

Universität Essen

**Untersuchungen zur Rolle von reaktiven  
Sauerstoffspezies bei der Schädigung der Haarzellen des  
Innenohres durch das Aminoglykosid-Antibiotikum  
Gentamicin und das Zytostatikum Cisplatin**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Chemie  
der Universität Essen

vorgelegt von  
Nathalie Dehne  
aus Oldenburg  
2002

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Dr. H. de Groot

**Tag der mündlichen Prüfung:** 14.02.2002

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 1997 bis Dezember 2001 an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und dem Institut für Physiologische Chemie durchgeführt. Mein Dank gilt vor allem

Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot,

Direktor des Instituts für Physiologische Chemie am Universitätsklinikum Essen, für die wertvollen Ratschläge und die mir gewährte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. Sustmann

vom Institut für Organische Chemie der Universität Essen danke ich für die Diskussionsbeiträge und für die Übernahme des Referates.

Des weiteren danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. J. Lautermann von der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Essen für die interessante Themenstellung und die gute Zusammenarbeit.

Frau Priv. Doz. Dr. U. Rauen vom Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen möchte ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen und Ideen danken.

Außerdem möchte ich Frau G. Hessler, ehemalige Mitarbeiterin der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik, sowie Frau P. Altenhoff von der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik für die Unterstützung bei praktischen Problemen und Frau C. Wacker von der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik für die Hilfe bei Problemen mit fotografischer oder digitaler Darstellung danken, sowie Herrn Dr. W.-J. F. ten Cate und Herrn Dr. J. Schacht für die Hilfe bei der Etablierung des Modells.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie danke ich für die Kollegialität und das gute Arbeitsklima, insbesondere möchte ich hierbei Frau I. Lehnen-Beyel und Frau U. Kerkweg erwähnen.

Herrn Dr. F. Petrat danke ich für die fruchtbare Kooperation zur Bestimmung des zellulären chelatisierbaren Eisens mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Mein Dank gilt ebenfalls meinem Freund Mischa Visic, der während der vier Jahre immer für mich da war und meiner Mutter Karin und meinem Vater Thorolf Dehne, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben und meiner Schwester Nicole Dehne, die mir, wie alle anderen auch, Mut gemacht hat diese Arbeit durchzuführen.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG La 876/3-2 von Herrn Priv. Doz. Dr. J. Lautermann und DFG Ja 205 9-1 von Herrn Prof. Dr. K. Jahnke)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1.	Aufbau und Funktion des Innenohres	3
1.2.	Reaktive Sauerstoffspezies und Erkrankungen des Innenohres	6
1.3.	Cisplatin	11
1.4.	Gentamicin	13
<b>2.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>17</b>
3.1.	Die Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Zellen des Innenohres	17
3.1.1.	Vitalitätstests mit 200 $\mu$ M Wasserstoffperoxid	17
3.1.2.	Vitalitätstests mit 50 $\mu$ M Wasserstoffperoxid	21
3.1.3.	Morphologische Veränderungen durch Wasserstoffperoxid	22
3.2.	Die Schädigung des Innenohres durch Cisplatin	24
3.2.1.	Vitalitätstests	24
3.2.2.	Morphologische Veränderungen durch Cisplatin	26
3.2.3.	Messung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools	26
3.2.4.	Bestimmung der Superoxidradikal-Anionen-Bildung in Anwesenheit von Cisplatin	31
3.3.	Die Schädigung des Innenohres durch Gentamicin	32
3.3.1.	Vitalitätstests	33
3.3.2.	Veränderungen des zellulären chelatisierbaren Eisenpools durch Gentamicin	34
3.3.3.	Bestimmung der Superoxidradikal-Anionen-Bildung in Anwesenheit von Gentamicin	35
3.3.4.	Morphologische Veränderungen durch Gentamicin	36
3.3.5.	Der mitochondriale Permeabilitätsübergang (MPT)	37
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1.	Das <i>in vitro</i> -Modell des neurosensorischen Epithels	40
4.2.	Der Mechanismus der Zellschädigung durch Wasserstoffperoxid	41
4.2.1.	Morphologische Veränderungen während der Inkubation mit Wasserstoffperoxid	41
4.2.2.	Mediatoren der Wasserstoffperoxidtoxizität	42
4.3.	Cisplatin	44
4.3.1.	Bedeutung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools für die Schädigung durch Cisplatin	44
4.3.2.	Die Rolle von Superoxidradikal-Anionen bei der Cisplatintoxizität	47
4.3.3.	Die Rolle von Kalzium bei der Schädigung durch Cisplatin	47
4.3.4.	Morphologische Veränderungen während der Cisplatininkubation	48
4.4.	Gentamicin	48
4.4.1.	Morphologische Veränderungen während der Schädigung durch Gentamicin	48

4.4.2.	Die Rolle des zellulären chelatisierbaren Eisenpools bei der Gentamicintoxizität	49
4.4.3.	Die Rolle von Kalzium bei der Gentamicintoxizität	51
4.4.4.	Die Rolle der Superoxidradikal-Anionen bei der Gentamicintoxizität	51
4.4.5.	Bedeutung von Mitochondrien für die Gentamicintoxizität	52
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>56</b>
6.1.	Material	56
6.1.1.	Versuchstiere	56
6.1.2.	Chemikalien	56
6.1.3.	Sonstige Materialien	57
6.2.	Präparation des neurosensorischen Epithels	58
6.3.	Vitalitätstests	59
6.3.1.	Vitalitätstests zur Untersuchung der Wasserstoffperoxidtoxizität	61
6.3.2.	Vitalitätstests zur Untersuchung der Cisplatintoxizität	61
6.3.3.	Vitalitätstests zur Untersuchung der Gentamicintoxizität	62
6.4.	Fluoreszenzmikroskopische Messungen	62
6.4.1.	Bestimmung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools mit Phen Green SK	63
6.4.2.	Untersuchungen zur Kernmorphologie mit SYTO Green und Propidiumjodid	65
6.4.3.	Nachweis eines mitochondrialen Permeabilitätsübergangs mittels Umverteilung von Fluoreszenzfarbstoffen	65
6.5.	Sonstige Messmethoden	67
6.5.1.	Nachweis des Superoxidradikal-Anions durch Reduktion von Nitrotetrazoliumblausäurechlorid	67
6.6.	Statistik	68
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>80</b>
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	80
8.2.	Literaturliste eigener Veröffentlichungen	81

