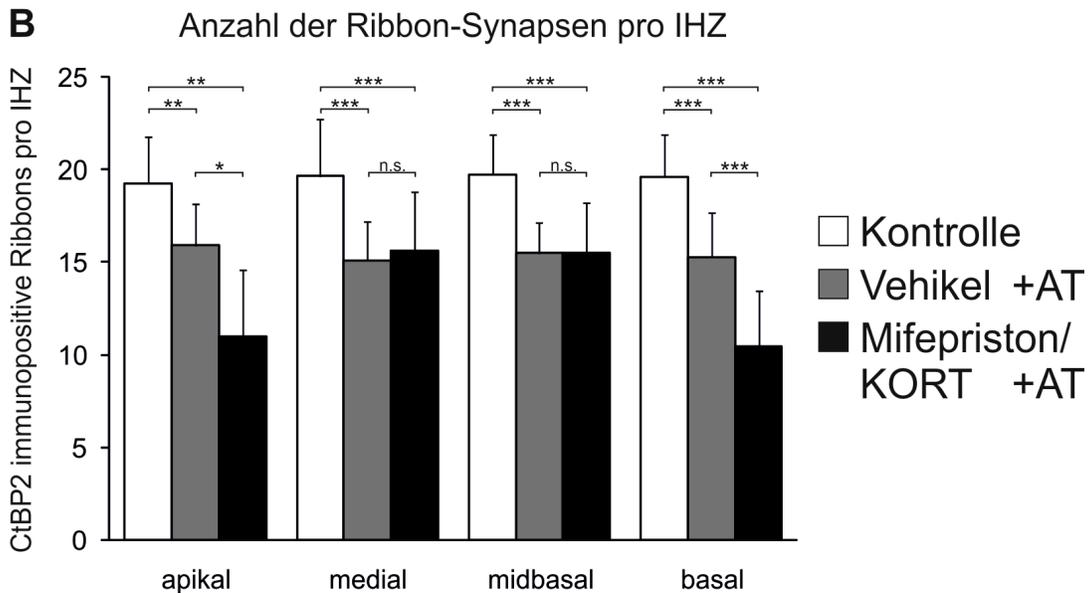
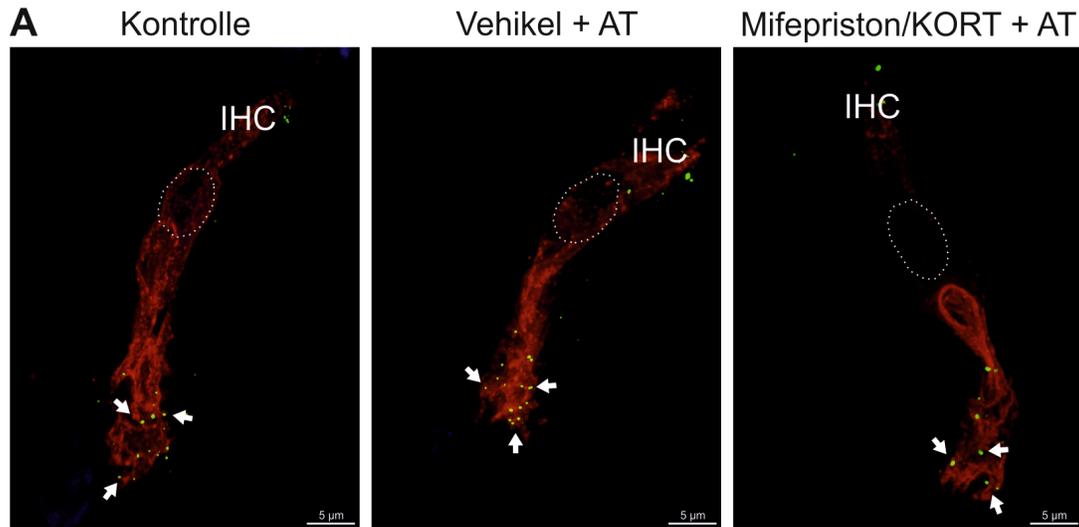


Abbildung 22. Immunhistochemische Untersuchung des Effektes von Mifepriston/KORT auf den IHC Phänotyp nach Schallexposition. (A) zeigt exemplarisch Färbungen im basalen Abschnitt der Cochlea für Tiere der Versuchsgruppen Kontrolle, Vehikel+AT und Mifepriston/KORT+AT. CtBP2/RIBEYE-positive Ribbon-Synapsen (grüne Punkte) sind durch weiße Pfeile beispielhaft hervorgehoben. Maßstab: 5 µm. (B) Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHC von Kontrolle (weiße Balken), Vehikel+AT (graue Balken) und Mifepriston/KORT+AT (schwarze Balken) in der apikalen, medialen, midbasalen und basalen Windung der Cochlea. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt. Statistische Signifikanz (t-test) ist mit Sternchen (*, **, ***) aufgeführt.

Während medial und midbasal keine signifikant verschiedene Änderung der Anzahl CtBP2-immunpositiver Ribbon-Synapsen in Mifepriston/KORT behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikel-Behandlung beobachtet werden konnte, zeigten die apikalen und viel erheblicher die basalen IHZ der Mifepriston/KORT+AT-Tiere einen statistisch signifikant stärkeren Verlust von Ribbon-Synapsen im Vergleich zur Vehikel-Behandlung (Tabelle 5 und Abbildung 22B, Vehikel+AT/Mifepriston/KORT+AT, t-test, apikal: $p < 0.05$, medial: $p = 0.7030$, midbasal: $p = 0.9716$, basal: $p < 0.0001$).

Tabelle 5. Anzahl der CtBP2/RIBEYE-positiven Ribbon-Synapsen pro IHZ (Mittelwert \pm SD).

	apikal	medial	midbasal	basal
Kontrolle	19.25 \pm 2.55, n=5	19.64 \pm 3.20, n=5	19.72 \pm 2.19, n=5	19.62 \pm 2.27, n=5
Vehikel + AT	15.91 \pm 2.21, n=5	15.09 \pm 2.13, n=5	15.48 \pm 1.63, n=5	15.28 \pm 2.42, n=5
Mifepriston/ KORT + AT	11.00 \pm 3.60, n=5	15.63 \pm 3.19, n=5	15.05 \pm 2.72, n=5	10.48 \pm 2.94, n=5

Abbildung 22 zeigt die zugehörige graphische Darstellung.

Die basale Region der Cochlea repräsentiert den Verarbeitungsbereich für hohe Frequenzen ab 25 kHz (Müller 1991) und entspricht somit der Cochlea-Region, in der durch eine Schalleexposition mit einer Zentrumsfrequenz von 10 kHz ein großer zu erwartender Schaden entsteht. So war der signifikante Unterschied zwischen der Anzahl von CtBP2-immunpositiven Ribbon-Synapsen der Vehikel und KORT-behandelten Tiere im wesentlichen auf eine erhebliche Erhöhung der Vulnerabilität von hochfrequenten beziehungsweise basalen afferenten synaptischen Strukturen zurückzuführen.

Im Rahmen der immunhistochemischen Auswertungen stellte sich aus technischer Sicht die Untersuchung der apikalen Windung, in erster Linie in der

Mifepriston/KORT+AT-Gruppe, besonders erschwert dar. Aus diesem Grund war die Menge der ausgewerteten apikalen IHZ nur gering und die Qualität bzw. Aussagekraft der Daten nicht ausreichend. Die statistisch signifikante Reduktion der apikalen Ribbon-Synapsen ist daher nicht robust genug für eine abschließende Bewertung. Die Daten sind im Zuge der Vollständigkeit dennoch mit aufgeführt.

Zusammenfassend wurde die Integrität der synaptischen Strukturen an den IHZ durch pharmakologische Stressinduktion mit Kortikosteron-Injektion (3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) bei zeitgleicher Inhibition der GR (Mifepriston, 100 mg/kg Körpergewicht, i.p.) im Vergleich zur Vehikel-Behandlung in Cochlea-Regionen hoher Frequenzen statistisch signifikant stärker beeinflusst. Die Inhibition der GR führte zu einer maßgeblich erhöhten Schallvulnerabilität, die sich vor allem mit einer erheblichen Vulnerabilität der hirnstammaudiometrisch bestimmten Hörfunktion und IHZ-Synapse korrelieren ließ.

3.3 Quantifizierung der Stress-Level durch Messung von Kortikosteron-Urinkonzentrationen

Um den Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress in Abhängigkeit von der Aktivität verschiedener Kortikosteroidrezeptor-Subtypen auf die Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation (AT) zu prüfen, wurde 90 Minuten vor der Schallexposition Kortikosteron (KORT; 3mg/kg Körpergewicht) zeitgleich mit einer Vehikel-Substanz (Ethanol/PEG 1:10, 2 ml/kg Körpergewicht) beziehungsweise einem Mineralokortikoid/Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten (MR-/GR-) intraperitoneal verabreicht. Von Versuchstieren wurde dabei während und drei Tage nach der Schallexposition beziehungsweise der Scheinexposition im Rahmen der Hörmessungen Urin gesammelt.

Die Quantifizierung der KORT- und Kreatinin-Konzentrationen in den Urinproben erfolgte mithilfe eines standardisierten Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) durch ein externes Labor (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg). Nach Berechnung des KORT/Kreatinin-Quotienten konnte eine quantitative Aussage über die Stress-Level der Tiere zum Zeitpunkt der Urinentnahme getroffen werden (Singer, Kasini et al. 2018). Um den Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf die endogene KORT-Konzentration zu minimieren, wurden alle Urinentnahmen zwischen 9.00 Uhr und 14.00 Uhr durchgeführt.

Die Auswertung der Urinproben zum Zeitpunkt der Schallexposition zeigte in rein mit KORT behandelten Versuchstieren eine leichte statistisch nicht signifikante Erhöhung des KORT-Kreatinin-Quotienten (KKrQ) im Vergleich zu Vehikel behandelten Versuchstieren und Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu verzeichneten Spironolacton/KORT und Mifepriston/KORT behandelte Versuchstiere einen größeren statistisch jedoch ebenfalls knapp nicht signifikanten Anstieg des KKrQ (Abbildung 23A, Vehikel+AT/Spironolacton/KORT+AT, t-test: $p=0.063$; Vehikel+AT/Mifepriston/KORT+AT, t-test: $p=0.068$). Das Stress-Niveau der Versuchstiere schien durch die medikamentöse Applikation von KORT und MR-/GR-Antagonisten erheblich beeinflusst zu werden.

