

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Hals - Nasen - Ohrenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier)

**Die Wirkung des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin im  
Salicylatmodell auf die neuronale Aktivität im Hörsystem  
der Mongolischen Wüstenrennmaus:  
eine <sup>14</sup>C-2-Deoxyglukose-Studie**

Jil Kamilla Schneider-Affeld

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. E. Oestreicher

2. Univ.-Prof. Dr. K.- F. Hamann

Die Dissertation wurde am 03.08.2009 bei der Technischen  
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 06.04.2011 angenommen.

für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
I. Einleitung .....	7
1. Tinnitus .....	7
2. Das Ohr .....	8
2.1 Das äußere Ohr und das Mittelohr .....	8
2.2 Das innere Ohr .....	9
2.3 Die Hörbahn .....	13
2.4 Colliculus inferior .....	14
2.5 Auditorischer Cortex .....	15
3. Hypothesen zur Entstehung von Tinnitus .....	15
3.1 Salicylatmodell .....	21
3.1.a Salicylat .....	21
3.1.b Salicylat-Tinnitusmodell .....	23
3.2 Die <sup>14</sup> C-2-DG-Methode .....	24
4. Fokus unserer Versuche: der Glutamat-Rezeptor .....	26
4.1 Physiologie Glutamat-Rezeptoren .....	26
4.2 Exzitotoxizität .....	28
5. Fragestellung .....	29
5.1 NMDA-Antagonisten – eine therapeutische Option bei Tinnitus? .....	29
5.2 Möglichkeiten der Unterdrückung der Tinnitus-Aktivität am NMDA- Rezeptor durch Glutamat-Rezeptor-Antagonisten .....	30
5.3 Memantin .....	30
II. Material und Methoden .....	32
1. Versuchstiere .....	32
2. Substanzen und Applikationsweisen .....	33
3. <sup>14</sup> C-2-DG-Methode und Bildbearbeitung .....	35
4. Experimentalgruppen .....	38

III. Ergebnisse.....	39
1. Salicylat .....	39
1.1 Salicylat systemisch versus NaCl systemisch.....	39
1.2 Salicylat lokal (cochleär) einseitig links versus NaCl lokal (cochleär) einseitig links .....	42
1.3 Salicylat lokal (cochleär) beiderseits versus NaCl lokal (cochleär) beiderseits .....	46
2. Therapeutische Vergleiche (= Nachbehandlung mit dem NMDA- Rezeptor-Antagonisten Memantin).....	49
Salicylat systemisch + Memantin systemisch versus Salicylat systemisch + NaCl systemisch.....	49
3. Prophylaktische Vergleiche (NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin vor Salicylatapplikation) .....	52
NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin systemisch vorher appliziert .....	52
IV. Diskussion .....	55
1. <sup>14</sup> C-2-DG Befunde nach Salicylat.....	56
2. Therapeutische Studien .....	63
2.1 Memantin.....	63
2.2 Memantin nach Salicylatintoxikation .....	64
3. Prophylaktische Vergleiche (Memantin systemisch vor Auslösung von Tinnitus durch Salicylat) .....	66
Salicylat systemisch versus NaCl systemisch.....	66
V. Zusammenfassung .....	68
VI. Anhang .....	70
VII. Literaturverzeichnis.....	73
VIII. Danksagung .....	90

## Abkürzungsverzeichnis

AAF	Anteriores auditorisches Feld des auditorischen Cortex
Abb.	Abbildung
AC	Auditorischer Cortex
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AI	Primäres auditorisches Feld des auditorischen Cortex
Applik.	Applikation
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
<sup>14</sup> C	Radioaktiv markiertes Kohlenstoffatom
<sup>14</sup> C-2-DG	<sup>14</sup> C-2-Deoxyglukose
°C	Grad Celsius
ca.	circa
COX	Cyclooxygenase
dB SPL	Decibel sound pressure level
DCN	Dorsaler Nucleus cochlearis
2-DG	2-Deoxyglukose
d.h.	das heißt
DPOAE	Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen
Dr.	Doktor
Dr. rer. nat.	Doktor rerum naturalium
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera
e.V.	eingetragener Verein
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
g/d	Gramm pro Tag
G-Protein	Guanosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein
2-DG-6-P	<sup>14</sup> C-2-Deoxyglukose-6-Phosphat
Glukose-6-P	Glukose-6-Phosphat
IC	Colliculus inferior
IHC	innere Haarzelle
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KHz	Kilohertz
LL	Lemniscus lateralis

LOC	Laterales olivocochleäres Faserbündel
µCi	Mikro Curie (Maßeinheit für die Radioaktivität)
Mema	Memantin
mg	Milligramm
MGB	Corpus geniculatum mediale
mg/d	Milligramm pro Tag
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MOC	Mediales olivocochleäres Faserbündel
MRT	Magnetresonanztomografie
mV	Millivolt
n	Anzahl der Tiere
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nucleus cochlearis
n. Chr.	nach Christus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
OHC	äußere Haarzelle
p	Ergebnis eines statistischen Signifikanzwertes
PET	Positronenemissionstomografie
Prof.	Professor
prophyl	prophylaktisch
RNA	Ribonukleinsäure
Sali	Salicylat
SD	Standardabweichung
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Statistiksoftware)
syst	systemisch
therap	therapeutisch
Treat.	Treatment (Behandlung)
v. Chr.	vor Christus
vs.	versus
Wiederh.	Wiederholung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
*	signifikant
**	hochsignifikant

# I. Einleitung

## 1. Tinnitus

Als Tinnitus bezeichnet man Hörempfindungen unterschiedlicher Art, die nicht von einer Schallquelle außerhalb des menschlichen Körpers erzeugt werden (Chan, 2009; Landgrebe et al., 2010).

Laut einer Studie der Deutschen Tinnitus-Liga e.V. von 1999 leiden etwa 4% der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland älter als 10 Jahre (2,9 Millionen Bürger) an Tinnitus (im Vergleich: Diabetes mellitus 4-5%, arterielle Hypertonie 15%). Jährlich kommen ca. 0,33% (250.000 Bürger) als chronische Tinnituspatienten hinzu (Pilgramm et al., 1999).

Diese Zahlen belegen die Bedeutung des Themas Tinnitus.

Für die Betroffenen ist Tinnitus oft sehr quälend. Neben permanenter Geräuschbelästigung kann er von Konzentrations- und Schlafstörungen über soziale Isolation, Angst oder Depression bis hin zum Suizid führen.

Bis heute existiert keine kausale Therapie.

Wir unterscheiden objektiven und subjektiven Tinnitus.

Beim (sehr seltenen) objektiven Tinnitus kann das „Geräusch“ von außen wahrgenommen (z.B. mit einem Stethoskop) oder zumindest gemessen werden, d.h. es existiert eine körpereigene Schallquelle wie z.B. abnorme Strömungen in den Blutgefäßen oder Muskelkontraktionen (Feldmann, 1998).

Der weit häufigere subjektive Tinnitus ist definiert als ein nur vom Betroffenen wahrgenommenes Geräusch (Brummen, Pfeifen, Zischen oder Rauschen), für welches es keine messbare Schallquelle gibt.

Diese Arbeit befasst sich im weiteren Verlauf mit dem subjektiven Tinnitus.

Tinnitus ist ein Begleitsymptom, das sowohl bei unterschiedlichen Erkrankungen des Hörsystems (Mittelohr- und Innenohrerkrankungen, Erkrankungen des Hörnerven und des auditorischen Cortex) als auch

außerhalb des Hörsystems entstehen kann (z.B. bei neurologischen Krankheitsbildern wie dem zerebralen Insult).

Da bis heute kein objektiver Nachweis des Tinnitus gelungen ist und der mögliche Entstehungsort sowie der Pathomechanismus unklar sind, gibt es bisher nur sehr eingeschränkte therapeutische Möglichkeiten.

Zum besseren Verständnis des Phänomens Tinnitus und der aktuellen Hypothesen wird zunächst die Anatomie und Physiologie des Hörsystems vorgestellt.

## **2. Das Ohr**

### **2.1 Das äußere Ohr und das Mittelohr**

(Abbildung 1.1)

Schall wird von der Ohrmuschel wie von einem Trichter aufgenommen und die Schwingungen werden an das Trommelfell, als Grenze zum Mittelohr, weitergeleitet.

Das Mittelohr

Hinter dem Trommelfell liegt die Paukenhöhle, ein mit Luft gefüllter Raum mit den Gehörknöchelchen Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes), die gelenkig miteinander verbunden sind und den Schall vom Trommelfell an das Innenohr weiterleiten. Die Fußplatte des Stapes sitzt beweglich im ovalen Fenster, welches eine Öffnung zum flüssigkeitsgefüllten Innenohr bildet. Der Schallwellenwiderstand (Impedanz) ist in der Luft geringer als in den Innenohrflüssigkeiten. Aus diesem Grund müsste der größte Teil der Schallenergie im Innenohr eigentlich durch Reflexion verloren gehen, was zu einem schlechteren Hörvermögen führen würde. Doch durch den Trommelfell-Gehörknöchelchen-Apparat erfolgt eine Impedanzanpassung, die zu einer Reduktion der Reflexionsverluste und somit zu einer Verbesserung unseres Hörvermögens führt (Klinke, 2005).

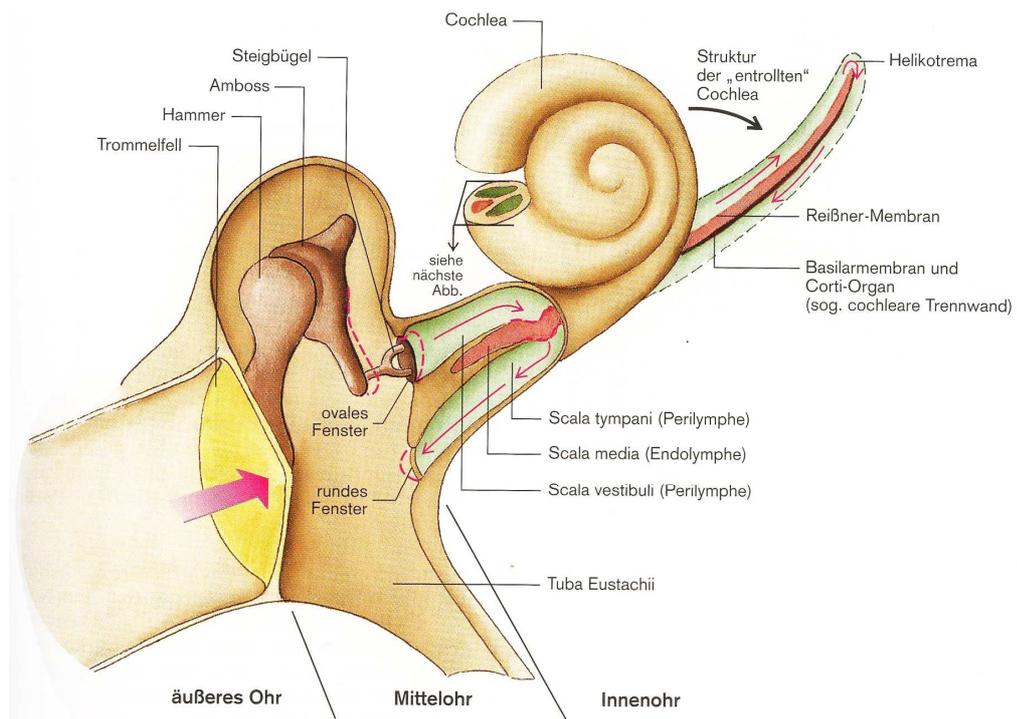


Abb. 1.1: Schema von Mittelohr und Innenohr (Klinke, 2005, S.661)

## 2.2 Das innere Ohr

(Abbildungen 1.2 und 1.3)

Drei schneckenförmig gewundene Kanäle (Scala vestibuli, Scala media und Scala tympani) bilden das Innenohr (Cochlea). Diese Kanäle sind mit verschiedenen Flüssigkeiten gefüllt. Scala vestibuli und Scala tympani enthalten Perilymphe, deren Zusammensetzung mit vielen Natrium- und wenigen Kalium-Ionen der Extrazellulärflüssigkeit entspricht, während die Scala media mit Endolymphe gefüllt ist, die mit einem Gehalt von wenigen Natrium- und vielen Kalium-Ionen der Intrazellulärflüssigkeit ähnelt. Die Grenze zwischen Endolymphraum und Scala vestibuli bildet die Reissner-Membran. Zwischen Endolymphraum und Scala tympani liegt die Basilarmembran, die den sensorischen Apparat, das Corti-Organ, trägt.

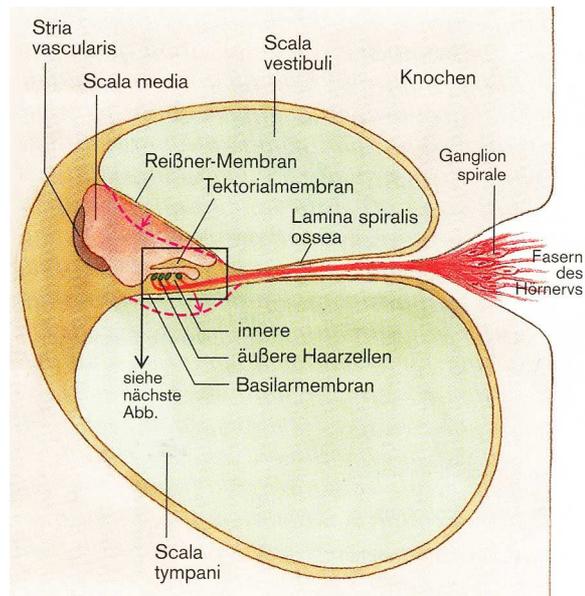


Abb. 1.2: Querschnitt durch die Cochlea (Klinke, 2005, S.662)

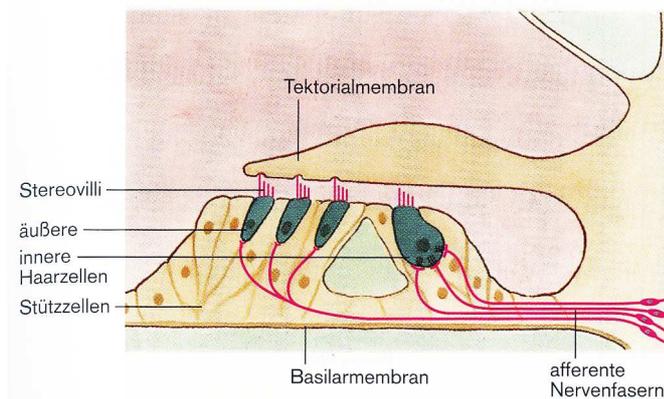


Abb. 1.3: Querschnitt durch das Corti-Organ (Klinke, 2005, S.663)

Das Corti-Organ ist das cochleäre Rezeptororgan. Es umfasst zwei Typen von insgesamt etwa 15.000 Rezeptorzellen. Die inneren Haarzellen (IHCs, ca. 3.000) sind einreihig angeordnet, während die äußeren Haarzellen (OHCs, ca. 12.000) drei Reihen bilden (Pujol, 1990, 2010). Zusätzlich befindet sich hier auch der Stützapparat bestehend aus Pfeiler-, Deiters-, Claudius- und Phalangealzellen. Er gewährleistet die Stabilität des Corti-Organs bei mechanischen Belastungen.

Über den Haarzellen liegt die Tectorialmembran. An der zu ihr hin gerichteten Seite jeder Haarzelle befinden sich die Stereovilli, feine Härchen unterschiedlicher Länge, die bei den OHCs in der

Tektorialmembran verankert sind. Bei den IHCs liegt die Tektorialmembran den Stereovilli nur auf.

Schallwellen (via Trommelfell und Gehörknöchelchen auf die Perilymphe übertragen) setzen die Basilmembran wellenförmig in Schwingung (Wanderwelle) und führen zu einer Bewegung gegen die feste Tektorialmembran. Durch die Abscherbewegung werden die Stereovilli der OHCs abgebogen. Gleichzeitig wirken die OHCs als sogenannte „Verstärker“ bzw. „Dämpfer“ der Bewegung der Basilmembran, indem sie aktiv ihre Länge verändern. Diese Aktivität wird durch das Molekül Prestin (Abbildung 1.4) ermöglicht (Oliver et al., 2001; Zheng et al., 2000). Prestin sitzt in der basolateralen Membran der OHCs.

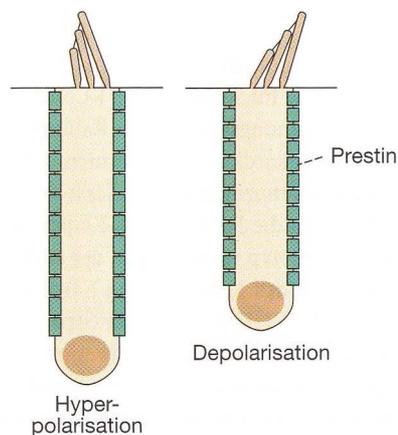


Abb. 1.4: Elektromotilität der OHCs durch Konformationsänderungen des Membranproteins Prestin (Oliver und Fakler, 2008, S.132)

Für jede Frequenz gibt es einen bestimmten Ort auf der Basilmembran, an dem die Wanderwelle ihre maximale Amplitude hat und die Haarzellen reizt. Dieser Ort befindet sich für hohe Frequenzen am basalen Ende, für mittlere in der Schneckenmitte und für tiefe Frequenzen am apikalen Ende. Die Zuordnung für jede Frequenz nennt man auch Tonotopie oder Frequenz-Orts-Abbildung.

Tonotopie besteht auch im weiteren Verlauf des auditorischen Systems wie z.B. im Colliculus inferior (IC) und dem auditorischen Cortex (AC) (Webster, 1992).

Die Abscherbewegung bewirkt einen Flüssigkeitsstrom unterhalb der Tektorialmembran und bewegt so die Stereovilli der IHCs (Abbildung 1.5).

Dieser Vorgang führt zur Freisetzung von Ionen (Kalium und Calcium), der Neurotransmitter Glutamat wird ausgeschüttet und der Schallreiz in ein Rezeptorpotenzial umgewandelt (Transduktion) (Klinke, 2005).

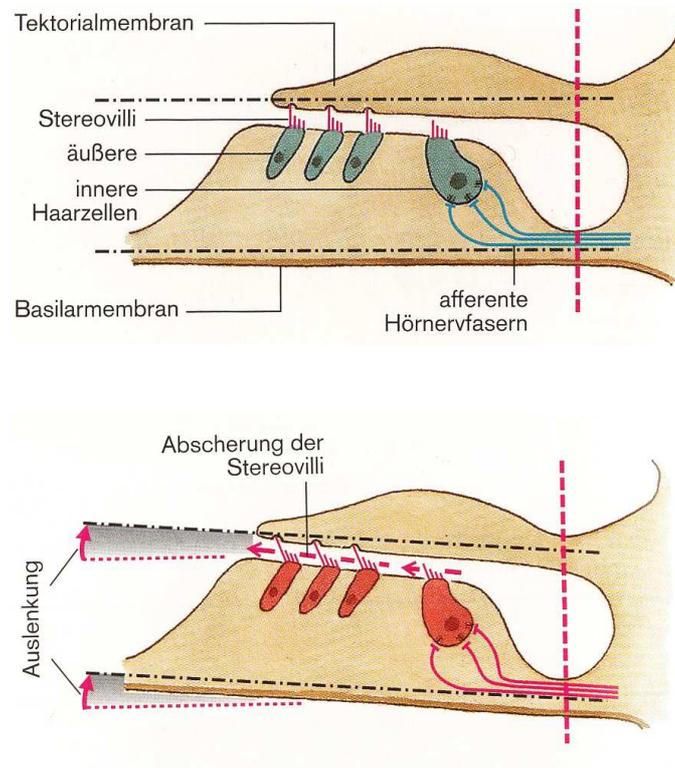


Abb. 1.5: Bewegungen der Stereovilli beim Schwingen von Basilar- und Tektorialmembran (Klinke, 2005, S.664)

Die Haarzellen sind mit afferenten und efferenten Nervenfasern verbunden. Ca. 95% der afferenten Nervenfasern innervieren die IHCs und nur die restlichen 5% die OHCs.

Die Neurone, die mit den IHCs verbunden sind, sind als Typ-I-Neurone größer als die Typ-II-Neurone und ab dem Ganglion spirale myelinisiert. Jedes Neuron ist mit nur einer Sinneszelle verbunden, jedoch bildet jede IHC Synapsen mit ca. 10-15 Typ-I-Neuronen, d.h. es gibt etwa 30.000 Typ-I-Neurone für ca. 3.000 Sinneszellen.

Die Neurone ziehen von den IHCs über das Ganglion spirale zum Nucleus cochlearis. Dort werden sie auf das zweite Neuron umgeschaltet und ins zentrale Nervensystem (ZNS) weitergeleitet.

Der restliche Teil der afferenten Fasern sind Typ-II-Neurone. Sie verzweigen sich und ziehen zu den OHCs. Jedes Neuron innerviert

mehrere OHCs einer Reihe. Ihre Funktion ist bis heute weitgehend unbekannt (Eybalin, 1993).

Die efferenten Nervenfasern gehen von zwei verschiedenen Ursprüngen aus, der lateralen und medialen oberen Olive. Über das efferente System wird auf die Funktion des Corti-Organs Einfluss genommen:

Ca. 60% der efferenten Fasern sind Teile des lateralen Anteils des olivocochleären Faserbündels (LOC), welches hauptsächlich auf die ipsilaterale Seite projiziert. Hier bilden die Fasern Synapsen mit den Dendriten der afferenten Typ-I-Neurone der IHCs. So können sie direkten Einfluss auf deren Aktivität nehmen.

Die restlichen fast 40% der efferenten Fasern sind Teile des medialen Anteils des olivocochleären Faserbündels (MOC). Dieses projiziert in beide Cochleae. Die Synapsen enden direkt an den OHCs und mittels dieser Fasern wird die Empfindlichkeitskontrolle geregelt (Warr, 1992).

## **2.3 Die Hörbahn**

(Abbildung 1.6)

Die Aktionspotenziale werden vom Nervus vestibulocochlearis (VIII. Hirnnerv) an den Nucleus cochlearis (NC) im Hirnstamm mit seinen drei Unterkernen (dorsaler (DCN), posteroventraler und anteroventraler Nucleus cochlearis) weitergeleitet.

Von hier ziehen die Neurone zur oberen Olive. Im Lemniscus lateralis (LL) – einem wichtigen auditorischen Fasertrakt – kreuzt dann der Großteil der Hörnervenfasern vom NC und einem Teil der oberen Olive auf die kontralaterale Seite zum IC. Ein kleinerer Teil verläuft über die obere Olive im LL in den ipsilateralen IC.

Vom IC wiederum ziehen die Fasern in das Corpus geniculatum mediale (MGB) im Thalamus und dann weiter in den AC (Oliver und Fakler, 2008).