# 1. Einleitung

## 1.1. Aufbau und Funktion des Innenohres

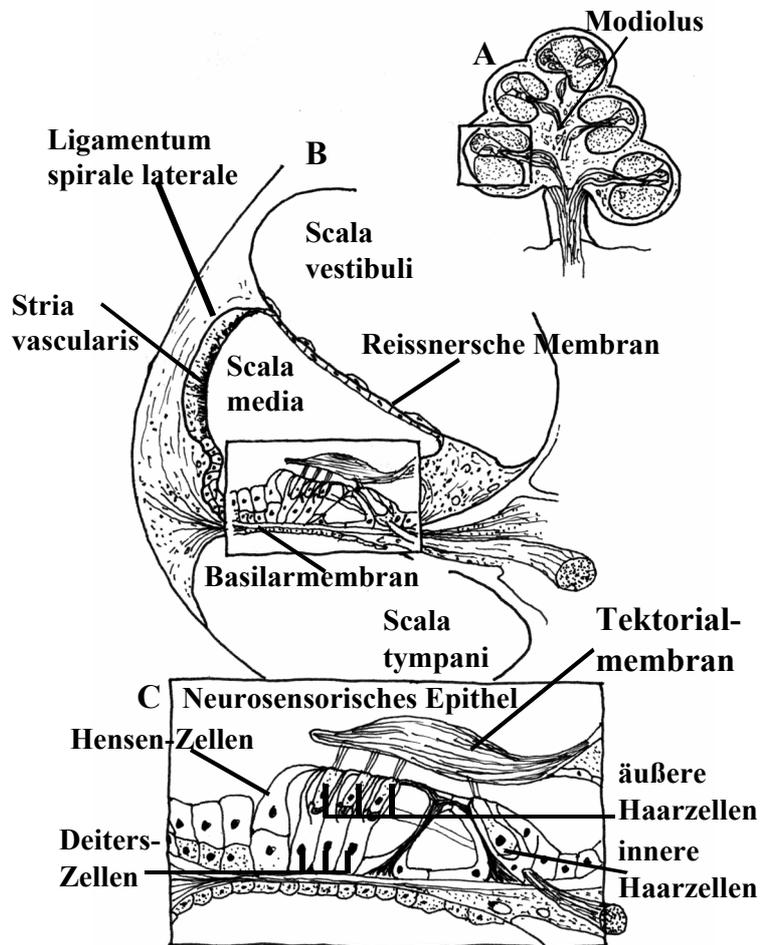
Das Innenohr der Säugetiere umfasst das Vestibularorgan, mit dem die Orientierung im Raum wahrgenommen wird, und die Cochlea, das Hörorgan (Abb. 1A, Ross, 1989).

Der Schneckengang der Cochlea windet sich spiralig um die knöcherne Schneckenwindung

(Modiolus). Seine Länge ist bei verschiedenen Tiergattungen unterschiedlich; beim Menschen variiert sie zwischen 29 und 42 mm in  $2\frac{1}{2}$  Windungen und beim Meerschweinchen beträgt sie ca. 21 mm, die sich auf  $4\frac{1}{2}$  Windungen verteilen.

Der Schneckengang wird durch die Reissnersche Membran und die Basilarmembran in 3 Flüssigkeitsräume unterteilt (Abb. 1B).

In den zwei Flüssigkeitsräumen der Scala vestibuli und der Scala tympani befindet sich Perilymphe, die reich an Natriumionen ( $\approx 140$  mM) und arm an Kaliumionen ist ( $\approx 5$  mM; Wangemann, 1996). Im Gegensatz dazu ist die Endolymphe, die sich in der Scala media befindet, arm an Natriumionen ( $\approx 1$  mM) und reich an Kaliumionen