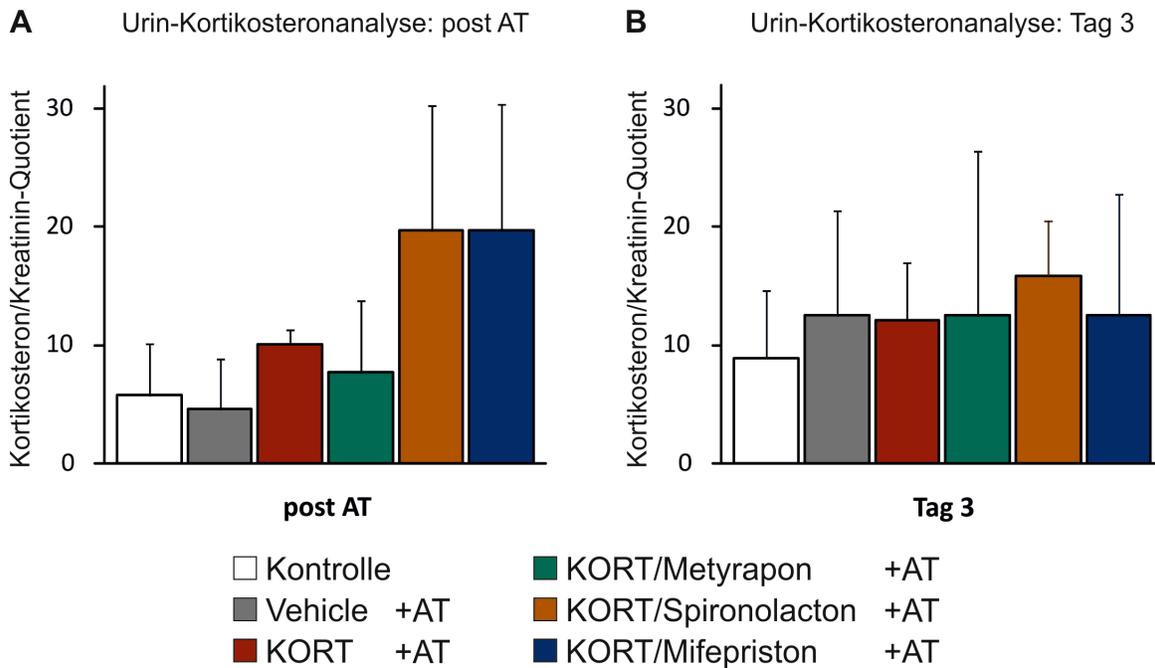


Abbildung 23. Urin-Kortikosteronanalyse. Es wird der Kortikosteron/Kreatinin-Quotient zu den Zeitpunkten **(A)** direkt und **(B)** Tag 3 nach Schallexposition dargestellt. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken) dargestellt.

Drei Tage nach der Schallexposition war zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen bezüglich der KKrQ kein Unterschied messbar. Der zuvor beobachtete Einfluss der applizierten Substanzen auf die Kortikosteron-Konzentration im Urin war nicht mehr zu beobachten.

Die Versuchstiere befanden sich drei Tage nach der Behandlung und der Schallexposition bezüglich der Stress-Level bzw. ihrer Kortisonausscheidung (abhängig von der Kortisonserumkonzentration) auf einem ähnlichen Niveau.

3.4 Zusammenfassendes Ergebnis

Pharmakologisch induzierter Stress (Kortikosteron, 3 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) vor einer Schallexposition besaß einen akuten kurzfristigen ototoxischen Einfluss auf die Hörfunktion und steigerte die Schallvulnerabilität deutlich. Die Integrität der Ribbon-Synapsen an den IHZ wurde nicht beeinflusst.

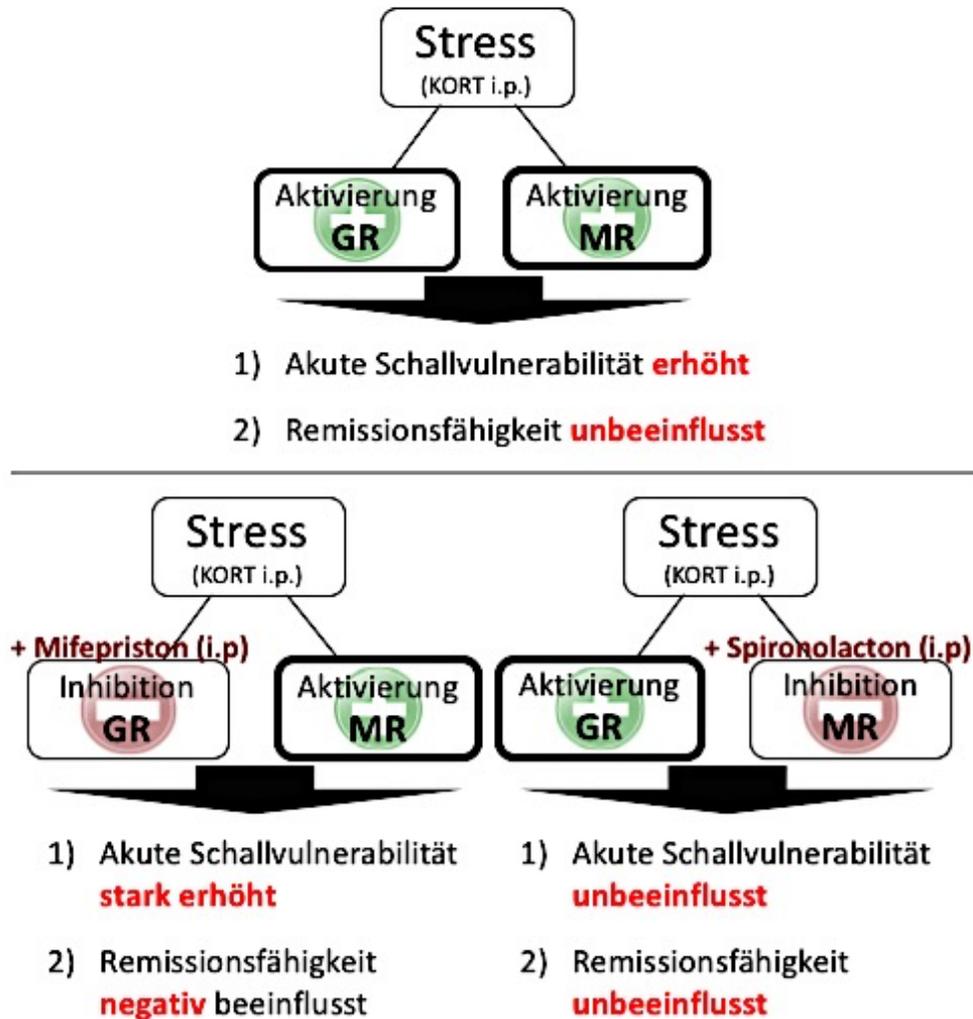


Abbildung 24. Schematische zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse nach injiziertem Kortikosteron und bei zeitgleicher Inhibition der Glukokortikoidrezeptoren (GR) durch Mifepriston- bzw. der Mineralokortikoidrezeptoren (MR) durch Spironolacton vor einer akustischen Überstimulation. Alle Aussagen sind im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zu deuten.

Bei zeitgleicher Inhibition der Mineralokortikoidrezeptoren (Spironolacton, 100 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) zeigte sich kein stärkerer Einfluss auf den

akuten und permanenten Trauma-induzierten Hörschwellenverlust im Vergleich zur Vehikel-Behandlung. Auch die Integrität synaptischer Strukturen an den IHZ wurde im Vergleich zur Vehikel-Behandlung nicht stärker beeinflusst. Die Vulnerabilität und Erholung der Hörfunktion und untersuchter cochleärer Strukturen nach der Schallexposition hing unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht von der Aktivierung der Mineralokortikoidrezeptoren ab.

Die zeitgleiche Inhibition der Glukokortikoidrezeptoren durch Mifepriston-Behandlung (100 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal) führte zu einer deutlich stärkeren Schwellenabwanderung im Vergleich zur Vehikel- und isolierten KORT-Behandlung. Auch der Remissionsverlauf verzeichnete ein deutliches Defizit. Die Integrität der basalen Ribbon-Synapsen wurde ebenso negativ beeinflusst. Die Vulnerabilität und Erholung der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation hing wesentlich von der Aktivierung der Glukokortikoidrezeptoren ab (Abbildung 24).

4 Diskussion

Schwerhörigkeit ist heute eine der weltweit häufigsten Ursachen von Behinderung. Etwa 16% aller erwachsenen Europäer sind nach der „World Health Organization (WHO)“-Definition betroffen (Mathers, Fat et al. 2008). Bis dato ist kein evidenzbasiertes Vorgehen bekannt, welches dauerhafte Hörschäden verhindern oder therapieren kann. Die regenerative Medizin bietet bisher die einzige biologisch kausale Möglichkeit der Behandlung einer chronischen Schwerhörigkeit als Folge von einem Haarzellverlust (Löwenheim, Waldhaus et al. 2008), wird jedoch nicht in naher Zukunft für einzelne Betroffene zur Verfügung stehen können (Knipper 2007). Umso höher erscheint aus klinischer Sicht der Bedarf an Protektions- und Präventionsstrategien.

Der Einfluss von exogen induziertem Stress (beispielsweise psychosozial oder durch Lärm erzeugt) auf die Hörfunktion von Versuchstieren und Menschen konnte bereits in zahlreichen Studien demonstriert und bestätigt werden (Canlon, Borg et al. 1988, Harding, Bohne et al. 2002, Ohlemiller 2008). Dabei wurde gezeigt, dass die bei einer Stressantwort ablaufenden Prozesse über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) sowohl eine schädliche ototoxische (Singer, Zuccotti et al. 2013), als auch protektive Wirkung auf die Hörfunktion und definierte cochleäre Strukturen besitzen können (Takahashi, Kusakari et al. 1996, Wang und Liberman 2002, Takemura, Komeda et al. 2004, Tahera, Meltser et al. 2006).

Da die Expression von GR und MR in ausgereiften Haarsinneszellen und Spiralganglion-Neuronen des Innenohres bereits mehrfach bestätigt wurde (Yao und Rarey 1996, Terakado, Kumagami et al. 2011), sollten direkte Effekte von KORT in Abhängigkeit dieser Rezeptorsubtypen auf die Vulnerabilität der ersten afferente Synapse der Hörbahn in Betracht gezogen und untersucht werden.

Der differentielle Einfluss von Stress auf das auditorische System und seine Abhängigkeit von unterschiedlichen Stressrezeptor-Aktivierungsmustern soll im

Folgenden in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und bereits vorhandener Studien diskutiert werden.

4.1 Kortikosteron-Behandlung ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung

4.1.1 Einfluss auf die hirstammaudiometrisch gemessene Hörfunktion

Durch diese Arbeit konnte ein akuter durch Kortikosteron (KORT)-Injektion vermittelter ototoxischer Effekt auf die Hörfunktion unmittelbar nach der Schallexposition demonstriert werden. Pharmakologisch induzierter Stress vor einer Schallexposition führte zu einer deutlichen Steigerung der Schallvulnerabilität im Vergleich zur Vehikel-Behandlung. Die Remissionsfähigkeit der Hörfunktion wurde durch den induzierten Stress allerdings nicht beeinflusst. Die mit KORT behandelten Versuchstiere waren in der Lage sich - trotz des initial stärkeren hörfunktionellen Schadens - im Vergleich zu den Vehikel behandelten Tieren gleichermaßen von der akustischen Überstimulation zu erholen. Die initial stärkere Abwanderung der Hörschwelle in den mit KORT behandelten Versuchstieren konnte im Verlauf hirstammaudiometrisch nicht mehr nachgewiesen werden.

