

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche der folgenden Arbeit wurden adulte Meerschweinchen beider Geschlechter des Stammes Dunkin Hartley verwendet. Die Tiere stammen aus der institutseigenen Zucht, sowie von einem externen Züchter (Bezugsquelle des Zuchtstammes, Harlan Laboratories, Roßdorf, Germany). Der verwendete Stamm ist in der Hörforschung etabliert. Er wurde bereits in vielen auditorischen Studien eingesetzt (Agterberg et al., 2009; Sly et al., 2007), was auch von Harlan angegeben wird. Die Versuchstiere weisen keine pathologischen Anomalien der Hörorgane oder Auffälligkeiten in Verhaltenstests auf. Das Gewicht liegt zum Implantationszeitpunkt bei mindestens 700 g. Die Tiere sind zu dem Zeitpunkt mindestens zehn Wochen alt (laut Harlan Laboratories, Roßdorf, Germany). Die Tiere wurden vor und während der Behandlung, durch einseitige Elektrostimulation mittels CI in Gruppen in großen Käfigen untergebracht, um eine tiergerechte Haltung zu gewährleisten. Der Raum wurde klimatisiert (23° C) und mittels künstlicher Beleuchtung eine 12 stündige Tag- Nachtphase simuliert. Die Versorgung der Tiere mit Futter und Wasser erfolgte *ad libitum*. Die Tierställe lagen auf dem Gelände der Humboldt Universität zu Berlin sowie im FEM (Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin) des Virchow Klinikum der Charité Berlin.

Das mittlere Alter der Versuchstiere unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen. Das mittlere Alter der Versuchsgruppen lag beim finalen Versuch bei: LSR (17-18 Monate, n=3; 27-30 Monate, n=3), MSR (10 Monate) und HSR (14 Monate) (siehe auch 4.1).

2.2 Cochlea Implantat und Operation

Für die einseitige Implantation eines CI wurden Meerschweinchen mit einem Gewicht von mindestens 700 g verwendet.

Für die Implantat-Operation wurden die Tiere mit einer intramuskulären Ketamin/Rompun-Injektion narkotisiert (Ketamin: 100 mg/Kg Körpergewicht; Ketanest. Pfizer Deutschland GmbH, Berlin; Rompun: 8 mg/Kg Körpergewicht, Bayer Health Care AG, Leverkusen, Germany) und mit einem Schmerzmittel (Carprofen, 0,08 ml/KG) versorgt.

Ein Hautschnitt wurde hinter dem linken Ohr des Meerschweinchens durchgeführt. Der Schädelsknochen wurde freigelegt und ein Loch mit 2 mm Durchmesser am Felsenbein in die Bulla gebohrt. Das Mittelohr wurde eröffnet und dadurch ein Zugang zur Cochlea, die sich medial

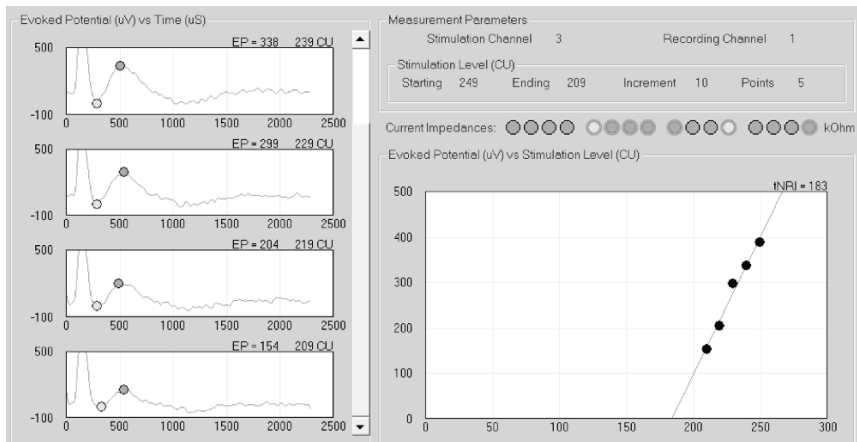
im Mittelohr befindet, geschaffen. Die Elektrode wurde durch das runde Fenster in die Cochlea geschoben. Dabei wurde die Rundfenstermembran zerstört. Ein zweites Loch im Schädelknochen diente dabei als Führung der Elektrode durch den Schädelknochen. Das eingeführte Elektrodenarray (HiFocus1j Electrode Array, Advanced Bionics LLC, Valencia, USA) lag mit den ersten vier bis fünf Elektroden (siehe Abbildung 1-5) in allen Scalen, da das Corti-Organ bei der Insertion durch die Elektrodendicke zerstört und zusammengeschoben wurde, wodurch eine Taubheit insbesondere im hochfrequenten Bereich auftrat. Das Elektrodenarray ist leicht vorgeformt (siehe Abbildung 1-5) mit 16 unabhängig stimulierbaren Elektroden, von denen die vier bis fünf in der Cochlea liegenden zur Elektrostimulation genutzt werden können. Ein kleines Stück Muskel wurde zunächst über das Runde Fenster gelegt, um den Zugang zur Cochlea zu verschließen und das Infektionsrisiko zu minimieren. Anschließend wurde die Cochleostomie mit Cyanacrylat Klebstoff (Roth Coll 1 von Carl Roth, Karlsruhe, Germany) verschlossen und die Elektrode am Knochen befestigt. Das Kabel, das von dem CI zum Elektrodenarray führte, wurde zur Zugentlastung außerhalb des Schädels mit der vorhandenen Muskulatur vernäht. Gleichzeitig wurde dadurch die Ringelektrode des Implantats in den Muskel eingebettet, um einen möglichst guten Gewebekontakt und damit einen geringen Widerstand für die Messungen zu erreichen. Der integrierte Magnet des CI wurde entfernt, sodass eine Untersuchung mit Magnet Resonanz Tomographie (MRT) ohne erneuten Eingriff ermöglicht wurde. Mit einem chirurgischen Nadelhalter wurde dann ein ausreichend großer Hautbereich im Nacken von dem darunter liegenden Muskel getrennt um eine Tasche zu schaffen, in die das CI eingenäht werden konnte. Die Haut des Tieres wurde wieder verschlossen und das Tier postoperativ mit einem Antibiotikum (Chlormycetin, 1,6 ml/Kg) versorgt. Chlormycetin wurde weitere vier Tage zweimal täglich verabreicht (0,8 ml/KG). 24 Stunden nach der Operation wurden die Tiere erneut mit einer identischen Dosis Carprofen (0,08 ml/KG) versorgt.

Für diese Untersuchung wurden Cochlea-Implantate des Modells HiRes 90k® mit „HiFocus 1j Electrode Array“ (Advanced Bionics LLC, Valencia, USA) verwendet. 90k steht hier für die Fähigkeit des Implantats, eine hohe Anzahl von Informationsupdates (83000) vom Soundprozessor an die 16 individuell stimulierbaren Elektroden des Implantats zu übermitteln.

2.2.1 Einstellung der Cochlea Implantate

Alle Versuchsgruppen waren präoperativ normalhörend und wurden auf einer Seite durch die Insertion einer humanen CI-Elektrode in die *Scala Tympani*, *Media* und *Vestibuli* (aufgrund des Elektrodendurchmessers) mechanisch ertaubt.

Abbildung 2-1: Zeigt links vier der fünf Messungen mit unterschiedlicher Stimulationsintensität mit Markierungen an Minima und Maxima. Die rechte Abbildung zeigt die Berechnung des t-NRI-Wertes (threshold Neural Response Imaging) den aus den Maxima der Einzelmessungen mit RSPOM (Advanced Bionics LLC, Valencia, USA).