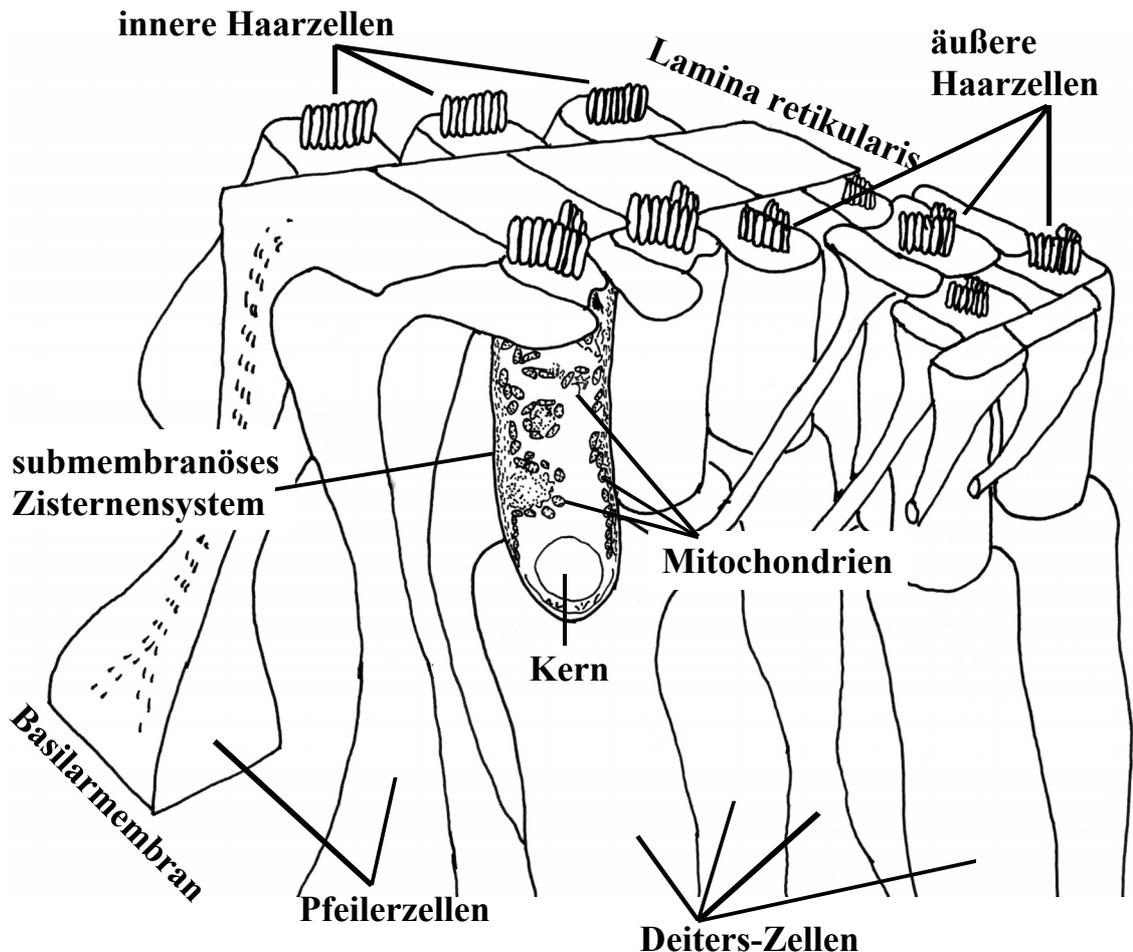
**Abb. 1**

Schematische Darstellung eines Querschnitts der Cochlea.

A. Querschnitt durch eine Cochlea auf der Ebene des Modiolus. Es sind  $2\frac{1}{2}$  Windungen zu erkennen. B: In diesem Ausschnitt einer basalen Windung sind die 3 Flüssigkeitsräume zu erkennen, in die die einzelnen Windungen unterteilt sind. C: Der vergrößerte Ausschnitt des neurosensorischen Epithels zeigt die Haarzellen und die Stützzellen im Detail (Modifiziert nach Ross, Reith und Romrell; *The Ear in Histology, A Text and Atlas*).

( $\approx 150$  mM), so dass ein chemischer Gradient über den Membranen der Cochlea besteht (Wangemann, 1996). Die laterale Wand (Ligamentum spirale laterale) mit der Stria vascularis hat die höchste Stoffwechselrate im Innenohr, da sie die Zusammensetzung der Endolymphe kontrolliert und somit den Ionengradienten aufrecht erhält (Wangemann, 1996). Auf der Basilarmembran sitzt das neurosensorische Epithel (welches auch als Cortisches Organ bezeichnet wird, nach dem Erstbeschreiber Alfons Corti 1851), das den eigentlichen Rezeptorapparat des Hörorgans darstellt. Es besteht aus den Sinneszellen, den inneren und äußeren Haarzellen, und den sie umgebenden Stützzellen, wie Hensen-Zellen und Deiters-Zellen (Abb. 1C). Die äußeren Haarzellen haben eine zylindrische Zellform, die inneren Haarzellen hingegen eine ovale. Der Kern beider Haarzelltypen ist rund und liegt basal im Zellkörper. Auf der apikalen Seite der Haarzellen sitzen die Stereocilien, die in die Endolymphe ragen, wohingegen der Zellkörper der Haarzellen von der Perilymphe umspült ist. Die Deiters-Zellen befinden sich unterhalb der äußeren Haarzellen. Sie haben Ausläufer, die hoch bis zu den Apikalplatten der äußeren Haarzellen ragen. Die Apikalplatten der äußeren Haarzellen und die Ausläufer der Deiters-Zellen sind durch so genannte „tight junctions“ verbunden und bilden zusammen mit den anderen Stützzellen die Lamina reticularis, die Grenzschicht zwischen der Endolymphe und der Perilymphe (Abb. 2). Die Hensen-Zellen liegen außen neben den Deiters-Zellen und den äußeren Haarzellen (Abb. 1C). Sie sind besonders in den apikalen Windungen mit großen Lipidtröpfchen gefüllt.

Beim Hörvorgang sind die Aufgaben der Haarzellen unterschiedlich verteilt. Die inneren Haarzellen stellen die eigentlichen Rezeptorzellen dar, von denen mehr als 90 % der afferenten, ableitenden Nervenfasern der Cochlea zum Gehirn ziehen (Puel, 1995). Sie beantworten einen akustischen Reiz, d.h. eine Schallwelle, die die Stereocilien der Zellen bewegt, mit einem Rezeptorpotenzial und geben dieses über Synapsen an die Nervenzellen weiter (Puel, 1995). Die äußeren Haarzellen dagegen haben beim Hörvorgang die Aufgabe, die Schallwellen zu verstärken (Zenner, 1986; Dallos und Corey, 1991). Auch sie wandeln den eintreffenden Reiz (eine Schallwelle) in ein Rezeptorpotenzial um, auf das sie dann mit Kontraktionen antworten. Äußere Haarzellen sind hauptsächlich mit Nervenenden verknüpft, die ihre Reaktionen regulieren (efferente Nerven). Nur etwa 10 % der afferenten Nerven der Cochlea ziehen von den äußeren Haarzellen zum Gehirn (Puel, 1995). Die verschiedenen Frequenzen eines Tons werden dabei räumlich getrennt in verschiedenen Windungen der Cochlea rezipiert (Evans, 1992). An der Basis der Cochlea sind die Haarzellen und auch die Stützzellen kleiner und flacher, so dass Töne hoher Frequenz



**Abb.2**

Schematische Darstellung der komplexen Beziehungen zwischen den Haarzellen und den Stützzellen. Die inneren und äußeren Haarzellen sind durch die Pfeilerzellen getrennt. Die äußeren Haarzellen sitzen nicht auf der Basilmembran, sondern auf den Deiters-Zellen. Am oberen Ende sind die äußeren Haarzellen voneinander durch die Ausläufer der Deiters-Zellen getrennt, die zur Lamina retikularis hochziehen. Innerhalb der äußeren Haarzellen sind die Mitochondrien häufig in der Nähe der Plasmamembran zu finden. Direkt unterhalb der Plasmamembran der äußeren Haarzellen befinden sich Kanäle, die als submembranöses Zisternensystem zusammengefasst werden. (Abbildung verändert nach Dallos, Popper und Fay; *The Cochlea*, 1996, Details nach Spicer et al. 1998).

detektiert werden können. Im Apex, also in der oberen Windung, sind die Zellen größer, so dass das gesamte Organ ein größeres Volumen hat. Hier werden die tiefen Töne rezipiert. Diese verschiedenen physiologischen Funktionen spiegeln sich auch im Stoffwechsel der äußeren Haarzellen wider, der Unterschiede zwischen Basis und Apex beim Sauerstoffverbrauch, Proteinumsatz und der Proteinregulation aufweist (Meyer zum Gottesberge, 1965; Niedzielski und Schacht, 1991).