Eine intraperitoneale KORT-Injektion mit 3 mg kg/Körpergewicht bewirkte in bereits vorhandenen Studien eine signifikante Steigerung der KORT-Blutkonzentration der Versuchstiere (MacDougall und Howland 2013). Als zentrales agonistisch wirkendes Hormon der HPA-Achse führt diese KORT-Konzentrationssteigerung zu einer verstärkten Aktivierung der verschiedenen Steroidrezeptoren (De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998). Auch in dieser Arbeit konnte eine tendenzielle (nicht signifikante) Steigerung des KORT-Kreatinin-Quotienten (KKrQ) im Anschluss an die Behandlung der Ratten mit KORT (3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können auf einen ersten Blick den in vorausgehenden Studien beschriebenen protektiven Effekt von Stresshormonen auf die Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation nicht direkt bestätigen. Der Frage nachgehend wie diese unterschiedlichen Beobachtungen zustande kommen

können, sollte man insbesondere die Art der Stressinduktion genauer unterscheiden:

1) So zeigen Wang und Liberman im Jahr 2002 einen sehr deutlichen protektiven Einfluss von Stress auf die Hörfunktion, indem sie psychosoziale Stressmodelle verwenden, in welchen sie die Versuchstiere vor einer Schallexposition unterschiedlich lang andauernden Perioden von Raum- und Bewegungseinschränkung (Restraint Stress, RS) aussetzten. In diesen Modellen kommt es je nach Länge und Häufigkeit der Wiederholung des RS zu verschiedenen starker Stressinduktion und dementsprechend verschieden starker Erhöhung der KORT-Blutkonzentration (Wang and Liberman 2002). Eine solche Erhöhung liegt vergleichsweise deutlich unter KORT-Konzentrationen, die durch eine intraperitoneale KORT-Injektion mit 3 mg/kg Körpergewicht erzielt werden können. Dies sollte zu einer schwächeren Aktivierungen der HPA-Achse beziehungsweise der KORT-Rezeptoren führen, als in dieser Arbeit vorliegend (Wang und Liberman 2002, MacDougall und Howland 2013) und wäre eine mögliche Ursache für die Dissonanz zwischen den bisherigen Beobachtungen und der vorliegenden Ergebnisse. Es bleibt dabei ungeklärt, ob ein KORT-Konzentrationseffekt eine weiterführende Rolle spielen könnte.

2) Tahera et al. verwendeten im Jahr 2006 zur Stressinduktion ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid (Dexamethason), das ebenso 90 Minuten vor einer akustischen Schallexposition intraperitoneal injiziert wurde. Hierdurch sollte die HPA-Achse verstärkt aktiviert und somit eine pharmakologisch induzierte Stressreaktion ausgelöst werden. Allerdings besitzt Dexamethason im Vergleich zu dem physiologischen Stresshormon KORT eine wesentlich höhere Affinität und Spezifität zu Glukokortikoid- als zu Mineralokortikoid-Rezeptoren (Luttge, Davda et al. 1989, Siegel und Agranoff 1999) und sollte aus diesem Grund nicht als gleichwertig zur „pharmakologischen Stressinduktion“ durch KORT-Injektion betrachtet werden. Die Ergebnisse der vorangehenden Studien lassen sich bei

Berücksichtigung der zwei oben diskutierten Punkte mit den Beobachtungen dieser Arbeit durchaus in Einklang bringen.



Abbildung 25. Schematische Darstellung der Wirkung von injiziertem Kortikosteron an seinen Rezeptoren im Gehirn. Pharmakologisch induzierter Stress vor einer Schallexposition besitzt einen akuten ototoxischen Einfluss auf die Hörfunktion und steigert die Schallvulnerabilität deutlich. MR besitzen eine 10-fach höhere Affinität zu KORT und binden das injizierte KORT somit wesentlich stärker (hervorgehobene Umrandung der MR). Hierdurch wird ein wesentlicher Einfluss der MR auf die Vulnerabilität und Remission der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation diskutiert.

MR besitzen eine 10-fach höhere Affinität zu KORT im Vergleich zu GR (Reul und de Kloet 1985, Arriza, Simerly et al. 1988). In peripheren Organen sind MR durch die Aktivität der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (11 β -HSD) hochspezifisch für Mineralokortikoide und so nahezu nicht verfügbar für Glukokortikoide wie Kortikosteron. Im zentralen Nervensystem ist das Vorkommen von 11 β -HSD auf

hypothalamische Regionen begrenzt, die für die Steuerung des Salz- und Volumenhaushaltes nötig sind (Gomez-Sanchez 1997, Ma, Itharat et al. 1997). Damit ist die Spezifität der MR für Mineralokortikoide in allen anderen Hirnregionen aufgehoben und Glukokortikoide können aufgrund der 10-fach höheren Affinität verstärkt an die MR binden (wie unter „1.4 ZNS-Aktivität der Kortikosteroidrezeptoren“ bereits beschrieben). Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass durch die KORT-Injektion eine stärkere zentrale MR als GR-Aktivierung stattgefunden hat und die MR einen wesentlichen Einfluss auf die Vulnerabilität und Erholung der Hörfunktion besitzen.

4.1.2 Einfluss auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen

In dieser Arbeit konnte zwischen den Vehikel und KORT behandelten Versuchstieren kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Verlustes der Ribbon-Synapsen („Ribbon-Loss“) festgestellt werden. Auch die Amplituden der ABR-Welle I (gemessen bei einer Frequenz von 16 kHz) der Versuchsgruppen KORT+AT und Vehikel+AT unterschieden sich nicht.

Betrachtet man dieses Ergebnis in Hinblick auf Studien aus dem Jahr 2009 (Kujawa und Liberman 2009), dürfte man folgend postulieren: die Integrität der synaptischen Strukturen an den IHz wird durch pharmakologische Stressinduktion vor der akustischen Überstimulation nicht beeinflusst.

Kujawa und Liberman (Kujawa und Liberman 2009) haben dabei bestätigt, dass sich in Versuchstieren die hirnstammaudiometrisch gemessenen Hörschwellen trotz eines akuten initialen Hörschadens nach einer akustischen Überstimulation acht Wochen Wochen nach dem Ereignis erholen und wieder beinahe normalisieren können (Temporary Threshold Shift (TTS) ohne Permanent Threshold Shift (PTS)). Untersuchten sie allerdings in den selben Tieren die Amplitude der ABR-Welle I im Bereich des größten initialen hörfunktionellen Schadens (in diesem Fall im hochfrequenten Bereich von 32 kHz), zeigte sich selbst acht Wochen nach der

Schallexposition noch eine signifikante Reduktion der Amplitude von bis zu 60 % im Vergleich zum Ausgangszustand - bei normalisierten ABR-Hörschwellen. Parallel zu diesen Beobachtungen stellten sie mithilfe immunhistochemischer Methoden einen signifikanten Verlust von Ribbon-Synapsen an den IHZ in hochfrequenten basalen Region der Cochlea fest (Bereich des größten initialen hörfunktionellen ABR-Schadens mit 32 kHz). Diese Beobachtungen bestätigten eine Korrelation zwischen der Reduktion der Amplitude der Welle I und dem Verlust der Ribbon-Synapsen an den IHZ. Somit sind sowohl der sogenannte Ribbon-Loss als auch Veränderungen der Welle I in ABR-Messungen ein Indikator für die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen an den IHZ.

Differentieller Einfluss von Stress in Abhängigkeit von verschiedenen KORT-Konzentrationen?

Singer et al. haben 2013 in einem psychosozialen Stressmodell bestätigt, dass Stress vor einer akustischer Überstimulation je nach Höhe der KORT-Blutkonzentration bzw. des KORT/Kreatinin-Urin-Quotienten (KKrQ) differentielle Effekte auf die hirnstammaudiometrisch gemessene Hörfunktion und die Anzahl der Ribbon-Synapsen besitzt. In Versuchstieren mit einem KKrQ bis 9-10 („moderate Stresslevel“) zeigten sich positive, protektive Einflüsse auf die Hörfunktion und die Integrität der IHZ nach einer akustischer Überstimulation – je niedriger der KKrQ hierbei lag, umso stärker waren die Einflüsse zu beobachten. Wohingegen bei KKrQ >10 („hohe Stresslevel“) vor allem schädliche, ototoxische Effekte auf die Hörfunktion und ein signifikanter Verlust der basalen Ribbon-Synapsen der IHZ beschrieben wurden. Hierbei galt: je höher der KKrQ >10 lag, umso stärker waren die negativen Effekte (Singer, Zuccotti et al. 2013).

Der von Singer et al. berichtete differentielle Einfluss von Stress konnte in der in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsgruppe nicht bestätigt werden. Betrachtet man die 2013 vorgeschlagenen Richtwerte, muss man in dieser Arbeit bei den isoliert mit KORT behandelten Versuchstieren von einem „hohen Stresslevel“ ausgehen. Der KORT-Kreatinin-Quotienten (KKrQ) war bei den isoliert mit KORT behandelten

Ratten ohne zusätzliche Rezeptorantagonisierung direkt nach der akustischen Überstimulation durchschnittlich 10.15 ± 2.68 hoch. Damit zeigten die KORT-injizierten Tiere eine tendenzielle (jedoch statistisch nicht signifikante) Erhöhung des KKrQ im Vergleich zu Kontroll- und Vehikel behandelten Tieren. Allerdings lagen sie zugleich deutlich unter den KKrQ-Levels der Steroidrezeptor-inhibierten Versuchsgruppen, sodass man im direkten Gruppenvergleich mehr zur Eingruppierung in „moderate Stresslevel“ tendieren sollte.

4.2 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten

4.2.1 Einfluss auf die hirstammaudiometrisch gemessene Hörfunktion

Wurden zeitgleich zur pharmakologischen Stressinduktion die MR-Rezeptoren durch Spironolacton-Injektion inhibiert, konnte der bei reiner KORT-Gabe akute ototoxische Effekt nicht mehr beobachtet werden. Die Inhibition der MR durch Spironolacton-Behandlung bei zeitgleicher Stressinduktion erhöhte in dieser Arbeit nicht die akute Schallvulnerabilität des Corti-Organes.

Bei einer reinen KORT-Behandlung wird auf Grund der hohen Affinität eine verstärkte zentrale Aktivierung der MR im Vergleich zu den GR angenommen (Abbildung 25). In Anbetracht der deutlichen akuten ototoxischen Effekte bei reiner KORT-Behandlung und der ausbleibenden Effekte bei zeitgleicher MR-Inhibition durch Spironolacton-Behandlung, könnte ein potentiell protektiver Einfluss der Inhibition der MR gefolgert werden (Abbildung 26, Schlussfolgerung).

Andersherum betrachtet könnte somit eine Aktivierung der MR, wie sie bei reiner KORT-Gabe nach vorliegendem Experimentalmodell verstärkt stattfindet, einen potentiellen nicht zu minder zu bewertenden negativen Einfluss auf die Schallvulnerabilität bei einer Schalleexposition besitzen (Abbildung 26, These 1). Zudem findet bei einer KORT-Behandlung und zeitgleicher Inhibition der sonst hochaffinen MR eine verstärkte Aktivierung der GR statt. Die ausbleibenden

negativen Effekte auf die Schallvulnerabilität bei zeitgleicher Spironolacton-Behandlung könnten hiermit ebenso auf einen protektiven Einfluss der verstärkten GR-Aktivierung zurückzuführen sein (Abbildung 26, These 2).