Während der Operation wurden mit dem Programm Soundwave (Version 1.1, Advanced Bionics LLC, Valencia, USA) Widerstandsmessungen der einzelnen Stimulationselektroden gegen die im Muskel liegende Ringelektrode durchgeführt, um eine optimale Positionierung der Elektrode zu gewährleisten. Außerdem wurden Hörnervantworten abgeleitet, um eine Stimulierung der SGZ zu validieren. Die endgültigen Einstellungen des CI und der Elektrostimulation wurden sechs Wochen nach der CI-Implantation durchgeführt. Es handelt sich hier um einen bewusst eingehaltenen Abstand zur OP. Dieser zeitliche Abstand zwischen Ertaubung und Beginn der Elektrostimulation dient neben dem Abwarten der Wundheilung auch der besseren Vergleichbarkeit mit einer Elektrostimulation die bei Taubheit durchgeführt wird, inklusive den damit verbundenen degenerativen Prozessen. Kurz nach der CI-Operation kommt es beim Menschen zu starken Veränderungen der t-NRI-Werte (threshold of the Neuronal Response Imaging; Schwelle der neuronalen Antwort-Telemetrie), der Schwellenlevel (T-Level;

Threshold-Level) und des „Most-Comfortable-Level“ (M-Level) die sich z.T. schon nach einigen Wochen stabilisieren können (Akin et al., 2006; Henkin et al., 2003). Daher werden alle für die Einstellung nötigen Messungen während der Anpassung vorgenommen.

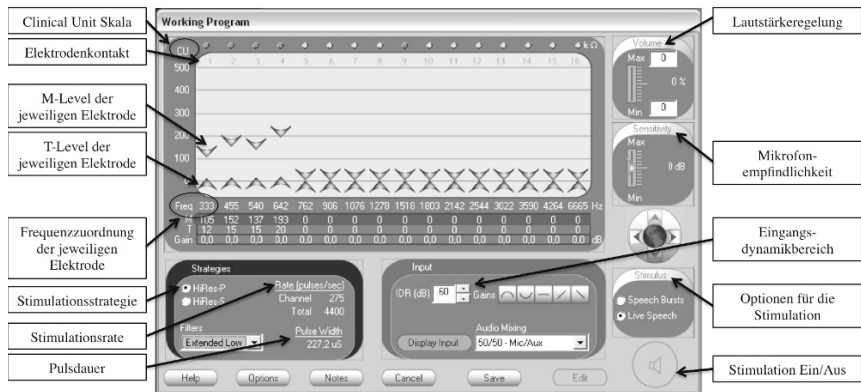


Abbildung 2-2: Zeigt die Benutzeroberfläche von Soundwave (Version 1.1, Advanced Bionics LLC, Valencia, USA) mit dessen Hilfe die Einstellungen am CI vorgenommen werden.

Die Einstellung der CI-Soundprozessoren wurde mit dem Programm „Research Sound Processor for Objective Measures“ (RSPOM, Advanced Bionics LLC, Valencia, USA) und mit dem Programm Soundwave und durchgeführt (siehe Abbildung 2-1 und Abbildung 2-2). Zunächst wurde dabei der Widerstand der einzelnen Elektroden gegen die Ringelektrode mit Soundwave ermittelt. Bei Elektroden mit Widerständen über 30 kΩ, sowie allen Elektroden, die nicht mehr in der Cochlea liegen, wurden die Lautstärke, T-Level und M-Level auf Null gesetzt (siehe Abbildung 2-2, Elektrodenkontakte 5-16) und damit die Elektrode deaktiviert. Die Verwendung von nicht optimalen Einstellungen könnten zu einer Schädigung führen (zu hoher Strom) oder auch eine Reaktion im Hörnerv verhindern (zu niedriger Strom). Mit dem Programm RSPOM wurden anschließend die ersten Elektrostimulationen der Elektroden durchgeführt (siehe Abbildung 2-1). Dabei wurden die Elektroden einzeln entweder gegen die Ringelektrode oder, wenn das zu keinen verwertbaren Ergebnissen führte, gegen das Decodergehäuse (siehe Abbildung 1-5) stimuliert. Die erste Stimulation wurde mit niedrigen Stimulationsintensitäten durchgeführt, um eine Schädigung auszuschließen. Gleichzeitig mit der Elektrostimulation wurde die Reaktion des Hörnervs mit einer anderen Elektrode aufgezeich-

net. Es wurde z.B. mit Elektrode 3 (Stimulation Channel) stimuliert und die Reaktion des Hörnervs mit Elektrode 1 aufgezeichnet (Recording Channel, siehe Abbildung 2-2). Das Programm RSPOM stellt die Aufzeichnung der Ableitelektrode grafisch dar. Die Intensität wurde gesteigert, bis eine eindeutige Antwort des Hörnervs erkennbar war. Es folgten mindestens vier weitere Stimulationen mit steigender Intensität (siehe Abbildung 2-1 links). Das Programm RSPOM zeigt die aufgezeichneten Reaktionen des Hörnervs inklusive Minima und Maxima an (siehe Abbildung 2-1 links) und verbindet die Maxima der Hörnervantworten (siehe Abbildung 2-1 rechts). Im linearen Arbeitsbereich der auditorischen Strukturen kommt es zu einer linearen Vergrößerung der Maxima bei linearer Steigerung der Intensität. Die Maxima, die nicht in diesen Bereich fielen, werden aus der Berechnung entfernt. Aus den Maxima, die im linearen Arbeitsbereich liegen, wird durch lineare Regression ein Y-Achsen-Schnittpunkt errechnet. Dabei handelt es sich um eine Schwelle für diesen Kanal, den t-NRI-Wert. Der t-NRI-Wert ist die Schwelle des Summenpotentials einer intracochleären Ableitung der elektrischen Antwort des Hörnervs auf die elektrische Stimulation in der Cochlea (Akin et al., 2006). Anhand dieser für jede der verwendeten Stimulationselektroden ermittelten t-NRI-Werte wurde nun die Einstellung des CI vorgenommen. Dabei wurde in Soundwave das M-Level, basierend auf dem t-NRI-Wert, eingestellt. In einigen Fällen war eine zusätzliche verhaltensbasierte Anpassung (Preyer-Reflex), mit Speech Burst, einer Einstellung in Soundwave, notwendig. Dabei wurden die intraoperativen NRI-Messungen aller Elektroden gemeinsam geregelt und auf Verhaltensreaktionen getestet. Die Schwelle für die Stimulation (T-Level) wurde automatisch auf 10 % des M-Levels festgelegt. Der IDR wurde auf 60 dB festgelegt (Abbildung 2-2). Für die Eingangsverstärkung sowie die Mikrofonempfindlichkeit wurde 0 dB eingestellt (Anleitung zu Soundwave, Advanced Bionics, LLC, Valencia, USA). Die M-Level und T-Level der nicht stimulierten weil außerhalb der Cochlea liegenden Elektroden wurden auf Null gesetzt um Änderungen an den Frequenzbändern (Frequenzbereich eines Kanals) der Kanäle zu verhindern die bei einer deaktivierung der Kanäle entstehen würden. Durch diese Einstellung war die Intensität der Stimulation ausreichend laut, so dass eine Reaktion am Hörnerv ausgelöst wurde. Intraoperativ wurden diese Messungen zur Überprüfung der richtigen Elektrodenlage in der Cochlea des Patienten ebenfalls durchgeführt.