Für das Rezeptorpotenzial nutzen beide Haarzelltypen den Kaliumgradienten zwischen der Endolymphe (oberhalb des Zellkörpers, in die nur die Stereocilien ragen) und der Perilymphe (die den Zellkörper umspült). Durch den mechanischen Reiz der Stereocilien werden Kaliumkanäle geöffnet, was bei den äußeren Haarzellen zu einem sekundären

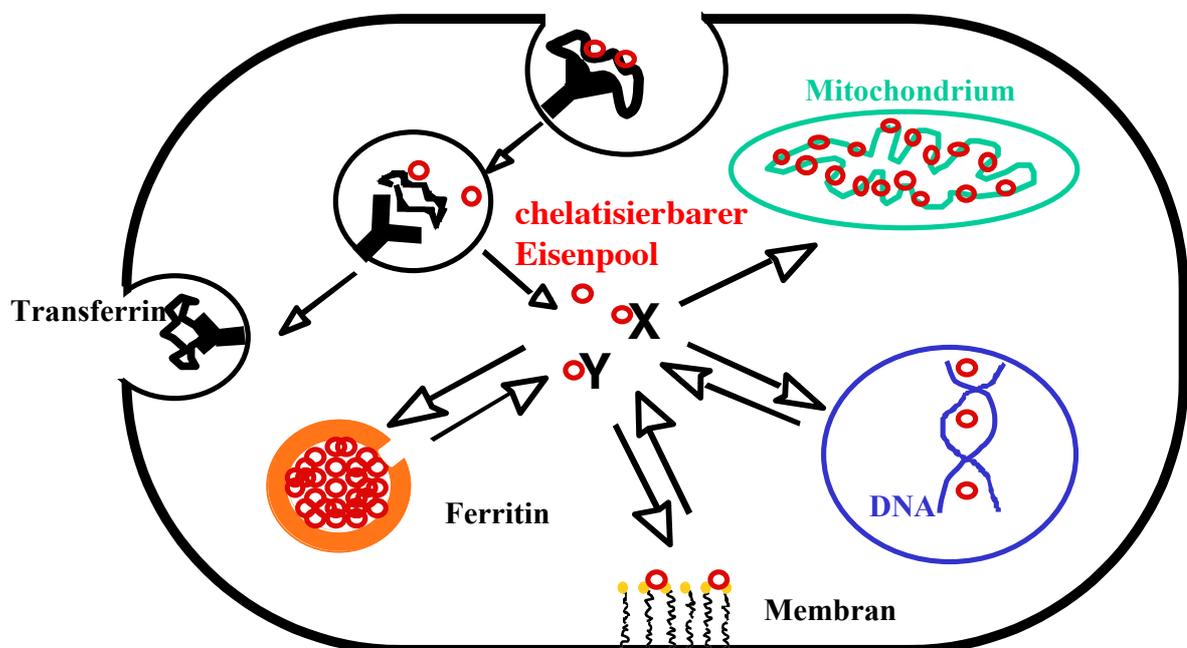
Einstrom von Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) durch spannungsabhängige Kalziumkanäle führt (Ikeda et al., 1994; Jaramillo, 1995). Über Calmodulin, an das  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden ist, wird dann das Cytoskelett aktiviert, so dass eine Kontraktion der Zelle stattfindet (Jaramillo, 1995). Auf diese Weise wird die Schallwelle in den Flüssigkeitsräumen des Innenohrs verstärkt und geschärft. Die Haarzellen, insbesondere die äußeren Haarzellen, besitzen daher eine Vielzahl von Ionenkanälen, die die Ionenhomöostase und den pH-Wert der Zellen regulieren (Ikeda et al., 1994). Wie für alle Zellen ist auch für die Haarzellen die Ionenhomöostase von großer Bedeutung, wobei unter Ionenhomöostase die Regulation der Konzentrationen der Alkali- und Erdalkalimetallionen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sowie die der Anionen wie  $\text{Cl}^-$  verstanden wird.  $\text{Ca}^{2+}$  spielt dabei eine besondere Rolle, da die extrazelluläre Kalziumionenkonzentration etwa 10 000 fach höher ist als die in den Zellen (Wangemann, 1996).  $\text{Ca}^{2+}$  bildet mit einigen zellulären Anionen (z.B. Phosphaten und Oxalaten) schwerlösliche Salze, deren Konzentration sehr leicht das Löslichkeitsprodukt überschreiten und dann ungewünschte Kristalle bilden können (Kaim und Schwederski, 1995). Im zellulären Gefüge dient  $\text{Ca}^{2+}$  besonders häufig der Regulation enzymatischer Reaktionen (z.B. im Zusammenhang mit Calmodulin) oder als Second Messenger, so dass die intrazelluläre Konzentration streng geregelt wird (Kaim und Schwederski, 1995). Die Kalziumhomöostase der äußeren Haarzellen wird nicht nur durch die Kalziumkanäle der Plasmamembran, sondern auch durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher, wie z.B. Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum und das submembranöse Zisternensystem, reguliert (Abb. 2; Ikeda et al., 1994; Spicer et al., 1998). Im Bereich des Letzteren liegen viele Mitochondrien, die auch die Energie für die Regulation der Ionenhomöostase liefern. Der Sauerstoffverbrauch des Cortischen Organs liegt zwar unter dem der Stria vascularis, trotzdem gewinnen die Haarzellen ihre Energie vorwiegend über den oxidativen Abbau von Glucose und damit unter maßgeblicher Beteiligung der Mitochondrien (Puschner und Schacht, 1997).