Gerade die letztere These bezüglich des protektiven Einflusses einer GR-Aktivierung wird durch Studien bestärkt, in denen ein protektiver Effekt eines synthetischen Glukokortikoids mit hoher Affinität zu GR (Dexamethason) auf die Hörfunktion beobachtet wurde. Hierbei wurde Dexamethason 90 Minuten vor einer akustischen Schallexposition intraperitoneal injiziert und anschließend hirstammaudiometrisch eine signifikant schwächere Schwellenabwanderung im Vergleich zur Vehikel-Behandlung festgestellt (Tahera, Meltser et al. 2006, Canlon, Meltser et al. 2007, Meltser und Canlon 2011).

Die vorliegenden Ergebnisse und Thesen werden durch Beobachtungen des Karolinska-Instituts aus dem Jahr 2006 bestärkt. Dabei wurden Versuchstiere 90 Minuten vor einer Schallexposition (AT) ebenso mit Spironolacton (in derselben Konzentration wie in dieser Arbeit verwendet, 100 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Um die Spezifität von Spironolacton für MR zu untermauern, wurde in einer weiteren Versuchsgruppe ein zweiter MR-Inhibitor (RU28318) eingesetzt. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit erfolgte in der schwedischen Studie keine zeitgleiche Injektion von KORT. Anschließend konnte hirstammaudiometrisch keine signifikante stärkere ototoxische Wirkung der MR-Inhibition im Vergleich zur reinen Vehikel-Behandlung festgestellt werden. Alle drei Versuchsgruppen „Spironolacton + AT“, „RU28318 + AT“ und „Vehikel + AT“ zeigten in ABR-Messungen nach der Schallexposition ähnliche hohe Schwellenabwanderungen (Tahera, Meltser et al. 2006).

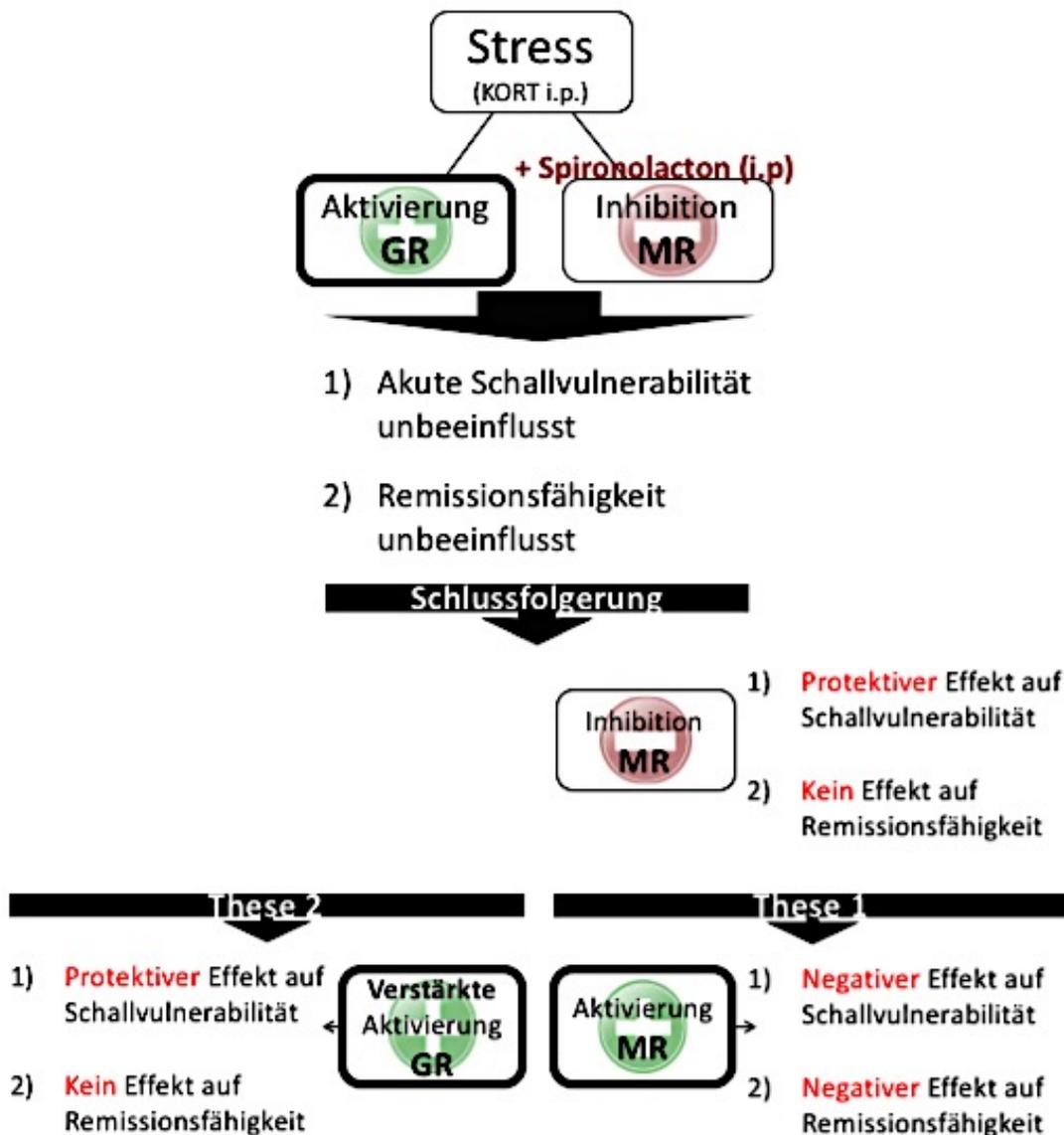


Abbildung 26. Schematische Darstellung der Wirkung von injiziertem Kortikosteron an seinen Rezeptoren im Gehirn bei gleichzeitiger Inhibition der Mineralokortikoidrezeptoren (MR) durch Spironolacton-Behandlung vor einer akustischen Überstimulation. Resultat, Schlussfolgerung und These sind im Vergleich zur reinen KORT-Behandlung zu deuten. In Anbetracht der deutlichen akuten ototoxischen Effekte bei reiner KORT-Behandlung und der ausbleibenden Effekte bei zeitgleicher Spironolacton-Behandlung lässt sich eine potentielle Protektion der Hörfunktion durch die Inhibition der MR vermuten („Schlussfolgerung“). Umgekehrt könnte eine Aktivierung der MR einen negativen Effekt auf die Schallvulnerabilität und Remissionsfähigkeit der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation besitzen (These 1). Die ausbleibenden negativen Effekte auf die Schallvulnerabilität bei zeitgleicher Spironolacton-Behandlung könnten auf einen protektiven Einfluss der verstärkten GR-Aktivierung zurückzuführen sein (These 2).

Allerdings postulieren Tahera et al. 2006 in einer ihrer Kernaussagen, dass MR keinen Einfluss auf die Schallvulnerabilität besitzen. Diese Aussage kann durch die

Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In Anbetracht der ausbleibenden schädlichen Effekte von reiner KORT-Injektion bei einer zeitgleichen MR-Inhibition, muss eine zentrale (womöglich ungünstige) Rolle der MR in ablaufenden Prozessen nach einer akustischen Überstimulation weiterhin diskutiert werden (Abbildung 26, Schlussfolgerung, These 1 und These 2).

4.2.2 Einfluss auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen

Die Vulnerabilität synaptischer Strukturen an den IHZ wurde durch pharmakologische Stressinduktion mit KORT-Injektion (3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) bei zeitgleicher Inhibition der MR (Spironolacton, 100 mg/kg Körpergewicht, i.p.) im Vergleich zur Vehikel-Behandlung nicht stärker beeinflusst. Die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen der IHZ nach Schallexposition war nicht von der Aktivierung der MR abhängig.

Kritische Betrachtung der Kortikosteron-Kreatinin-Quotienten im Urin

Betrachtet man den durchschnittlichen Kortikosteron-Kreatinin-Quotienten (KKrQ) der Versuchsgruppe „Spironolacton/KORT + AT“, fällt insbesondere die statistische signifikante Erhöhung im Vergleich zu isoliert mit KORT behandelten Versuchstieren auf. Diese Beobachtung wirkt auf den ersten Blick verwunderlich, da in allen behandelten Gruppen durchweg eine KORT-Behandlung mit 3 mg/kg Körpergewicht – unabhängig von zeitgleicher Rezeptorinhibition – stattgefunden hat. Wie können solch große Unterschied in Messungen des KORT-Kreatinin-Quotienten bei gleichbleibender KORT-Dosierung vorkommen? Man muss an dieser Stelle vor allem bedenken, dass durch die Erhöhung der KORT-Konzentration nach Injektion von 3 mg/kg Körpergewicht nicht nur zentrale, sondern auch periphere MR und GR aktiviert werden – so auch an Strukturen des Organismus zur Regulierung des Wasserhaushaltes. Spironolacton kann dabei an den Nieren zu einer erniedrigten Glomerulären Filtrationsrate (GFR) führen, die sich insbesondere auch durch eine verminderte Kreatinin-Clearance merklich

macht (Rossing, Schjoedt et al. 2005, Saklayen, Gyebi et al. 2008). Dies wiederum bedeutet, dass unter Umständen weniger Kreatinin über die Niere gefiltert wird und somit bei gleichbleibendem beziehungsweise teils sogar steigendem Urinvolumen der KKrQ unvorhersehbar beeinflusst wird (Walker und Cumming 1964, Bauersachs, Fraccarollo et al. 2000). Dies erschwerte die Vergleichbarkeit der einzelnen KKrQ-Level. Inwieweit hierbei tatsächlich eine verminderte oder erhöhte Diurese bzw. eine veränderte Ausscheidung von Kreatinin bei verschiedenartiger Osmolarität des Urins stattgefunden hat, ist abschließend nicht zu klären, da Urinvolumina nach Behandlung der Versuchstiere in dieser Arbeit nicht kontrolliert wurden. Eine solche Überprüfung sollte in weiterführenden Studien unbedingt in Betracht gezogen werden.

4.3 Kortikosteron-Behandlung und zeitgleiche Gabe eines Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten

4.3.1 Einfluss auf die hirstammaudiometrisch gemessene Hörfunktion

Die pharmakologische Stressinduktion durch KORT-Injektion bei zeitgleicher Inhibition der GR durch Mifepriston-Behandlung 90 Minuten vor der Schallexposition verstärkte deutlich die Schwellenabwanderung im hochfrequenten Bereich verglichen zur Vehikel-Behandlung. Die zeitgleiche GR-Inhibition erhöhte die Vulnerabilität der Hörfunktion. Auch der Remissionsverlauf verzeichnete im Vergleich zur isolierten KORT- und Vehikel-Behandlung ein deutliches Defizit – so beobachtete man 14 Tage nach der Schallexposition in dieser Versuchsgruppe den noch stärksten verbleibenden hörfunktionellen Schaden (Permanent Threshold Shift, PTS).