Bei den vier Versuchsgruppen wurden unterschiedliche Stimulationsraten am CI eingestellt (siehe Abschnitt 2.3). Dabei wurden die Parameter Pulsdauer und Intensität nicht frei gewählt. Die Pulsdauer wird abhängig von der Stimulationsrate von Soundwave ausgewählt. Die Intensität wird in Soundwave anhand der zuvor bestimmten t-NRI-Werte festgelegt. Diese tNRI-basierte Einstellung wird häufig bei Kindern und selten bei unkooperativen Erwachsenen

verwendet (Basta et al., 2015). Die Lautstärke des Profils wurde teilweise verhaltensbasierend anhand des Preyer-Reflexes angepasst, da es nicht immer einen eindeutigen Zusammenhang zwischen den gemessenen Werten und dem M-Level gibt (Brown et al., 2000). Die intraoperativ messbare Stapediusreflexschwelle ist beim Menschen eine Alternative (Battmer et al., 1990). Beim Meerschweinchen wird das Mittelohr beschädigt und dadurch diese Messung unmöglich. An einer alternativen Operationstechnik für die Meerschweinchen wird zu diesem Zeitpunkt gearbeitet.

Die hier beschriebenen Einstellungen entsprechen denen, die bei der Anpassung von CI beim Menschen verwendet werden. Dadurch lassen sich die Ergebnisse dieser Untersuchung leichter vergleichen.

Die Versuchsgruppe LSR wurde mit 275 pps/ch und einer Pulsdauer von 227,2 μ s an 90 Versuchstagen einseitig elektrisch stimuliert. Dabei wurde eine Stimulationsintensität durchschnittlich 99,24 CU mit einem Standardfehler (SE, Standard Error) von $\pm 5,38$ verwendet. Die Versuchsgruppe MSR wurde mit 1513 pps/ch und einer Pulsdauer von 41,3 μ s bei durchschnittlich 189,64 (SE $\pm 16,48$) CU ebenfalls an 90 Versuchstagen einseitig elektrisch stimuliert. Die Versuchsgruppe HSR wurde mit 5156 pps/ch und einer Pulsdauer von 10,8 μ s bei durchschnittlich 147,38 (SE $\pm 9,38$) CU wie die anderen Versuchsgruppen an 90 Versuchstagen einseitig elektrisch stimuliert.

Die Kontrollgruppe wurde einer identischen Operation unterzogen und unter identischen Bedingungen für den gleichen Zeitraum gehalten, jedoch nicht einseitig elektrisch stimuliert.

Die CU Werte werden laut Advanced Bionics (persönliche Kommunikation) wie folgt berechnet: $CU = \text{Stromstärke} \times \text{Pulsdauer} \times \text{Faktor K} (0,0128447)$.

Tabelle 1: Verwendete Stimulationsparameter der drei Versuchsgruppen.

	LSR	MSR	HSR
Stimulationsrate	275 pps/ch	1513 pps/ch	5156 pps/ch
Stimulusintensität ($\pm$ SE)	99,24 CU ($\pm$ 5,38)	189,64 CU ($\pm$ 16,48)	147,38 CU ($\pm$ 9,38)
Pulsdauer	227,2 μ s	41,1 μ s	10,8 μ s
Stromstärke pro Puls	33,99 μ A	357,82 μ A	1062,55 μ A
Ladung pro Puls	7,72 nC	14,71 nC	11,48 nC

2.3 Elektrostimulation

Sechs Wochen nach der Implantation wurde der Soundprozessor Auria® (Advanced Bionics LLC, Valencia, USA) auf dem Rücken der Tiere befestigt. Dafür wurde ihnen der Bauch mit Verbandmaterial umwickelt und der Soundprozessor samt Batterie und Überträger mit Klebeband (Leukosilk® S, BSN medical GmbH, Hamburg, Germany) auf dem Verband (Peha-haft®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Germany) befestigt (siehe Abbildung 2-3). Der Überträger wurde dabei direkt über das CI geklebt und die Verbindung überprüft (Abbildung 1-5, Nr.6).

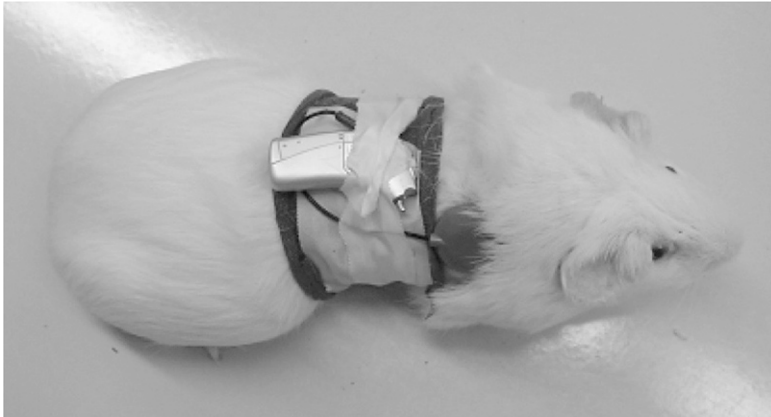


Abbildung 2-3: Meerschweinchen mit Soundprozessor und Überträger wie sie während der Beschallung getragen wurden.

Im Soundprozessor befindet sich ein Mikrofon, das die Umgebungsgeräusche einfängt. Der Prozessor verarbeitet die Geräusche und wandelt sie in elektrische Impulse für die 16 vorhandenen Stimulationselektroden um. Dabei wird jeder der 16 Elektroden ein anderer Frequenzbereich (siehe Abbildung 2-2) der am Mikrofon eingefangenen Geräusche zugewiesen (Elektrode 1 = 250-416 Hz, mittlere Frequenz 333 Hz; E2 = 416-494 Hz, mittlere Frequenz 455 Hz; E3 = 494-587 Hz, mittlere Frequenz 540 Hz; E4 = 587-697 Hz, mittlere Frequenz 642 Hz; E5 = 697-828 Hz, mittlere Frequenz 762 Hz). In diesem Versuch wurden ausschließlich die vier bis fünf in der Cochlea liegenden Elektroden elektrisch stimuliert. Bei den nicht zur Stimulation genutzten Elektroden wurde die Amplitude auf Null gesetzt. Die den einzelnen Elektroden vom Soundprozessor zugewiesenen Frequenzbereiche blieben ebenso wie die sonstigen Einstellungen unverändert.

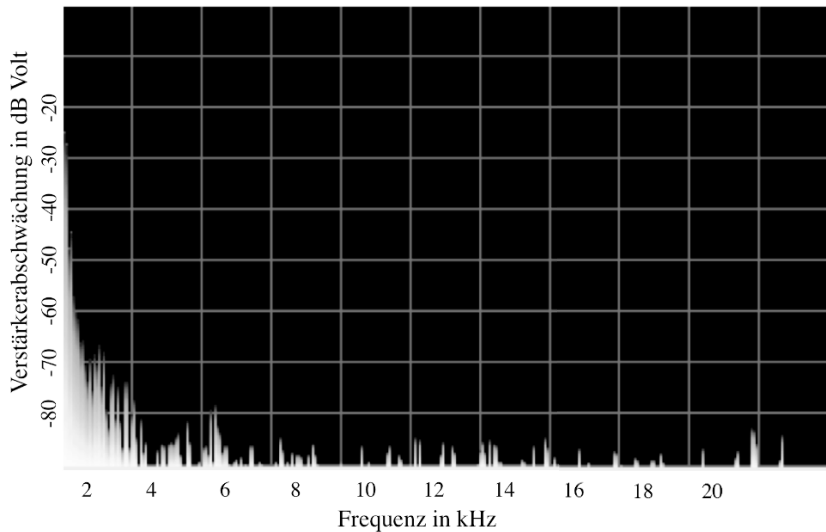


Abbildung 2-4: Spektrogramm des zur Beschallung verwendeten Hörspiels (Tolkien et al., 2003). Untersucht wurden die Frequenzen von 0 bis 20 kHz bei der bis zu 70 dB SPL lauten Wiedergabe. Die Beschallung beinhaltete zum großen Teil Frequenzen unter 2 kHz. Frequenzen dieses Bereiches wurden auch vom Cochlea-Implantat zur Stimulation der vier bis fünf implantierten Elektroden verwendet. Im Spektrum sind die vorhandenen Frequenzen in Hz gegen die Amplitude als Verstärkerabschwächung in dB Volt aufgetragen.