## **1.2. Reaktive Sauerstoffspezies und Erkrankungen des Innenohres**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels aller Lebewesen (Halliwell und Gutteridge, 1999). Neben einigen Enzymen, wie der Xanthin-Oxidase und der NADPH-Oxidase, sind die Proteine der Atmungskette in den Mitochondrien eine der Hauptquellen für ROS (Halliwell und Gutteridge, 1999). Durch

Fehlübertragungen von einzelnen Elektronen auf molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) entstehen Superoxidradikal-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ), die spontan oder enzymatisch katalysiert zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) dismutieren (Symonds und Gutteridge, 1998).  $H_2O_2$ , das auch direkt von einigen Enzymen gebildet werden kann, ist eines der wenigen membranpermeablen ROS (Halliwell et al., 2000).  $H_2O_2$  selber ist für die meisten Biomoleküle ein relativ schwaches Oxidationsmittel und reagiert nur mit wenigen Molekülen direkt. In Anwesenheit von Übergangsmetallionen, wie z. B.  $Fe^{II}$ , allerdings reagiert es schnell zu dem sehr reaktiven Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ) ab (Fenton Reaktion; Halliwell et al., 2000).

Ein Großteil der intrazellulären Hydroxylradikal-Bildung wird auf eisenkatalysierte Prozesse zurückgeführt, so dass die Regulation des Eisenstoffwechsels eine wichtige Rolle spielt (Herbert et al., 1994). Der Großteil der durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommenen Eisenionen wird umgehend in Speicherproteine wie Ferritin eingebaut (Aisen et al., 1999). Somit liegt nur ein Bruchteil des zellulären Eisens als chelatisierbares oder redox-aktives Eisen (chelatable iron pool; CIP), relativ schwach gebunden an niedermolekulare zelluläre Bestandteile, wie ATP, aber auch Membran- und DNA-assoziert, vor (Abb. 3; Pollack und Campana, 1981; Petrat et al., 2001). Dieser Eisenpool ist zugänglich für Eisenchelatoren wie 2,2'-Dipyridyl (2,2'-DPD; Rothman et al., 1992; Breuer



**Abb. 3**

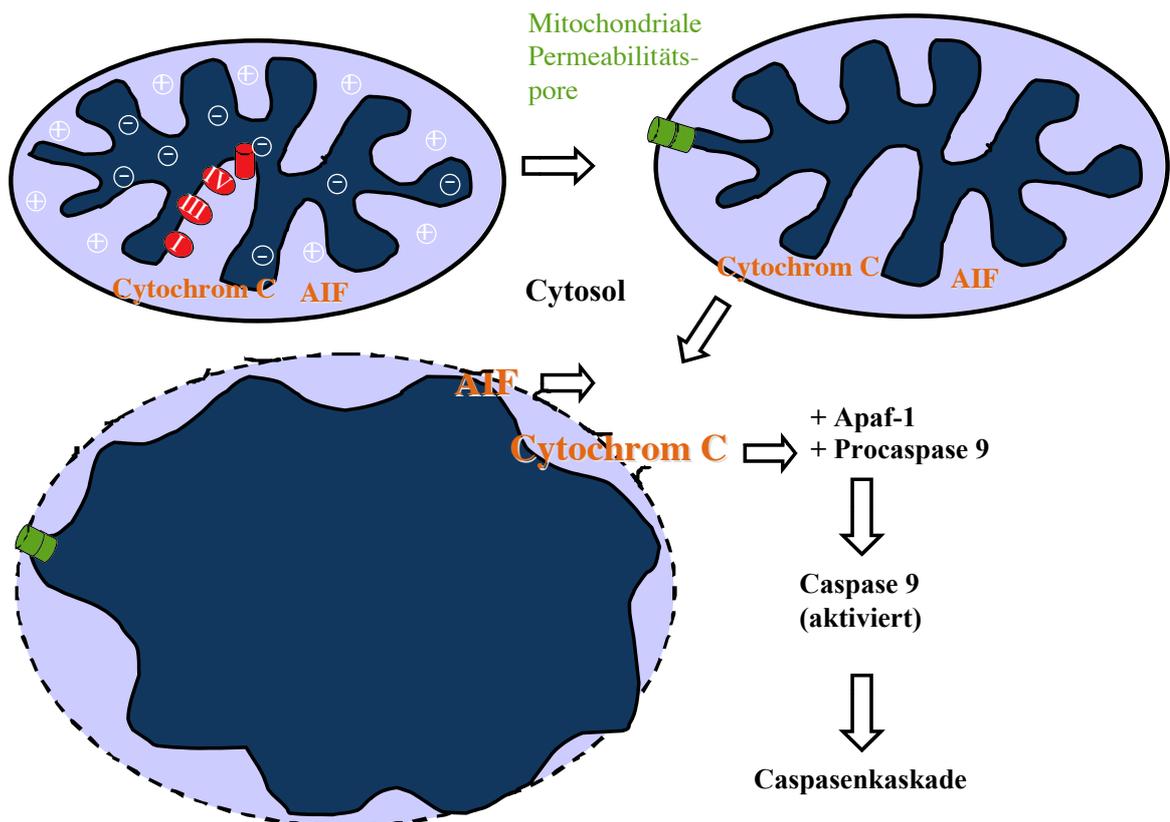
Der Eisenstoffwechsel der Zelle (Übersicht). Das durch Endozytose (über Transferrin und Transferrinrezeptoren) in die Zelle aufgenommene Eisen (rot) durchläuft einen Übergangspool chelatisierbaren Eisens, der sich auf verschiedene Kompartimente verteilt und von dem aus der Einbau des Eisens in Speicher- (z.B. Ferritin) und Funktionsproteine (z.B. Häm in den Mitochondrien) erfolgt.