In Anbetracht der deutlich stärkeren negativen ototoxischen Effekte bei KORT- und zeitgleicher Mifepriston-Behandlung im Vergleich zur isolierten KORT-Gabe darf ein potentiell schädlicher Einfluss der GR-Inhibition auf die Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation angenommen werden (Abbildung 27, Schlussfolgerung).

Umgekehrt betrachtet kann man auch einen potentiell protektiven Effekt auf die Schallvulnerabilität bzw. die ablaufenden Prozesse nach einer Schallexposition durch eine GR-Aktivierung diskutieren (Abbildung 27, These 3). Zudem könnte es im Rahmen der Mifepriston-Behandlung und der damit einhergehenden GR-Inhibition zu einer überwiegenden Aktivierung der MR durch KORT gekommen sein. Aus diesem Grund sollte ein schädlicher Einfluss der MR-Aktivierung bezüglich ablaufender Prozesse nach einer Schallexposition in Betracht gezogen werden (Abbildung 27, These 4).

Schädlicher Einfluss der GR-Inhibition

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen bisherige Studien bezüglich des Einflusses der GR-Subtypen auf ablaufende Prozesse nach einer akustischen Überstimulation. Tahera et al. berichteten beispielsweise von höheren Schwellenabwanderungen nach einer Schallexposition in Versuchstieren, wenn diese zuvor mit der Kombination eines GR-Inhibitors (RU486, Mifepriston) und eines endogenen KORT-Synthesehemmers behandelt wurden (Tahera, Meltser et al. 2006). Auch Mori et al. haben einen schädlichen Einfluss einer Mifepriston-Injektion vor einer akustischen Überstimulation auf die Hörfunktion beobachtet (Mori, Fujimura et al. 2004). Beide demonstrierten somit ebenfalls einen ototoxischen Effekt der GR-Inhibition auf auditorische Prozesse nach einer Schallexposition. Desweiteren wurden, wie zuvor schon beschrieben, bereits in zahlreichen Studien ein protektiver Einfluss von psychosozial induziertem Stress (beispielsweise durch Raum- und Bewegungseinschränkung, Restraint Stress) vor einer akustischen Überstimulation beschrieben. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der protektiv wirkende induzierte Stress mit einer Erhöhung der KORT-Blutkonzentration einherging (Tahera, Meltser et al. 2006, Tahera, Meltser et al. 2006, Canlon, Meltser et al. 2007, Meltser und Canlon 2011). Wurde den Versuchstieren zusätzlich zum Restraint Stress der GR-Inhibitor Mifepriston vor einer Schallexposition appliziert, konnte der zuvor protektive Einfluss von Stress nicht mehr demonstriert werden (Meltser und Canlon 2011).

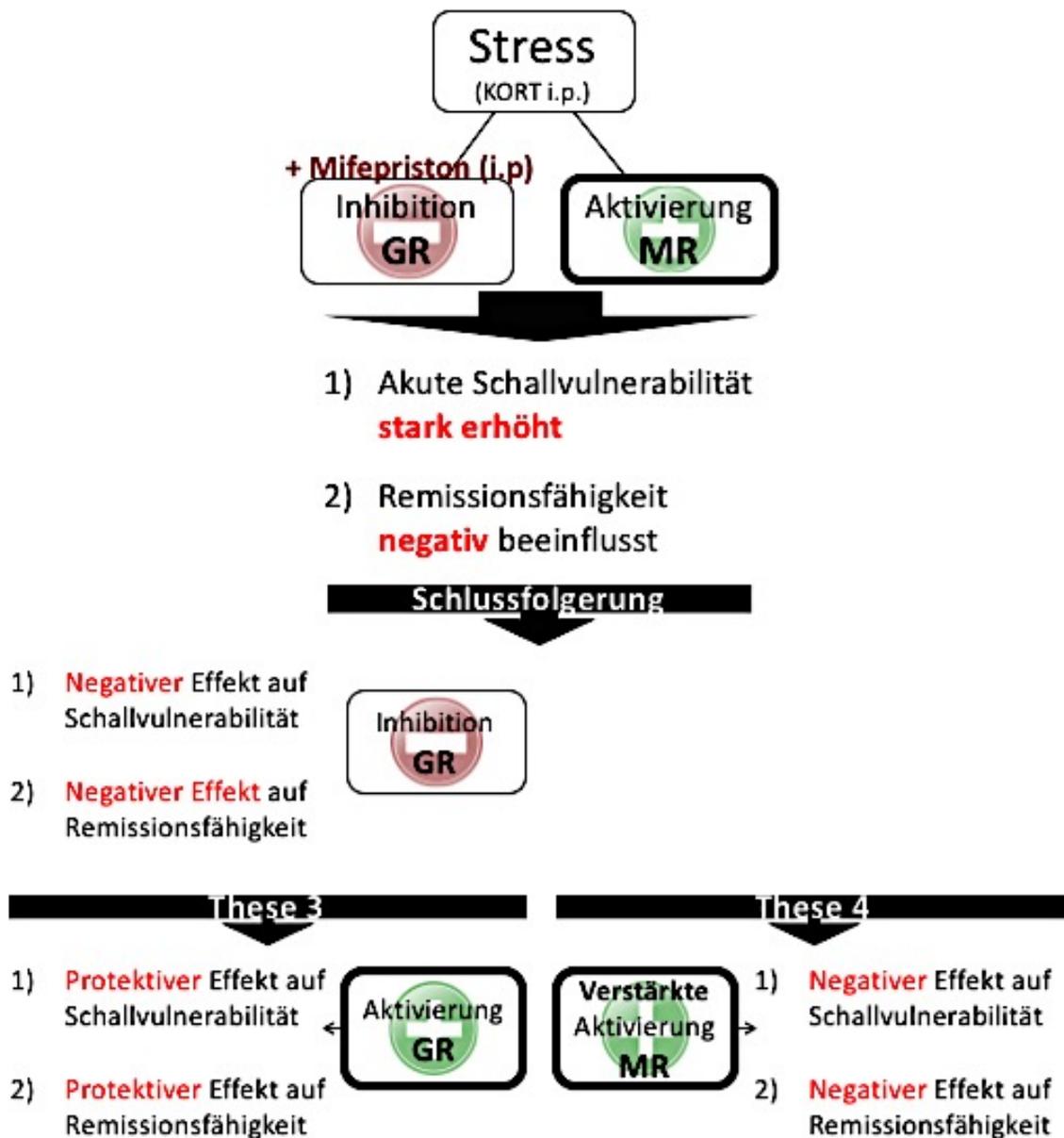


Abbildung 27. Schematische Darstellung der Wirkung von injiziertem Kortikosteron bei gleichzeitiger Inhibition der Glukokortikoidrezeptoren (GR) durch Mifepriston-Behandlung vor einer akustischen Überstimulation. Resultat, Schlussfolgerung und Thesen sind im Vergleich zur reinen KORT-Behandlung zu deuten. Die Vulnerabilität und Erholung der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation wurden wesentlich von der Inhibition der GR negativ beeinflusst. Die zeitgleiche GR-Inhibition erhöhte die Vulnerabilität der Hörfunktion. Auch der Remissionsverlauf verzeichnete im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen ein deutliches Defizit („Schlussfolgerung“). Umgekehrt könnte eine Aktivierung der GR einen protektiven Effekt auf die Schallvulnerabilität und Remissionsfähigkeit der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation besitzen (These 3). Die verstärkt negativen Effekte auf die Schallvulnerabilität bei zeitgleicher Mifepriston-Behandlung könnten auf eine verstärkte GR-Aktivierung zurückzuführen sein (These 4).

Insbesondere diese Beobachtung bestärkt die Ergebnisse und Thesen der vorliegenden Arbeit: die Aktivierung der GR-Rezeptoren spielt im Zuge einer Protektion der Hörfunktion nach einer akustischen Schallexposition eine zentrale Rolle (Abbildung 27, These 23).

4.3.2 Einfluss auf die Integrität der afferenten synaptischen Strukturen

Die Integrität der synaptischen Strukturen an den IHZ wurde durch pharmakologische Stressinduktion mit Kortikosteron-Injektion (3 mg/kg Körpergewicht, i.p.) bei zeitgleicher Inhibition der GR (Mifepriston, 100 mg/kg Körpergewicht, i.p.) im Vergleich zur Vehikel-Behandlung in Cochlea-Regionen hoher Frequenzen statistisch signifikant stärker beeinflusst. Mit Mifepriston/KORT behandelte Tieren zeigten im Vergleich zur Vehikel-Behandlung einen statistisch signifikant stärkeren Verlust von basalen Ribbon-Synapsen.

Kritische Betrachtung der Kortikosteron-Kreatinin-Quotienten im Urin

Auch nach einer GR-Inhibition durch Mifepriston-Injektion fällt zunächst eine signifikante Erhöhung des Kortikosteron-Kreatinin-Quotienten (KKrQ) im Vergleich zu isoliert mit KORT behandelten Versuchstieren auf. Ebenso an dieser Stelle stellt sich die Frage: Wie können solch große Unterschiede in Messungen des KORT-Kreatinin-Quotienten bei gleichbleibender KORT-Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht vorkommen? Es gibt – im Vergleich zum MR-Inhibitor Spironolacton – keine evidenten Hinweise des Einflusses von Mifepriston auf den Wasserhaushalt beziehungsweise auf die renale Funktion und insbesondere die Kreatinin-Clearance. Es konnte allerdings in vielen Studien gezeigt werden, dass die Blutkonzentration und damit auch die renale Ausscheidung von Kortikosteron nach Mifepriston-Gabe bei inhibierten GR signifikant ansteigt (Jobin, de Jonge et al. 1996). Hierbei sollte man vor allem die Auswirkungen der pharmakologischen Behandlung auf die negative Feedbackschleife der HPA-Achse genauer betrachten. Die Aufrechterhaltung der basalen Aktivität der HPA-Achse als Stress-System des

Körpers wird über die konstante Aktivierung der MR im Hippocampus im Sinne eines positiven Feedbacks vermittelt, während eine zusätzliche Aktivierung der GR bei höheren KORT-Spiegeln mit einer Suppression der HPA-Achse einhergeht und so für den negativen Feedback und für die Wiederherstellung des basalen Zustandes verantwortlich ist (De Kloet, Vreugdenhil et al. 1998). Durch die Inhibition der GR nach Mifepriston-Gabe kommt es womöglich zu einer Entkoppelung dieser negativen Feedback-Schleife, was sich letztendlich über eine erhöhte renale Ausscheidung beziehungsweise einem erhöhten KKrQ ausdrückt. Diese Tatsache erschwert weiterhin einen direkten Vergleich der KKrQ verschiedener Versuchstiere und muss in nachfolgenden Studien unbedingt durch eine direkte KORT-Blutkonzentrationskontrolle untersucht werden.

4.4 Fazit und Ausblick

Zusammenfassende Hypothesendarstellung

Pharmakologisch induzierter Stress vor einer Schallexposition besitzt einen akuten ototoxischen Einfluss auf die Hörfunktion und steigert die Schallvulnerabilität deutlich.