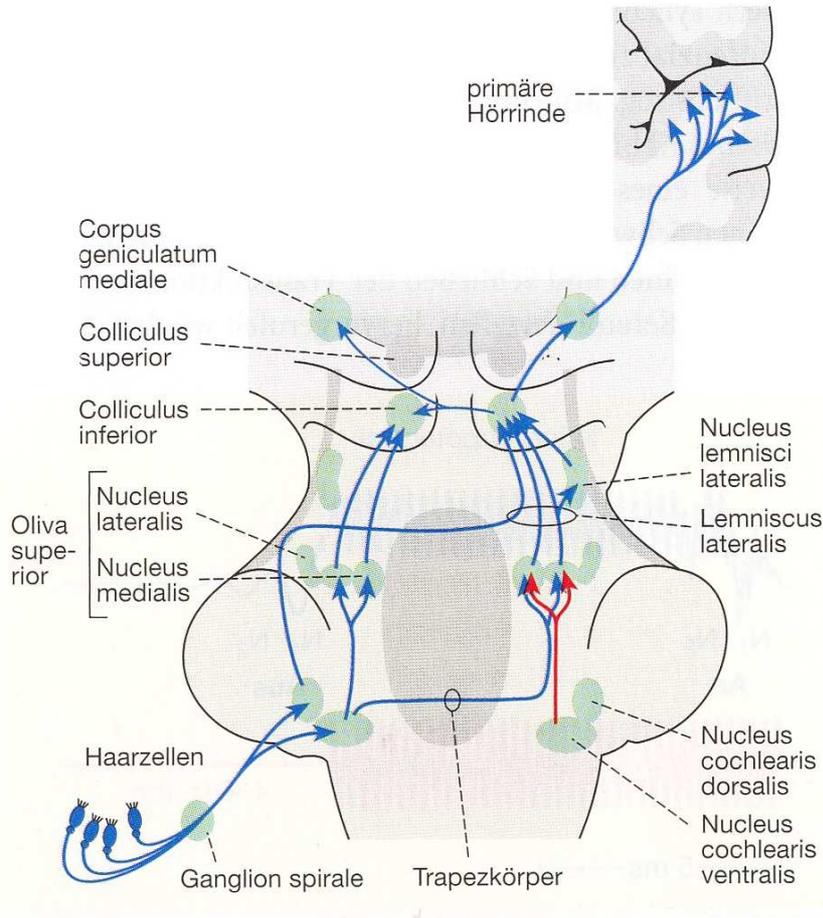


Abb. 1.6: Aufbau der Hörbahn (Oliver und Fakler, 2008, S.134)

## 2.4 Colliculus inferior

Der IC ist als hinterer Kern der Vierhügelplatte Teil des Mittelhirns. Hier ist er das wichtigste auditorische Gebiet als Hauptumschaltstelle zwischen auditorischem Hirnstamm und Thalamus (Oliver und Huerta, 1992; Trepel, 2008). Man kann ihn anatomisch in drei Untereinheiten aufteilen, den zentralen IC, den dorsalen Cortex und den externen Cortex des IC (Budinger et al., 2000).

Der zentrale IC zeigt eine tonotope Ordnung. Die Haupteingangsinformation stammt aus den auditorischen Hirnstammkernen. Die Neurone des IC sind an der Analyse von zeitlichen oder räumlichen Mustern beteiligt (Oliver und Huerta, 1992).

## 2.5 Auditorischer Cortex

Der AC gehört zum Neocortex und besteht aus verschiedenen Feldern (Abbildung 1.7). Den größten Raum nimmt das primäre auditorische Feld AI ein, rostral hierzu liegt das anteriore auditorische Feld AAF. Beide sind tonotop aufgebaut, spiegelbildlich zueinander. Weitere Bereiche sind das posteriore Feld, welches sich in einen dorsalen und einen ventralen Teil untergliedern lässt, sowie das dorsale, ventrale und anteroventrale Feld (Thomas et al., 1993; Scheich et al., 1993).

Der AC ist an der primären Verarbeitung auditorischer Stimuli beteiligt.

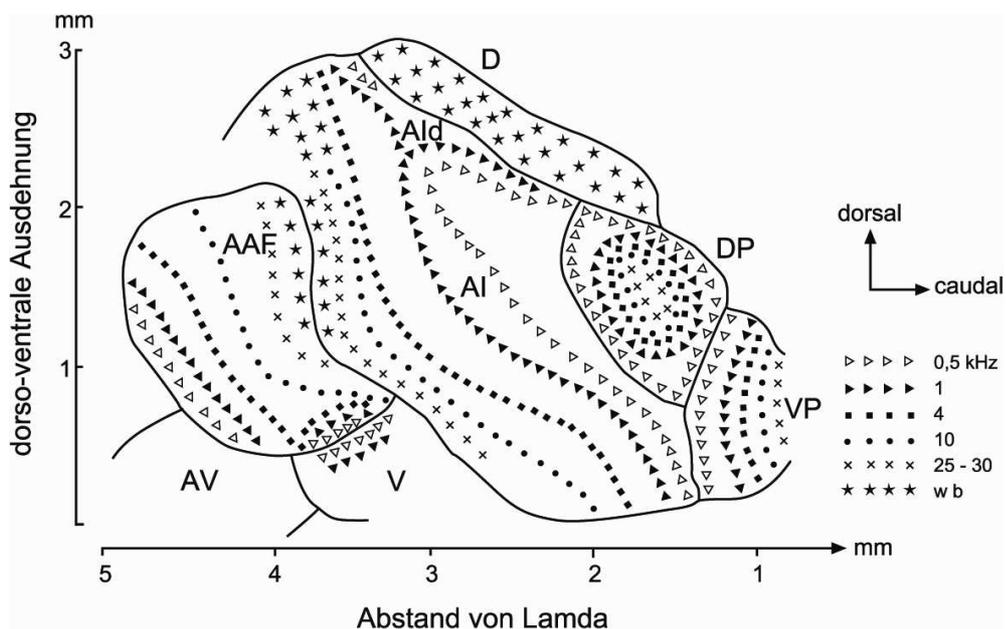


Abb. 1.7: Unterteilung des AC in die verschiedenen Felder mit tonotoper Anordnung (Thomas et al., 1993, S.893), elektro-physiologische Karte

## 3. Hypothesen zur Entstehung von Tinnitus

In der Klinik kann Tinnitus bei einer Vielzahl von Erkrankungen, vor allem des Hörsystems, oder als Nebenwirkung von Medikamenten auftreten. In der Regel ist er Begleitsymptom bei cochleären Störungen, wie z.B. beim Hörsturz, chronischen Lärmschäden, akuten Knalltraumata, Presbyakusis, ototoxischen Schäden (Cisplatin, Aminoglykoside) und hereditären Hörminderungen. Er kann jedoch auch ohne erkennbare cochleäre Ursache auftreten. So ist Tinnitus ein mögliches Symptom bei

Erkrankungen der zentralen Hörbahn (Akustikusneurinom), aber auch bei neurologischen (zerebrale Durchblutungsstörungen und Degenerationsvorgänge, Schädel-Hirn-Traumata, Multiple Sklerose) sowie orthopädischen Krankheitsbildern (Funktionsstörungen der Halswirbelsäule und des Kiefergelenkes).

Aus der Auflistung wird ersichtlich, dass als Entstehungsort jeglicher Abschnitt der Hörbahn möglich ist und dass die auslösenden Erkrankungen durchaus unterschiedlich sein können. Der Entstehungsort (Ort der Generierung) ist also variabel und das neurophysiologische Korrelat von Tinnitus bis heute nicht eindeutig geklärt, da es kein objektives Nachweisverfahren gibt.

Als zugrunde liegende pathophysiologische Vorgänge werden unterschiedliche Möglichkeiten diskutiert:

Häufig gilt eine Störung der Haarzellfunktion im Innenohr als Ursache für die Entstehung von Tinnitus.

Zenner und Ernst berichteten 1993 von Funktionsstörungen der IHCs oder OHCs bei Meerschweinchen, wobei es durch Ionenkanalstörungen zu einer Hyperpolarisation des Hörnerven komme. Dies könne eine Entstehungsmöglichkeit für ein Tinnituskorrelat sein.

Pujol et al. beschrieben 1993, dass An- und Hypoxie sowie Lärm zu exzessiver Glutamatausschüttung an den IHCs von Meerschweinchen führen. Dies löse ein Anschwellen der Dendriten der afferenten Typ-I-Neurone, einen Funktionsverlust der Nervenfasern und nach starken oder repetitiven Zuständen schließlich den Zelltod aus (Exzitotoxizität siehe Einleitung Punkt 4.2). Die durch die Exzitotoxizität bedingte Hypererregbarkeit des Hörnerven könnte auch beim Menschen Ausgangspunkt für posttraumatischen Tinnitus sein.

Guitton et al. konnten 2003 experimentell zeigen, dass durch Salicylatgabe bei ihren Versuchstieren (Ratten) die cochleären N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren aktiviert wurden. Dies würde zur Entstehung von „Tinnitusverhalten“ bei den Tieren beitragen. Als Ursache komme eine erhöhte Öffnungswahrscheinlichkeit der NMDA-Rezeptoren infrage als mögliche Folge der erhöhten Arachidonsäure-Konzentration. Salicylat führt durch Hemmung der Cyclooxygenase (COX) zu vermehrter Bildung von

Arachidonsäure. NMDA-Antagonisten verhinderten in dieser Studie tinnitustypisches Verhalten.

Ruel et al. bestätigten 2008 diese Befunde und zeigten ebenfalls die Aktivierung der cochleären NMDA-Rezeptoren an den IHCs durch Glutamat – ausgelöst durch Salicylat.

Eggermont diskutierte im Jahr 2000 die Tinnitusgenerierung – ausgelöst durch Lärm – durch eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration der Haarzellen, die eine vermehrte Ausschüttung von Neurotransmittern an den IHCs nach sich ziehe. Die Folge sei eine erhöhte spontane Aktivität in den afferenten Nerven und folglich Tinnitus.

Kaltenbach et al. vermuteten im Jahr 2002 die Ursache der Tinnituserstehung in einem Anstieg der Aktivität im DCN aufgrund des Verlustes der Funktion der OHCs. Die Studie stützt sich auf Ergebnisse aus Tierversuchen mit dem Zytostatikum Cisplatin, welches zu einem cochleären Haarzellschaden und zu Tinnitus beim Menschen führen kann. Für den Aktivitätsanstieg im DCN diskutierten die Autoren eine Veränderung in der Balance der afferenten Typ-I- und -II-Neurone. Diese Veränderung führe zu einer Verschiebung des exzitatorischen und inhibitorischen Gleichgewichts der DCN-Neurone und werde im Cortex als Tinnitus wahrgenommen.

Um welche Funktionsstörung im Innenohr es sich auch exakt handelt, die Tinnitus auslöst, als neurophysiologisches Korrelat wird häufig eine veränderte Spontanrate des Hörnerven angesehen:

Schon 1970 diskutierten Kiang et al., ob das Auftreten unterschiedlicher Aktivitätsverteilung in tonotopisch benachbarten Gebieten des Hörnerven oder ob eine unterdrückte Aktivität in diesem (nach der Gabe von ototoxischen Medikamenten) zu Tinnitus bzw. Korrelaten, die einem Tinnitus beim Tier entsprechen könnten, führe. Sie sahen pathologische Antwortmuster ausschließlich in Gebieten des Hörnerven von Katzen, der Orten in der Cochlea mit nur teilweisem Verlust der Haarzellen entsprach.

Evans und Borerwe fanden im Gegensatz dazu im Jahr 1982 eine erhöhte Aktivität im Hörnerv der Katze (vor allem in den hohen Frequenzen) ausgelöst durch Salicylat. Stypulkowski 1990 und Kumagai et al. 1991 bestätigten diese erhöhte Spontanrate experimentell am Meerschweinchen.

Stypulkowski berichtete über eine Aktivitätssteigerung bei 200 mg/kg KG Salicylat, Kumagai et al. beschrieben die Steigerung erst bei hohen Dosen Salicylat (400 mg/kg KG).

Müller et al. (2003) hingegen konnten eine erhöhte Spontanrate im Hörnerv nach Salicylatgabe am Gerbil nicht zeigen.

Eggermont berichtete 1990 über eine pathologische Synchronisation von spontaner Aktivität der einzelnen Fasern des Hörnerven ausgelöst durch verstärkte Transmitterausschüttung an den Haarzellsynapsen nach unvermitteltem Kationenfluss (Kalium und/oder Calcium).

Lenarz et al. (1993) sowie Lenarz (1998) beschrieben keine Änderung der Spontanrate des Hörnerven (diese könne sich erhöhen oder auch erniedrigen), sondern vielmehr ein abnormes Muster der Spontanaktivität der einzelnen Neurone der verschiedenen Nervenfasern oder von deren Zusammenspiel. Diese geänderte Spontanaktivität der Neurone imitiere die Qualitäten eines physiologischen Tons und resultiere somit in Tinnitus bzw. Korrelaten, die einem Tinnitus beim Tier entsprechen könnten.

Wahrscheinliche Ursache sei die Synchronisation der Aktivität der verschiedenen Synapsen nach spontanem Ioneneinstrom (Kalium oder Calcium – Leckströme), der zu dauerhafter Haarzelldepolarisation führe und einen konstanten Transmitter-Ausstoß an den Synapsen verursache (Aktionspotenziale). Ebenso könnten unkontrollierte Kontraktionen der OHCs die IHCs stimulieren und Aktionspotenziale auslösen, die weitergeleitet würden.

Die meisten Autoren stimmen darin überein, dass beim Tinnitus auf jeden Fall eine Veränderung im auditorischen Cortex vorliegen muss, denn Tinnitus persistiert auch nach Durchtrennung des Hörnerven (Wigand et al., 1982; Pulec, 1984; Andersson et al., 1997).

Überzeugendere Daten stammen von Studien mit Positronenemissionstomografie (PET) oder funktioneller Magnetresonanztomografie (MRT) beim Menschen. In mehreren Studien konnten Aktivitätssteigerungen in unterschiedlichen Arealen des ZNS und insbesondere im AC nachgewiesen werden (Arnold et al., 1996; Lockwood et al., 1998; Cacace, 2003; Mühlau et al., 2006). Arnold et al. machten 1996 erstmalig die erhöhte Aktivität im AC beim Menschen sichtbar.

Lockwood et al. zeigten 1998, dass ein weitverzweigtes neuronales Netzwerk zwischen emotionalem (limbischem), Erinnerungs- und auditorischem System beim Tinnituspatienten vorliege. Sie folgerten, dies beweise kortikale Plastizität, welche für Tinnitus verantwortlich sein könne. Nach Meinung von Cacace im Jahr 2003 ist zur Auslösung und Aufrechterhaltung von Tinnitus aufgrund der verschiedensten Auslöser ein breites, vielverzweigtes Netzwerk von Neuronen notwendig. Er demonstrierte dies an Menschen, die ihren Tinnitus „verändern“ bzw. sogar „steuern“ konnten (durch z.B. Starren, festes Zähnezusammenbeißen, Hautstimulation an der Hand etc.).

Mühlau et al. postulierten 2006, dass es nach einer Hörstörung zu einer Neuorganisation im MGB komme mit Aufrechterhalten von abnormaler neuronaler Aktivität (Tinnitusgenerator?). Diese werde unter anderem zum limbischen System weitergeleitet, wo sie aufgrund von Schäden (durch z.B. Stress, Erregung oder Alter) nicht mehr herausgefiltert, sondern an den AC weitergeleitet werde.

Zhang et al. führten 2003  $^{14}\text{C}$ -2-Deoxyglukose ( $^{14}\text{C}$ -2-DG)-Versuche an Hamstern aus, bei denen durch Lärmtrauma „tinnitusähnliche“ neuronale Veränderungen im Hörsystem ausgelöst werden sollten. Sie fanden signifikante Erhöhungen der Aktivität im ipsilateralen LL, zentralen IC und MGB; im kontralateralen zentralen IC hingegen konnten sie keine Aktivitätserhöhung feststellen.

Wallhäusser-Franke et al. (1996) sowie Wallhäusser-Franke und Langner (2001) stellten die Hypothese auf, dass durch einen Hörschaden die Spontanaktivität in den Haarzellen und im Hörnerv abgeschwächt werde. Dies wurde auch von anderen Autoren diskutiert (Kiang et al., 1970; Lenarz et al., 1993; Müller et al., 2003).

Wallhäusser-Franke et al. postulierten, die verringerte Spontanaktivität führe z.B. zum Wegfall der Hemmung „normaler“ Geräusche im IC (verminderte Aktivität), wodurch es zur Weiterleitung eines abnormen Signals an Cortex und Thalamus komme. Sie fanden in Tierexperimenten am Gerbil nach Gabe von Salicylat mittels der  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Methode im AC

einen signifikanten Aktivitätsanstieg. Aufgrund von kortikaler Rückkopplung mit emotionalen und Aufmerksamkeits-Zentren werde diese Aktivität im AC dominant.

Zu dem gleichen Ergebnis kamen c-fos-Studien von Wallhäusser-Franke et al. (2003). Sie zeigten am Gerbil nach Salicylatgabe eine vermehrte Bildung dieses „immediate early“-Gens im AC, welche durch exzitatorische Stimulation induziert werde.

Auch Panford-Walsh et al. sahen 2008 eine wesentliche Beteiligung des AC bei Tinnitus bzw. einem Korrelat, das Tinnitus beim Tier entsprechen könnte. Sie belegten dies in ihrer Studie an Ratten mit einer verminderten Ausbildung von Arg3.1 sowohl nach durch Salicylat als auch durch Lärm ausgelöstem cochleären Schaden. Das Protein Arg3.1 kontrolliert die synaptische Homöostase, sodass der AC bei verminderter Bildung dieses Proteins aus der Peripherie stammende Signale nicht mehr richtig verarbeiten kann.

Brozoski et al. demonstrierten 2002 bei Chinchillas nach Lärmtrauma eine erhöhte spontane Aktivität in den fusiformen Zellen des DCN. Diese werde in höhere Stationen des auditorischen Systems weitergeleitet und möglicherweise als „Tinnituskorrelat“ wahrgenommen. 2005 kamen Brozoski und Bauer nach weiteren Studien an Ratten zu der Vermutung, dass die Generierung von „Tinnituskorrelaten“ unter Einbeziehung des DCN und anderer Strukturen des Hörsystems zentral geschehe.

Eggermont und Roberts beschrieben 2004, dass es womöglich durch verminderte Hemmung in zentralen auditorischen Gebieten zu einer Hypererregbarkeit des AC und vor allem zu erhöhtem „burst-firing“ (= Auftreten einer schnellen Folge von Aktionspotenzialen als Antwort auf einen Stimulus oder auch spontan) und erhöhter neuronaler Synchronisierung komme.

Viele Autoren sehen inzwischen auch eine Beteiligung des limbischen Systems (Lockwood et al., 1998; Møller, 2003; Mahlke und Wallhäusser-Franke, 2004; Mühlau et al., 2006; Haab et al., 2009; Mazurek et al., 2010; Rauschecker et al., 2010).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass aufgrund der bisherigen Daten eine veränderte neuronale Aktivität im Hörsystem mit erhöhter Aktivität im AC als gemeinsames Korrelat für Tinnitus angesehen wird

### **3.1 Salicylatmodell**

Aufgrund seiner bekannten tinnitusauslösenden Wirkung beim Menschen (Sée, 1877; McFadden und Plattsmier, 1983, 1984; Boettcher und Salvi, 1991; Janssen et al., 2000) und seiner somit wichtigen Stellung in der Tinnitusforschung wird im Folgenden ein Überblick über die Wirkung von Salicylat auf das Hörsystem gegeben:

#### **3.1.a Salicylat**

Acetylsalicylsäure – als Bestandteil von Weidenrinde – wurde schon 400 v. Chr. von Hippokrates als Mittel gegen Schmerzen benutzt und gegen 1860 n. Chr. von Hoffmann zum ersten Mal synthetisch hergestellt (Cazals, 2000).

Es gehört zur Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika und inaktiviert irreversibel die COX, ein Enzym, das für die Umwandlung von Arachidonsäure in die zyklischen Endoperoxide (Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxan) verantwortlich ist. Die COX existiert in mindestens zwei Isoformen, COX 1 und COX 2, die beide von Acetylsalicylsäure gehemmt werden (Vane et al., 1998; Lüllmann et al., 2010).

Salicylate haben eine Reihe von Nebenwirkungen. In hohen Dosen verabreicht verursachen sie unter anderem ein Syndrom, das aus Tinnitus, Schwindel, Hörverlust und manchmal Übelkeit und Erbrechen besteht.

Zahlreiche Untersuchungen konnten beweisen, dass Salicylat in hohen Dosen beim Menschen (6-8 g/d) (Sée, 1877; McFadden und Plattsmier, 1983, 1984; Boettcher und Salvi, 1991) reversibel Tinnitus auslöst und insbesondere die OHCs reversibel blockiert (Jansen et al., 2000).

Auch bei Tieren (wahrscheinlich ab einer Dosis von minimal 200 mg/kg KG) scheint es tinnitusartiges Verhalten auszulösen, wie Verhaltensexperimente

wiederholt zeigen konnten (Brennan und Jastreboff, 1991; Bauer et al., 1999; Guillon et al., 2003; Rüttiger et al., 2003). Daher ist das Salicylatmodell das gängige Modell für experimentelle Untersuchungen zum Thema Tinnitus.

Der Wirkmechanismus, der zu diesen Symptomen führt, wurde vielschichtig untersucht, ist aber bis heute nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass Salicylat die Hörschwelle vor allem im hochfrequenten Bereich erhöht.

Dies geschieht durch Blockierung der OHCs, die sich in der Herabsetzung der Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAEs) beim Menschen zeigt (Jansen et al., 2000). Weiterhin hemmt Acetylsalicylsäure kompetitiv das Molekül Prestin, welches sich in der basolateralen Membran der OHCs befindet und deren Beweglichkeit bewirkt (Zheng et al., 2000; Oliver et al., 2001) (siehe Einleitung Punkt 2.2).

In einigen Studien wurden eine Reduktion der Kontraktilität der OHCs, die zum Ausfall der Verstärkung im Innenohr führt (Tunstall et al., 1995), oder eine Veränderung der Membranleitfähigkeit der OHCs (Stypulkowski, 1990) festgestellt.

Guillon et al. fanden durch Experimente an Ratten 2003 heraus, dass die COX-Hemmung eine Aktivierung von cochleären NMDA-Rezeptoren sowie eine Abschwächung der DPOAEs zur Folge hat.

Ruel et al. zeigten 2008 ebenfalls durch Verhaltensversuche an Tieren, dass die Blockade von COX durch Salicylat zu einem Anstieg von intrazellulärer Arachidonsäure führt, die wiederum die Aktivität von NMDA-Rezeptoren an der IHC erhöht.

Die neurophysiologischen Effekte nach Salicylat wurden schon angeführt (siehe Hypothesen zur Entstehung von Tinnitus) und sollen hier nur kurz erwähnt werden:

Eggermont und Kenmochi sprachen 1998 von einer Erhöhung der spontanen Entladungsrate im sekundären AC.

Andere Autoren fanden Veränderungen in den OHCs, die Erhöhung der Schwelle der Summenaktionspotenziale sowie eine dosisabhängige Reduktion der Spontanaktivität in Hörnervenfasern (Müller et al., 2003).

Lenarz et al. postulierten 1993, dass Salicylat aufgrund des Anstiegs der Hörschwelle die Aktivität des auditorischen Nerven (durch Reduktion der Spontanaktivität oder Verminderung der Weiterleitung „normaler“ Geräusche (z.B. von Gefäßen etc.)) vermindere.

Dieser veränderte periphere Input sei als plötzlich zeitlich geordnete (= synchronisierte) Spontanaktivität – die normale Aktivität des Hörnerven ist unregelmäßig – und/oder als von der Norm abweichende Entladungsmuster einzelner Hörnervenfasern zu messen. Hierdurch könne die oszillatorische Aktivität einiger Frequenzkanäle des ZNS induziert, verstärkt und/oder aufrechterhalten werden, was das ZNS als Ton (Tinnitus) interpretiere.