Die Versuchstiere wurden in vier Versuchsgruppen eingeteilt, welche alle unter denselben Bedingungen gehalten wurden. Dazu gehörte eine Beschallung an 90 Stimulationstagen mit einem Hörspiel (Tolkien et al., 2003) für jeweils 16 Stunden. Das Hörspiel enthält Geräusche, deren Hauptfrequenzen im Bereich der ersten vier Stimulationselektroden lagen. Das wurde anhand des Spektrogramms in Abbildung 2-4 dargestellt. Das Hörspiel wurde für die Erstellung des Spektrogramms wie unter den Bedingungen der Beschallung wiedergegeben und von einem am PC angeschlossenen Mikrofon aufgezeichnet. Untersucht wurde die Amplitude im Frequenzbereich von 0 bis 20 kHz (Lautstärke in der Abbildung als Verstärkerabschwächung in dB Volt angegeben). Dabei entspricht die dargestellte Lautstärke von -20 dB Abschwächung der maximal verwendeten Lautstärke von 70 dB SPL. Die Software nutzt eine Fast Fourier Transformation, um dieses Spektrogramm zu erstellen. Dabei wird die Zeit bzw. die Häufigkeit berücksichtigt, mit der Frequenzen unterschiedlicher Amplituden wiedergegeben werden.

2.4 Radiologische Untersuchung der Cochlea

Stichprobenweise wurden Cochleae der Versuchstiere in einem Micro-Computer-Tomograph (Micro-CT; VivaCT 40, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) des FEM des Virchow Klinikum der Charité Berlin untersucht, um die Lage der CI-Elektroden innerhalb der Cochlea zu bestimmen. Von denselben Cochleae wurden mit dem Micro-CT Röntgenbilder angefertigt, die ebenfalls der Verifizierung der CI-Elektrodenlage dienen.

Die Cochleae wurden in einem mit 4% Paraformaldehydlösung (PFA) gefüllten 15 ml Falcon-Tube fixiert und anschließend über Nacht vom Micro-CT gescannt. Dabei wurde die maximale Auflösung des Micro-CT von 10,5 μm verwendet. Aus den über 2000 CT-Bildern (2048 x 2048 Pixel) einer Cochlea wurden mit dem Softwareplugin ImageJ 3D Viewer (Virtual Insect Brain Project, Universität Würzburg, Deutschland) für das Programm ImageJ64 (Version 1.44, National Institutes of Health, USA) 3D-Modelle der Cochleae erzeugt. Damit konnte über eine Dichtedarstellung der Knochen die Position der Elektroden in Falschfarben dargestellt werden.

2.5 Extrazelluläre Messungen der ereigniskorrelierten Aktivitätsänderung im auditorischen Cortex

Als Teil eines Versuchs, der nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit ist, wurden In-Vivo-Ableitungen am AC von Meerschweinchen durchgeführt. Deren Ziel war es, sowohl akusti-

sche, als auch elektrisch ausgelöste Hörschwellen zu bestimmen und die topografische Verteilung der besten Frequenzen zu untersuchen.

Die Versuchstiere wurden narkotisiert, wie in Kapitel 2.2 beschrieben (jedoch mit halber Dosis) und anschließend auf eine Wärmematte gelegt. Fixiert in einer Stereotaxis (Lab Standard Stereotaxis Rat, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) wurde unter ständiger Kontrolle der Körpertemperatur die Stelle des Schädels markiert, unter der sich der AC befindet. Die Position wurde anhand der bereits bekannten Anatomie des Versuchstiers (Wysocki, 2005) ausgewählt. Sie entspricht der in der Histologie der vorliegenden Arbeit als AC verwendeten Cortex-Region. Eine Kraniotomie wurde durchgeführt. Die Ränder eines Fensters im Schädelsknochen wurden mit einem Bohrer freigelegt ohne die Dura Mater zu beschädigen und der Knochen in einem Stück entfernt. Die Dura-Mater wurde mit einer Kanüle angeritzt und im Bereich des Fensters entfernt. Die Fläche wurde möglichst gering gehalten, um die Bewegung des Gehirns (Pinault, 2005), die bei jeder arteriellen und venösen Druckänderung sowie bei jedem Respirationszyklus auftritt, zu minimieren. Mit Hilfe der Sterotaxis und eines Mikromanipulators (MHM-4, Narishige International, Tokyo, Japan) wurden die acht Ableitelektroden (4x2 Elektroden mit 115 µm Abstand) einer Wolfram-Matrix-Multielektrode (FHC Inc., Bowdoin USA) in das Gehirn eingeführt.

Die extrazellulär abgeleiteten Potentiale waren Aktionspotentiale von Einzelzellen. Die Antworten der Einzelzellen auf akustische Signale (breitbandiges Rauschen bzw. Knacken) wurden mit einem 8-Kanal-Vorverstärker (MPA8I, Multichannel Systems) und einem 16-Kanal-Verstärker (USB-ME16-FAI-System, Multichannel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany), der zur Datenaufnahme an einen PC angeschlossen war, verstärkt. Die Software MC_Rack (Multichannel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Germany) diente der Filterung, Aufnahme und anschließenden Bearbeitung der Daten. Zur Reduzierung von Störungen wurden diese Versuche in einem Faraday'schen Käfig durchgeführt.

In einem weiteren Versuchsteil wurde nach der akustischen Stimulation, die auch zur Bestätigung der Elektrodenplatzierung im AC verwendet wurde, eine CI-Elektrode (1j Electrode Array, Advanced Bionics LLC, Valencia, USA) in eine Cochlea des Versuchstieres implantiert. An das Elektrodenarray wurde ein speziell für diesen Zweck umfunktioniertes CI (Advanced Bionics LCC, Valencia, USA) angeschlossen, mit dem sich manuell jede Elektrode einzeln als Stimulations- bzw. Referenzelektrode verwenden lässt. Anschließend wurden die unterschiedlichen Stimulationselektroden des CI stimuliert und die Antwort des AC mit Hilfe der Acht-Kanal-Multielektrode am PC aufgezeichnet. Stimuliert wurde mit unterschiedlichen Spannun-