Bei zeitgleicher Inhibition der Mineralokortikoidrezeptoren (MR) zeigte sich keine erhöhte akute Schallvulnerabilität des Corti-Organs. Es lässt sich eine potentielle Protektion der Hörfunktion durch die Inhibition der MR schlussfolgern (Abbildung 28, „Schlussfolgerung“). Umgekehrt könnte eine Aktivierung der MR einen negativen Einfluss auf die Schallvulnerabilität und Remissionsfähigkeit der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation besitzen (These 1). Ebenso bleibt ein möglicher protektiver Einfluss einer GR-Aktivierung zu diskutieren (These 2).

Bei zeitgleicher Glukokortikoidrezeptor-Inhibition zeigte sich eine erhöhte Vulnerabilität der Hörfunktion. Auch der Remissionsverlauf verzeichnete ein deutliches Defizit (Abbildung 28, „Schlussfolgerung“).

Eine Aktivierung der GR könnte einen protektiven Effekt auf die Schallvulnerabilität der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation besitzen (These 3). Die verstärkten negativen Effekte auf die Schallvulnerabilität bei zeitgleicher Mifepriston-Behandlung könnten ebenso auf eine verstärkte MR-Aktivierung zurückzuführen sein (These 4).

Ausblick und ausstehende Untersuchungen

Zur Verifizierung der Ergebnisse und Thesen dieser Arbeit ist zunächst aus statistischer Sicht eine Wiederholung der Versuche mit erhöhter Anzahl der Versuchstiere nötig. Hierbei wird die Schwierigkeit insbesondere darin liegen, in nächsten Versuchsblöcken eine ähnlich „stressfreie“ Umgebung für die Ratten zu schaffen um eine Vergleichbarkeit des sehr anfälligen Parameters „Stress“ (beziehungsweise Kortikosteron-Blutkonzentration) zu erlauben.

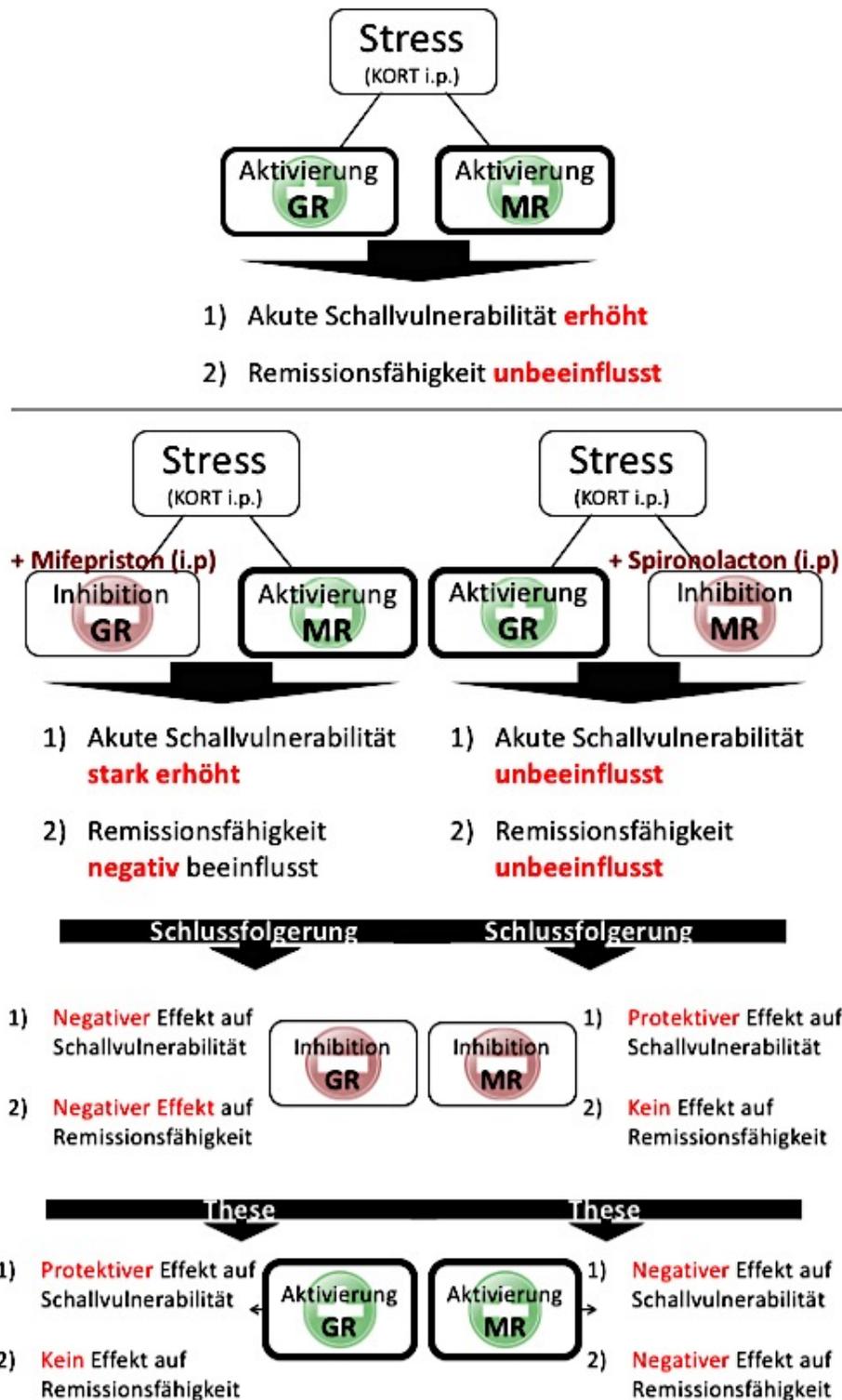


Abbildung 28. Schematische zusammenfassende Darstellung der Wirkung von injiziertem Kortikosteron an seinen Rezeptor-Subtypen bei gleichzeitiger Inhibition der Glukokortikoidrezeptoren (GR) durch Mifepriston- bzw. der Mineralokortikoidrezeptoren (MR) durch Spironolacton vor einer akustischen Überstimulation. Resultate, Schlussfolgerungen und Thesen sind im Vergleich zur reinen KORT-Behandlung zu deuten.

Um weitergehende Aussagen über basale Veränderung der Hörfunktion und die Integrität der synaptischen Strukturen nach Aktivierung oder Inhibition der Rezeptorsubtypen durch KORT + Spironolacton/Mifepriston zu ermöglichen, sollten Untersuchungen auch ohne eine folgende akustische Überstimulation erfolgen. Abschließend muss in Folgeprojekten der Einfluss einer isolierten Inhibition der MR und GR ohne zeitgleiche KORT-Gabe analysiert werden. Diese Experimente sind teilweise schon in Folgeprojekten durchgeführt worden, welche noch in Auswertung sind und die Ergebnisse dieser Studie voraussichtlich bestätigen werden (Singer W., Kasini K., Armbruster P. et al. 2018, in Vorbereitung).

Desweiteren muss ein Dosiswirkungsspektrum für KORT und seine Rezeptor-Inhibitoren in Betracht gezogen und genauer analysiert werden. Um die einzelnen „Stress-Level“ der Versuchstiere in diesen Experimenten verlässlicher und von exogenen Faktoren unabhängiger quantifizieren zu können, sollten in nächsten Studien hierfür nicht mehr ausschließlich die KORT-Kreatinin-Quotienten sondern auch Urinvolumina, die Kreatinin-Clearance und wenn möglich auch direkte KORT-Blutkonzentrationen bestimmt werden.

5 Zusammenfassung

Übermäßige Schallbelastung ist ein globaler Umwelteinfluss, der bei Betroffenen zu schallinduziertem Hörverlust und Altersschwerhörigkeit führen kann. Beide Erkrankungen sind oft mit einer sozialen Isolation und in Folge eines Mobilitätsverlustes mit vielen weiteren Sekundärerkrankungen vergesellschaftet - bis heute existiert keine spezifische klinische Therapie. Der Einfluss von exogen induziertem Stress (beispielsweise psychosozial oder durch Lärm erzeugt) auf die Hörfunktion von Versuchstieren und Menschen konnte bereits in zahlreichen Studien bestätigt werden. Dabei wurde gezeigt, dass die bei einer Stressantwort ablaufenden Prozesse sowohl eine schädliche ototoxische als auch protektive Wirkung auf die Hörfunktion und definierte cochleäre Strukturen besitzen können.

Um die beschriebenen Beobachtungen besser zu verstehen, wurde der Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress durch Kortikosteron (KORT)-Behandlung auf die Hörfunktion nach einer Schallexposition (acoustic trauma, AT) bzw. Scheinexposition in Abhängigkeit von der Aktivität verschiedener Kortikosteroidrezeptor-Subtypen in einem Rattentiermodell untersucht.

Hierzu wurde 90 Minuten vor einer akustischen Überstimulation (116 dB SPL, 10 kHz, 60 Minuten) KORT (3 mg/kg) zeitgleich mit einer Vehikel-Substanz (Ethanol/PEG 1:10, 2 ml/kg) bzw. eines Mineralokortikoid/Glukokortikoidrezeptor (MR-/GR-) -Antagonisten intraperitoneal verabreicht. Die Remission der Hörfunktion wurde über einen Zeitraum von 14 - 16 Tagen durch auditorisch evozierte Potenziale (Click- und Frequency auditory brainstem response, ABR) und Distorsionsprodukte (DPOAE) kontrolliert. Der Einfluss von pharmakologisch induziertem Stress auf den Phänotyp Innerer Haarsinneszellen (IHZ) wurde mittels immunhistochemischer Methoden untersucht.

Eine isolierte Kortikosteron-Injektion vor einer Schallexposition hatte einen akuten ototoxischen Einfluss auf die Hörfunktion und steigerte die Schallvulnerabilität der Versuchstiere. Im Verlauf von zwei Wochen zeigte sich jedoch das initiale deutliche Defizit im Vergleich zur Vehikel-Gruppe nicht mehr. Bei zeitgleicher Inhibition der

GR stellte sich eine deutlich stärkere Schwellenabwanderung im Vergleich zur Vehikel- und isolierten KORT-Behandlung dar. Auch der Remissionsverlauf der Hörfunktion verzeichnete bei diesen Tieren ein deutliches Defizit. Die Vulnerabilität und Erholung der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation wurde somit wesentlich von der Aktivierung der GR beeinflusst. Diese Effekte konnten bei zeitgleicher Inhibition der MR nicht beobachtet werden.

In immunhistochemischen Untersuchungen wurden die afferenten synaptischen Strukturen an der IHZ untersucht. Die afferenten synaptischen Strukturen waren durch isolierte KORT-Behandlung nicht beeinflusst. Anders kam es durch eine zeitgleiche Hemmung der GR zu einem destruktiven Effekt auf die afferenten synaptischen cochleären Strukturen.

Die Integrität und Erholung der Afferenzen bzw. der Hörfunktion nach einer akustischen Überstimulation hing somit wesentlich von der Aktivierung der GR ab.

In Zusammenschau der Ergebnisse und der häufigen Verwendung von Steroiden in der HNO-Heilkunde ist ein besseres Verständnis bezüglich der Wirkung von Glukokortikoiden auf das auditorische System einschließlich der Haarsinneszellen von besonderer Wichtigkeit. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass der bisherige ubiquitäre Einsatz von Steroiden differentiell betrachtet werden muss und erbringen Hinweise auf mögliche Wirkungsmechanismen im auditorischen System.