Wang et al. überlegten 2006 nach Studien an mit Salicylat behandelten Ratten, ob die Wirkung sowohl auf zentrale (Salicylat kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden) als auch periphere Strukturen – z.B. postsynaptisch durch Veränderung der hemmenden  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-Effekte, bzw. präsynaptisch über das Einwirken auf die GABA-Freisetzung – zurückzuführen sei.

Mahlke und Wallhäusser-Franke (2004) sowie Wallhäusser-Franke et al. (2003, 2006) beschrieben, dass Salicylat die Bildung des c-fos-Proteins, welches der Plastizität zugeordnet werden kann, im AC und in den Amygdalae fördere.

### **3.1.b Salicylat-Tinnitusmodell**

1988 zeigten Jastreboff et al., dass bei Ratten durch Salicylat „Tinnitusverhalten“ ausgelöst werden kann.

Hierzu konditionierten sie Ratten, bei Stille ihr Trinkverhalten zu unterdrücken. Die Tiere wurden dauerhaft mit einem weißen Rauschen beschallt. Während Unterbrechungen des Geräusches bekamen sie bei Trinkversuchen jedes Mal einen leichten Fußschock, sodass sie lernten, bei Stille eine Unterdrückung der Trinkrate zu zeigen.

Ratten, die mit Salicylat behandelt worden waren, zeigten in Stille seltener eine Unterdrückung der Trinkrate als die Kontrolltiere, die nur Natriumchlorid (NaCl)-Lösung bekommen hatten.

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die mit Salicylat behandelten Tiere Geräusche wahrnehmen, d.h. dass bei ihnen durch Salicylat ein „Tinnituskorrelat“ ausgelöst wurde.

Auch die anderen Tiermodelle (Bauer et al., 1999; Rüttiger et al., 2003; Lobarinas et al., 2004) basieren auf pawlowscher Konditionierung. Als cochleäre Auslöser von Ohrgeräuschen wurden unterschiedliche Traumata verwandt (Lärm, ototoxische Medikamente, Salicylate etc.). In allen Studien zeigte sich „Tinnitusverhalten“ bei den behandelten Tieren.

Es sollte allerdings zurückhaltend interpretiert werden, ob die in neurophysiologischen Studien gezeigten Veränderungen nach systemischer oder lokaler Gabe von Salicylat wirklich dem neuronalen Korrelat von Tinnitus entsprechen.

Bei Versuchsanordnungen gibt es zusätzlich begleitende transiente oder bleibende Hörschäden, deren Einfluss auf die neuronale Aktivität bedacht sein will.

### **3.2 Die $^{14}\text{C}$ -2-DG-Methode**

Um einen Energiemetabolismus zu gewährleisten, benötigt das Gehirn Glukose. Glukose ist im neuronalen Gewebe für jede Art der „Zelleistung“ notwendig, so z.B. auch für die Generierung des Aktionspotenzials beim Hörvorgang.

Die autoradiografische  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Methode wurde 1977 von Sokoloff et al. entwickelt. Sie ist für die quantitative Messung der Glukoseaufnahmeraten in allen Strukturen des Gehirns geeignet und ermöglicht für einzelne Hirnstrukturen eine gesonderte Auswertung. Mit diesem Verfahren kann auch die neuronale Aktivität während des Hörvorgangs gemessen werden. Da der neuronale Energiestoffwechsel alleinig auf Glukose beruht, erlaubt die  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Methode mittels der quantitativen Erfassung der Glukoseaufnahme im Gewebe die quantitative Messung der neuronalen Aktivität.

Der Unterschied von  $^{14}\text{C}$ -2-DG zu normaler Glukose liegt im Austausch der Hydroxylgruppe durch ein Wasserstoffatom am zweiten Kohlenstoffatom.

$^{14}\text{C}$ -2-DG wird genau wie Glukose über die Blut-Hirn-Schranke transportiert und konkurriert im Gehirn mit Glukose sowohl um den Rücktransport ins Blut als auch um die Hexokinase, ein Enzym, welches  $^{14}\text{C}$ -2-DG in  $^{14}\text{C}$ -2-DG-6-Phosphat (2-DG-6-P) und Glukose in Glukose-6-Phosphat (Glukose-6-P) umwandelt.

Mithilfe der Phosphohexoisomerase wird Glukose-6-P dann zu Fruktose-6-Phosphat konvertiert und folgt weiter der Glykolyse. 2-DG-6-P dagegen kann nicht isomerisiert werden und der Stoffwechsel hält hier an.

Aufgrund einer geringen Affinität von  $^{14}\text{C}$ -2-DG zur Phosphohexoisomerase muss mit niedrigen Konzentrationen gearbeitet werden. Sonst kann es zu einer Hemmung der gesamten Glykolyse kommen mit der Folge von Symptomen wie z.B. bei Hypoglykämie.

Glukose-6-P kann zu freier Glukose zurückhydrolysiert werden. Da aber das Enzym Glukose-6-Phosphatase fast nur in der Leber und der Nierenrinde vorkommt, die Konzentration im Säugergehirn hingegen sehr niedrig ist (De Duve und Hers, 1957) und die Hexokinase-reaktion irreversibel ist, sammelt sich 2-DG-6-P im Hirngewebe an.

Voraussetzung hierfür ist eine für diesen Zeitraum gleichmäßige Transportrate von Glukose und  $^{14}\text{C}$ -2-DG zwischen Blut und Gewebe, ein gleichmäßiger Blutfluss und ein konstanter glykolytischer Metabolismus.

Der Glukoseverbrauch des Gehirns ist von der elektrischen Aktivität abhängig, d.h. aufgrund des oben beschriebenen Aufnahme- und Umsetzungsmechanismus von  $^{14}\text{C}$ -2-DG nimmt man an, dass sich nach  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Applikation in stark aktiven Hirnbezirken besonders viel radioaktiv markiertes 2-DG-6-P anreichert.

Die quantitative Autoradiografie ist ein Verfahren, mit dem man eine chemische Komponente mithilfe radioaktiver Isotope und anschließend Exponieren auf einem Film durch Schwärzen desselben sichtbar machen kann. Es unterscheidet nicht zwischen  $^{14}\text{C}$ -2-DG und 2-DG-6-P, sondern misst die totale  $^{14}\text{C}$ -Konzentration im Gewebe. Deshalb muss nach der  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Applikation eine gewisse Zeit für die Umwandlung von  $^{14}\text{C}$ -2-DG in 2-DG-6-P vergehen. Bei Sokoloff et al. (1977) betrug die Zeit für die Ratte 45 Minuten nach intravenöser (i.v.) Injektion von etwa 50  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -2-DG.

Für die in unseren Versuchen verwendete Mongolische Wüstenrennmaus nimmt man an, dass diese Bedingungen bei einer Dosis von 17  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -2-DG intraperitoneal (i.p.) nach etwa 45-60 Minuten erreicht sind (Scheich et al., 1993).

## 4. Fokus unserer Versuche: der Glutamat-Rezeptor

### 4.1 Physiologie Glutamat-Rezeptoren

Glutamat, eine Aminosäure, ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Ca. 50% aller exzitatorischen Synapsen sind glutamaterg, so auch die cochleären IHCs, die afferenten Neurone der Cochlea und der AC (Eybalin, 1993; Puel, 1995).

Die Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt erfolgt nach präsynaptischem Einstrom von Calcium-Ionen via Exocytose, die Beendigung der synaptischen Prozesse durch Wiederaufnahme des Transmitters entweder in die Präsynapse oder in Gliazellen.

Es gibt verschiedene Arten von Glutamat-Rezeptoren:

1. Ionotrope Rezeptoren: Sie sind mit einem Ionenkanal assoziiert. Zu ihnen gehören die  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA), Kainat- und NMDA-Rezeptoren.
2. Metabotrope Rezeptoren: Diese sind an ein G-Protein gebunden.

AMPA- und NMDA-Rezeptoren finden sich in den afferenten Neuronen der IHCs von Säugetieren sowie im weiteren Verlauf der Hörbahn (Ehrenberger und Felix, 1991; Puel, 1995).

Der AMPA-Rezeptor ist unter physiologischen Bedingungen der wichtigste Rezeptor im auditorischen System. Unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise Tinnitus oder Auftreten von starken Stimuli hingegen ist der NMDA-Rezeptor involviert (Puel, 1995; Guitton et al., 2003).

Der NMDA-Rezeptor ist unter den Bedingungen des Ruhemembranpotenzials von etwa -70 mV durch Magnesium-Ionen blockiert (Abbildung 1.8), sodass das Neuron vor Exzitotoxizität (= irreversible Zellschädigung durch exzessive Reizung) geschützt wird (eingehende Beschreibung in der Einleitung Punkt 4.2).

Kommt es nun zu einer Transmitterausschüttung und gleichzeitiger Verminderung des Membranpotenzials durch exzitatorische Synapsen anderen Typs, z.B. AMPA-Rezeptoren, diffundiert das Magnesium-Ion vom

Ionenkanal weg, Natrium-Ionen können in die Zelle eindringen und eine Depolarisation wird ausgelöst (Klinke, 2005; Abbildung 1.9).

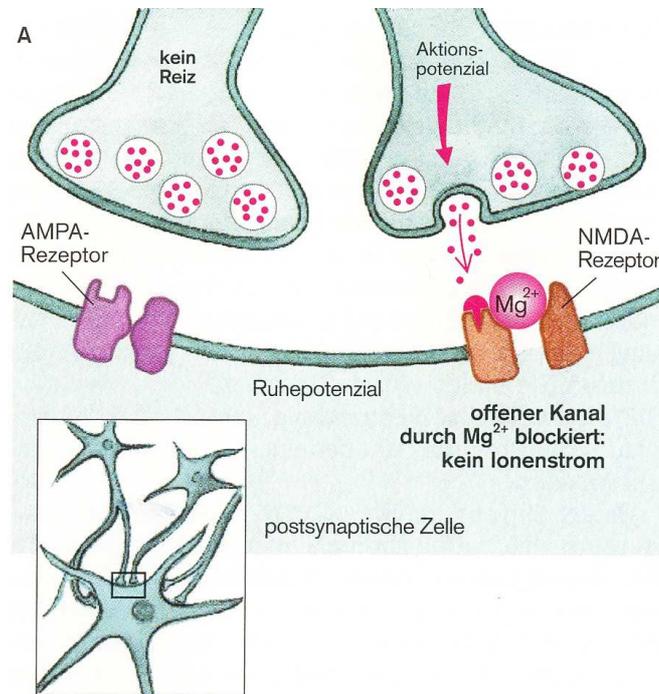


Abb. 1.8: AMPA- und NMDA-Rezeptor (Ruhepotenzial) (Klinke, 2005, S.94)

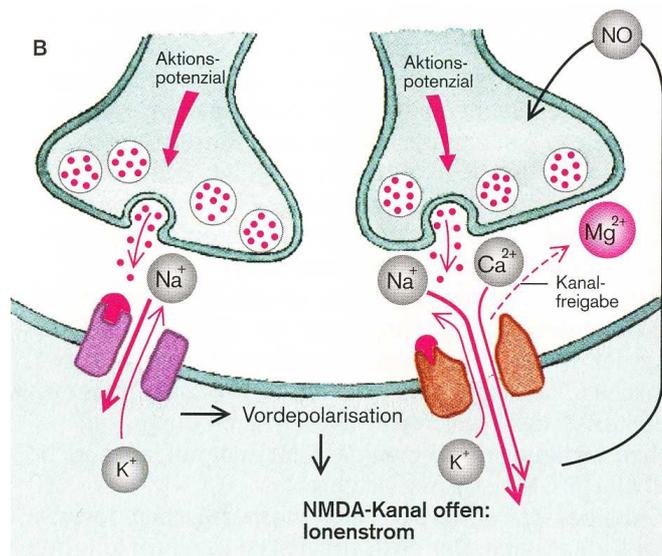


Abb. 1.9: AMPA- und NMDA-Rezeptor (nach Vordepolarisation) (Klinke, 2005, S.94)

## 4.2 Exzitotoxizität

Als Exzitotoxizität bezeichnet man die übermäßige Ausschüttung oder die inkomplette Wiederaufnahme von Glutamat und die daraufhin folgende Schädigung der postsynaptischen afferenten Typ-I-Dendriten.

In der Cochlea gibt es verschiedene pathologische Konditionen, unter denen Exzitotoxizität auftreten kann, beispielsweise beim Lärmtrauma, der Hyp- oder Anoxie.

Wie Pujol und Puel 1999 schrieben, führt die übermäßige Ausschüttung von Glutamat zur Schädigung der Strukturen der Cochlea:

1. Eine hohe Konzentration von Glutamat führt zu einem Ungleichgewicht des osmotischen Systems, d.h. es kommt zum Eintritt von Wasser und Ionen in die postsynaptischen Strukturen (afferente Typ-I-Dendriten, die mit den IHCs verbunden sind). Dies kann zu deren Schwellung und einem eventuellen Auseinanderreißen führen (wahrscheinlich via non-NMDA-Rezeptoren).
2. Zusätzlich kann es (nach starken oder repetitiven pathologischen Zuständen) zu einem Calcium-Ionen-Einstrom kommen, der die Produktion von z.B. freien Radikalen und/oder die Aktivierung von Proteasen und Endonukleasen triggert und zum Zelltod (im Spiralganglion) führen kann (wahrscheinlich via NMDA-Rezeptoren).

Wenn die Traumata nicht zu häufig erfolgen, ist erneutes Aussprossen der Afferenzen und Efferenzen möglich.

Während des Reinnervationsprozesses werden vermehrt NMDA-Rezeptoren gebildet (erhöhte Bildung von messenger RNA, die für die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors kodiert). Dies impliziert, dass NMDA-Rezeptoren an der Regeneration von Nervenzellen sowie an der Neubildung von Synapsen beteiligt sind. Ihre Blockade führt zur Verlangsamung dieses Prozesses sowie zur Verlangsamung der Bildung neuer Synapsen und der Wiederherstellung des Hörens.

Eine vermehrte Bildung von NMDA-Rezeptoren nach Exzitotoxizität könnte zu vermehrter Ausschüttung von Glutamat führen („epileptic-like firing“/„burst-firing“) und zur Entstehung von Tinnitus beitragen, indem es vom ZNS als Tinnitus interpretiert wird.

Gleichzeitig findet man vermehrt aussprossende efferente Nervenfasern des LOC nach Exzitotoxizität, die direkt an den IHCs ansetzen. Möglicherweise fördert dies die Ausschüttung von Glutamat und dadurch die Regeneration und Neubildung von Synapsen und/oder das vermehrte Auftreten von Aktionspotenzialen, wodurch Tinnitus gefördert oder aufrechterhalten wird (d’Aldin et al., 1997; Puel et al., 2002; Mazurek et al., 2007).

## **5. Fragestellung**

### **5.1 NMDA-Antagonisten – eine therapeutische Option bei Tinnitus?**

Glutamat gilt als wichtigster exzitatorischer Transmitter im ZNS von Säugetieren, insbesondere der Hörbahn (Eybalin, 1993).

Mehrfach wurde diskutiert, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren für die Generierung von Tinnitus verantwortlich sei (siehe Einleitung Punkt 3 und 3.1). Da die gesamte Hörbahn Glutamat als Transmitter benutzt, könnte auch die veränderte Aktivität im AC bei Tinnitus durch NMDA-Rezeptoren hervorgerufen werden.

Diese Hypothese könnte therapeutische Bedeutung haben und die Blockierung der NMDA-Rezeptor-Aktivierung könnte beim Tinnitus sinnvoll sein (Oestreicher et al., 1998, 1999; Nordang et al., 2000).

Während auf pharmakologischer Basis ausschließlich in der akuten Phase des Tinnitus versucht wird, die auslösende Erkrankung (z.B. Hörsturz, Lärmtrauma) mit Rheologika oder Steroiden zu behandeln, gibt es für den chronischen Tinnitus bisher keine pharmakologische Therapie.

Im chronischen Stadium geht es in erster Linie darum, dem Patienten dabei zu helfen, sein Ohrgeräusch zu akzeptieren, gegebenenfalls mit medikamentöser Unterstützung (Benzodiazepine, Antidepressiva). Hilfe können i.v. applizierte Lokalanästhetika (vor allem Lidocain) bieten

(allerdings nur temporär) oder bei Erfolglosigkeit die Tinnitus-Retraining-Therapie, die sozusagen einer Desensibilisierung gegen den Tinnitus entspricht (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2010).

## **5.2 Möglichkeiten der Unterdrückung der Tinnitus-Aktivität am NMDA-Rezeptor durch Glutamat-Rezeptor-Antagonisten**

Da der NMDA-Rezeptor unter pathologischen Bedingungen der wichtigste Glutamat-Rezeptor zu sein scheint, kann man mit Glutamat-Rezeptor-Antagonisten die durch Glutamat ausgelöste Aktivität supprimieren bzw. die Aktivitätssteigerung verhindern. Diese Medikamente können verschiedene Bindungsstellen des NMDA-Rezeptors besetzen (die Glycin-, Glutamat- oder Magnesium-Bindungsstelle).

Es gibt kompetitive und nichtkompetitive Antagonisten, die an der afferenten postsynaptischen Membran wirken. Die Blocker können selektiv und nichtselektiv sein, wie bereits 1999 Oestreicher et al. zeigen konnten. Memantin ist ein für NMDA-Rezeptoren selektiver Antagonist, zu den nichtselektiven zählt z.B. Caroverine. Es wirkt sowohl auf AMPA- als auch auf NMDA-Rezeptoren (Oestreicher et al., 2002).

## **5.3 Memantin**

Memantin ist ein nichtkompetitiver, selektiver NMDA-Rezeptor-Antagonist, der seit Jahren in der Behandlung von Patienten mit Parkinson und Demenz Anwendung findet und nur wenige Nebenwirkungen bei Langzeitbehandlung zeigt. Unerwünschte Wirkungen sind vorwiegend Agitiertheit/Erregung, Schlaflosigkeit, gesteigerte motorische Aktivität und Bewegungsunruhe (sogenannte „Restlessness“). Diese Nebenwirkungen bilden sich meist im Verlauf der Therapie zurück (Ditzler, 1991).

Memantin blockiert – wie Magnesium – den assoziierten Calcium-Ionenkanal, im Gegensatz zu Magnesium allerdings auch bei chronisch erhöhten Glutamatkonzentrationen oder Eintreffen von pathologischer Aktivität, und gibt ihn wieder frei, wenn ein physiologisches Signal eintrifft. Es schützt somit das postsynaptische Neuron vor Glutamat-vermitteltem Calcium-Ionen-Einstrom. Dadurch vermindert sich das intrazelluläre

Calcium und das „Grundrauschen“ (synaptische Rauschen) bleibt gering (© Merz Pharmaceuticals, 2010).

Oestreicher et al. berichteten 1998, 1999 und 2002 zuerst über die Wirkung von Memantin auf die Transmitterausschüttung an den IHCs. Sie fanden eine potente und reversible Hemmung der Spontanrate und des durch Glutamat induzierten Abfeuerns der Neurone und schlugen Memantin als potenziellen Wirkstoff in der Behandlung von Innenohrerkrankungen und vor allem des Tinnitus vor.

Gitton et al. fanden 2003 heraus, dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten gute Medikamente in der Tinnitusbehandlung sein könnten. Sie belegten dies mit Tierversuchen an Ratten.

## II. Material und Methoden

### 1. Versuchstiere

Für die Versuche verwendeten wir 45 Mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*; auch Gerbil genannt) beiden Geschlechts im Alter zwischen drei und zehn Monaten mit einem Gewicht zwischen 60 und 100 g. Diese Tiere eignen sich besonders gut für Untersuchungen am auditorischen System, da es eine weitgehende Übereinstimmung ihres Audiogramms mit dem des Menschen gibt (Ryan, 1976; Abbildungen 2.1 und 2.2).

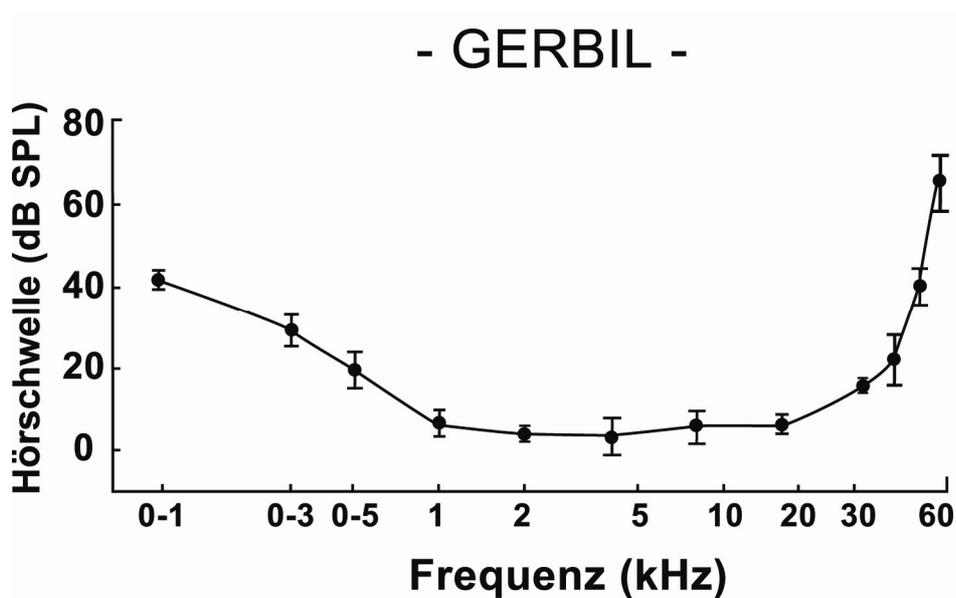


Abb. 2.1: Hörkurve des Gerbils (Ryan, 1976, S.1224)

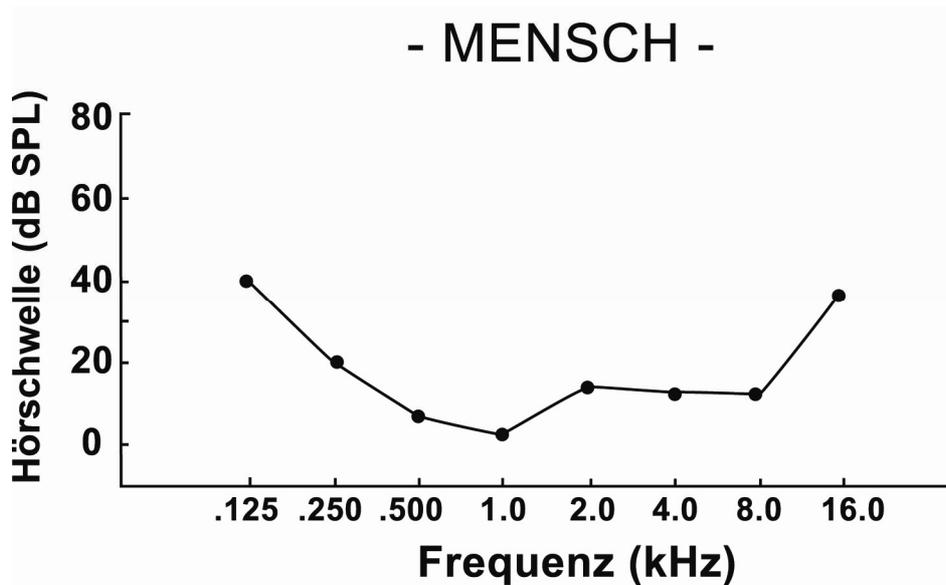


Abb. 2.2: Hörkurve des Menschen (Owren et al., 1988, S.104)

Somit ist eine Übertragung der Untersuchungsergebnisse auf den Menschen eher möglich als bei Verwendung anderer Nager wie Ratten oder Mäuse, deren bestes Hören im hochfrequenten und Ultraschallbereich liegt. Zudem sind Gerbils widerstandsfähig, genügsam und wenig anfällig für Infektionen.