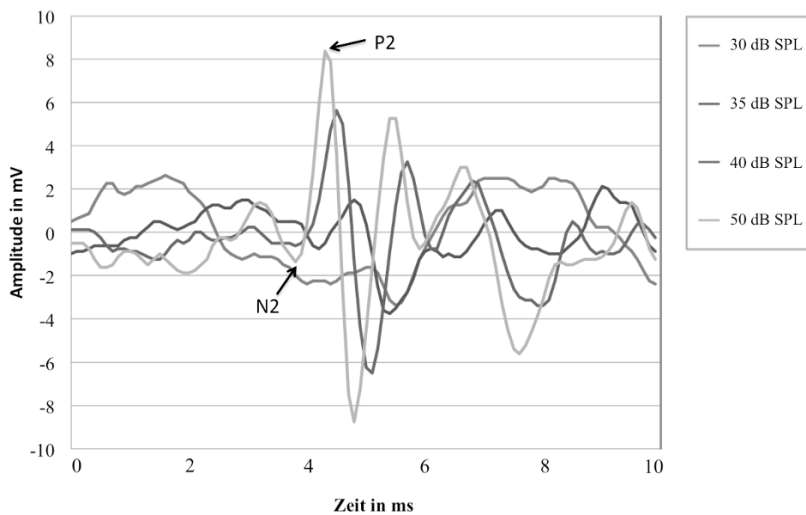
gen von 50 bis 750 μV bei einer Stimulusdauer von 20 ms. Die Software MC_Rack wurde dabei genutzt, um mit Hoch- und Tiefpassfiltern Störungen in den Rohdaten zu minimieren und Antworten aufzuzeichnen, die eine festgesetzte Schwelle überschreiten. Dafür wurden folgende Filter verwendet: Butterworth 2nd Order, Hochpassfilter (300 Hz), Tiefpassfilter (4000 Hz) sowie ein Bandstop Resonator ($F=50\text{ Hz}$; $Q=1,0$).

Nach Beendigung des Versuchs wurde das Gehirn entnommen, die Position der Einstichstelle im Gehirnschnitt ermittelt und fotografiert.

2.6 Hirnstammaudiometrie

Die Messung der Hörschwelle und die Berechnung der Hörschwellenverschiebung der jeweiligen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe der Hirnstammaudiometrie (ABR, Auditory Brainstem Response) in einer schallisolierten Kammer durchgeführt. Die Kammer (80 x 80 x 80 cm Innenmaß) wurde aus verschraubten Pressspanplatten gefertigt und innen mit Akustikmatten zur Schallisolation ausgekleidet. Die betäubten Tiere wurden auf eine beheizte Styroporplatte gelegt (Thermolux CM 15W, Acculux, Murrhardt, Germany), um ein Auskühlen zu verhindern. Die Körpertemperatur wurde bei 37°C gehalten, auch um die Wirkung des Anästhetikums nicht zu beeinflussen (Barrows, 1942). Nach Anästhesie mit einer intramuskulären Ketamin/Rompun-Injektion (Ketamin: 100 mg/Kg Körpergewicht; Ketanest. Pfizer Deutschland GmbH, Berlin; Rompun: 8 mg/Kg Körpergewicht, Bayer Health Care AG, Leverkusen, Germany) wurden subdermale Nadelelektroden am Vertex (Messelektrode), dem Mastoidknochen (Referenzelektrode) und am Fuß (Erdungselektrode) angebracht. Ein Sinusgenerator (Modell SSU2, Werk für Fernmeldewesen, Berlin, Germany) wurde zur Generierung kurzer Tonimpulse der zehn untersuchten Frequenzen (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 kHz), mit einer Länge von 200 ms und einer Pulsfrequenz von 2,5 Hz eingesetzt. Zur Erhöhung der Genauigkeit der generierten Frequenz wurde er mit einem Impulszähler verbunden (Fluke 1941A Digital Counter, Scarborough, Ontario, Canada). Das intraoperative Messsystem Viking IV® (Viasys Healthcare, Conshohocken, Pennsylvania, USA) wurde zur Aufzeichnung der reizkorrelierten Hirnstammantworten eingesetzt. Dabei wurden ausschließlich die ersten zehn Millisekunden nach Reizpräsentation aufgenommen, da die relevanten neuronalen Antworten in diesem Zeitfenster auftreten. Die Signale wurden 100.000fach verstärkt, gefiltert (Bandpassfilter 0,15-3 kHz) und über 300 Wiederholungen gemittelt. Für jede der zehn untersuchten Frequenzen wurden vier bis fünf Messungen mit unterschiedlichen Schalldruckpegeln durchgeführt, die der Verstärker als relative Einheit (Abschwächung in dBV vom Maximum) anzeigte. Die verwendeten Schalldruckpegel lösten alle eine intensitätsabhängige (d.h. die Ant-

wortamplitude nimmt bei steigender Lautstärke zu) und reproduzierbare Antwort aus. Diese Antworten konnten dem linearen Arbeitsbereich der beteiligten auditorischen Strukturen zugeordnet werden, der sich als evoziertes Summenpotential mit bis zu fünf aufeinander folgenden Einzelwellen darstellt. Diese fünf Wellen wurden den folgenden Strukturen zugeordnet: I. distaler Bereich des Hörnervs, II. proximaler Bereich des Hörnervs, III. *Nucleus Cochlearis*, IV. superiorer Olivenkomplex, V. Eingang des lateralen Lemniscus in den IC (Møller, 2006). Bei dieser Methode handelt es sich um die Standardmethode zur frequenzspezifischen Ermittlung eines Hörverlusts durch die Ermittlung der Hörschwelle und den Vergleich mit einer Kontrollgruppe. Die Amplitude der Welle II wurde für alle gemessenen Lautstärken ermittelt (Amplitude von N2 bis P2 siehe Abbildung 2-5). So konnte eine Amplituden-Wachstumsfunktion für die zehn untersuchten Frequenzen berechnet werden (siehe Abbildung 2-6). Der lineare Abschnitt der Amplituden-Wachstumsfunktion wurde ermittelt und eine lineare Regression für diesen Abschnitt durchgeführt. Der Schnittpunkt der Regressionsgraden mit der Y-Achse ergab die Hörschwelle für die jeweilige untersuchte Frequenz bei dem untersuchten



Tier.

Abbildung 2-5: Bestimmung der Hörschwelle mit den N2-P2 Werten der Messungen bei fünf Lautstärken. Die errechnete Hörschwelle liegt hier bei 23 dB SPL.

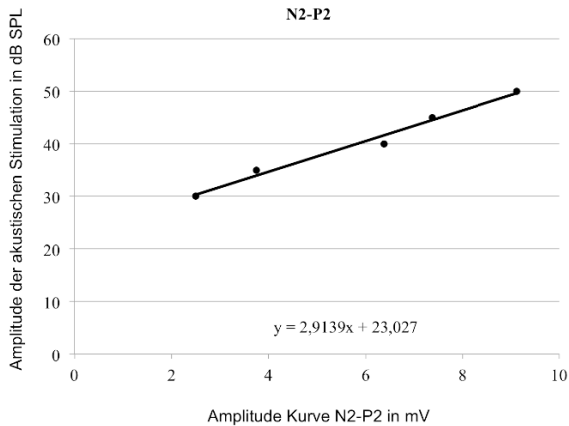


Abbildung 2-6: Hirnstammaudiometrie (ABR) bei vier unterschiedlichen Lautstärken, von 30 bis 50 dB SPL.

Zwei unterschiedliche Untersuchungen wurden mit dieser Methode durchgeführt. In der ersten wurden ABR-Messungen an sechs Meerschweinchen vor sowie sechs Wochen nach der einseitigen Implantation eines CI durchgeführt, um den Einfluss der Implantation auf die Hörschwelle zu untersuchen. Im zweiten Versuch wurde an Tieren der drei Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe eine ABR-Messung nach 90 Tagen einseitiger Elektrostimulation (bzw. einseitiger Taubheit bei der Kontrollgruppe) durchgeführt. Dabei wurden fünf Tiere der Versuchsgruppe LSR, sechs Tiere der Versuchsgruppe MSR, vier Tiere der Versuchsgruppe HSR sowie sieben Tiere der Kontrollgruppe untersucht.