et al., 1995; Petrat et al., 1999) und ist maßgeblich an der Bildung reaktiver Spezies, wie z.B.  $\bullet\text{OH}$  und Ferryl-Spezies, beteiligt (de Groot, 1994; Halliwell und Gutteridge, 1999). Der Eisenstoffwechsel des Innenohres ist nahezu unerforscht, aber Untersuchungen an Ratten, die mit einer eisenarmen Diät ernährt wurden, zeigten, dass diese Ernährung zu Funktionsstörungen des Innenohres führt (Sun et al., 1987a; Sun et al., 1987b). Diese Funktionsstörungen werden auf den Verlust an Enzymaktivität, insbesondere der Enzyme der Atmungskette, die Eisenionen im aktiven Zentrum besitzen, zurückgeführt (Sun et al., 1990). Somit darf auch für die Haarzellen, wie für alle bisher untersuchten Zellen, ein zellulärer Eisenpool postuliert werden, der zur Synthese eisenhaltiger Proteine genutzt wird und an der Generierung von ROS wie dem  $\bullet\text{OH}$  beteiligt ist. Das Hydroxylradikal reagiert praktisch mit allen Biomolekülen, hat aufgrund seiner hohen Reaktivität allerdings nur eine sehr kurze Halbwertszeit (Symonds und Gutteridge, 1998). Um eine massive Schädigung zellulärer Makromoleküle durch ROS zu verhindern, sind Zellen mit einer Vielzahl an enzymatischen (Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase u. a.) und nicht enzymatischen Antioxidantien (Vitamin C, Vitamin E, Glutathion u. a.) ausgestattet, die ROS „abfangen“ und damit unschädlich machen (z.B. de Groot, 1994; Halliwell und Gutteridge, 1999; Mates, 2000). Einige dieser Antioxidantien, wie Vitamin C, Glutathion (GSH) oder Superoxid-Dismutase (SOD), sind auch im Innenohr nachgewiesen worden (Weidauer, 1969; Pierson und Gray, 1982; el Barbary et al., 1993; Lai et al., 1996; Rarey und Yao, 1996; Usami et al., 1996).

Kommt es in einer Zelle zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der ROS-Bildung und ihrer „Entfernung“ durch das antioxidative Abwehrsystem, können ROS oder Toxine konzentrationsabhängig eine Nekrose oder Apoptose in Zellen auslösen (Hickman und Boyle, 1997; Raffray und Cohen, 1997). Hohe Konzentrationen an ROS führen meist zu einem nekrotischen Zelltod, der durch einen massiven Schaden der zellulären Makromoleküle charakterisiert ist. Dazu gehört die Oxidation von Membranlipiden durch  $\bullet\text{OH}$  mit einer nachfolgenden Kettenreaktion (Lipidperoxidation), durch die es zur Lipidzerstörung, zur Schädigung von Membranproteinen und letztendlich zur Zerstörung von Zell- und Organellmembranen kommt (Gutteridge, 1995). Aus dieser Schädigung resultiert eine fortschreitende Dysfunktion der Ionenhomöostase der Zellen und ein Verlust der mitochondrialen Atmung, wodurch der ATP-Spiegel der Zellen absinkt, und letztendlich der Zelltod ausgelöst wird (Buja et al., 1993; Raffray und Cohen, 1997). Auch andere Proteine können durch Oxidation ihrer Aminosäuren zerstört oder deaktiviert werden (Halliwell und Gutteridge, 1999). Insbesondere Enzyme mit Thiolgruppen im aktiven

Zentrum sind davon betroffen (Reed, 1990; Halliwell und Gutteridge, 1999). Darüber hinaus können ROS auch DNA-Basen oder deren Zucker oxidieren, so dass Nukleotide zerstört werden (Henle und Linn, 1997; Linn, 1998). In den meisten Zellen findet während der Schädigung durch ROS eine Kombination dieser Einzelschädigungen statt, die dann letztendlich zum Zelltod führen (de Groot, 1994).

Im Unterschied zur nekrotischen Zellschädigung können moderate Konzentrationen an reaktiven Spezies oder Toxinen auf verschiedenen Wegen den apoptotischen Zelltodprozess aktivieren. Morphologisch wird eine Apoptose an der Kondensation und Fragmentation des Chromatins und der Bildung von „Apoptotic Bodies“ (membranumschlossene Anteile des Cytosols, die auch DNA-Fragmente und Mitochondrien enthalten können) identifiziert (Buja et al., 1993; Raffray und Cohen, 1997). Während der Apoptose werden Cysteinproteasen (Caspasen), die für viele der morphologischen Veränderungen verantwortlich gemacht werden, aktiviert (Budihardjo et al., 1999). Zwischen Nekrose auf der einen Seite und Apoptose auf der anderen Seite gibt es eine



**Abb. 4**

Schema des mitochondrialen Permeabilitätsübergangs (MPT). Cytochrom c und der Apoptose induzierende Faktor (AIF) sind in intakten Mitochondrien im Intermembranraum lokalisiert. Der allgemeinen Vorstellung entsprechend wird während der MPT die mitochondriale Permeabilitätspore geöffnet, so dass aufgrund des osmotischen Gefälles zwischen Matrix und Cytosol Wasser in die Matrix eindringen kann. Dadurch schwillt das gesamte Mitochondrium an, die äußere Membran platzt und Cytochrom c und AIF können ins Cytosol diffundieren, wo sie, z.B. durch Aktivierung der Caspasenkaskade, Apoptose auslösen können.

Vielzahl von Mischformen der Zelltodmechanismen und verschiedene Mediatoren ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\bullet\text{OH}$ , Thiolgruppen) spielen sowohl bei einer Apoptose als auch bei einer Nekrose eine Rolle (Raffray und Cohen, 1997; Nicotera und Orrenius, 1998). Mitochondrien, als hauptsächliche ATP-Lieferanten und ROS-Produzenten, können sowohl bei einer Nekrose als auch bei einer Apoptose eine entscheidende Rolle spielen (Thress et al., 1999). Bei einem hochgradigen Verlust von ATP scheint eher Nekrose stattzufinden, bei moderatem Verlust von ATP dagegen wird Apoptose ausgelöst (Lemasters et al., 1999a; Nicotera et al., 1999). Eine besondere Bedeutung scheint dabei der mitochondriale Permeabilitätsübergang (MPT) zu haben, der zunächst mit Nekrose in Verbindung gebracht wurde, da die Mitochondrien dabei zerstört werden, was zu einem massiven Verlust an ATP führen kann (Lemasters et al., 1999a). Das verbreitetste Modell zur MPT geht davon aus, dass eine durch Cyclosporin A (CsA) inhibierbare Pore in der inneren Membran geöffnet wird, was zur Schwellung des gesamten Mitochondriums und schließlich zu einer Zerstörung der äußeren mitochondrialen Membran führt (Abb. 4; Bernardi et al., 1994). Die genaue Beschaffenheit der Pore und die aktivierenden und deaktivierenden Faktoren der MPT sind noch nicht genau charakterisiert (Lemasters et al., 1999a; Thress et al., 1999). Da durch die Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran Cytochrom c und der „Apoptosis Inducing Factor“ (AIF) aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Cytosol entlassen werden und dort u. a. die Caspasenkaskade aktivieren können (Kroemer und Reed, 2000), wird eine Beteiligung der MPT auch an einigen Apoptoseformen angenommen.