Die Versuchstiere entstammten alle aus der Zucht des Fachbereichs Biologie, Institut für Zoologie, Abteilung für Neuroakustik (Prof. Dr. Gerald Langner) der Technischen Universität Darmstadt. Sie bekamen Futter und Wasser ad libitum und wurden in Gruppen zu maximal drei Tieren in Standardrattenkäfigen gehalten. Sie erhielten Material zum Nagen und Spielen in Form von Holzstückchen und Pappröhren. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde künstlich generiert und betrug 12:12 Stunden.

## 2. Substanzen und Applikationsweisen

Zur Auslösung von Tinnitus wurde den Tieren vier Tage lang einmal täglich 350 mg/kg KG Salicylat i.p. (also systemisch) appliziert, wie in der Studie von Wallhäuser-Franke et al. (1996) beschrieben.

Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob auch eine lokale Gabe von Salicylat in die Cochlea tinnitusauslösende Wirkung habe.

Hierzu wurden 100 µl Salicylat bzw. NaCl lokal in die Cochlea appliziert.

Memantin wurde ebenfalls i.p. verabreicht.

Dosierungen innerhalb der Experimentalgruppen:

1. Salicylat (Natrium-Salicylat von Sigma):

- Systemisch: 350 mg/kg KG (vier Tage hintereinander einmal täglich oder einmalig)
- Lokal: 100 µl einer Stammlösung von 140 mg/ml

2. Memantin (®Akatinol von Merz):

- Systemisch: 1 mg/kg KG bzw. 10 mg/ml (einmalig oder vier Tage hintereinander einmal täglich)

Systemische Applikation:

Die Tiere erhielten die systemisch applizierten Substanzen mittels einer i.p. Injektion.

a) Salicylat bzw. NaCl systemisch:

vier Tage lang einmal täglich Salicylat bzw. NaCl i.p.

Am vierten Tag folgte sofort nach der letzten Injektion der <sup>14</sup>C-2-DG-Versuch.

b) Therapiegruppe (Memantin/NaCl i.p. nach Tinnitusauslösung durch Salicylat):

Vier Tage lang einmal täglich Salicylat i.p.

Am vierten Tag folgte eine Stunde nach der letzten Salicylatgabe die Injektion von Memantin/NaCl und sofort danach der <sup>14</sup>C-2-DG-Versuch.

c) Prophylaxegruppe (Vorbehandlung mit Memantin systemisch):

Vier Tage lang einmal täglich Memantin i.p.

Am vierten Tag folgte eineinhalb Stunden nach der letzten Memantingabe die Injektion von Salicylat/NaCl, weitere zwei Stunden später der <sup>14</sup>C-2-DG-Versuch.

Die Opferung aller Tiere erfolgte eine Stunde nach Wirkzeit der <sup>14</sup>C-2-DG-Injektion.

Lokale Applikation:

Die Operationen fanden unter semisterilen Bedingungen statt und wurden auf einer speziellen Heizdecke zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur durchgeführt.

Den Tieren wurde unter Fluorethan-Inhalationsnarkose die Haut hinter dem Ohr bzw. den Ohren rasiert und ein Schnitt über der Bulla/den Bullae gesetzt. Diese wurde/n mit einer spitzen Pinzette eröffnet, ein Stück Gelfoam auf das/die runde/n Fenster gelegt und mit Salicylat getränkt. Die Wunde/n wurde/n mit Histoacryl verschlossen. Die Tiere erwachten im Durchschnitt zehn Minuten nach Abschalten der Atemnarkose. Während der Aufwachzeit lagen sie unter einem Wärmestrahler. Im Durchschnitt vergingen nicht mehr als 30 Minuten bis zur  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Injektion, nach deren Wirkzeit von einer Stunde das Tier geopfert wurde.

### 3. $^{14}\text{C}$ -2-DG-Methode und Bildbearbeitung

Die Experimente und die damit verbundenen Behandlungen der Tiere sowie die digitalen Aufnahmen der Autoradiogramme wurden im Fachbereich Biologie, Institut für Zoologie, Abteilung für Neuroakustik (Prof. Dr. Gerald Langner) der Technischen Universität Darmstadt unter Anleitung von Dr. rer. nat. Susanne Braun durchgeführt.

Es wurde  $^{14}\text{C}$ -2-Fluoro-2-deoxy-D-Glukose (Biotrend) verwendet.

Den Tieren wurden 17  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -2-DG in 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. injiziert. Danach wurden sie sofort in ein Aquarium mit Teppichboden (als Schalldämmung) gesetzt und verblieben eine Stunde lang im Dunkeln in einer schallisolierten Kammer.

Nach dieser Zeit wurden sie mit einem Gemisch aus Ketanest/Rompun (2+1) tief anästhetisiert und dekapitiert. Das Gehirn wurde schnell herauspräpariert, bei  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und am Kryostat (Leica) geschnitten; der Hirnstamm frontal von caudal nach rostral in einer Dicke von 20  $\mu\text{m}$ , das Vorderhirn horizontal von dorsal nach ventral in einer Dicke von 40  $\mu\text{m}$ .

Sowohl die Schnittdicke als auch die Zeit zwischen dem Aufnehmen auf die Objektträger und dem Trocknen auf der Wärmeplatte beeinflussen die

räumliche Auflösung der Methode. Daraus schloss man, dass die Schnittdicke 20-50 µm betragen sollte (Scheich et al., 1993).

Die gefrorenen Schnitte wurden auf einen zimmerwarmen Objektträger gebracht, an den sie sich möglichst faltenlos anhefteten. Danach wurden sie auf einer Wärmebank bei 60 °C getrocknet, auf Röntgenfilm (Kodak NMB, 18x24) in einer bleiummantelten Filmkassette (Kodak X-Omatik) aufgelegt und zwei Wochen lang exponiert, d.h. der Film wurde der Strahlung zwei Wochen lang ausgesetzt. Diese Expositionszeit gewährleistet in Bezug zur Injektionsdosis eine optimale Abbildung auf dem Röntgenfilm (Scheich et al., 1993).

Anschließend wurden die Röntgenfilme entwickelt (Entwickler: Kodak D19; Fixierer: Kodak Rapidfix) und die Gehirnautoradiogramme mit einer hochauflösenden Videokamera (Basler) aufgenommen. Parallel wurde der Leerfilm, der eine Eigenfarbe hat, ab fotografiert und sein Grauwert dem jeweiligen Autoradiogramm zugeordnet.

Diese Aufnahmen wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 5.2 zu Grauwertabbildungen konvertiert, und die Grauwerte wurden nach dem Abziehen des Hintergrundbildes mit dem Programm Scion Image am Computer quantitativ berechnet. Hierzu wurden die Umrisse der zu untersuchenden Hirnstrukturen auf jedem einzelnen Bild mit der Maus umfahren (siehe Anhang Abbildungen 6.1 und 6.2) und markiert und der Grauwert wurde von dem Programm selbstständig gemessen (siehe Anhang Tabelle 6.1). Zur Auswertung kamen etwa 8.900 Strukturen.

Da es individuelle Unterschiede bei der Filmentwicklung, bei der Injektion und der <sup>14</sup>C-2-DG-Aufnahme gibt, die zu einer Variation der Autoradiogramme führen können, mussten Verhältnisse bezogen auf eine Referenzstruktur gebildet werden. Hierzu dienen Strukturen mit geringer optischer Dichte, die nicht durch die experimentelle Stimulation beeinflusst sein dürfen. In unserem Fall waren die Referenzstrukturen für den Cortex (AI und AAF) das Corpus callosum – bestehend aus quer über die Seitenventrikel verlaufenden Fasermassen – und für den IC die Pedunkel – sie entsprechen den Kleinhirnstielen (Trepel, 2008).

Die Auswertung der Statistik erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Hamburg unter Verwendung des Programms SPSS.

Es wurde ein gemischtes lineares Modell gerechnet. Die vorliegenden Messwiederholungen der Outcomevariable (Grauwert) für die einzelnen Gerbils, innerhalb eines bzw. über mehrere Versuche, wurden als zufällig modelliert. Zusätzliche Einflussfaktoren (Versuch, Salicylatanwendung, Behandlungsart, Applikationsweise, Applikationsart, Feld und Seite) und Wechselwirkungen wurden betrachtet, um eventuelle Einflüsse dieser Variablen auf die Ausprägung der Outcomevariable zu analysieren und gegebenenfalls dafür zu adjustieren.

Es wurde eine getrennte Analyse der Versuche Salicylat systemisch versus (vs.) NaCl systemisch, Salicylat lokal einseitig links vs. NaCl lokal einseitig links, Salicylat lokal beiderseits vs. NaCl lokal beiderseits und Memantin prophylaktisch vorgenommen. Aufgrund eines andersartigen Aufbaus wurde die Untersuchung Memantin therapeutisch unabhängig von den eben beschriebenen Versuchen analysiert.

Es ergaben sich die im Ergebnisteil beschriebenen Endergebnisse durch Variablenselektion, d.h. Variablen ohne Einfluss auf die Outcomevariable wurden nach Backwardselection aus dem Modell genommen.

Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

## 4. Experimentalgruppen

Es wurden verschiedene Gruppen gebildet, um die Wirkung des NMDA-Antagonisten Memantin im Salicylatmodell auf die Aktivität im IC und AC zu studieren (die Gabe von Memantin erfolgte **vor** („Prophylaxe“) oder **nach** („Therapie“) dem Auslösen von Tinnitus bzw. Korrelaten, die einem Tinnitus beim Tier entsprechen könnten). Als Kontrolle dienten jeweils die Behandlungen mit NaCl.

Weitere Versuchsgruppen sollten die Wirkung von Salicylat systemisch bzw. lokal (in die Cochlea appliziert) untersuchen. Auch hier dienten Behandlungen mit NaCl als Kontrolle.

### 1. Pharmakologische Wirkungen von Salicylat

- a) Salicylat systemisch (n = 7) vs. NaCl systemisch (n = 8)
- b) Salicylat lokal einseitig links (n=3) vs. NaCl lokal einseitig links (n=3)
- c) Salicylat lokal beiderseits (n = 3) vs. NaCl lokal beiderseits (n = 3)

### 2. Memantin-Applikation **nach** Salicylatgabe („Therapiegruppe“):

Nach viertägiger Vorbehandlung mit Salicylat systemisch wurde eine Stunde nach der letzten Salicylatinjektion und direkt vor dem <sup>14</sup>C-2-DG-Versuch

Memantin systemisch (n = 7) vs. NaCl systemisch (n = 7) appliziert.

### 3. Vorbehandlung mit Memantin („Prophylaxegruppe“):

Nach viertägiger Vorbehandlung mit Memantin systemisch wurde eineinhalb Stunden nach der letzten Injektion und zwei Stunden vor dem <sup>14</sup>C-2-DG-Versuch

einmalig Salicylat systemisch (n=2) vs. einmalig NaCl systemisch (n=2) gegeben.

### III. Ergebnisse

#### 1. Salicylat

##### 1.1 Salicylat systemisch versus NaCl systemisch

Die Grauwerte der ICs ergaben bei den Gerbils, die Salicylat systemisch (n = 7) erhalten haben, einen deutlich niedrigeren Wert als bei den Tieren, die NaCl systemisch (n = 8) erhalten haben.

Die Aktivität im IC war in diesem Fall bei den mit Salicylat behandelten Tieren signifikant geringer als bei den mit NaCl behandelten Tieren.

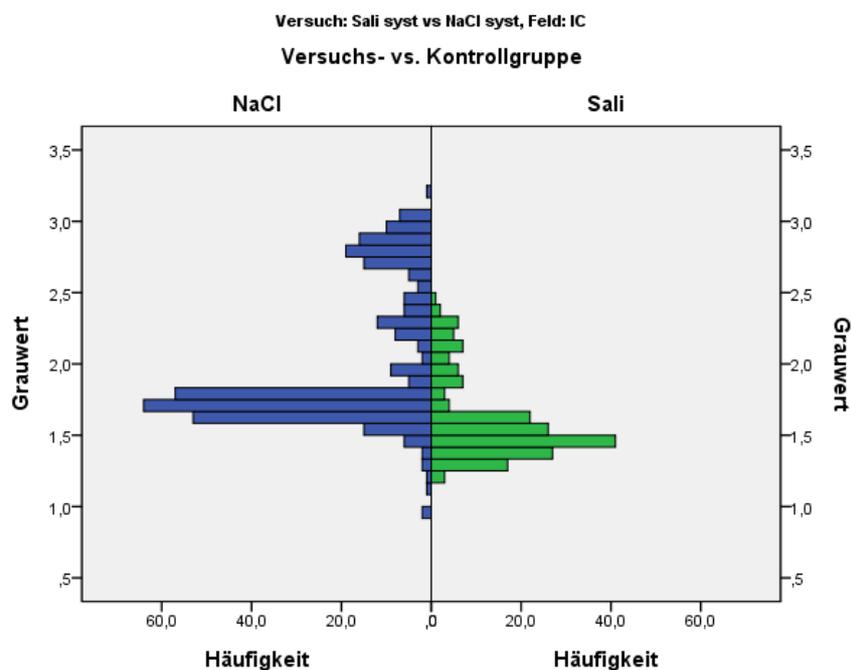


Abb. 3.1: Salicylat systemisch (grün) vs. NaCl systemisch (blau):  
Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld IC.

Die Grauwerte von AI und AAF dieser Tiere ergaben ebenfalls niedrigere Werte für die Salicylat-Tiere, waren jedoch nicht signifikant.

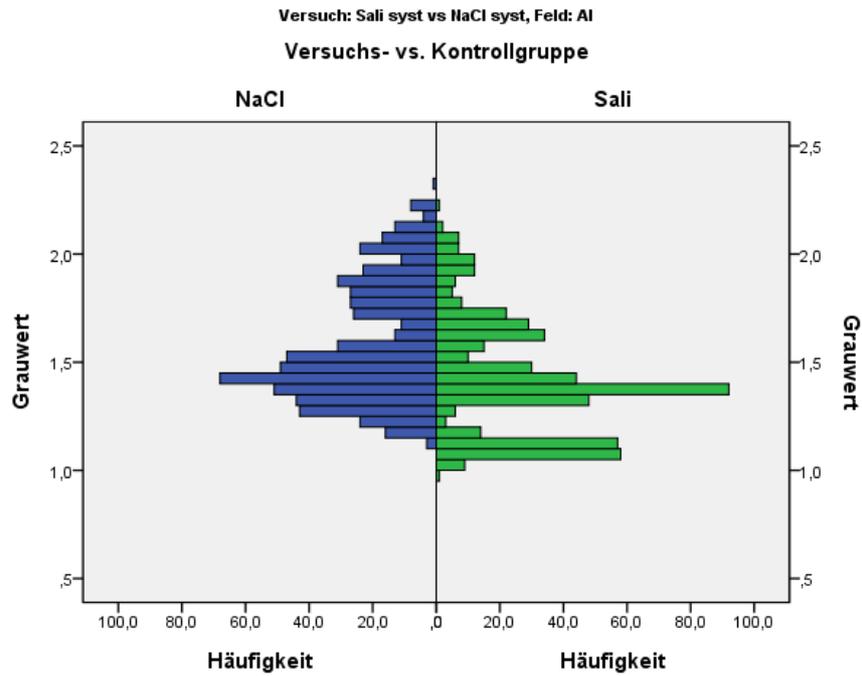


Abb. 3.2: Salicylat systemisch (grün) vs. NaCl systemisch (blau):  
 Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AI.

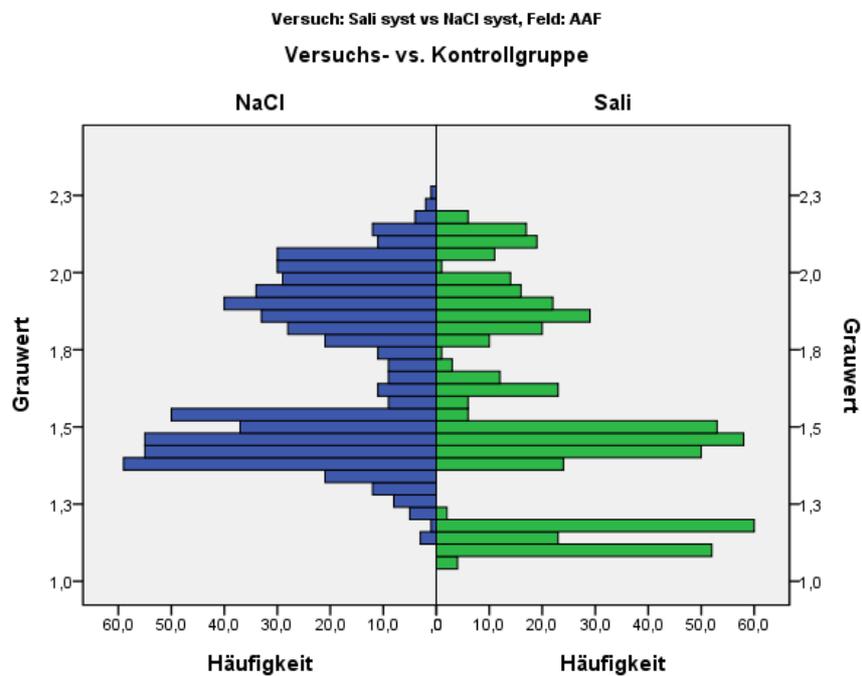


Abb. 3.3: Salicylat systemisch (grün) vs. NaCl systemisch (blau):  
 Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AAF.

	n	Mittelwert			Quotient	
		IC	AI	AAF	AI/IC	AAF/IC
<b>Salicylat systemisch</b>	<b>7</b>	<b>1,603</b>	<b>1,413</b>	<b>1,523</b>	<b>0,88</b>	<b>0,95</b>
SD		+/- 0,19	+/- 0,19	+/- 0,19		
<b>NaCl systemisch</b>	<b>8</b>	<b>2,001</b>	<b>1,583</b>	<b>1,666</b>	<b>0,79</b>	<b>0,83</b>
SD		+/- 0,18	+/- 0,18	+/- 0,18		
p		*	n.s.	n.s.		
		(0,004)	0,193	0,267		
<p>* = signifikant (p = 0,05 - 0,01)      ** = hochsignifikant (p = &lt;0,01)      n.s. = nicht signifikant</p>						

Tabelle 3.1:  
Übersicht der mittleren Grauwerte und deren Standardabweichung sowie die statistische Signifikanz.  
Übersicht der Aktivitätsunterschiede (Quotient) vom IC zu AI bzw. AAF.  
Vergleich Versuchs- (Salicylat systemisch) und Kontrollgruppe (NaCl systemisch).

## 1.2 Salicylat lokal (cochleär) einseitig links versus NaCl lokal (cochleär) einseitig links

Beim Vergleich von Gerbils, die Salicylat lokal einseitig links (n = 3) und als Kontrollsubstanz NaCl lokal einseitig links (n = 3) bekamen, wiesen die Salicylat-Tiere im IC auf beiden Seiten deutlich verminderte Grauwerte auf. Diese Verminderung war statistisch hochsignifikant.

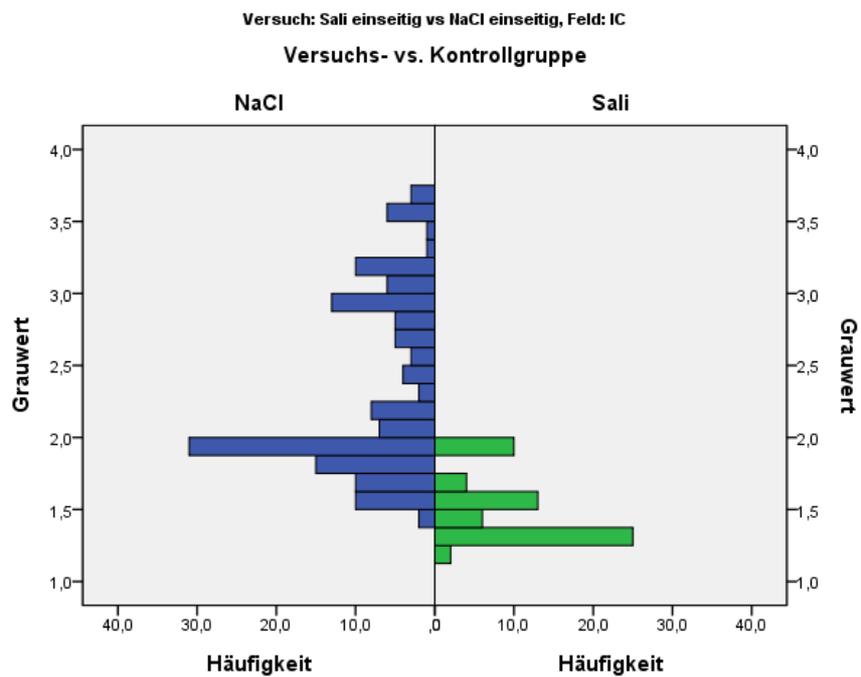


Abb. 3.4: Salicylat lokal einseitig links (grün) vs. NaCl lokal einseitig links (blau): Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld IC.

Im AI und AAF beider Seiten war die neuronale Aktivität der Salicylat-Tiere leicht erhöht, jedoch nicht signifikant.

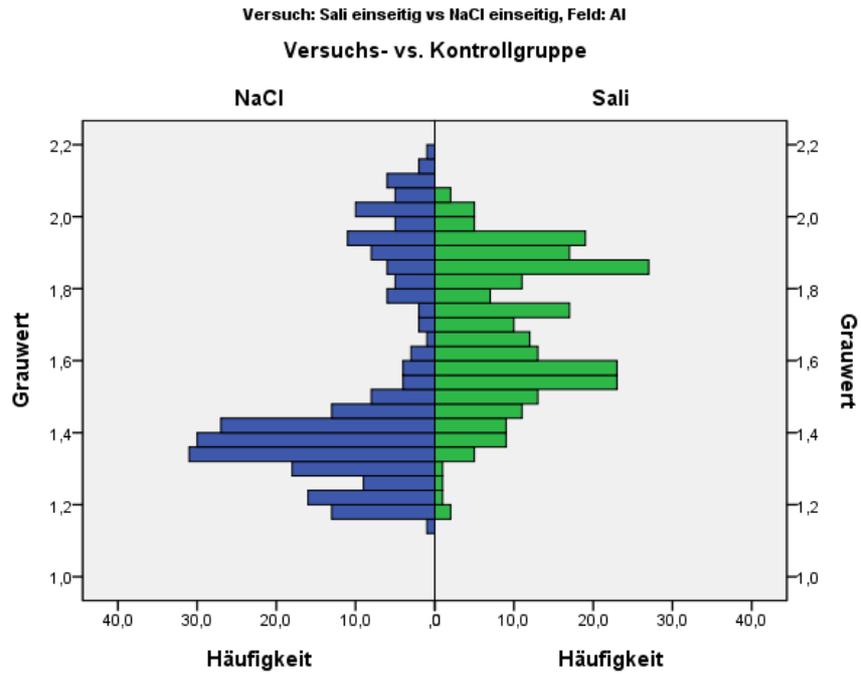


Abb. 3.5: Salicylat lokal einseitig links (grün) vs. NaCl lokal einseitig links (blau):  
 Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AI.