2.7 Histologie

2.7.1 Präparation und Histologie der zentralen Hörbahn

Die Tiere erhielten vor der Perfusionsfixierung eine Narkose, die der dreifachen Operations-Dosis entsprach (siehe Abschnitt 2.2), um ein Aufwachen zu verhindern. Ein Reflextest (Kneifen in den Fuß) wurde zur Überprüfung der Wirksamkeit der Narkose durchgeführt. Nach Aussetzen der Atmung wurden die Tiere mit Klebeband an Vorder- und Hinterbeinen in einer Kunststoffwanne fixiert. Mit einer Schere wurden Haut und Bindegewebe, am Rande des Brustbeins beginnend, zu beiden Seiten geöffnet. Das Zwerchfell wurde durchtrennt, wodurch

die Lunge kollabierte. Die Rippenbögen und das darunterliegende Gewebe wurden an beiden Seiten des Brustkorbes durchschnitten. Der Brustkorb wurde nun entfernt und das Herz freigelegt. Der Herzbeutel wurde mit einer Mikroschere geöffnet und anschließend entfernt. Die Perfusion erfolgte durch Einbringen einer Perfusionskanüle in die linke Herzkammer. Dabei wurde die Kanüle vom kaudalen Ende her eingeführt und fixiert. Den Tieren wurde zuerst mit NaCl 0,9 % durch eine Überdruckpumpe (20 ml/min, Pumpendruck 0,1 bar) das Blut aus dem Kreislauf gespült, bis die Leber hell und die austretende Flüssigkeit klar wurden. Anschließend wurde der Kreislauf mit 4% PFA in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS 0,2 M, Phosphate Buffered Saline) zur Fixierung weitere 5-10 Minuten perfundiert. Eine eintretende Starre der Extremitäten zeigte eine gleichmäßige Fixierung. Die Tiere wurden dekapitiert und der Schädel eröffnet. Das Gehirn wurde entnommen, in die beiden Hemisphären geteilt und mindestens 24 Stunden in PFA 4% bei 7°C gelagert.

Die Gehirne wurden mit dem Einbettautomaten (Leica EG 1160 Histoembedder, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) in Paraffin eingebettet und 10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Dafür wurden unterschiedliche Mikrotome verwendet: Die Gewebeschnitte der Versuchsgruppe HSR sowie der Kontrollgruppe wurden auf einem Schlittenmikrotom (Sartorius-Werke AG, Göttingen, Deutschland) angefertigt. Die Gehirne der Versuchsgruppe MSR wurden mit einem Mikrotom der Firma Euromex, (präzisions Minot Rotationsmikrotom MT.5505, Euromex Microscopen BV, Arnhem, Niederlande), die Gehirne der Versuchsgruppe LSR mit einem Rotationsmikrotom der Firma Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) geschnitten. Das geschnittene Gewebe wurde in langen Bahnen auf ein Wasserbad mit Raumtemperatur gelegt. Jeder zweite Gewebeschnitt wurde aus den langen Bahnen herausgetrennt, mit sechs bis acht anderen auf einen Objektträger aufgezogen, einige Sekunden auf ein 45-48°C warmes Wasserbad gelegt, damit sich das Gewebe ausdehnen konnte und anschließend getrocknet. Die anderen Gewebeschnitte wurden nicht verworfen, sondern ebenfalls auf Objektträger aufgezogen. Das so konservierte geschnittene Gewebe wird für weitere Experimente aufbewahrt. Nach dem Trocknen der Gewebeschnitte über Nacht erfolgte eine Hämalaun-Eosin-Färbung.

2.7.2 Hämalaun Eosin Färbung

Die Färbung der Gehirnschnitte wurden nach folgendem Verfahren durchgeführt. Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert (Schritte 1+2) und gewässert (Schritte 3-5), bevor man sie mit einer Hämalaun Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) färbte (Schritt 6). Die Schnitte wur-

den gespült (Schritte 7+8), mit 0,1% Eosin-Lösung ein zweites Mal gefärbt (Schritt 9) und anschließend in Aqua dest. und 70% Ethanol unter visueller Kontrolle differenziert (Schritte 10+11). Es folgte die Entwässerung (Schritte 11-13) und die anschließende Tränkung mit Roti-Histol, (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) (Schritte 14-15), bevor sie mit einem Tropfen Roti-Histo-Kitt (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) unter einem Deckglas eingedeckelt wurden. Hämalan färbt die Zellkerne blau. Eosin wird zur Gegenfärbung verwendet und färbt Zytoplasma, Bindegewebe und ebenfalls den Zellkern rot. Dadurch entsteht schließlich die typische rötlich-violette Färbung.

Die einzelnen Schritte sind im folgenden aufgelistet:

1. Roti-Histol	10 Minuten
2. Roti-Histol	10 Minuten
3. Ethanol 90%	5 Minuten
4. Ethanol 70%	5 Minuten
5. Aqua dest.	5 Minuten
6. Hämalan-Lösung (sauer, nach Mayer)	4 Minuten
7. Aqua dest.	1 Minute
8. Spülen in fließendem Leitungswasser	10 Minuten
9. Eosin 0,1%	3 Minuten
10. Aqua dest.	20 Sekunden
11. Ethanol 70% (Differenzierung)	1-3 Minuten unter visueller Kontrolle
12. Ethanol 90%	1 Minute
13. Ethanol abs.	1 Minute
14. Roti-Histol	1 Minute
15. Roti-Histol	1 Minute oder länger

2.7.3 Fotografie der Gewebeschnitte

Die gefärbten Gewebeschnitte wurden zur Trocknung des Roti-Histo-Kitts mindestens 24 Stunden gelagert. Anschließend wurden Fotos des Modiolus und der zu untersuchenden Kerngebiete CN, IC, MGB und AC angefertigt.

An einem Mikroskop (Carl Zeiss Axiovert 25 C) wurde eine digitale Kamera montiert. Für die Fotos der Gehirnschnitte der Versuchsgruppen HSR und der Kontrollgruppe verwendete man eine Nikon E5000 (Nikon Corp., Tokio, Japan). Für die Versuchsgruppe LSR wurden jedoch unterschiedliche Kameras eingesetzt: Canon Eos 10D (Canon Inc., Tokio, Japan) für MGB und IC, Nikon D90 für den CN und eine Canon Eos 1000D für AC und *Cerebellum* (CB). Für alle Kerngebiete der Versuchsgruppe MSR wurde eine Canon Eos 1000D eingesetzt. In den zu Testzwecken ausgewerteten Bereichen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Kameras festgestellt. Alle Fotos wurden mit denselben Einstellungen aufgenommen (Belichtungszeit 1/20 s, ISO 200, Blendeneinstellung am Mikroskop) und als Datei (JPEG, Joint Photographic Expert Group) gespeichert. Anschließend wurden die farbigen Fotos mit Adobe Photoshop CS 3 (Adobe Systems, San Jose, USA) in Graustufen umgewandelt und eine Routine zur Kontrastkorrektur durchgeführt.

2.7.4 Bestimmung der Zelldichte der Gehirnschnitte

Zur Bestimmung der Zelldichten wurden genau definierte Ausschnitte aus den erstellten Fotos der untersuchten Kerngebiete ausgeschnitten. Es wurden lediglich die Ausschnitte ausgewertet, die komplett in den Kerngebieten oder den Schichten der Kerngebiete lagen.