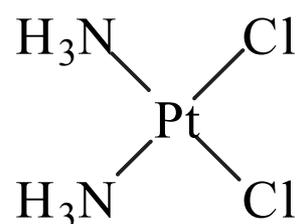
Für zahlreiche klinisch relevante Innenohrerkrankungen gibt es Hinweise auf eine pathogene Beteiligung von ROS. Eine häufige pathogene Erscheinung ist der Hörsturz, für den es verschiedene Erklärungshypothesen gibt (Jahnke, 1993). Als mögliche Ursache wird eine mangelnde Durchblutung mit einer nachfolgenden Ischämie-Reperfusionsschädigung angenommen (Jahnke, 1993). Innenohrschäden durch Hypoxie und anschließender Reoxygenierung können durch Antioxidantien gemildert werden (Seidman und Quirk, 1991; Seidman et al., 1993). Zudem zeigte die Oxidation von Salicylsäure die Bildung von  $\bullet\text{OH}$  während einer Ischämie/Reperfusion im Gehirn an (Cao et al., 1988). Beides sind indirekte Hinweise auf die Beteiligung von ROS an der Innenohrschädigung. Auch bei dem Lärmtrauma gibt es Hinweise für die erhöhte Produktion von ROS während der Schädigung (Seidman et al., 1991; Yamane et al., 1995a; Yamane et al., 1995b; Yamasoba et al., 1998; Yamasoba et al., 1999), die wiederum durch Antioxidantien und Eisenchelatoren gemildert werden kann (Quirk et al., 1994; Hu et al., 1997). Eine Beteiligung von ROS wird auch bei der Schädigung durch chemische Substanzen wie Trimethylzinn (Clerici, 1996), Gentamicin

oder Cisplatin (siehe auch unten; Priuska und Schacht, 1995; Clerici et al., 1996; Hirose et al., 1997; Kopke et al., 1997; Lautermann et al., 1997) vermutet.

Untersuchungen zu Schädigungs- und Zelltodmechanismen des Innenohres sind schwierig, da das Organ für direkte Beobachtungen nicht zugänglich ist. Es sind Methoden entwickelt worden, um cochleäre Schädigungen *in vivo*, d. h. an lebenden Individuen, durchführen zu können, allerdings sind die Möglichkeiten, einen Schädigungsmechanismus auf diesem Weg zu erforschen, begrenzt. *In vivo*-Untersuchungen an Versuchstieren haben gezeigt, dass bei einem Hörverlust, z. B. durch Arzneistoffe (wie z. B. Cisplatin und Gentamicin; Chiodo und Alberti, 1994) und bei einem Lärmtrauma (Theopold, 1978; Ide und Morimitsu, 1990), besonders die äußeren Haarzellen geschädigt werden. Der Verlust dieser Zellen führt zu einem Hörverlust, obwohl die inneren Haarzellen die eigentlichen Rezeptorzellen sind (Harrison und Evans, 1977). Studien zum Mechanismus von Hörschäden haben sich deshalb häufig auf die äußeren Haarzellen konzentriert. Dazu wurden verschiedene meist jedoch weniger geeignete *in vitro*-Zellmodelle entwickelt. So sind isolierte Haarzellen aus der adulten Meerschweinchencochlea (Zenner et al., 1985) *in vitro* nur wenige Stunden überlebensfähig. Dieses Modell hat zudem den Nachteil, dass die isolierten Zellen *in vitro* nicht durch Ototoxika geschädigt werden (Saito et al., 1991; Crann et al., 1992; Ernst et al., 1994; Yamamoto et al., 1994) und damit nicht vergleichbar mit Haarzellen im intakten Organ sind. Im Unterschied dazu kann das isolierte Cortische Organ aus wenige Tage alten, aber noch nicht vollständig differenzierten Maus- oder Rattencochleae (Richardson und Russell, 1991; Kopke et al., 1997) einige Tage oder Wochen kultiviert werden. Diese Modelle arbeiten aber mit undifferenzierten Zellen, die in bestimmten Entwicklungsstadien empfindlicher auf Ototoxika reagieren als vollständig differenzierte Zellen (Osako et al., 1979; Chen und Saunders, 1983). Auch bei der bislang einzigen etablierten Innenohrzelllinie handelt es sich gleichfalls um undifferenzierte Vorläuferzellen der Haarzellen und Deiters-Zellen des Innenohres (Holley und Lawlor, 1997).

### 1.3. Cisplatin

Cisplatin ist ein quadratisch-planarer Komplex mit einem Platinatom als Zentralatom sowie zwei Chloridionen und zwei Amoniakmolekülen als Liganden ( $\text{cis}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ;



**Abb. 5**  
Cisplatin

Abb. 5), der seit einigen Jahren als Chemotherapeutikum zur Behandlung verschiedener Tumore eingesetzt wird. Der Wirkmechanismus von Cisplatin beruht vermutlich auf der Substitution der Cl<sup>-</sup>-Ionen durch Hydroxylionen (OH<sup>-</sup>), wodurch Cisplatin „aktiviert“ wird (Chaney, 1995). An diesen Koordinationsstellen bildet Cisplatin dann, durch Austausch der OH<sup>-</sup> gegen DNA-Basen (hauptsächlich benachbarte Purinbasen, meist Guanin, eines Stranges), Komplexe mit der DNA (Trimmer und Essigmann, 1999). Dies scheint entscheidend für die Antitumor-Wirkung von Cisplatin zu sein, da Transplatin (trans[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]), das kaum cytotoxisch ist, zwar ebenfalls Komplexe mit DNA-Basen, aber nicht Komplexe zwischen benachbarten Guaninbasen bildet (Hambley, 1997). Die durch Cisplatin an der DNA von Tumorzellen induzierten Schäden verhindern weitere Zellteilungen und können damit den Zelltod auslösen (Coultas und Strasser, 2000).