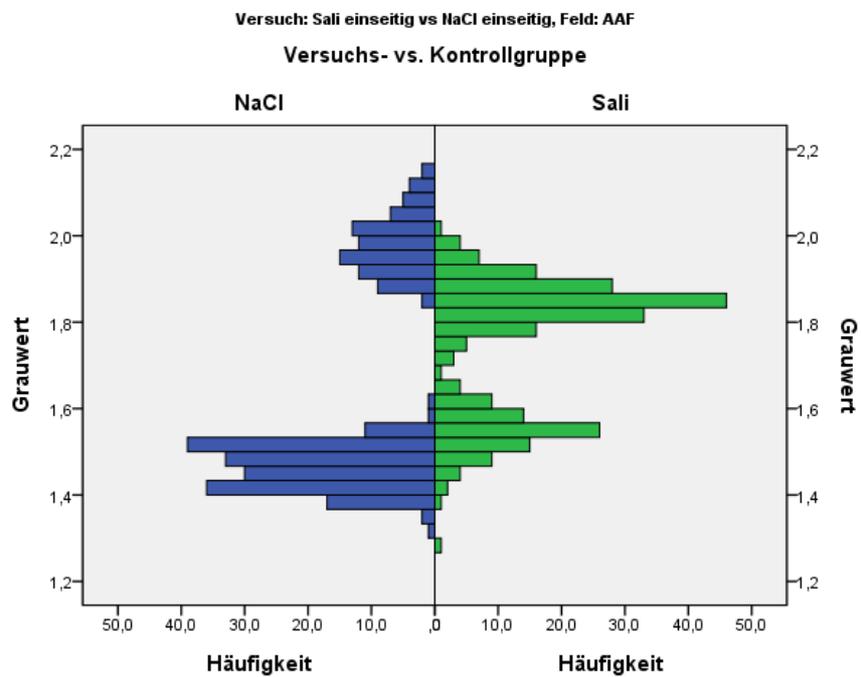


Abb. 3.6: Salicylat lokal einseitig links (grün) vs. NaCl lokal einseitig links (blau):  
 Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AAF.

	n	Mittelwert			Quotient	
		IC	AI	AAF	AI/IC	AAF/IC
<b>Salicylat lokal einseitig links</b>	<b>3</b>	<b>1,519</b>	<b>1,674</b>	<b>1,736</b>	<b>1,1</b>	<b>1,14</b>
SD		+/- 0,29	+/- 0,29	+/- 0,29		
<b>NaCl lokal einseitig links</b>	<b>3</b>	<b>2,419</b>	<b>1,540</b>	<b>1,647</b>	<b>0,64</b>	<b>0,68</b>
SD		+/- 0,29	+/- 0,29	+/- 0,29		
p		** 0,000	n.s. 0,508	n.s. 0,658		
<p>* = signifikant (p = 0,05 - 0,01)      ** = hochsignifikant (p = &lt;0,01)      n.s. = nicht signifikant</p>						

Tabelle 3.2:  
Übersicht der mittleren Grauwerte und deren Standardabweichung sowie die statistische Signifikanz.  
Übersicht der Aktivitätsunterschiede (Quotient) vom IC zu AI bzw. AAF.  
Vergleich Versuchs- (Salicylat lokal einseitig links) und Kontrollgruppe (NaCl lokal einseitig links).

Auch im intraindividuellen Vergleich der Grauwerte innerhalb der Gruppe von Gerbils, die Salicylat lokal einseitig links erhielten (n = 3), ergaben sich beim Links-Rechts-Vergleich im IC hochsignifikante Unterschiede.

Die Werte im AI und AAF waren nicht unterschiedlich.

Salicylat lokal einseitig links		n	Mittelwert			Quotient	
			IC	AI	AAF	AI/IC	AAF/IC
links	3	1,622	1,262	1,279	0,78	0,79	
	SD	+/- 0,59	+/- 0,32	+/- 0,38			
rechts	3	1,363	1,248	1,284	0,92	0,94	
	SD	+/- 0,59	+/- 0,32	+/- 0,38			
	p	** 0,000	n.s. 0,491	n.s. 0,695			
* = signifikant (p = 0,05 - 0,01)		** = hochsignifikant (p = <0,01)		n.s. = nicht signifikant			

Tabelle 3.3:  
Übersicht der mittleren Grauwerte und deren Standardabweichung sowie die statistische Signifikanz.  
Übersicht der Aktivitätsunterschiede (Quotient) vom IC zu AI bzw. AAF.  
Salicylat lokal einseitig links: Vergleich rechts vs. links

### 1.3 Salicylat lokal (cochleär) beiderseits versus NaCl lokal (cochleär) beiderseits

Auch in diesem Fall zeigte die Gruppe, die Salicylat lokal beiderseits erhalten hatte ( $n = 3$ ), für die ICs beider Seiten deutlich niedrigere Grauwerte als die Gruppe der mit NaCl lokal beiderseits ( $n = 3$ ) behandelten Tiere. Auch hier fand sich ein hochsignifikanter Unterschied.

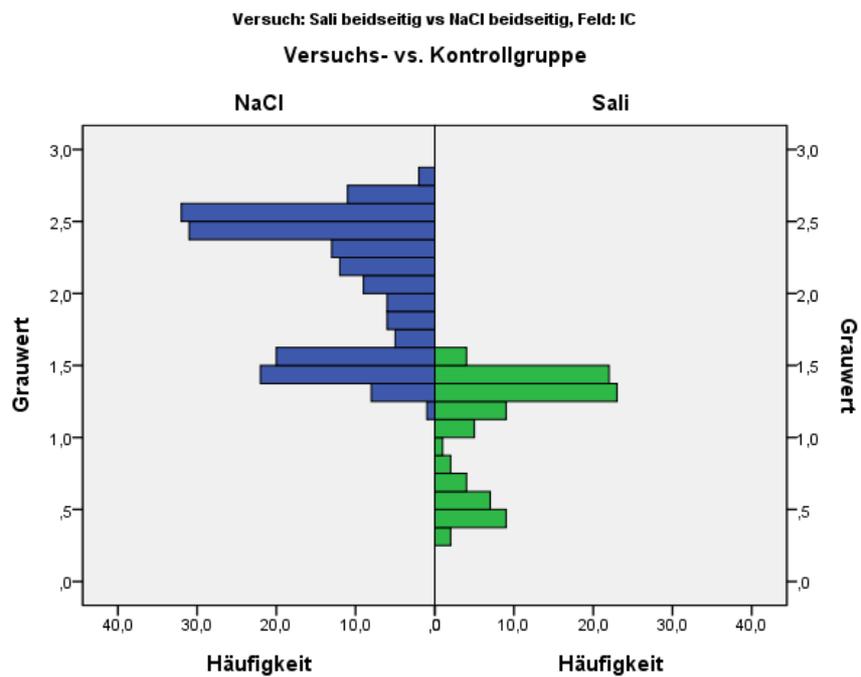


Abb. 3.7: Salicylat lokal beiderseits (grün) vs. NaCl lokal beiderseits (blau):  
Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld IC.

Im Vergleich der Messungen vom AAF und AI waren die Grauwerte beider Versuchsgruppen nicht unterschiedlich.

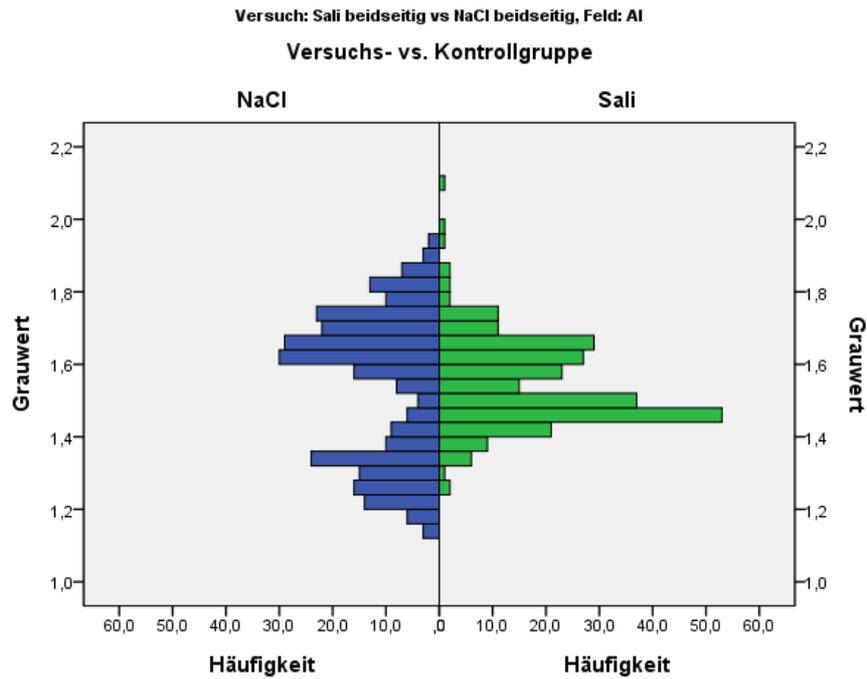


Abb. 3.8: Salicylat lokal beiderseits (grün) vs. NaCl lokal beiderseits (blau):  
 Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AI.

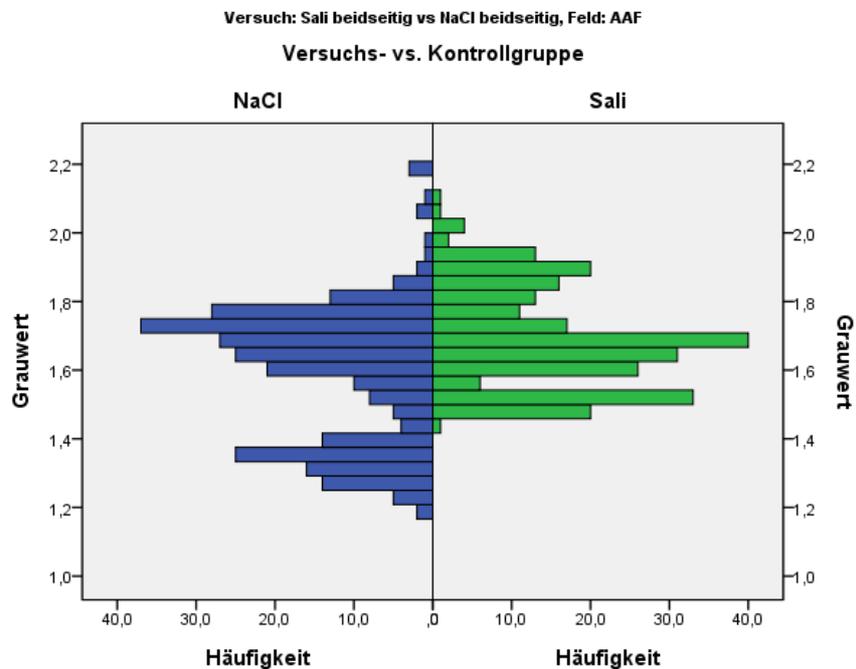


Abb. 3.9: Salicylat lokal beiderseits (grün) vs. NaCl lokal beiderseits (blau):  
 Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AAF.

	n	Mittelwert			Quotient	
		IC	AI	AAF	AI/IC	AAF/IC
<b>Salicylat lokal beiderseits</b>	<b>3</b>	<b>1,105</b>	<b>1,543</b>	<b>1,400</b>	<b>1,4</b>	<b>1,27</b>
SD		+/- 0,29	+/- 0,29	+/- 0,29		
<b>NaCl lokal beiderseits</b>	<b>3</b>	<b>2,093</b>	<b>1,535</b>	<b>1,589</b>	<b>0,73</b>	<b>0,76</b>
SD		+/- 0,29	+/- 0,29	+/- 0,29		
p		** 0,000	n.s. 0,968	n.s. 0,615		
<p>* = signifikant (p = 0,05 - 0,01)      ** = hochsignifikant (p = &lt;0,01)      n.s. = nicht signifikant</p>						

Tabelle 3.4:  
Übersicht der mittleren Grauwerte und deren Standardabweichung sowie die statistische Signifikanz.  
Übersicht der Aktivitätsunterschiede (Quotient) vom IC zu AI bzw. AAF.  
Vergleich Versuchs- (Salicylat lokal beiderseits) und Kontrollgruppe (NaCl beiderseits).

## 2. Therapeutische Vergleiche (= Nachbehandlung mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin)

### Salicylat systemisch + Memantin systemisch versus Salicylat systemisch + NaCl systemisch

Es zeigte sich in den ICs der Versuchsgruppe der mit Memantin systemisch behandelten Tiere (n = 7) im Vergleich zu den mit NaCl systemisch behandelten Gerbils (n = 7) ein hochsignifikanter Unterschied in den Grauwerten. Die Werte der Memantin-Tiere sind deutlich höher.

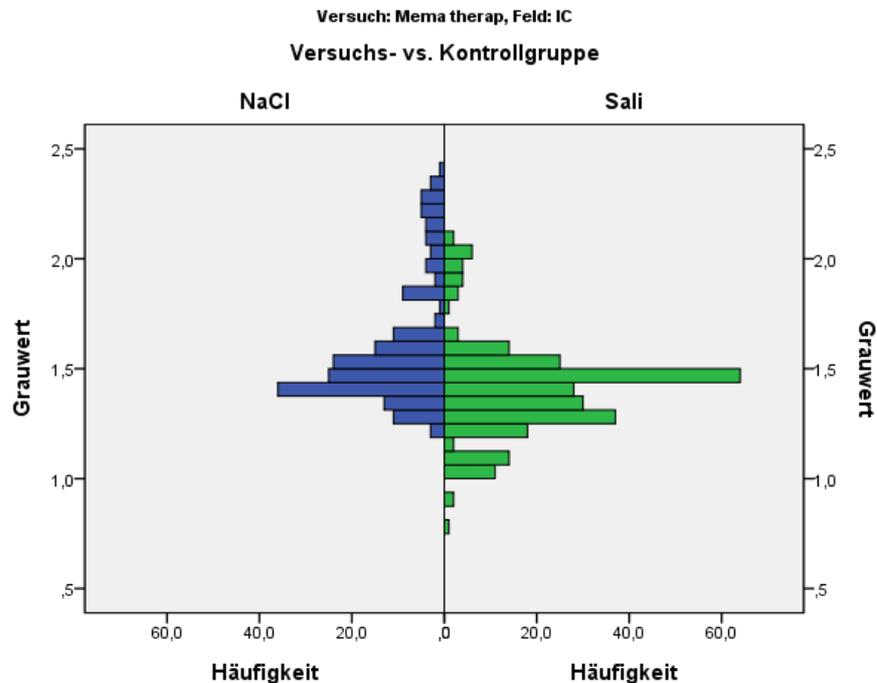


Abb. 3.10: Salicylat systemisch + Memantin therapeutisch (grün) vs. Salicylat systemisch + NaCl therapeutisch (blau): Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld IC.

AI und AAF zeigten im Vergleich beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

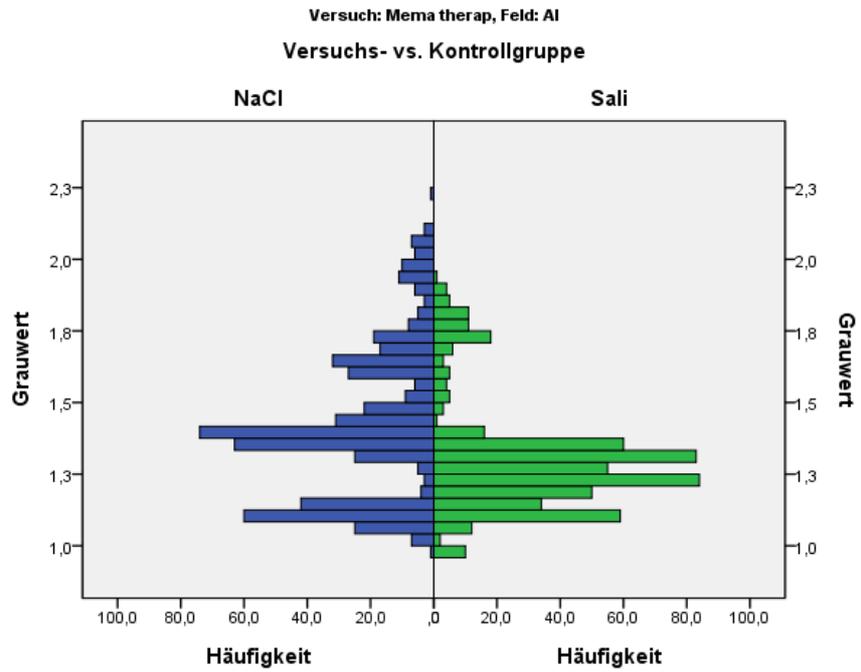


Abb. 3.11: Salicylat systemisch + Memantin therapeutisch (grün) vs. Salicylat systemisch + NaCl therapeutisch (blau):  
Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AI.

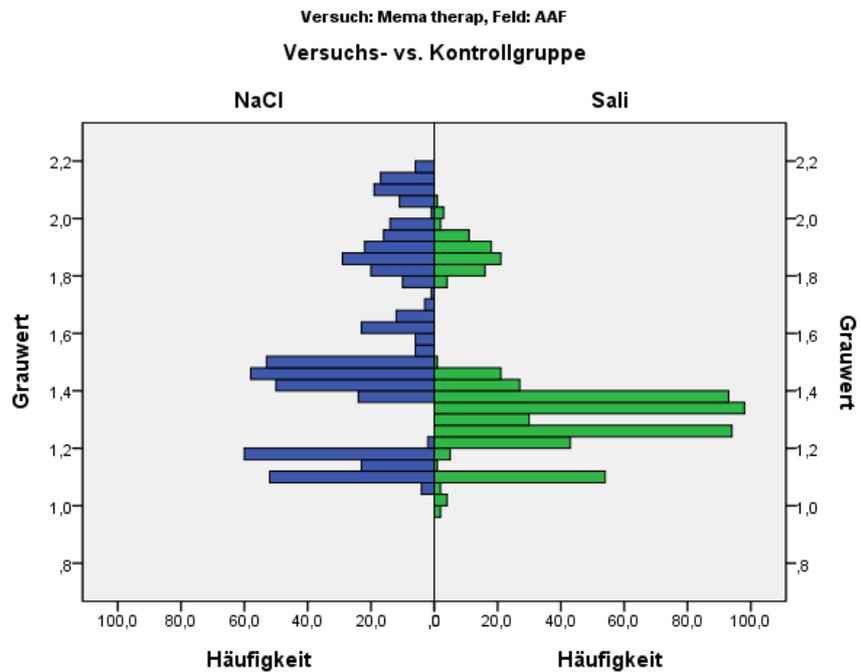


Abb. 3.12: Salicylat systemisch + Memantin therapeutisch (grün) vs. Salicylat systemisch + NaCl therapeutisch (blau):  
Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AAF.

	n	Mittelwert			Quotient	
		IC	AI	AAF	AI/IC	AAF/IC
<b>Salicylat systemisch</b>						
<b>Memantin systemisch</b>	7	<b>1,925</b>	<b>1,479</b>	<b>1,564</b>	<b>0,77</b>	<b>0,81</b>
SD		+/- 0,11	+/- 0,11	+/- 0,11		
<b>NaCl systemisch</b>	7	<b>1,492</b>	<b>1,409</b>	<b>1,500</b>	<b>0,94</b>	<b>1,01</b>
SD		+/- 0,12	+/- 0,12	+/- 0,12		
p		** 0,000	n.s. 0,384	n.s. 0,422		
<p>* = signifikant (p = 0,05 - 0,01)      ** = hochsignifikant (p = &lt;0,01)      n.s. = nicht signifikant</p>						

Tabelle 3.5:  
Übersicht der mittleren Grauwerte und deren Standardabweichung sowie die statistische Signifikanz.  
Übersicht der Aktivitätsunterschiede (Quotient) vom IC zu AI bzw. AAF.  
Vergleich Versuchs- (Salicylat systemisch + Memantin therapeutisch) und Kontrollgruppe (Salicylat systemisch + NaCl therapeutisch).

### 3. Prophylaktische Vergleiche (NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin vor Salicylatapplikation)

#### NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin systemisch vorher appliziert

Bei der Versuchsanordnung von prophylaktisch verabreichtem Memantin systemisch fand sich kein Unterschied in den Grauwerten im IC zwischen den Gruppen Salicylat systemisch (n = 2) und NaCl systemisch (n = 2).

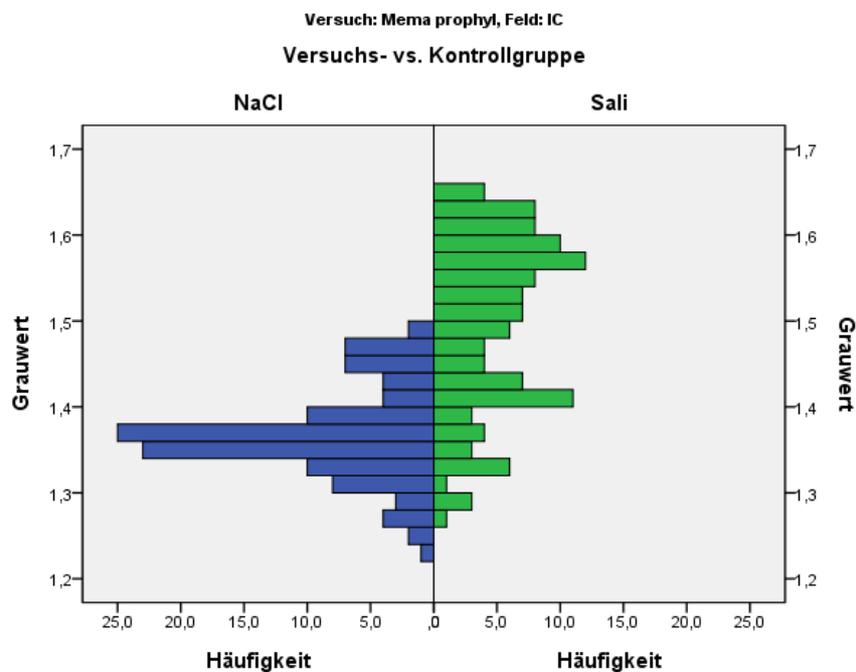


Abb. 3.13: Memantin prophylaktisch + Salicylat systemisch (grün) vs. Memantin prophylaktisch + NaCl systemisch (blau): Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld IC.

Auch die Messwerte im AI und AAF waren für beide Gruppen nah beieinander liegend und ohne statistische Aussagekraft.

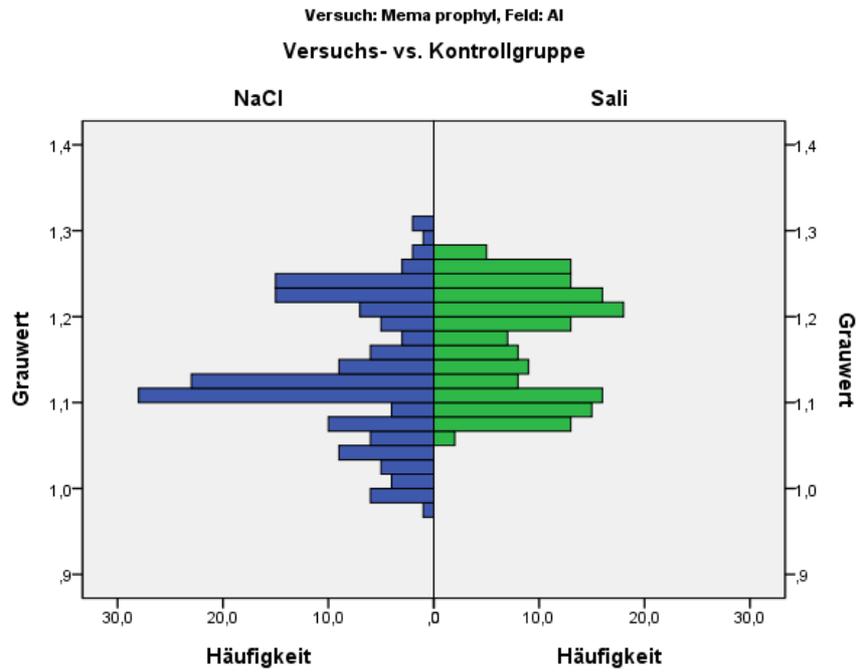


Abb. 3.14: Memantin prophylaktisch + Salicylat systemisch (grün) vs. Memantin prophylaktisch + NaCl systemisch (blau):  
Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AI.