Für die Bestimmung der Zelldichten wurde der DCN in neun Bereiche (siehe Abbildung 2-7) eingeteilt: Die drei äußeren eindeutig voneinander getrennten Zellschichten (Kandel, 2013; Manis et al., 1994; Ryugo und Willard, 1985) mit unterschiedlichen Eigenschaften wurden wiederum, begründet in der tonotopen Struktur des DCN, in je drei Frequenzbereiche aufgeteilt (Kraus et al., 2011). Betrachtet werden demnach HF (hoher Frequenzbereich), MF (mittlerer Frequenzbereich) und TF (tiefer Frequenzbereich) der drei Zellschichten. Dabei liegt der HF dorsal und der TF ventral im DCN (Muniak und Ryugo, 2014; Ryugo und May, 1993; Ryugo und Parks, 2003). Für die Schichten 1 und 2 des DCN wurde eine Ausschnittgröße von 0,39 x 0,08 mm verwendet, für Schicht 3 eine von 0,39 x 0,26 mm.

Die Ausschnitte des IC hatten eine Größe von 0,52 x 0,52 mm (siehe Abbildung 2-8) und die des MGB eine Größe von 0,52 x 0,26 mm (siehe Abbildung 2-9). Im AC wurden Ausschnitte

einer Größe von 0,65 x 0,1 mm von allen sechs Schichten des AC angefertigt (siehe Abbildung 2-10). Ein nicht auditorischer Bereich (Ausschnittgröße 0,65 x 0,1 mm) in der Molekularschicht des *Cerebellums* (siehe Abbildung 2-11) wurde neben den auditorischen Gebieten ausgewertet und als Referenzgebiet betrachtet.

Die Ausschnitte wurden mit der maximalen Auflösung von 1200 dpi (dots per inch, Punkte pro Quadratzoll) auf schwarzweiß Laserdruckern (HP Laserjet 1200 und HP Laserjet 2055; Hewlett Packard Company, Palo Alto, USA) ausgedruckt. Für die unterschiedlichen Kerngebiete im Gehirn wurden für die Auszählung unterschiedliche Vergrößerungen verwendet (CN 500x, IC und MGB 250x, CB und AC 200x)

Die in den Ausschnitten vorhandenen Zellen wurden per Hand gezählt. Eine Normalisierung der Zelldichten aller Gehirnschnitte des jeweiligen Tieres auf die Molekularschicht des *Cerebellums* (desselben Tieres, soweit möglich) wurde anschließend durchgeführt, um methodisch bedingte Unterschiede bei den Fixier- oder Einbettvorgängen der Gehirne der unterschiedlichen Tiere auszugleichen. Mit der nun ermittelten und normalisierten Zellanzahl pro Ausschnitt und der bekannten Ausschnittgröße konnte die Zelldichte pro mm² ermittelt werden.

Beispiel: In einem Ausschnitt des IC wurden 200 Zellen gezählt. Für die Normalisierung wurde die Molekularschicht des *Cerebellum* verwendet (bei diesem Tier im Mittel 90 Zellen pro Ausschnitt). Anschließend erfolgte die Berechnung der normalisierten Zelldichte pro mm².

Zellen pro IC Ausschnitt normalisiert auf die Molekularschicht des CB:

$$= (200 \cdot 100) / 90 = 222,22 \text{ Zellen pro IC Ausschnitt nach der Normalisierung.}$$

Berechnung der Zelldichte pro mm²:

$$\text{Fläche Ausschnitt IC} = 0,52 \text{ mm} \times 0,52 \text{ mm} = 0,2704 \text{ mm}^2$$

$$\text{Zelldichte pro mm}^2 = 222,22 / 0,2704 = 821,8 \text{ Zellen pro mm}^2$$

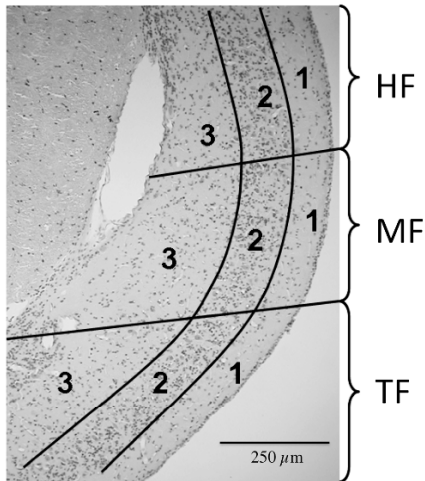


Abbildung 2-7: Grenzen der drei Schichten des DCN sowie die drei unterschiedlichen Frequenzbereiche HF (hoher Frequenzbereich), MF (mittlerer Frequenzbereich) und TF (tiefer Frequenzbereich). Innerhalb dieser Grenzen wurden die Ausschnitte zur Bestimmung der Zelldichte angefertigt.

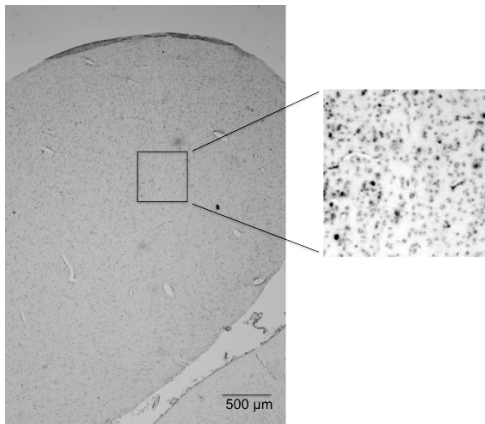


Abbildung 2-8: IC mit maßstabsgetreuem Ausschnitt (0,52 x 0,52 mm) und Ausschnittvergrößerung. Der Ausschnitt wurde anschließend zur Zelldichtebestimmung verwendet.

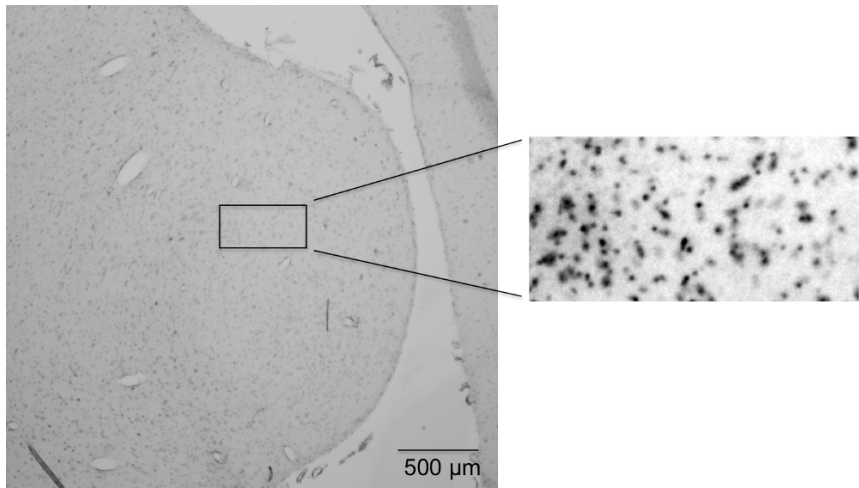


Abbildung 2-9: MGB mit maßstabsgetreuem Ausschnitt (0,52 x 0,26 mm) und Ausschnittvergrößerung. Der Ausschnitt wurde für die Bestimmung der Zelldichte verwendet.