6 Literaturverzeichnis

- Aron DC, Findling JW und Tyrrell JB (2004). "Glucocorticoids and adrenal androgens." Greenspan, F.S., Strewler, G.J. (Eds.), Basic and Clinical Endocrinology 7: 363-413.
- Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW und Evans RM (1988). "The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response." Neuron 1(9): 887-900.
- Bauersachs J, Fraccarollo D, Ertl G, Gretz N, Wehling M und Christ M (2000). "Striking increase of natriuresis by low-dose spironolactone in congestive heart failure only in combination with ACE inhibition: mechanistic evidence to support RALES." Circulation 102(19): 2325-2328.
- Beato M, Herrlich P und Schutz G (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." Cell 83(6): 851-857.
- Biggs DS (2010). "3D deconvolution microscopy." Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.] Chapter 12: Unit 12 19 11-20.
- Bygdeman M und Van Look PF (1988). "Anti-progesterones for the interruption of pregnancy." Bailliere's clinical obstetrics and gynaecology 2(3): 617-629.
- Canlon B, Borg E und Flock A (1988). "Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus." Hear Res 34(2): 197-200.
- Canlon B, Meltser I, Johansson P und Tahera Y (2007). "Glucocorticoid receptors modulate auditory sensitivity to acoustic trauma." Hear Res 226(1-2): 61-69.
- Cannon WB (1920). "Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. an account of recent researches into the function of emotional excitement." Journal of the American Medical Association 74(21): 1477-1477.
- Cannon WB (1929). "Bodily changes in pain, hunger, fear and rage."
- Cannon WB (1932). The wisdom of the body, W.W. Norton & Company, inc.
- Centanni TM, Engineer CT und Kilgard MP (2013). "Cortical speech-evoked response patterns in multiple auditory fields are correlated with behavioral discrimination ability." Journal of neurophysiology 110(1): 177-189.
- Chintamaneni K, Bruder ED und Raff H (2014). "Programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neonatal intermittent hypoxia: effects on adult

- male ACTH and corticosterone responses are stress specific." *Endocrinology* 155(5): 1763-1770.
- Chrousos GP (2009). "Stress and disorders of the stress system." *Nature reviews. Endocrinology* 5(7): 374-381.
- Chrousos GP und Kino T (2005). "Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic." *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005(304): pe48.
- Cintra A, Zoli M, Rosen L, Agnati LF, Okret S, Wikstrom AC, Gustaffsson JA und Fuxe K (1994). "Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system." *Neuroscience* 62(3): 843-897.
- Conlin A und Parnes LS (2007). "Treatment of sudden sensorineural hearing loss: li. a meta-analysis." *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 133(6): 582-586.
- Conlin AE und Parnes LS (2007). "Treatment of sudden sensorineural hearing loss: II. A Meta-analysis." *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 133(6): 582-586.
- Cope D und Bova R (2008). "Steroids in otolaryngology." *The Laryngoscope* 118(9): 1556-1560.
- Cox TJ und Shield BM (1999). "Audience questionnaire survey of the acoustics of the Royal Festival Hall, London, England." *Acustica* 85(4): 547-559.
- Dagnino-Subiabre A, Munoz-Llancao P, Terreros G, Wyneken U, Diaz-Veliz G, Porter B, Kilgard MP, Atzori M und Aboitiz F (2009). "Chronic stress induces dendritic atrophy in the rat medial geniculate nucleus: effects on auditory conditioning." *Behavioural brain research* 203(1): 88-96.
- Daynes RA, Araneo BA, Dowell TA, Huang K und Dudley D (1990). "Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function." *The Journal of experimental medicine* 171(4): 979-996.
- de Kloet ER, Joels M und Holsboer F (2005). "Stress and the brain: from adaptation to disease." *Nature reviews. Neuroscience* 6(6): 463-475.
- De Kloet ER und Reul JM (1987). "Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems." *Psychoneuroendocrinology* 12(2): 83-105.

- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS und Joels M (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease." *Endocrine reviews* 19(3): 269-301.
- Eggermont JJ und Roberts LE (2004). "The neuroscience of tinnitus." *Trends in neurosciences* 27(11): 676-682.
- Ehret G und Frankenreiter M (1977). "Quantitative analysis of cochlear structures in the house mouse in relation to mechanisms of acoustical information processing." *Journal of comparative physiology* 122(1): 65-85.
- Engineer ND, Percaccio CR, Pandya PK, Moucha R, Rathbun DL und Kilgard MP (2004). "Environmental enrichment improves response strength, threshold, selectivity, and latency of auditory cortex neurons." *Journal of neurophysiology* 92(1): 73-82.
- Felmingham KL, Rennie C, Gordon E und Bryant RA (2012). "Autonomic and cortical reactivity in acute and chronic posttraumatic stress." *Biological psychology* 90(3): 224-227.
- Foldesi I, Falkay G und Kovacs L (1996). "Determination of RU486 (mifepristone) in blood by radioreceptorassay; a pharmacokinetic study." *Contraception* 54(1): 27-32.
- Fries E, Dettenborn L und Kirschbaum C (2009). "The cortisol awakening response (CAR): facts and future directions." *International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology* 72(1): 67-73.
- Gomez-Sanchez EP (1997). "Central hypertensive effects of aldosterone." *Frontiers in neuroendocrinology* 18(4): 440-462.
- Harding GW, Bohne BA und Ahmad M (2002). "DPOAE level shifts and ABR threshold shifts compared to detailed analysis of histopathological damage from noise." *Hear Res* 174(1-2): 158-171.
- Henley DE und Lightman SL (2011). "New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery." *Neuroscience* 180: 1-8.
- Jacobson L und Sapolsky R (1991). "The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis." *Endocrine reviews* 12(2): 118-134.
- Jobin N, de Jonge L und Garrel DR (1996). "Effects of RU 486 on energy expenditure and meal tolerance in normal men." *Journal of the American College of Nutrition* 15(3): 283-288.
- Joels M und Baram TZ (2009). "The neuro-symphony of stress." *Nature reviews. Neuroscience* 10(6): 459-466.

- Joëls M, Pasricha N und Karst H (2013). "The interplay between rapid and slow corticosteroid actions in brain." *European journal of pharmacology* 719(1-3): 44-52.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G und Joels M (2005). "Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(52): 19204-19207.
- Kino T und Chrousos GP (2004). "Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases." *Essays Biochem.* 40: 137-155.
- Kitchener P, Di Blasi F, Borrelli E und Piazza PV (2004). "Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle." *The European journal of neuroscience* 19(7): 1837-1846.
- Knipper M (2007). "Therapeutische Nutzung von Stammzellen." *HNO* 55(11): 845-847.
- Knipper M, Bandtlow C, Gestwa L, Kopschall I, Rohbock K, Wiechers B, Zenner HP und Zimmermann U (1998). "Thyroid hormone affects Schwann cell and oligodendrocyte gene expression at the glial transition zone of the VIIIth nerve prior to cochlea function." *Development* 125(18): 3709-3718.
- Kujawa SG und Liberman MC (2009). "Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(45): 14077-14085.
- Liston C, Cichon JM, Jeanneteau F, Jia Z, Chao MV und Gan WB (2013). "Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance." *Nature neuroscience* 16(6): 698-705.
- Lobarinas E, Salvi R, Baizer J, Altman C und Allman B (2013). "Noise and health special issue: advances in the neuroscience of tinnitus." *Noise & health* 15(63): 81-82.
- Löwenheim H, Waldhaus J, Hirt B, Sandke S und Müller M (2008). "Regenerative Medizin in der Therapie der Innenohrschwerhörigkeit." *HNO* 56(3): 288-300.
- Luttge WG, Davda MM, Rupp ME und Kang CG (1989). "High affinity binding and regulatory actions of dexamethasone-type I receptor complexes in mouse brain." *Endocrinology* 125(3): 1194-1203.

- Ma LY, Itharat P, Fluharty SJ und Sakai RR (1997). "Intracerebroventricular Administration of Mineralocorticoid Receptor Antisense Oligonucleotides Attenuates Salt Appetite in the Rat." *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 2(1): 37-50.
- MacDougall MJ und Howland JG (2013). "Acute stress, but not corticosterone, disrupts short- and long-term synaptic plasticity in rat dorsal subiculum via glucocorticoid receptor activation." *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 23(11): 2611-2619.
- Mathers C, Fat DM, Boerma JT und World Health Organization. (2008). *The global burden of disease : 2004 update*. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL und Weiss JM (1997). "The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions." *Brain research. Brain research reviews* 23(1-2): 79-133.
- Meltser I und Canlon B (2011). "Protecting the auditory system with glucocorticoids." *Hear Res* 281(1-2): 47-55.
- Mori T, Fujimura K, Yoshida M und Suzuki H (2004). "Effects of glucocorticoid receptor antagonist on CAPs threshold shift due to short-term sound exposure in guinea pigs." *Auris, nasus, larynx* 31(4): 395-399.
- Mosges R, Koberlein J, Erdtracht B und Klingel R (2008). "Quality of life in patients with idiopathic sudden hearing loss: comparison of different therapies using the Medical Outcome Short Form (36) Health Survey questionnaire." *Otology & neurotology : official publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology* 29(6): 769-775.
- Müller M (1991). "Frequency representation in the rat cochlea." *Hear Res* 51(2): 247-254.
- Nadol JB, Jr. (1993). "Hearing loss." *The New England journal of medicine* 329(15): 1092-1102.
- Nelson DI, Nelson RY, Concha-Barrientos M und Fingerhut M (2005). "The global burden of occupational noise-induced hearing loss." *American Journal of Industrial Medicine* 48(6): 446-458.
- Norena AJ und Eggermont JJ (2005). "Enriched acoustic environment after noise trauma reduces hearing loss and prevents cortical map reorganization." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(3): 699-705.