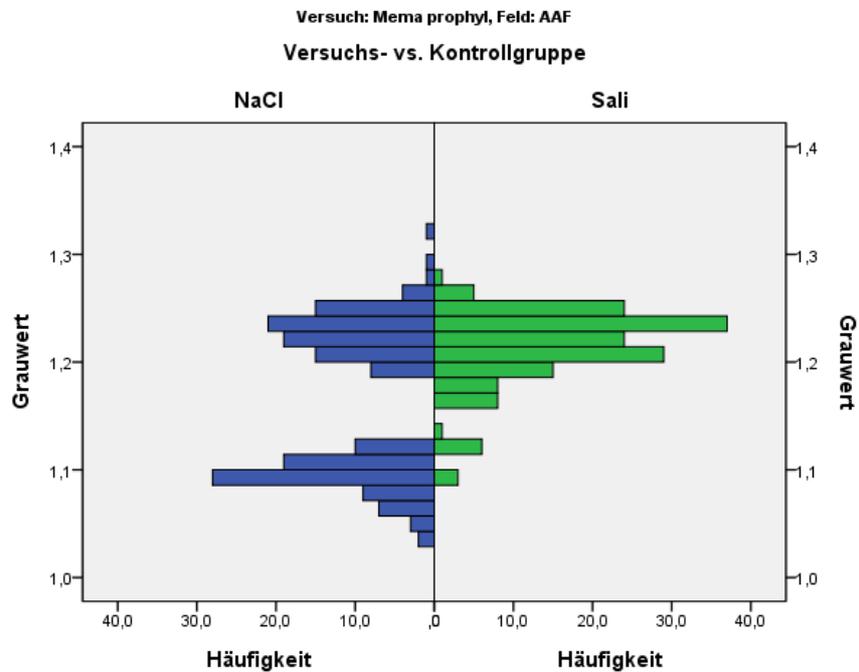


Abb. 3.15: Memantin prophylaktisch + Salicylat systemisch (grün) vs. Memantin prophylaktisch + NaCl systemisch (blau):  
Gegenüberstellung der Grauwerte und deren Häufigkeit im Feld AAF.

Memantin prophylaktisch	n	Mittelwert			Quotient	
		IC	AI	AAF	AI/IC	AAF/IC
<b>Salicylat systemisch</b>	<b>2</b>	<b>1,497</b>	<b>1,171</b>	<b>1,214</b>	<b>0,78</b>	<b>0,81</b>
SD		+/- 0,36	+/- 0,36	+/- 0,36		
<b>NaCl systemisch</b>	<b>2</b>	<b>1,368</b>	<b>1,133</b>	<b>1,162</b>	<b>0,83</b>	<b>0,85</b>
SD		+/- 0,36	+/- 0,36	+/- 0,36		
p		n.s. 0,602	n.s. 0,877	n.s. 0,833		
<p>* = signifikant (p = 0,05 - 0,01)      ** = hochsignifikant (p = &lt;0,01)      n.s. = nicht signifikant</p>						

Tabelle 3.6:  
Übersicht der mittleren Grauwerte und deren Standardabweichung sowie die statistische Signifikanz.  
Übersicht der Aktivitätsunterschiede (Quotient) vom IC zu AI bzw. AAF.  
Memantin prophylaktisch: Vergleich Versuchs- (Salicylat systemisch) und Kontrollgruppe (NaCl systemisch).

## IV. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, zu erforschen, wie der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin auf verschiedene Teile der Hörbahn (IC und AC) der Mongolischen Wüstenrennmaus (Gerbil) wirkt und ob Memantin ein geeignetes Medikament (therapeutisch und/oder prophylaktisch) bei durch Salicylat ausgelöster veränderter neuronaler Aktivität ist. Beides wurde mittels der  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Methode untersucht.

Ein Problem bei der Auswertung unserer Versuchsergebnisse liegt darin, dass ein neuronales Aktivitätsmuster sichtbar gemacht wurde, ohne dass Kenntnis besteht, ob diesem alleinig Tinnitus bzw. ein Korrelat, das einem Tinnitus bei Tieren entsprechen könnte, zugrunde liegt.

Die in der Einleitung dargestellten Verhaltensexperimente belegen die Auslösung eines „Tinnitusverhaltens“ bei Tieren mit den in unseren Versuchen benutzten Salicylatdosen. Auf neuronaler Ebene kann jedoch nicht zwischen Hörverlust, der bei Salicylatgabe auch stets ausgelöst wird, und Tinnitus als Ursache für veränderte neuronale Aktivität unterschieden werden. Daher werden die durch unsere Versuche ausgelösten Veränderungen im Weiteren konsequenterweise als veränderte neuronale Aktivität beschrieben.

Bei der Frage, ob ein NMDA-Rezeptor-Antagonist in der Therapie von Tinnitus sinnvoll eingesetzt werden könnte, verwendeten wir das Salicylatmodell mit den oben genannten Einschränkungen und detektierten die neuronale Aktivität von Teilen der Hörbahn.

Die Untersuchungen basieren auf den Befunden von Wallhäusser-Franke et al. (1996), die zeigen konnten, dass der Wirkung von Salicylat eine Unterdrückung der neuronalen Aktivität im IC und eine erhöhte neuronale Aktivität im AC zugrunde liegt.

## 1. <sup>14</sup>C-2-DG Befunde nach Salicylat

Aus unseren Ergebnissen wird ersichtlich, dass systemisch appliziertes Salicylat im Vergleich zu systemisch verabreichtem NaCl die neuronale Aktivität im IC signifikant unterdrückt, die neuronale Aktivität im AC bleibt dagegen unverändert (siehe Ergebnisse Abbildungen 3.1, 3.2, 3.3 sowie Tabelle 3.1).

Diese Resultate bestätigen nur zum Teil die Studie von Wallhäusser-Franke et al. (1996). Während in den Versuchen von Wallhäusser-Franke et al. im IC ebenfalls eine Unterdrückung der Aktivität auftrat, fand sich im AC (begrenzt auf die tonotope Gegend zwischen 0,5 und 8 kHz) eine Aktivitätserhöhung.

Es gibt eine Vielzahl möglicher Ursachen dafür, weshalb in unseren Experimenten die Erhöhung der neuronalen Aktivität im AC – im begrenzten Bereich zwischen 0,5 und 8 kHz – nicht zu sehen war. Dies soll im Folgenden diskutiert werden:

Wallhäusser-Franke et al. untersuchten die Schnitte subjektiv vergleichend ohne objektive Auswertmethode und haben des Weiteren selektive Regionen des AC betrachtet.

Unsere Methode der optischen Dichtemessung beruht auf einer Mittelung der neuronalen Aktivität im Bereich des gesamten Cortex und unterscheidet lediglich zwischen den Regionen AI und AAF. Die unterschiedlichen tonotopen Regionen wurden nicht separiert. Diese Methode ist aufgrund der optischen Dichtemessung (Programm Scion Image) objektiv.

Dennoch kann diese Vorgehensweise eine mögliche Fehlerquelle aufweisen, die in der subjektiven Definition der Grenzen der untersuchten Areale (IC, AI und AAF) auszumachen ist (siehe Anhang Abbildungen 6.1 und 6.2).

Es ist also vorstellbar, dass sich die Aktivität im AC in unseren Versuchen deshalb nicht signifikant erhöht zeigte, da sie nur in einzelnen Bereichen (Wallhäusser-Franke et al., 1996), nicht aber im ganzen AC vermehrt auftrat.

Wahrscheinlich aktiviert Tinnitus – bzw. ein Korrelat, das Tinnitus bei Tieren entsprechen könnte – nicht den gesamten AC, sondern nur schmale Bereiche (gemäß der tonotopen Organisation). Tinnitus wird von den Betroffenen zumeist als ein schmalbandiges Pfeifen empfunden.

Ausgehend von dieser Annahme lässt sich mit unserer Methode die Aktivierung einer nur kleinen Population von „Tinnitus-Neuronen“ in der Gesamtheit des auditorischen Cortex nicht darstellen.

Die von uns durchgeführten Versuche zeigten im AC keinen signifikanten Unterschied der Aktivität nach Gabe von Salicylat bzw. NaCl. Im IC hingegen war die Aktivität nach Salicylatgabe signifikant reduziert, d.h. die Aktivitätsunterschiede zwischen AC und IC (Quotient AI/IC bzw. AAF/IC) waren in der Salicylatgruppe größer (siehe Ergebnisse Tabelle 3.1). Hieraus darf gefolgert werden, dass in der Gruppe der Salicylat-Tiere eine stärkere relative Aktivitätssteigerung auf dem Weg vom IC zum AC auftrat als in der Kontrollgruppe.

Ursache der vergleichsweise höheren Aktivitätssteigerung nach Salicylatapplikation könnte ein Ungleichgewicht zwischen hemmenden und aktivierenden Eingängen und Ausgängen im IC aufgrund des Hörschadens sein. Durch eine verminderte Hemmung „normaler“ oder „unwichtiger“ Geräusche könnte ein kompensatorisch gesteigertes Signal an Cortex und Thalamus weitergeleitet werden. Dieses würde möglicherweise durch Rückkopplung mit emotionalen Zentren (z.B. Amygdala oder Locus coeruleus) dominant und entspräche damit einem Korrelat von Tinnitus. Diese Hypothese bestätigen die Studien von Wallhäusser-Franke et al. von 1996 sowie von 2001.

Im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau setzten Noreña und Eggermont im Jahr 2003 ihre Tiere zwar einem akustischen Trauma aus, diese Studie zeigt jedoch ebenso einen Anstieg der Spontanrate im AC. Sie stimmt mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit überein, da auch in unseren Untersuchungen bei erniedrigten Aktivitätswerten im IC eine vergleichbar hohe neuronale Aktivität im AC gefunden wurde. Somit besteht eine relative Aktivitätssteigerung nach Salicylatgabe. Noreña und Eggermont erklärten ihr Ergebnis ebenfalls mit einer verminderten Hemmung nach peripherer Verletzung, die wiederum zu gesteigerter Spontanrate im AC führt.

Ob diese erhöhte Aktivität der zentralen Neurone das Korrelat für Tinnitus darstellt, muss – wie bereits erwähnt – indes offenbleiben.

Es sind verschiedene Ursachen für die Aktivitätsunterdrückung im IC denkbar:

Die verminderte Aktivität könnte aus dem durch Salicylat ausgelösten Hörschaden resultieren. Ein solcher Hörschaden führt zu einer verminderten Spontanaktivität der Hörnervenfasern, wie Müller et al. im Jahr 2003 nach Salicylatapplikation bei Gerbils diskutierten.

Auch Lenarz et al. zeigten 1993 eine geringere Aktivität des Hörnerven von Katzen nach Salicylatgabe vor allem im Frequenzbereich zwischen 0,8 und 1-2 kHz auf. Sie führten dies auf eine Verminderung der Spontanaktivität und/oder eine Reduzierung der Fortleitung von Umgebungsgeräuschen (z.B. Blutströmung) zurück.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten von Chen und Jastreboff. Sie untersuchten im Jahr 1995 anästhetisierte Ratten und fanden eine Zunahme der spontanen Aktivitätsrate im externen Nucleus des IC. Der Unterschied zu unseren Aussagen könnte in der Unterteilung des ICs durch eben genannte Autoren liegen. In unseren Versuchen wurde der IC als Ganzes gemessen. Zudem standen die Ratten von Chen und Jastreboff während der Messungen unter Narkose. Gaese und Ostwald zeigten 2001, dass Narkotika möglicherweise das Hören der Versuchstiere beeinflussen oder die Antwortigenschaften der zentralen auditorischen Neurone verändern.

2003 bestätigten Wallhäusser-Franke et al. ihre Ergebnisse aus den Jahren 1996 und 2001 mittels einer Untersuchung zur Bildung des c-fos-Proteins in Gerbilgehirnen. Das c-fos-Gen gehört zur Gruppe der „immediate early“-Gene. Es ist ein sehr guter Marker für plastische Veränderungen in Neuronen, da es bei Änderungen des Zellstoffwechsels als Erstes exprimiert wird.

Sie zeigten in dieser Studie, dass Salicylat, in hohen Dosen verwendet, die Bildung des c-fos-Proteins im IC unterdrückt, im AC jedoch erhöht.

Auch Ma et al. beschrieben 2006 nach Versuchen an Mäusen die Unterdrückung der Aktivität im IC nach Salicylatapplikation.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unsere Versuche frühere Studien hinsichtlich der These, dass Salicylat zu erniedrigter neuronaler Aktivität im IC und (relativ) erhöhter neuronaler Aktivität im AC führt, bestätigen.

In einer zweiten Versuchsreihe versuchten wir herauszufinden, ob lokal in die Cochlea appliziertes Salicylat die gleichen Befunde zeigt wie Salicylat, das auf systemischem Wege verabreicht wurde.

Lokal appliziertes Salicylat erniedrigte – wie auch bei der systemischen Gabe beobachtet – die neuronale Aktivität im IC signifikant im Vergleich zu lokal appliziertem NaCl (siehe Ergebnisse Abbildung 3.4 sowie Tabelle 3.2). Im AC fanden sich nichtsignifikant erhöhte Werte gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Ergebnisse Abbildungen 3.5, 3.6 sowie Tabelle 3.2).

Die Resultate, die den neuronalen Mustern aus den Versuchen mit systemisch appliziertem Salicylat vor allem im IC ähnlich sind, zeigen, dass möglicherweise auch lokal appliziertes Salicylat „Tinnituskorrelate“ auslösen kann. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Tinnitus durch Salicylat beim Menschen peripher generiert wird.

Salicylat hemmt bekannterweise die COX, das Enzym, welches für die Umwandlung von Arachidonsäure in die Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxan verantwortlich ist, und es kommt so zu einer Akkumulation von Arachidonsäure.

Zudem hemmt Salicylat in der Cochlea das Molekül Prestin in der Membran der OHCs und mindert deren Verstärker-/Modulatorfunktion (Oliver et al., 2001; Zheng et al., 2000).

Guillon et al. (2003) sowie Ruel et al. (2008) fanden in Tierversuchen heraus, dass es wahrscheinlich durch vermehrte Arachidonsäure zu einer Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat kommt bzw. dass deren Öffnungswahrscheinlichkeit erhöht wird. Sie postulierten, dies trage zur Tinnitusgenerierung bzw. zur Generierung eines Tinnitus bei Tieren entsprechenden Korrelates bei.

Panford-Walsh et al. belegten 2008 durch Versuche an Ratten, dass eine Aktivierung von NMDA-Rezeptoren nach Salicylatapplikation zu vermehrter Bildung des brain-derived neurotrophic factor (BDNF) führt. BDNF ist ein

Neurotrophin, das eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Nerven spielt und auch bei der Entstehung von Tinnitus beteiligt ist. Wahrscheinlich durch die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren komme es zu einem gesteigerten Auftreten von Calcium-Ionen, sowie zusätzlich zu einer Hemmung von hemmenden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Die vermehrte Ausbildung von BDNF in der Cochlea nach Salicylatgabe zeige die veränderte neuronale Aktivität, welche mit einem „Tinnituskorrelat“ einhergehe.

In der aktuellen Literatur gibt es nur die erwähnte Studie von Panford-Walsh et al. (2008), welche die lokale Wirkung von Salicylat auf die „Tinnitusauslösung“ (von diesen Autoren gemessen an der Ausbildung von BDNF) untersucht hat. Panford-Walsh et al. fanden – wie auch wir – keinen Unterschied zwischen lokaler und systemischer Salicylatgabe.

In unseren Versuchen fällt auf, dass jeweils die kontralateralen ICs nach lokal einseitig appliziertem Salicylat in ihrer Aktivität signifikant vermindert sind (siehe Ergebnisse Tabelle 3.3). Da die Hörfasern zum Großteil auf die andere Seite kreuzen, bedeutet diese Verminderung die Unterdrückung der Aktivität auf diesem Weg zum IC.

Die Aktivität im AC hingegen ist auf beiden Seiten ähnlich hoch. Dies zeigt, dass es eine verstärkte Aktivitätserhöhung auf der kontralateralen Seite gibt. Der Aktivitätsunterschied jeweils ipsi- und kontralateral zwischen IC und AC ist auf der kontralateralen Seite größer (Quotient AI/IC bzw. AAF/IC, siehe Ergebnisse Tabelle 3.3). Möglicherweise ist diese Aktivitätssteigerung zum AC hin als „Tinnituskorrelat“ zu interpretieren.

Imig und Durham beschrieben 2005 eine Dichteveränderung im kontralateralen IC nach einseitigem Lärmtrauma. Sie beobachteten mittels des <sup>14</sup>C-2-DG-Versuches an Ratten eine geringere optische Dichte der hohen Frequenzen im kontralateralen IC und führten das auf die verminderte Spontanaktivität in dieser Struktur zurück.

Dies bestätigt die in unserer Arbeit gefundenen Seitenunterschiede.

Bei dem Versuchsaufbau mit beiderseitiger Applikation waren die Grauwerte im IC nach Salicylatgabe im Vergleich zu NaCl ebenfalls signifikant vermindert, im AC allerdings fand sich kein wesentlicher

Aktivitätsunterschied (siehe Ergebnisse Abbildungen 3.7, 3.8, 3.9 sowie Tabelle 3.4).

Wie bei der einseitig lokalen Gabe ähnelt das Ergebnis dem der systemischen Gabe. Die Aktivität im IC zeigte bei den Salicylat-Tieren deutlich geringere Werte als in der Vergleichsgruppe, die Werte im AC hingegen wichen nur gering voneinander ab. Diese relativ erhöhte neuronale Aktivität im AC bei den Tieren nach lokaler Salicylatapplikation (Quotient AI/IC bzw. AAF/IC, siehe Ergebnisse Tabelle 3.4) könnte auf ein „Tinnituskorrelat“ hinweisen.

Die in der vorliegenden Arbeit erwähnten unterschiedlichen Forschungsergebnisse haben ihre Ursache möglicherweise darin, dass in manchen Arbeiten mit anderen Tinnitusauslösern als Salicylat geforscht wurde – wie zum Beispiel mit einem Knalltrauma – und dass das „Tinnituskorrelat“, das jeweils entsteht, unterschiedlich generiert wird bzw. an verschiedenen Orten und auf andere Art und Weise „passiert“ (Ochi et al., 2003; Ma et al., 2006; Møller, 2007; Guitton und Dudai, 2007).

So berichteten Ma et al. 2006 über eine signifikant erhöhte Spontanrate im IC von Mäusen nach Knalltrauma und eine signifikante Verminderung nach Salicylatgabe.

Guitton und Dudai bemerkten 2007 verschiedenes Verhalten ihrer Versuchstiere nach Anwendung von Salicylat oder Lärmtraumata. Zudem stellten sie die Möglichkeit einer Behandlung von akut durch Lärmtrauma ausgelöstem „Tinnitusverhalten“ mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten fest, die es bei chronisch gewordenem „Tinnitusverhalten“ nicht mehr gab. Der NMDA-Rezeptor-Antagonist Ifenprodil verhinderte „Tinnitusverhalten“ bei den Tieren nur, wenn er innerhalb der ersten vier Tage nach dem auslösenden Ereignis verabreicht wurde.

Ein Zusammenspiel von AC und emotionalen Zentren wie der Amygdala (Teil des limbischen Systems), welche die Sinnesfunktionen bewertet und adäquate Reaktionen hierauf steuert, oder dem Locus coeruleus, welcher die generelle Aufmerksamkeit und den Wachheitszustand reguliert, ist bei Tinnituserstehung bzw. -aufrechterhaltung ebenfalls sehr wahrscheinlich.

In diversen Arbeiten wird dieser Zusammenhang diskutiert bzw. gezeigt (Chen und Jastreboff, 1995; Wallhäusser-Franke und Langner, 2001; Eggermont und Roberts, 2004; Mühlau et al., 2006).

Beachtenswert sind einige Gemeinsamkeiten zwischen Tinnitus und Schmerz (im Besonderen dem Phantomschmerz), die zu einem besseren Verständnis von Tinnitus führen könnten:

Schmerz und Tinnitus sind beide primär subjektiv wahrnehmbar. Oftmals ausgelöst durch eine periphere Verletzung, führen sie zu plastischen Veränderungen in zentralen Teilen des ZNS (die Gebiete, die den Schmerz/Tinnitus im Cortex repräsentieren, können sich räumlich vergrößern). Schmerz kommt ebenso wie Tinnitus in verschiedenen Variationen bezüglich Art, Intensität und Leidensdruck vor, und es ist unwahrscheinlich, dass allen Varianten die gleiche Pathologie zugrunde liegt. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten könnten die Veränderungen, die bei Schmerz im ZNS zu finden sind, mit denen von Tinnitus vergleichbar sein (Lockwood et al., 1999; Møller, 2000, 2001, 2003, 2007).

Da die Forschung über Schmerz schon viel weiter fortgeschritten ist als die über Tinnitus, sollte man diese Erkenntnisse nutzen, um auch die Pathophysiologie von Tinnitus besser zu verstehen und mögliche Therapien zu finden.

Der Entstehungsort von Tinnitus bleibt weiter ungeklärt.

Sehr wahrscheinlich wird Tinnitus an einem anderen „Ort“ generiert als an der Lokalisation, der seine Pathologie zugeordnet wird (Cacace, 2003). Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung von Menschen, die ihren Tinnitus „steuern“ oder gar „verändern“ können mithilfe anderer sensorischer, sensomotorischer oder visueller Systeme (z.B. durch Starren, festes Zähnezusammenbeißen, Hautstimulation an der Hand etc.). Es scheint bei diesen Personen zur Bildung anomaler neuronaler Verbindungen zwischen beispielsweise visuellen und auditorischen Bereichen im Gehirn gekommen zu sein (Lockwood et al., 1998).

In Anbetracht der Schwierigkeit, alle Tinnitusarten zu verallgemeinern, ist zu bedenken, dass das in unserer Arbeit verwendete Versuchsmodell auf einem akuten Trauma basiert. Dieses kann Auswirkungen auf die Interpretation der Daten haben.

Es ist vorstellbar, dass bei chronischem Tinnitus, der in der Realität meist durch Lärmbelästigung ausgelöst wird, bereits Plastizitätsveränderungen auf cochleärer Ebene und im ZNS stattgefunden haben. Somit wäre chronischer Tinnitus anders zu therapieren als akut aufgetretener Tinnitus, bei dem diese Modifikationen vermutlich noch nicht zum Tragen gekommen sind. Unter Umständen könnten die plastischen Umwandlungen sogar medikamentös verhindert werden, sodass ein akuter Tinnitus nicht in die chronische Form übergeht (Figueiredo et al., 2008).