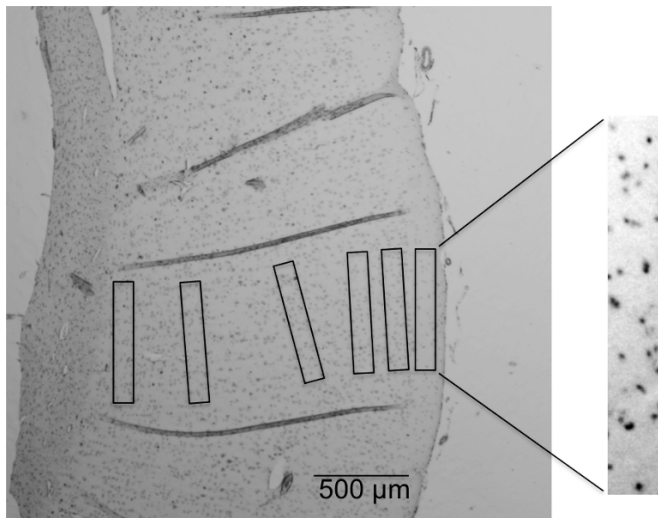


Abbildung 2-10: AC je ein Ausschnitt (0,65x0,1 mm) in den sechs Schichten. Der Ausschnitt aus Schicht 1 ist vergrößert dargestellt. Die sechs Ausschnitte wurden für die Bestimmung der Zelldichten verwendet.

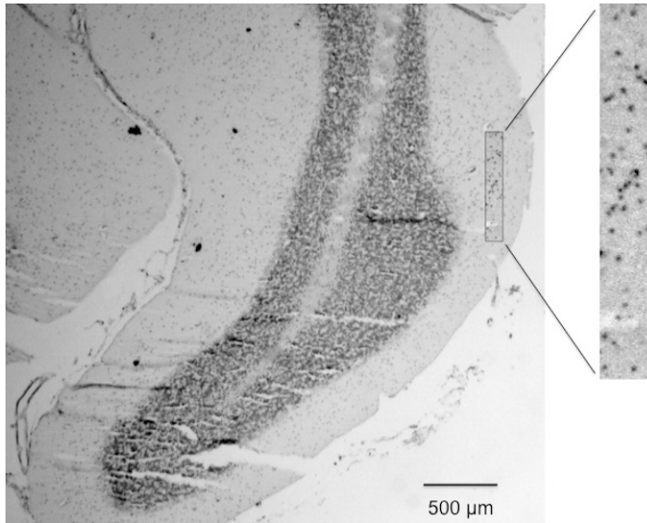


Abbildung 2-11: *Cerebellum* mit 0,65x0,1 mm großem Ausschnitt in der Molekularschicht. Dieser Ausschnitt wurde für die Zelldichtebestimmung im *Cerebellum* verwendet.

2.8 Statistik

2.8.1 Statistik ABR

Die statistische Auswertung der ABR-Messungen vor und direkt nach der CI-Implantation erfolgte mit dem Programm IBM Statistics 20.0 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA). Die Auswertung der ABR-Messungen nach 90 Tagen Elektrostimulation erfolgte mit SPSS Version 10.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Zuerst wurden die vorliegenden Daten auf Normalverteilung untersucht. Dafür wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet. Alle Versuchsgruppen wurden sowohl einzeln als auch Paarweise mit der Kontrollgruppe untersucht. Normalverteilte Daten ($p > 0,05$) wurden mit einem T-Test verglichen, nicht normalverteilte Daten mit einem Mann-Whitney U-Test. Verglichen wurden die Daten der Kontrollgruppe mit jeder der drei Versuchsgruppen. Entsprechend wurde das Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Alpha-Korrektur für Mehrfachvergleiche angepasst, wodurch sich für die Annahme der Nullhypothese ein p-Wert von $> 0,0167$ ergab. Ein Unterschied wird daher ab einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,0167$ als signifikant (*), ab $p \leq 0,0033$ als hochsignifikant (**) und ab $p \leq 0,00033$ als hochsignifikant (***) angenommen.

2.8.2 Statistik der histologischen Auswertung

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm IBM Statistics 20.0 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA) genutzt. Die Ergebnisse der Tiere einer Versuchsgruppe wurden einzeln sowie als gesamte Versuchsgruppe mit einem Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung getestet. Bei normalverteilten Daten ($p > 0,05$) wurde der T-Test angewandt, bei nicht normalverteilten der Mann-Whitney-U-Test. Verglichen wurden die Daten der Kontrollgruppe mit jeder der drei Versuchsgruppen. Entsprechend wurde das Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Alpha-Korrektur für Mehrfachvergleiche angepasst, wodurch sich für die Annahme der Nullhypothese ein p-Wert von $> 0,0167$ ergab. Die Statistiken der Histologie wurden stets mit den normierten Originaldaten, nicht mit den (auf eine Standardfläche, z.B. 1 mm^2) hochgerechneten Daten durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung handelt es sich um einen Dreifachvergleich. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,0167$ als signifikant (*), $p \leq 0,0033$ als hochsignifikant (**) und $p \leq 0,00033$ als hochsignifikant (***) angenommen.

Der in den Abbildungen dargestellte Standardfehler wurde aus den beiden Standardfehlern SE1 und SE2 der zu vergleichenden Versuchsgruppen wie folgt errechnet:

$$SE = \sqrt{(SE1)^2 + (SE2)^2}.$$

Eine Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of Variance) wurde durchgeführt, um die Zusammengehörigkeit der einzelnen Versuchstiere einer Versuchsgruppe zu untersuchen. Es musste anhand der Ergebnisse kein Tier aus einer Versuchsgruppe herausgenommen werden.

2.9 Durchführung der Versuche

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden nicht ausschließlich von mir durchgeführt. Die Beteiligung von mir sowie von weiteren Personen an den einzelnen Versuchen wird in diesem Abschnitt besprochen.

Die CI-Implantationen wurden von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe eines Veterinärmediziners entwickelt abwechselnd von zwei Personen durchgeführt. Ich habe keine CI-Implantation selbstständig durchgeführt, jedoch bei vielen Operationen assistiert.

Die CI-Anpassung wurde von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Ich habe assistiert, jedoch keine Anpassung selbstständig vorgenommen.

Die radiologischen Untersuchungen wurden am FEM des Virchow Klinikum der Charité Berlin durchgeführt und in meiner Gegenwart, sowie in Absprache mit mir, ausgewertet.

Die ABR-Messungen wurde wie die CI-Implantationen von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe etabliert und durchgeführt. Ich habe bei vielen der Messungen assistiert, jedoch keine selbstständig durchgeführt. Die Auswertungen wurden zum Teil von mir und zum Teil von weiteren Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, wobei oberste Priorität auf einer vergleichbaren Durchführung und einer maximalen Qualität lag.

Die extrazellulären Messungen der ereigniskorrelierten Aktivitätsänderung im auditorischen Cortex wurden von verschiedenen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe etabliert und durchgeführt. Ich habe bei allen Messungen assistiert und die Auswertungen selbstständig durchgeführt.

Die histologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Mitarbeiterinnen des Instituts für Pathologie des Unfallkrankenhauses Berlin von verschiedenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe etabliert. Die Anfertigung der Paraffinschnitte, die Färbung und das anschließende bestimmen der Zelldichten wurde gemeinsam von mehreren Personen durchgeführt. Dabei wurden Stichproben verglichen um eine gleichbleibende Qualität gewährleisten zu können.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Tierexperimente wurden durch Tier-schutzbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin: G0280/04; G0392/08; G0417/10) genehmigt.

Chronische intracochleäre Elektrostimulation und ihr
Einfluss auf das auditorische System

Jansen, S.

2017, XV, 116 S. 27 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-18140-6