- O'Byrne PM und Pedersen S (1998). "Measuring efficacy and safety of different inhaled corticosteroid preparations." *The Journal of allergy and clinical immunology* 102(6 Pt 1): 879-886.
- Ohlemiller KK (2008). "Recent findings and emerging questions in cochlear noise injury." *Hear Res* 245(1-2): 5-17.
- Peden MM, McGee K, Krug E und World Health Organization. Injuries and Violence Prevention Department. (2002). *Injury : a leading cause of the global burden of disease, 2000*. Geneva, Dept. of Injuries and Violence Prevention, Noncommunicable Diseases and Mental Health Cluster, World Health Organization.
- Perez MA, Perez-Valenzuela C, Rojas-Thomas F, Ahumada J, Fuenzalida M und Dagnino-Subiabre A (2013). "Repeated restraint stress impairs auditory attention and GABAergic synaptic efficacy in the rat auditory cortex." *Neuroscience* 246: 94-107.
- Piccirillo JF (2011). "Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss: some questions answered, others remain." *JAMA : the journal of the American Medical Association* 305(20): 2114-2115.
- Pierson TM, Wang Y, DeMayo FJ, Matzuk MM, Tsai SY und Omalley BW (2000). "Regulable expression of inhibin A in wild-type and inhibin alpha null mice." *Mol Endocrinol* 14(7): 1075-1085.
- Pujol R (1989). "[Anatomy and physiology of the cochlea]." *Archives internationales de physiologie et de biochimie* 97(4): A51-78.
- Raphael Y (2002). "Cochlear pathology, sensory cell death and regeneration." *British medical bulletin* 63(1): 25-38.
- Reul JM und de Kloet ER (1985). "Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation." *Endocrinology* 117(6): 2505-2511.
- Reul JM und de Kloet ER (1986). "Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis." *Journal of steroid biochemistry* 24(1): 269-272.
- Roberts LE, Eggermont JJ, Caspary DM, Shore SE, Melcher JR und Kaltenbach JA (2010). "Ringing ears: the neuroscience of tinnitus." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(45): 14972-14979.
- Rossing K, Schjoedt KJ, Smidt UM, Boomsma F und Parving HH (2005). "Beneficial effects of adding spironolactone to recommended antihypertensive

- treatment in diabetic nephropathy: a randomized, double-masked, cross-over study." *Diabetes care* 28(9): 2106-2112.
- Ruben RJ (1967). "Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses." *Acta oto-laryngologica: Suppl* 220:221-244.
- Rucker G und Antes G (2013). "Reply to Tass et al. on "Counteracting tinnitus by acoustic coordinated reset neuromodulation" *Restorative neurology and neuroscience* Vol. 30 (2), 2012." *Restorative neurology and neuroscience* 31(3): 233-234.
- Saklayen MG, Gyebi LK, Tasosa J und Yap J (2008). "Effects of additive therapy with spironolactone on proteinuria in diabetic patients already on ACE inhibitor or ARB therapy: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover trial." *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 56(4): 714-719.
- Schug N, Braig C, Zimmermann U, Engel J, Winter H, Ruth P, Blin N, Pfister M, Kalbacher H und Knipper M (2006). "Differential expression of otoferlin in brain, vestibular system, immature and mature cochlea of the rat." *The European journal of neuroscience* 24(12): 3372-3380.
- Selye H (1936). "A syndrome produced by diverse nocuous agents." *Nature; Nature*.
- Shield B (2006). "Evaluation of the social and economic costs of hearing impairment." *Hear-it AISBL*.
- Siegel GJ und Agranoff BW (1999). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Singer W, K. Kasini, M. Manthey, P. Eckert, P. Armbruster, M. A. Vogt, M. Jaumann, M. Dotta, K. Yamahara, C. Harasztosi, U. Zimmermann, M. Knipper and L. Ruttiger (2018). "The glucocorticoid antagonist mifepristone attenuates sound-induced long-term deficits in auditory nerve response and central auditory processing in female rats." *Journal of Federation of American Societies For Experimental Biology* 32(6): 3005-3019.
- Singer W, Zuccotti A, Jaumann M, Lee SC, Panford-Walsh R, Xiong H, Zimmermann U, Franz C, Geisler HS, Kopschall I, Rohbock K, Varakina K, Verpoorten S, Reinbothe T, Schimmang T, Ruttiger L und Knipper M (2013). "Noise-induced inner hair cell ribbon loss disturbs central arc mobilization: a novel molecular paradigm for understanding tinnitus." *Molecular neurobiology* 47(1): 261-279.
- Smith DF und Toft DO (1993). "Steroid receptors and their associated proteins." *Mol Endocrinol* 7(1): 4-11.

- Tahera Y, Meltser I, Johansson P, Bian Z, Stierna P, Hansson AC und Canlon B (2006). "NF-kappaB mediated glucocorticoid response in the inner ear after acoustic trauma." *Journal of neuroscience research* 83(6): 1066-1076.
- Tahera Y, Meltser I, Johansson P, Hansson AC und Canlon B (2006). "Glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappa B interactions in restraint stress-mediated protection against acoustic trauma." *Endocrinology* 147(9): 4430-4437.
- Takahashi K, Kusakari J, Kimura S, Wada T und Hara A (1996). "The effect of methylprednisolone on acoustic trauma." *Acta oto-laryngologica* 116(2): 209-212.
- Takemura K, Komeda M, Yagi M, Himeno C, Izumikawa M, Doi T, Kuriyama H, Miller JM und Yamashita T (2004). "Direct inner ear infusion of dexamethasone attenuates noise-induced trauma in guinea pig." *Hear Res* 196(1-2): 58-68.
- Tasker JG, Di S und Malcher-Lopes R (2006). "Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors." *Endocrinology* 147(12): 5549-5556.
- Tass PA, Adamchic I, Freund HJ, von Stackelberg T und Hauptmann C (2013). "Rebuttal to reply by G. Rucker and G. Antes on Tass et al. "Counteracting tinnitus by acoustic coordinated reset neuromodulation", *Restorative neurology and neuroscience* Vol. 30(2), 2012." *Restorative neurology and neuroscience* 31(3): 235-237.
- Terakado M, Kumagami H und Takahashi H (2011). "Distribution of glucocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in the rat inner ear." *Hear Res* 280(1-2): 148-156.
- Thorpe JB, Rajabi N und Decatanzaro D (2012). "Circadian rhythm and response to an acute stressor of urinary corticosterone, testosterone, and creatinine in adult male mice." *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 44(6): 429-435.
- Trune DR und Kempton JB (2009). "Blocking the glucocorticoid receptor with RU-486 does not prevent glucocorticoid control of autoimmune mouse hearing loss." *Audiology & neuro-otology* 14(6): 423-431.
- Veldhuis HD, Van Koppen C, Van Ittersum M und De Kloet ER (1982). "Specificity of the adrenal steroid receptor system in rat hippocampus." *Endocrinology* 110(6): 2044-2051.

- Vio MM und Holme RH (2005). "Hearing loss and tinnitus: 250 million people and a US\$10 billion potential market." *Drug discovery today* 10(19): 1263-1265.
- Walker RD und Cumming GR (1964). "RESPONSE OF THE INFANT KIDNEY TO DIURETIC DRUGS." *Canadian Medical Association journal* 91: 1149-1153.
- Wang Y und Liberman MC (2002). "Restraint stress and protection from acoustic injury in mice." *Hear Res* 165(1-2): 96-102.
- Wei BP, Mubiru S und O'Leary S (2006). "Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss." *The Cochrane database of systematic reviews*(1): CD003998.
- Wei BP, Stathopoulos D und O'Leary S (2013). "Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss." *The Cochrane database of systematic reviews*(7): Cd003998.
- Wei BP, Stathopoulos D und O'Leary S (2013). "Steroids for idiopathic sudden sensorineural hearing loss." *The Cochrane database of systematic reviews* 7: CD003998.
- Weinberger NM (2003). "The nucleus basalis and memory codes: auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory." *Neurobiology of learning and memory* 80(3): 268-284.
- Yang LN und Shield BM (2000). "Development of a ray tracing computer model for the prediction of the sound field in long enclosures." *J Sound Vib* 229(1): 133-146.
- Yang LN und Shield BM (2001). "The prediction of speech intelligibility in underground stations of rectangular cross section." *J Acoust Soc Am* 109(1): 266-273.
- Yao X und Rarey KE (1996). "Localization of the mineralocorticoid receptor in rat cochlear tissue." *Acta oto-laryngologica* 116(3): 493-496.
- Young EA, Abelson J und Lightman SL (2004). "Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health." *Frontiers in neuroendocrinology* 25(2): 69-76.
- Zarrow MX, Haltmeyer GC, Denenberg VH und Thatcher J (1966). "Response of the infantile rat to stress." *Endocrinology* 79(3): 631-634.
- Zhao B, Chua SS, Burcin MM, Reynolds SD, Stripp BR, Edwards RA, Finegold MJ, Tsai SY und DeMayo FJ (2001). "Phenotypic consequences of lung-specific inducible expression of FGF-3." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(10): 5898-5903.

Zhou QG, Zhu LJ, Chen C, Wu HY, Luo CX, Chang L und Zhu DY (2011).
"Hippocampal neuronal nitric oxide synthase mediates the stress-related depressive behaviors of glucocorticoids by downregulating glucocorticoid receptor." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(21): 7579-7590.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss von Stress auf die Hörfunktion in Abhängigkeit der Steroidrezeptor-Subtypen nach einer akustischen Überstimulation“ selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. M. Knipper, PD Dr. L. Rüttiger und Dr. M. Jaumann.

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Hörforschungszentrum Tübingen (Sektion für Molekulare Hörphysiologie) unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. M. Knipper, PD Dr. L. Rüttiger und Dr. M. Jaumann. durchgeführt.

Der hauptsächliche Teil der in dieser Arbeit aufgeführten Experimente (Anästhesie der Versuchstiere, akustische Überstimulation, hirnstammaudiometrische Messungen, Messung distorsiv produzierter otoakustischer Emissionen, Urinkollektion, immunhistochemische Verfahren, mikroskopische Auswertung der Kryostatschnitte) sowie die statistische Auswertung wurden von mir eigenständig durchgeführt. Sämtliche Abbildungen dieser Dissertation wurden von mir erstellt und entworfen.

Die mikroskopische Präparation der Cochleae aus dem Felsenbein nach Dekapitation der Versuchstiere und die folgende Anfertigung der Kryostatschnitte zur weiteren Untersuchung erfolgte durch Fr. Karin Rohbock. Zur quantitativen Analyse der KORT- und Kreatinin-Konzentrationen in den Urinproben wurde ein externes tiermedizinisches Labor konsultiert (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg).

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Marlies Knipper für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die exzellente Betreuung, die inspirierenden Gespräche und insbesondere für ihr Vertrauen bedanken.

Herrn PD Dr. Lukas Rüttiger gilt ebenfalls mein größter Dank für die unermüdliche Unterstützung, für das Bereitstellen von interessantem Lesestoff, immer schlaue Materialien und für das großzügige Teilen seiner Ideen und seines großen Wissens – vielen Dank lieber Lukas!

Bei Herrn Dr. Mirko Jaumann möchte ich mich für seine konstruktive Art und sehr lehrreiche Betreuung im Labor bedanken.

Frau Karin Rohbock danke ich vor allem für ihre ausgezeichnete Hilfe bei den Präparationen der Versuchstiere, aber auch für die Geduld mit mir und für ihre köstlichen Zitronenkekse während der Pausenzeit.

Ebenfalls bin ich allen anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe – Dr. Wibke Singer, Dr. Ulrike Zimmermann, Dr. Dario Campanelli, Iris Köpschall und Hyun-Soon Geisler – für jeglichen Beistand und Ratschlag dankbar. Ohne ihre Hilfe wäre vieles sicherlich nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Beteiligten des IZKF-Promotionskollegs für die Begleitung und Unterstützung auf verschiedensten Ebenen.

Letztlich wäre diese Arbeit ohne den starken Rückhalt meiner Familie unmöglich gewesen, sie waren stets eine unersetzbare Stütze. Insbesondere danke ich meinen Eltern von ganzem Herzen, die mich in den vielen Jahren bei Allem mit ganzer Kraft unterstützt haben und mir bei der Verwirklichung meiner Ziele stets zur Seite standen. Danke für viel Verständnis und Ansporn der letzten Jahre!