Wie bereits erwähnt, bemerkten Guitton und Dudai 2007, dass der NMDA-Rezeptor-Antagonist Ifenprodil nur innerhalb der ersten vier Tage nach einem Lärmtrauma in der Lage war, das „Tinnitusverhalten“ zu verhindern. Auch bei Phantomschmerz beispielsweise konnte die Gabe des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin direkt nach der Operation bzw. der Amputation helfen, das Auftreten von Phantomschmerz zu inhibieren bzw. die Schwere zu vermindern (Stubhaug et al., 1997; Dertwinkel et al., 2002).

## **2. Therapeutische Studien**

Wie im ersten Teil der Diskussion bereits erwähnt, könnten NMDA-Rezeptor-Antagonisten eine mögliche Option in der Therapie von Tinnitus darstellen.

Ziel dieses Teils unserer Versuche war herauszufinden, ob der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin therapeutisch verabreicht bei Gerbils ein durch Salicylat ausgelöstes verändertes neuronales Muster beeinflussen kann.

### **2.1 Memantin**

Die vom Menschen tolerierte Dosis Memantin liegt bei 20-30 mg/d, wie sich bei der Behandlung von Patienten mit Demenz, Alzheimer und Entzugssymptomatik nach Morphin-Abhängigkeit gezeigt hat. Die unter Memantin auftretenden Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen,

Ruhelosigkeit (innere oder auch motorische) und Schlafstörungen werden toleriert und sind vermutlich auf die zu schnelle Aufsättigung des Medikamentes zurückzuführen. Die unerwünschten Wirkungen sind im weiteren Verlauf der Einnahme meist rückläufig (Ditzler, 1991; Bisaga et al., 2001). In unseren Versuchen wurden Dosierungen von 1 mg/kg KG angewandt, eine vergleichsweise sehr hohe Menge.

## **2.2 Memantin nach Salicylatintoxikation**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass im Salicylatmodell bei der Mongolischen Wüstenrennmaus therapeutisch systemisch verabreichtes Memantin im Vergleich zu NaCl eine signifikante Erhöhung der Aktivität im IC, in AI und AAF jedoch keine Veränderungen hervorrufen kann (siehe Ergebnisse Abbildungen 3.10, 3.11, 3.12 sowie Tabelle 3.5).

Die im IC aufgetretene signifikante Aktivitätsunterdrückung nach Salicylat kann somit durch systemisch appliziertes Memantin aufgehoben werden. Da die Aktivität im AC jedoch unverändert bleibt, wird folglich der Aktivitätsunterschied zwischen AC und IC unter Memantin deutlich geringer (Quotient AI/IC bzw. AAF/IC, siehe Ergebnisse Tabelle 3.5). Dies könnte als eine erfolgreiche Manipulation der neuronalen Aktivitätsmuster nach Salicylatgabe interpretiert werden.

Guillon et al. fanden 2003 durch Versuche an Ratten heraus, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren ein Mechanismus ist, durch den nach Salicylatgabe „Tinnitusverhalten“ ausgelöst werden kann. Dementsprechend postulierten sie, NMDA-Rezeptor-Antagonisten müssten zu einer Unterdrückung des „Tinnitusverhaltens“ führen. Eine weitere Forschergruppe um Guillon bestätigte diese Theorie 2005 für die lokale Applikation in Verhaltensversuchen mit Ratten, bei denen das „Tinnitusverhalten“ zusätzlich durch Angst verstärkt wurde. Auf gleiche Weise verfahren Guillon und Dudai 2007 mit einem weiteren, lokal an die Cochlea applizierten NMDA-Rezeptor-Antagonisten bei noch frischem Lärmtrauma.

Ähnlich interpretieren wir unsere Befunde für die systemische Gabe von Memantin.

Oestreicher et al. stellten nach Versuchen an Meerschweinchen 1998 eine starke und reversible Hemmung der Spontanrate und des „burst-firing“ an den IHCs sowie die Unterdrückung der durch Glutamat ausgelösten Aktivität nach Memantingabe fest. Sie folgerten daraus, dass Memantin ein geeignetes Medikament gegen Tinnitus beim Menschen sein könnte, indem es die Spontanaktivität der afferenten Neurone unterdrücke.

In einer Arbeit von Lobarinas et al. von 2006 fand sich nach der systemischen Gabe von Memantin zwar keine komplette Unterdrückung des salicylatinduzierten „Tinnitusverhaltens“, einige Ratten zeigten aber nach Memantin eine leichte Erhöhung der Trinkrate bei Stille. Dies könnte bedeuten, dass ein kleiner Teil der Tiere Stille empfand, also möglicherweise kein „Tinnituskorrelat“ mehr hatte. Bei einem größeren Teil der Ratten veränderte sich das Verhalten jedoch nicht. Die von Lobarinas et al. verwendeten Dosen waren höher als die unserer Studie (1,5-3 mg/kg KG). Zu demselben Ergebnis kam 2008 auch eine weitere Forschergruppe um Lobarinas.

Es legte die Vermutung nahe, dass Memantin unter Umständen besser bei Tinnitus helfen könnte, der durch exzessive exzitatorische Stimulation ausgelöst wurde.

Da es, wie schon erwähnt, Ähnlichkeiten zwischen Tinnitus und Phantomschmerz gibt, ist es legitim, unsere Ergebnisse mit Studien über Phantomschmerz zu vergleichen.

Wiech et al. untersuchten 2004 die Wirkung von systemischem Memantin auf chronischen Phantomschmerz und fanden keine klinische Besserung. Auch die im ZNS aufgetretenen Veränderungen (kortikale Plastizität) blieben erhalten. Zu demselben Ergebnis kamen Maier et al., 2003. Es scheint jedoch bei akutem und chronischem neuropathischen Schmerz Unterschiede in der Behandlung zu geben. Memantin hilft nicht bei chronisch gewordenem neuropathischen Schmerz, könnte aber, laut Aussage der Forscher, bei akutem Schmerz als Therapeutikum infrage kommen.

Es ist keineswegs sicher, ob der Mechanismus der Tinnitusgenerierung stets derselbe ist. Es könnten z.B. bei chronischem Tinnitus Veränderungen im Hörsystem stattgefunden haben (Plastizitätsänderungen), die möglicherweise bei frühzeitiger Therapie zu verhindern gewesen wären. Dieses diskutieren Figueiredo et al. 2008 in einer Arbeit, in der sie 60 Patienten mit Tinnitus untersuchten. Sie fanden in der Gruppe von Patienten, die mit Memantin oral (in ansteigender Dosierung bis zu 20 mg) über zwölf Wochen behandelt worden waren, keine Besserung der Symptome. Sie gaben allerdings zu bedenken, dass alle Patienten an chronischem Tinnitus litten.

Möglich wäre demnach, dass für unterschiedliche Arten von Tinnitus (chronisch/akut, verschiedene Auslöser) unterschiedliche Therapieschemata und -optionen benötigt werden.

Das in unseren Versuchen ausgelöste Modell zeigt ein akutes Trauma. Wir fanden Unterschiede in der Aktivität und der Aktivitätssteigerung im Vergleich von salicylatausgelösten neuronalen Mustern mit oder ohne therapeutische Gabe von Memantin. Möglicherweise ist demnach systemisch verabreichtes Memantin in der von uns verwendeten Dosierung in der Lage, ein akutes durch Salicylat ausgelöstes neuronales Muster zu verhindern.

Zusammengefasst legen unsere Versuche nahe, dass systemisch appliziertes Memantin eine therapeutische Option bei der Behandlung von Tinnitus sein kann.

### **3. Prophylaktische Vergleiche (Memantin systemisch vor Auslösung von Tinnitus durch Salicylat)**

Wir untersuchten zusätzlich die Wirkung einer prophylaktischen Gabe von Memantin auf einen durch systemisches Salicylat ausgelösten Tinnitus.

#### **Salicylat systemisch versus NaCl systemisch**

Alle Ergebnisse fallen negativ aus. Es zeigen sich weder im IC noch im AC Unterschiede in der Aktivität zwischen Gerbils, die nach der prophylaktischen Gabe von Memantin Salicylat bzw. NaCl systemisch

appliziert bekamen (siehe Ergebnisse Abbildungen 3.13, 3.14, 3.15 sowie Tabelle 3.6).

Es ist jedoch zu beachten, dass die Unterdrückung der Aktivität im IC nach Salicylat ohne vorherige Applikation von Memantin signifikant war. Dies war nach prophylaktischer Gabe von Memantin nicht mehr festzustellen.

Diese Aufhebung des Unterschiedes ist allerdings nicht durch eine Anhebung der Aktivität im IC der Salicylat-Tiere, sondern vielmehr durch eine Unterdrückung der Aktivität im IC in der NaCl-Gruppe zu erklären. Es liegt hier die Vermutung nahe, dass prophylaktisch verabreichtes Memantin die Ausbildung eines abnormen neuronalen Musters nicht verhindern kann. Memantin ist nicht in der Lage, die Aktivitätsunterdrückung im IC durch Salicylat aufzuheben.

Aufgrund der niedrigen Anzahl der verwendeten Tiere ( $n = 2$ ) ist die Aussagekraft dieses Teils unserer Versuche jedoch eingeschränkt.

Im Gegensatz dazu steht eine Studie von Guitton und Dudai aus dem Jahr 2007, die von einer prophylaktischen Wirkung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten spricht. Die Autoren fanden bei ihren Ratten, die Ifenprodil (einen NMDA-Rezeptor-Antagonisten) direkt vor einem Lärmtrauma lokal in die Cochlea appliziert bekommen hatten, im Verhaltensmodell keine Anzeichen von Korrelaten, die einem Tinnitus beim Tier entsprechen könnten.

Dieser Effekt war mit unserer Methode für systemisch prophylaktisch verabreichtes Memantin nicht zu beobachten.

## V. Zusammenfassung

Tinnitus ist ein weitverbreitetes, die Patienten oft stark beeinträchtigendes Symptom. Weder der Ort noch der Mechanismus seiner Generierung sind bisher vollständig geklärt.

Diese Arbeit untersuchte die therapeutische und prophylaktische Wirkung des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin auf die neuronale Aktivität von Teilen des Hörsystems (IC und AC) der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Gerbil/Meriones unguiculatus*) nach Gabe von Salicylat i.p. Zusätzlich wurde die Wirkung von Salicylat (lokal und systemisch verabreicht) auf die neuronale Aktivität im Hörsystem des Gerbils analysiert.

Die Hörkurve der Mongolischen Wüstenrennmaus ist der des Menschen sehr ähnlich, deshalb eignet sie sich besonders gut für Untersuchungen am auditorischen System.

Die Versuche wurden mit der  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Methode durchgeführt, welche die quantitative Messung der Glukoseaufnahmeraten in allen Strukturen des Gehirns ermöglicht. Der Glukoseverbrauch des Gehirns ist von der elektrischen Aktivität abhängig. Man nimmt daher an, dass sich nach  $^{14}\text{C}$ -2-DG-Applikation in stark elektrisch aktiven Hirnbezirken (wie es auch bei Tinnitus vermutet wird) besonders viel radioaktiv markierte Glukose anreichert. Die neuronale Aktivität wurde mittels quantitativer Autoradiografie mithilfe des Programmes Scion Image in IC, AI und AAF beiderseits gemessen. Als Referenzstrukturen dienten das Corpus callosum und das Pedunkel. Beides sind Faserstrukturen im ZNS, die aufgrund ihrer geringen optischen Dichte nicht durch die experimentelle Stimulation beeinflusst werden.

Im Einzelvergleich von Salicylat und NaCl (systemisch sowie lokal ein- und beiderseits appliziert) kam es zu einer statistisch relevanten Unterdrückung der Aktivität im IC nach Salicylatgabe. Dies kann mit einer durch den Hörschaden – aufgrund von Salicylat – verursachten niedrigeren

Spontanrate im Hörnerv erklärt werden. Im AC zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied, d.h. auf dem Weg vom IC zum AC fand sich eine stärkere Aktivitätssteigerung der Salicylat-Tiere. Dies werten wir als neuronales Korrelat, das einem Tinnitus entsprechen könnte.

Im therapeutischen Versuch konnte gezeigt werden, dass systemisch verabreichtes Memantin die erniedrigte Aktivität eines durch Salicylat ausgelösten neuronalen Musters im IC in der hier verwendeten Dosierung aufheben kann und dass die Aktivitätssteigerung vom IC zum AC somit geringer wird.

Weiterhin ergaben unsere Versuche bei prophylaktisch verabreichtem Memantin – systemisch appliziert – keine Suppression der durch Salicylat ausgelösten veränderten neuronalen Aktivität.

## VI. Anhang

Versuch	Treat. 1	Treat. 2	Applik. 1	Applik. 2	Feld	Seite	Maus	Wiederh.	Grauwert
2	0	0	1	0	2	1	21	27	1.501
2	0	0	1	0	2	1	21	28	1.503
2	0	0	1	0	2	1	21	29	1.476
2	0	0	1	0	2	1	21	30	1.456
2	0	0	1	0	2	1	21	31	1.480
2	0	0	1	0	2	1	21	32	1.496
2	0	0	1	0	2	1	21	33	1.491
2	0	0	1	0	2	1	21	34	1.532
2	0	0	1	0	2	1	21	35	1.527
2	0	0	1	0	2	1	21	36	1.490
2	0	0	1	0	2	1	21	37	1.483
2	0	0	1	0	2	1	21	38	1.483
3	1	0	2	0	0	0	22	1	1.442
3	1	0	2	0	0	0	22	2	1.477
3	1	0	2	0	0	0	22	3	1.451
3	1	0	2	0	0	0	22	4	1.483
3	1	0	2	0	0	0	22	5	1.447
3	1	0	2	0	0	0	22	6	1.457
3	1	0	2	0	0	0	22	7	1.474
3	1	0	2	0	0	0	22	8	1.468
3	1	0	2	0	0	0	22	9	1.423
3	1	0	2	0	0	0	22	10	1.513
3	1	0	2	0	0	1	22	1	1.523
3	1	0	2	0	0	1	22	2	1.404
3	1	0	2	0	0	1	22	3	1.485
3	1	0	2	0	0	1	22	4	1.454
3	1	0	2	0	0	1	22	5	1.475
3	1	0	2	0	0	1	22	6	1.489
3	1	0	2	0	0	1	22	7	1.485
3	1	0	2	0	0	1	22	8	1.454
3	1	0	2	0	0	1	22	9	1.475
3	1	0	2	0	0	1	22	10	1.489
3	1	0	2	0	1	0	22	1	1.516
3	1	0	2	0	1	0	22	2	1.450
3	1	0	2	0	1	0	22	3	1.469
3	1	0	2	0	1	0	22	4	1.449

Tabelle 6.1:

Aufbau der statistischen Berechnungen an einem Beispiel:  
dunkel unterlegt ist der Versuch 3 (Salicylat lokal beiderseits vs. NaCl lokal beiderseits) an Maus 22 (Salicylat lokal beiderseits) im Feld IC links mit den durch das Programm Scion Image errechneten Grauwerten. Die helleren Felder zeigen die vorherigen bzw. folgenden Messungen im Verlauf.

Versuch	2 = Salicylat lokal einseitig links vs. NaCl lokal einseitig links	Applik. 2	keine
	3 = Salicylat lokal beiderseits vs. NaCl lokal beiderseits	Feld	0 = IC 1 = AI 2 = AAF
Treat. 1	0 = NaCl 1 = Salicylat	Seite	0 = links 1 = rechts
Treat. 2	0 = kein Memantin	Maus	Nummer/ID der Maus
Applik. 1	1 = lokal einseitig 2 = lokal beiderseits	Wiederh.	Nummer der Messung
		Grauwert	gemessener Wert

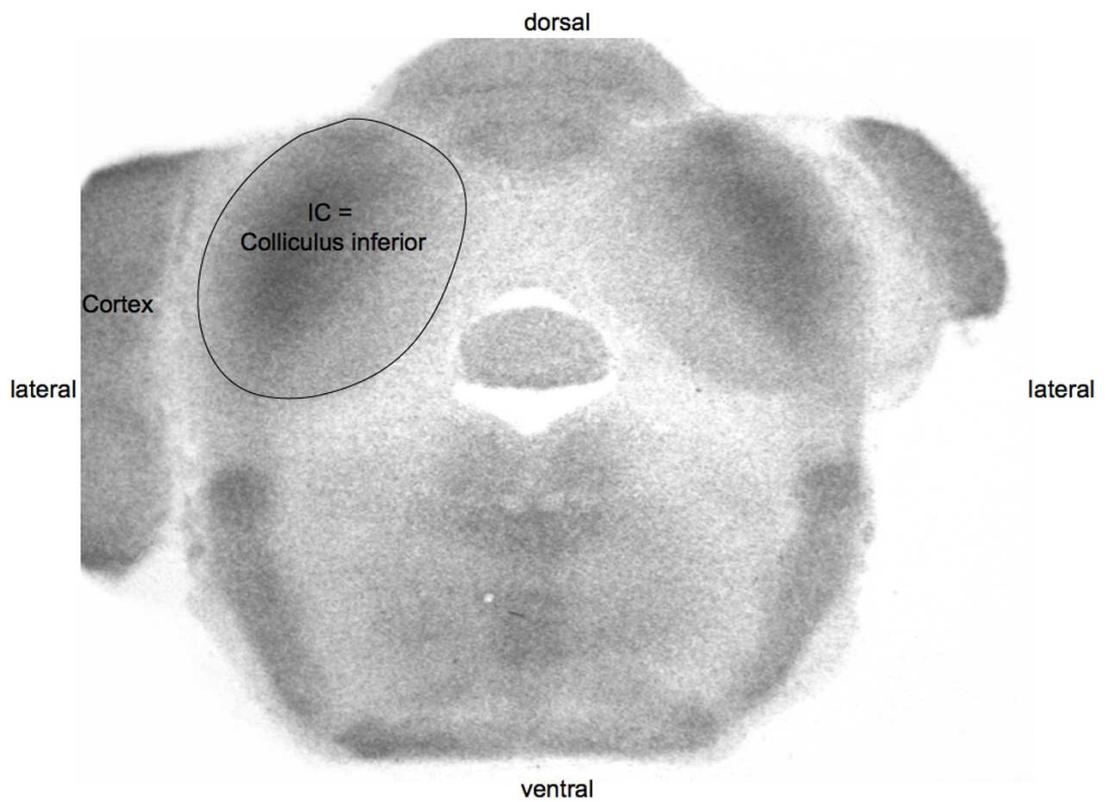


Abb. 6.1: Beispiel eines Originalschnittes durch das Gerbilgehirn mit dem IC, wie er zur Messung der Grauwerte verwendet wurde. Mit der Maus wurde der IC umfahren und der Grauwert vom Programm Scion Image errechnet.

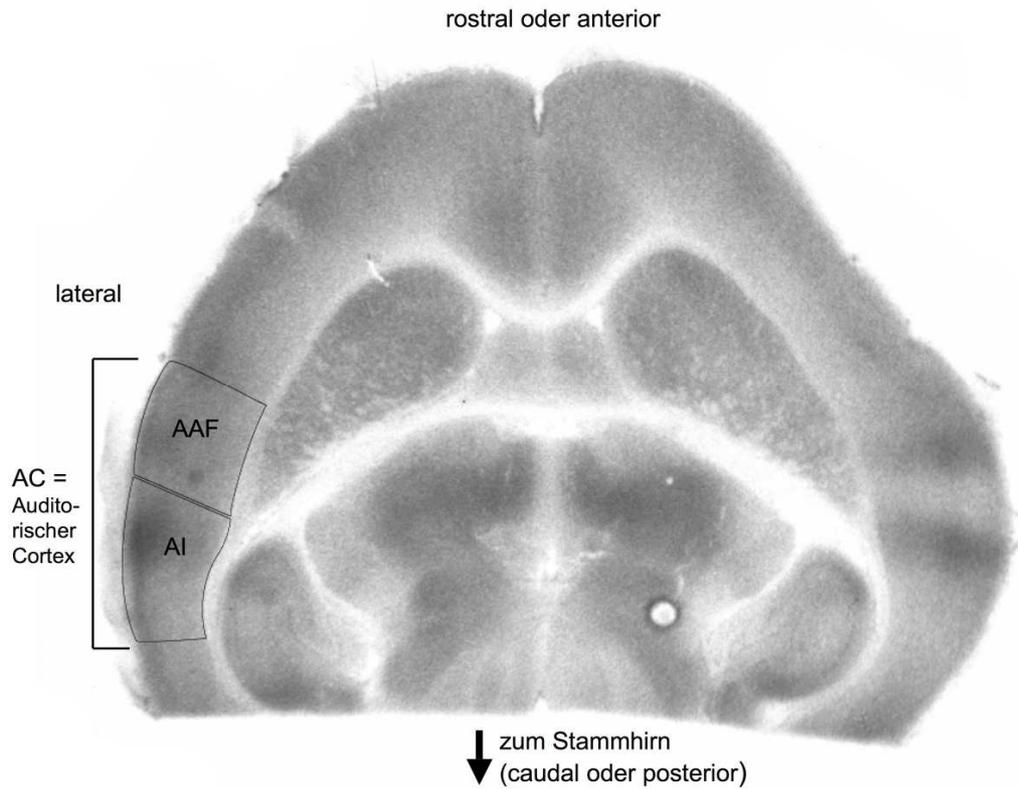


Abb. 6.2: Beispiel eines Originalschnittes durch das Gerbilgehirn mit dem AC und dessen Unterteilung in AI und AAF, wie er zur Messung der Grauwerte verwendet wurde. Mit der Maus wurden jeweils AI und AAF umfahren und die Grauwerte vom Programm Scion Image errechnet.

## VII. Literaturverzeichnis

Andersson, G., Kinnefors, A., Ekvall, L., Rask-Andersen, H.  
Tinnitus and translabyrinthine acoustic neuroma surgery.  
Audiol. Neurootol. 2 (1997) 403 - 409

Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen  
Fachgesellschaften  
Copyright ©: Dt. Ges. f. HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie  
<http://www.leitlinien.net> (Tinnitus)  
Stand: Februar 2010

Arnold, W., Bartenstein, P., Oestreicher, E., Römer, W., Schwaiger, M.  
Focal metabolic activation in the predominant left auditory cortex in patients  
suffering from tinnitus: a PET study with [18F]deoxyglucose.  
ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 58 (1996) 195 - 199

Bauer, C.A., Brozoski, T.J., Rojas, R., Boley, J., Wyder, M.  
Behavioral model of chronic tinnitus in rats.  
Otolaryngol. Head Neck Surg. 121 (1999) 457 - 462

Bisaga, A., Comer, S.D., Ward, A.S., Popik, P., Kleber, H.D.,  
Fischmann, M.W.  
The NMDA antagonist memantine attenuates the expression of opioid  
physical dependence in humans.  
Psychopharmacology (Berl.) 157 (2001) 1 - 10

Boettcher, F.A., Salvi, R.J.  
Salicylate ototoxicity: review and synthesis.  
Am. J. Otolaryngol. 12 (1991) 33 - 47

Brennan, J.F., Jastreboff, P.J.

Generalization of conditioned suppression during salicylate-induced phantom auditory perception in rats.

Acta Neurobiol. Exp. (Wars). 51 (1991) 15 - 27

Brozoski, T.J., Bauer, C.A., Caspary, D.M.

Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus.

J. Neurosci. 22 (2002) 2383 - 2390

Brozoski, T.J., Bauer, C.A.

The effect of dorsal cochlear nucleus ablation on tinnitus in rats.

Hear. Res. 206 (2005) 227 - 236

Budinger, E., Heil, P., Scheich, H.

Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). IV. Connections with anatomically characterized subcortical structures.

Eur. J. Neurosci. 12 (2000) 2452 - 2474

Cacace, A.T.

Expanding the biological basis of tinnitus: crossmodal origins and the role of neuroplasticity.

Hear. Res. 175 (2003) 112 - 132

Cazals, Y.

Auditory sensory-neural alterations induced by salicylate.

Prog. Neurobiol. 62 (2000) 583 - 631

Chan, Y.

Tinnitus: etiology, classification, characteristics, and treatment.

Discov. Med. 8 (2009) 133 - 136

Chen, G.D., Jastreboff, P.J.

Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats.

Hear. Res. 82 (1995) 158 - 178

D'Aldin, C.G., Ruel, J., Assié, R., Pujol, R., Puel, J.L.  
Implication of NMDA type glutamate receptors in neural regeneration and  
neof ormation of synapses after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea.  
Int. J. Dev. Neurosci. 15 (1997) 619 - 629

De Duve, C., Hers, H.G.  
Carbohydrate metabolism.  
Annu. Rev. Biochem. 26 (1957) 149 - 180

Dertwinkel, R., Heinrichs, C., Senne, I., Tegenthoff, M., Weiss, T.,  
Malin, J., Zenz, M., Maier, C.  
Prevention of severe phantom limb pain by perioperative administration of  
ketamine – an observational study.  
Acute Pain 4 (2002) 9 - 13

Ditzler, K.  
Efficacy and tolerability of memantine in patients with dementia syndrome.  
A double-blind, placebo controlled trial.  
Arzneimittelforschung 41 (1991) 773 - 780

Eggermont, J.J.  
On the pathophysiology of tinnitus; a review and a peripheral model.  
Hear. Res. 48 (1990) 111 - 123

Eggermont, J.J., Kenmochi, M.  
Salicylate and quinine selectively increase spontaneous firing rates in  
secondary auditory cortex.  
Hear. Res. 117 (1998) 149 - 160

Eggermont, J.J.  
Physiological mechanisms and neural models.  
In "Tinnitus Handbook", Tyler, R. (Ed.), Singular Thomson Learning, Africa,  
Australia, Canada, 2000, first edition, 85 - 122

Eggermont, J.J., Roberts, L.E.

The neuroscience of tinnitus.

Trends Neurosci. 27 (2004) 676 - 682

Ehrenberger, K., Felix, D.

Glutamate receptors in afferent cochlear neurotransmission in guinea pigs.

Hear. Res. 52 (1991) 73 - 80

Evans, E.F., Borerwe, T.A.

Ototoxic effects of salicylates on the responses of single cochlear nerve fibres and on cochlear potentials.

Br. J. Audiol. 16 (1982) 101 - 108

Eybalin, M.

Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea.

Physiol. Rev. 73 (1993) 309 - 373

Feldmann, H.

Pathophysiologie objektiver Ohrgeräusche.

In: „Tinnitus: Grundlagen einer rationalen Diagnostik und Therapie“

Feldmann, H. (Hrsg.), unter Mitarbeit von Lenarz, T. und von Wedel, H.,

Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York, 1998, 2. Auflage, 37 - 41

Figueiredo, R.R., Langguth, B., Mello de Oliveira, P.,

Aparecida de Azevedo, A.

Tinnitus treatment with memantine.

Otolaryngol. Head Neck Surg. 138 (2008) 492 - 496

Gaese, B.H., Ostwald, J.

Anesthesia changes frequency tuning of neurons in the rat primary auditory cortex.

J. Neurophysiol. 86 (2001) 1062 - 1066

Guitton, M.J., Caston, J., Ruel, J., Johnson, R.M., Pujol, R., Puel, R.L.

Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors.

J. Neurosci. 23 (2003) 3944 - 3952

- Guitton, M.J., Pujol, R., Puel, J.L.  
m-Chlorophenylpiperazine exacerbates perception of salicylate-induced tinnitus in rats.  
Eur. J. Neurosci. 22 (2005) 2675 - 2678
- Guitton, M.J., Dudai, Y.  
Blockade of cochlear NMDA receptors prevents long-term tinnitus during a brief consolidation window after acoustic trauma.  
Neural Plast. ID: 80904 (2007) 1 - 11
- Haab, L., Wallhäusser-Franke, E., Trenado, C., Strauss, D.J.  
Modeling limbic influences on habituation deficits in chronic tinnitus aurium.  
Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. (2009) 4234 - 4237
- Imig, T.J., Durham, D.  
Effect of unilateral noise exposure on the tonotopic distribution of spontaneous activity in the cochlear nucleus and inferior colliculus in the cortically intact and decorticate rat.  
J. Comp. Neurol. 490 (2005) 391 - 413
- Janssen, T., Boege, P., Oestreicher, E., Arnold, W.  
Tinnitus and 2f1 - f2 distortion product otoacoustic emissions following salicylate overdose.  
J. Acoust. Soc. Am. 107 (2000) 1790 - 1792
- Jastreboff, P.J., Brennan, J.F., Coleman, J.K., Sasaki, C.T.  
Phantom auditory sensation in rats: an animal model for tinnitus.  
Behav. Neurosci. 102 (1988) 811 - 822
- Jastreboff, P.J., Brennan, J.F., Sasaki, C.T.  
An animal model for tinnitus.  
Laryngoscope 98 (1988) 280 - 286

Kaltenbach, J.A., Rachel, J.D., Mathog, T.A., Zhang, J., Falzarano, P.R.,  
Lewandowski, M.

Cisplatin-induced hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus and its  
relation to outer hair cell loss: relevance to tinnitus.

J. Neurophysiol. 88 (2002) 699 - 714

Kiang, N.Y.S., Moxon, E.C., Levine, R.A.

Auditory-nerve activity in cats with normal and abnormal cochleas.

In "Sensorineural hearing loss: a Ciba Foundation Symposium",

Wolstenholme, G.E.W., Knight, J. (Eds.), Verlag J.&A. Churchill, Ltd.,

London, 1970, 241 - 273

Klinke, R.

Erregungsübertragung in Zellverbänden.

In: „Physiologie“

Klinke, R., Pape, H.C., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag,

Stuttgart – New York, 2005, 5. Auflage, 79 - 99

Klinke, R.

Hören und Sprechen: Kommunikation des Menschen.

In: „Physiologie“

Klinke, R., Pape, H.C., Silbernagl, S. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag,

Stuttgart – New York, 2005, 5. Auflage, 657 - 674

Kumagai, M., Matsushima, J., Harada, C., Inuyama, Y.

Effects of intravenous injection of salicylate on the spontaneous discharge  
rate of the cochlear nerve.

Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 94 (1991) 1710 - 1715

Landgrebe, M., Zeman, F., Koller, M., Eberl, Y., Mohr, M., Reiter, J.,  
Staudinger, S., Hajak, G., Langguth, B.

The Tinnitus Research Initiative (TRI) database: a new approach for  
delineation of tinnitus subtypes and generation of predictors for treatment  
outcome.

BMC Med. Inform. Decis. Mak. 10 (2010) 1 - 7

Lenarz, T., Schreiner, C., Snyder, R.L., Ernst, A.  
Neural mechanisms of tinnitus.  
Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 249 (1993) 441 - 446

Lenarz, T.  
Diagnostik und Therapie des Tinnitus.  
Laryngo-Rhino-Otol. 77 (1998) 54 - 60

Lobarinas, E., Sun, W., Cushing, R., Salvi, R.  
A novel behavioral paradigm for assessing tinnitus using schedule-induced  
polydipsia avoidance conditioning (SIP-AC).  
Hear. Res. 190 (2004) 109 - 114

Lobarinas, E., Yang, G., Sun, W., Ding, D., Mirza, N., Dalby-Brown, W.,  
Hilczmayer, E., Fitzgerald, S., Zhang, L., Salvi, R.  
Salicylate- and quinine-induced tinnitus and effects of memantine.  
Acta Otolaryngol. Suppl. 556 (2006) 13 - 19

Lobarinas, E., Sun, W., Stolzberg, D., Lu, J., Salvi, R.  
Human brain imaging of tinnitus and animal models.  
Semin. Hear. 29 (2008) 333 - 349

Lockwood, A.H., Salvi, R.J., Coad, M.L., Towsley, M.L., Wack, D.S.,  
Murphy, B.W.  
The functional neuroanatomy of tinnitus: evidence for limbic system links  
and neural plasticity.  
Neurology 50 (1998) 114 - 120

Lockwood, A.H., Salvi, R.J., Burkard, R.F., Galantowicz, P.J., Coad, M.L.,  
Wack, D.S.  
Neuroanatomy of tinnitus.  
Scand. Audiol. Suppl. 51 (1999) 47 - 52

Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L.

Nozizeptives System.

In: „Pharmakologie und Toxikologie“

Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag,

Stuttgart – New York, 2010, 17. Auflage, 289 - 324

Ma, W.L., Hidaka, H., May, B.J.

Spontaneous activity in the inferior colliculus of CBA/J mice after manipulations that induce tinnitus.

Hear. Res. 212 (2006) 9 - 21

Mahlke, C., Wallhäusser-Franke, E.

Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3.1 and c-fos immunocytochemistry.

Hear. Res. 195 (2004) 17 - 34

Maier, C., Dertwinkel, R., Mansourian, N., Hosbach, I., Schwenkreis, P., Senne, I., Skipka, G., Zenz, M., Tegenthoff, M.

Efficacy of the NDMA-receptor antagonist memantine in patients with chronic phantom limb pain – results of a randomized double-blinded, placebo-controlled trial.

Pain 103 (2003) 277 - 283

Mazurek, B., Stöver, T., Haupt, H., Gross, J., Szczepek, A.

Die Rolle der kochleären Neurotransmitter in Bezug auf Tinnitus.

HNO 55 (2007) 964 - 971

Mazurek, B., Stöver, T., Haupt, H., Klapp, B.F., Adli, M., Gross, J., Szczepek, A.J.

Bedeutung von Stress: Seine Rolle im auditorischen System und bei der Tinnitusentstehung.

HNO 58 (2010) 162 - 172

McFadden, D., Plattsmier, H.S.

Aspirin can potentiate the temporary hearing loss induced by intense sounds.

Hear. Res. 9 (1983) 295 - 316

McFadden, D., Plattsmier, H.S.

Aspirin abolishes spontaneous oto-acoustic emissions.

J. Acoust. Soc. Am. 76 (1984) 443 - 448

© Merz Pharmaceuticals

[http://www.memantine.com/en/studies/preclinical\\_data/signal-to-noise\\_hypothesis/](http://www.memantine.com/en/studies/preclinical_data/signal-to-noise_hypothesis/)

Stand: 12.11.2010

Møller, A.R.

Similarities between severe tinnitus and chronic pain.

J. Am. Acad. Audiol. 11 (2000) 115 - 124

Møller, A.R.

Symptoms and signs caused by neural plasticity.

Neurol. Res. 23 (2001) 565 - 572

Møller, A.R.

Pathophysiology of tinnitus.

Otolaryngol. Clin. North Am. 36 (2003) 249 - 266

Møller, A.R.

Tinnitus: presence and future.

In "Progress in brain research; Volume 166; Tinnitus: Pathophysiology and treatment"

Langguth, B., Hajak, G., Kleinjung, T., Cacace, A.T., Møller, A.R. (Eds.), Elsevier B.V., Amsterdam – Boston – Heidelberg – London – New York – Oxford – Paris – San Diego – San Francisco – Singapore – Sydney – Tokyo, 2007, first edition, 3 - 16

Møller, A.R.

Tinnitus and pain.

In "Progress in brain research; Volume 166; Tinnitus: Pathophysiology and treatment"

Langguth, B., Hajak, G., Kleinjung, T., Cacace, A.T., Møller, A.R. (Eds.),  
Elsevier B.V., Amsterdam – Boston – Heidelberg – London – New York –  
Oxford – Paris – San Diego – San Francisco – Singapore – Sydney –  
Tokyo, 2007, first edition, 47 - 53

Mühlau, M., Rauschecker, J.P, Oestreicher, E., Gaser, C., Röttinger, M.,  
Wohlschläger, A.M., Simon, F., Etgen, T., Conrad, B., Sander, D.

Structural brain changes in tinnitus.

Cereb. Cortex. 16 (2006) 1283 - 1288

Müller, M., Klinke, R., Arnold, W., Oestreicher, E.

Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited.

Hear. Res. 183 (2003) 37 - 43

Nordang, L., Oestreicher, E., Arnold, W., Anniko, M.

Glutamate is the afferent neurotransmitter in the human cochlea.

Acta Otolaryngol. 120 (2000) 359 - 362

Noreña, A.J., Eggermont, J.J.

Changes in spontaneous neural activity immediately after an acoustic  
trauma: Implications for neural correlates of tinnitus.

Hear. Res. 183 (2003) 137 - 153

Ochi, K., Kinoshita, H., Kenmochi, M., Nishino, H., Ohashi, T.

Zinc deficiency and tinnitus.

Auris, Nasus, Larynx. 30 Suppl. (2003) 25 - 28

Oestreicher, E., Arnold, W., Ehrenberger, K., Felix, D.

Memantine suppresses the glutamatergic neurotransmission of  
mammalian inner hair cells.

ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec. 60 (1998) 18 - 21

Oestreicher, E., Arnold, W., Ehrenberger, K., Felix, D.  
New approaches for inner ear therapy with glutamate antagonists.  
Acta Otolaryngol. 119 (1999) 174 - 178

Oestreicher, E., Ehrenberger, K., Felix, D.  
Different action of memantine and caroverine on glutamatergic  
transmission in the mammalian cochlea.  
Adv. Otorhinolaryngol. 59 (2002) 18 - 25

Oliver, D.L., Huerta, M.F.  
Inferior and superior colliculi.  
In "The mammalian auditory pathway: neuroanatomy"  
Webster, D.B., Popper, A.N., Fay, R.R. (Eds.), Springer-Verlag,  
New York – Berlin – Heidelberg – London – Paris – Tokyo – Hong Kong –  
Barcelona – Budapest, 1992, first edition, 168 - 221

Oliver, D., He, D.Z.Z., Klöcker, N., Ludwig, J., Schulte, U., Waldegger, S.,  
Ruppersberg, J.P., Dallos, P., Fakler, B.  
Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell  
motor protein.  
Science 292 (2001) 2340 - 2343

Oliver, D., Fakler, B.  
Auditorisches System.  
In: „Physiologie“  
Speckmann, E.J., Hescheler, J., Köhling, R. (Hrsg.), Elsevier GmbH,  
Urban & Fischer, München, Jena, 2008, 5. Auflage, 121 - 141

Owren, M.J., Hopp, S.L., Sinnott, J.M., Petersen, M.R.  
Absolute auditory thresholds in three old world monkey species  
(Cercopithecus aethiops, C. neglectus, Macaca fuscata) and humans  
(Homo sapiens).  
J. Comp. Psychol. 102 (1988) 99 - 107

Panford-Walsh, R., Singer, W., Rüttiger, L., Hadjab, S., Tan, J., Geisler, H.S., Zimmermann, U., Köpschall, I., Rohbock, K., Vieljans, A., Oestreicher, E., Knipper, M.

Midazolam reverses salicylate-induced changes in brain-derived neurotrophic factor and Arg3.1 expression: implications for tinnitus perception and auditory plasticity.

Mol. Pharmacol. 74 (2008) 595 - 604

Pilgramm, M., Rychlik, R., Lebisch, H., Siedentop, H., Goebel, G., Kirchhoff, D.

Tinnitus in der Bundesrepublik Deutschland – eine repräsentative epidemiologische Studie.

HNO aktuell 7 (1999) 261 - 265

Puel J.L.

Chemical synaptic transmission in the cochlea.

Prog. Neurobiol. 47 (1995) 449 - 476

Puel, J.L., Ruel, J., Guitton, M., Wang, J., Pujol, R.

The inner hair cell synaptic complex: physiology, pharmacology and new therapeutic strategies.

Audiol. Neurootol. 7 (2002) 49 - 54

Pujol, R.

Physiologie et physiopathologie cochléaires. Données récentes.

Ann. Oto-Laryngol. 107 (1990) 36 - 47

Pujol, R., Puel, J.L., d'Aldin, C.G., Eybalin, M.

Pathophysiology of the glutamatergic synapses in the cochlea.

Acta Otolaryngol. 113 (1993) 330 - 334

Pujol, R., Puel, J.L.

Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 884 (1999) 249 - 254

Pujol, R.  
Promenade autour de la Cochlée.  
www.cochlee.org  
Stand: 12.11.2010

Pulec, J.L.  
Tinnitus: surgical therapy.  
Am. J. Otol. 5 (1984) 479 - 480

Rauschecker, J.P., Leaver, A.M., Mühlau, M.  
Tuning out the noise: limbic-auditory interactions in tinnitus.  
Neuron 66 (2010) 819 - 826

Ruel, J., Chabbert, C., Nouvian, R., Bendris, R., Eybalin, M., Leger, C.L.,  
Bourien, J., Mersel, M., Puel, J.L.  
Salicylate enables cochlear arachidonic-acid-sensitive NMDA receptor  
responses.  
J. Neurosci. 28 (2008) 7313 - 7323

Rüttiger, L., Ciuffani, J., Zenner, H.P., Knipper, M.  
A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound  
experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus.  
Hear. Res. 180 (2003) 39 - 50

Ryan, A.  
Hearing sensivity of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatis*.  
J. Acoust. Soc. Am. 59 (1976) 1222 - 1226

Scheich, H., Heil, P., Langner, G.  
Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones  
unguiculatus*). II. Tonotopic 2-deoxyglucose.  
Eur. J. Neurosci. 5 (1993) 898 - 914

Sée, G.

Études sur l'acide salicylique et les salicylates; traitement du rhumatisme aigu et chronique de la goutte, et de diverses affections du système nerveux sensitif par les salicylates.

Bulletin de L'Academie Nationale de Medicine. 6 (1877) 689 - 706

Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O., Shinohara, M.

The [<sup>14</sup>C]-deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat.

J. Neurochem. 28 (1977) 897 - 916

Stubhaug, A., Breivik, H., Eide, P.K., Kreunen, M., Foss, A.

Mapping of punctuate hyperalgesia around a surgical incision demonstrates that ketamine is a powerful suppressor of central sensitization to pain following surgery.

Acta Anaesthesiol. Scand. 41 (1997) 1124 - 1132

Stypulkowski, P.H.

Mechanisms of salicylate ototoxicity.

Hear. Res. 46 (1990) 113 - 146

Thomas, H., Tillein, J., Heil, P., Scheich, H.

Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Electrophysiological mapping of frequency representation and distinction of fields.

Eur. J. Neurosci. 5 (1993) 882 - 897

Trepel, M.

„Neuroanatomie: Struktur und Funktion“

Kapitel 6: Mittelhirn (Mesencephalon).

Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München – Jena, 2008,

4. Auflage, 149 - 170

Trepel, M.  
„Neuroanatomie: Struktur und Funktion“  
Kapitel 7: Kleinhirn (Cerebellum).  
Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München – Jena, 2008,  
4. Auflage, 171 - 193

Trepel, M.  
„Neuroanatomie: Struktur und Funktion“  
Kapitel 9: Großhirn (Telencephalon) und funktionelle Bahnsysteme.  
Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München – Jena, 2008,  
4. Auflage, 215 - 282

Tunstall, M.J., Gale, J.E., Ashmore, J.F.  
Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the  
guinea-pig cochlea.  
J. Physiol. 485 (1995) 739 - 752

Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M.  
Cyclooxygenases 1 and 2.  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 38 (1998) 97 - 120

Wallhäusser-Franke, E., Braun, S., Langner, G.  
Salicylate alters 2-DG-uptake in the auditory system: a model for tinnitus?  
NeuroReport 7 (1996) 1585 - 1588

Wallhäusser-Franke, E., Langner, G.  
Phantomgeräusche: Zentralnervöse Mechanismen von Tinnitus.  
Neuroforum 1 (2001) 21 - 27

Wallhäusser-Franke E., Mahlke C., Oliva R., Braun S.,  
Wenz G., Langner G.  
Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil  
after manipulations that induce tinnitus.  
Exp. Brain Res. 153 (2003) 649 - 654

Wallhäusser-Franke, E., Cuautle-Heck, B., Wenz, G.,  
Langner, G., Mahlke, C.

Scopolamine attenuates tinnitus-related plasticity in the auditory cortex.  
NeuroReport 17 (2006) 1487 - 1491

Wang, H.T., Luo, B., Zhou, K.Q., Xu, T.L., Chen, L.

Sodium salicylate reduces inhibitory postsynaptic currents in neurons of rat  
auditory cortex.

Hear. Res. 215 (2006) 77 - 83

Warr, W.B.

Organization of olivocochlear efferent systems in mammals.

In "The mammalian auditory pathway: neuroanatomy"

Webster, D.B., Popper, A.N., Fay, R.R. (Eds.), Springer-Verlag,

New York – Berlin – Heidelberg – London – Paris – Tokyo – Hong Kong –  
Barcelona – Budapest, 1992, first edition, 410 - 448

Webster, D.B.

An overview of mammalian auditory pathways with an emphasis on  
humans.

In "The mammalian auditory pathway: neuroanatomy"

Webster, D.B., Popper, A.N., Fay, R.R. (Eds.), Springer-Verlag,

New York – Berlin – Heidelberg – London – Paris – Tokyo – Hong Kong –  
Barcelona – Budapest, 1992, first edition, 1 - 22

Wiech, K., Kiefer, R.T., Töpfner, S., Preissl, H., Braun, C., Unertl,  
K., Flor, H., Birbaumer, N.

A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic  
acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb  
pain.

Anesth. Analg. 98 (2004) 408 - 413

Wigand, M.E., Hellweg, F.C., Berg, M.

Tinnitus nach Eingriffen am achten Hirnnerven.

Laryng. Rhinol. Otol. 61 (1982) 132 - 134

Zenner, H.P., Ernst, A.

Cochlear-motor, transduction and signal-transfer tinnitus: models for three types of cochlear tinnitus.

Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 249 (1993) 447 - 454

Zhang, J.S., Kaltenbach, J.A., Wang, J., Bronchti, G.

Changes in [<sup>14</sup>C]-2-deoxyglucose uptake in the auditory pathway of hamsters previously exposed to intense sound.

Hear. Res. 185 (2003) 13 - 21

Zheng, J., Shen, W., He, D.Z., Long, K.B., Madison, L.D., Dallos, P.

Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells.

Nature 405 (2000) 149 - 155

## VIII. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Elmar Oestreicher für die Überlassung des interessanten Themas, für seine Unterstützung, seine Anregungen und Hilfestellungen sowie für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bedanken.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Susanne Braun. Sie war auch in schwierigen Zeiten immer wieder zur Stelle und hat mir fachlich und menschlich sowie mit viel Literatur unter die Arme gegriffen.

Zudem danke ich Frau Susanne Sehner vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Hamburg für ihre wertvolle Hilfe bei der Erarbeitung der Statistik sowie für ihre Flexibilität mit der Terminvergabe. Vielen Dank auch an Prof. Dr. K. Wegscheider.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, denen diese Doktorarbeit gewidmet ist, für ihre konstruktive Kritik, fachliche und seelische Unterstützung, Motivation, Liebe und ihren bedingungslosen Rückhalt.

Nicht vergessen möchte ich meine Schwester Liv, die mich stets ermuntert hat, die Dissertation fertig zu stellen, Minne, Lila, die Damen der Bibliothek des Ärztlichen Vereins der Ärztekammer Hamburg sowie alle nicht namentlich genannten Personen, die auf unterschiedliche Art zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.