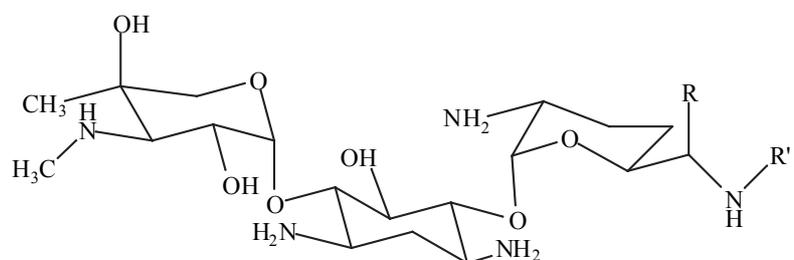
Zu den wichtigsten Nebenwirkungen von Cisplatin zählt neben der Nierenschädigung die Schädigung des Innenohres (Martindale und Reynolds, 1993; Pryor, 1994), die mechanistisch jedoch kaum aufgeklärt ist. Intraperitoneale Injektionen von Cisplatin führten bei Meerschweinchen zu einem Hochton-Hörverlust, der mit einem Verlust der Funktionstüchtigkeit oder sogar einem Vitalitätsverlust der äußeren Haarzellen, besonders an der Basis der Cochlea, einhergeht (Estrem et al., 1981; Comis et al., 1986). Experimente an isolierten äußeren Haarzellen haben dagegen gezeigt, dass diese anders als *in vivo* nicht empfindlich gegenüber Cisplatin sind, sondern Cisplatin lediglich Ca<sup>2+</sup> an der Plasmamembran verdrängt und so den Kalziumeinstrom durch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle verhindert (Saito et al., 1991; Ernst et al., 1994; Yamamoto et al., 1994). „Aktiviert“ man Cisplatin mit Hilfe eines Leberhomogenates, ist es auch für isolierte äußere Haarzellen toxisch (Saito et al., 1996). Der Mechanismus dieser „Aktivierung“ ist nicht bekannt. *In vivo* konnte an Meerschweinchen und Ratten gezeigt werden, dass Cisplatin den Gehalt an GSH in der Cochlea verringert (Ravi et al., 1995; Lautermann et al., 1997) und dass Antioxidantien (wie Diethyldithiocarbamat und 4-Methyl-Benzoesäure) die Cisplatinschädigung verringern (Rybak et al., 1995; Kamimura et al., 1999). Außerdem fördert Cisplatin Lipidperoxidation in der Cochlea, die ebenfalls durch Antioxidantien verhindert werden kann (Rybak et al., 2000). Diese Befunde legen nahe, dass ROS an der Schädigung durch Cisplatin beteiligt sind, was durch Befunde aus Messungen mit ROS-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen (Gabaizadeh et al., 1997) und Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrometrie (ESR; Clerici et al., 1996) unterstützt wird. Ähnliche Befunde gibt es auch zur Nierenschädigung durch Cisplatin. Die Gabe von Antioxidantien wie GSH wirkt *in vivo* protektiv gegen die Schädigung durch Cisplatin (Anderson et al., 1990; Kim et al., 1997),

und der zelluläre Gehalt von GSH wird durch Cisplatin auch in der Niere verringert (Somani et al., 1995). Darüber hinaus wurden indirekte Hinweise auf die Beteiligung von ROS (Somani et al., 1995; Matsushima et al., 1998) und Eisen an der Schädigung der Niere durch Cisplatin gefunden (al-Harbi et al., 1995; Baliga et al., 1998a). Der chelatisierbare Eisenpool (Bleomycin-Nachweis) der Niere und des Zellüberstands von Nierenzellkulturen war nach Behandlung durch Cisplatin erhöht (Shenberg et al., 1994; Baliga et al., 1998a; Baliga et al., 1998b). Über die Rolle der Eisenionen bei der Innenohrschädigung durch Cisplatin gibt es hingegen keine Erkenntnisse.

Da Cisplatin, ebenso wie in der Antitumorwirkung, auch in der cytotoxischen Nebenwirkung wesentlich effektiver als Transplatin ist (Saito et al., 1995; Saito et al., 1997), liegt die Vermutung nahe, dass auch während der Schädigung der Nieren- und Ohrzellen DNA-Schäden auftreten. Tatsächlich konnten DNA-Einzelstrangbrüche nach Cisplatininjektion *in vivo* bei Meerschweinchencochleae festgestellt werden (Watanabe et al., 2001). Unklar bleibt allerdings, welche Bedeutung diese DNA-Schäden bei der Toxizität haben. Es ist bekannt, dass DNA-Schäden eine Apoptose auslösen können (Coultas und Strasser, 2000). So deuten neben DNA-Fragmentationen in den Zellen der Cochlea, nachgewiesen mit der TUNEL-Methode (Liu et al., 1998; Cheng et al., 1999; Alam et al., 2000), auch morphologische Veränderungen der Haarzellen (Saito und Aran, 1994) nach Schädigung durch Cisplatin *in vivo* auf einen apoptotischen Zelltod hin. Außerdem konnte eine Beteiligung von Caspasen am Zelltod nachgewiesen werden (Liu et al., 1998). Zusammenfassend scheint Cisplatin somit eine Apoptose in den Zellen des Innenohres auszulösen.

## 1.4. Gentamicin

Aminoglykosid-Antibiotika wie Gentamicin (Abb. 6), binden an die 30 S- Untereinheit der Ribosomen von Bakterien. Die dadurch entstehenden Fehler bei der Translation führen zur Produktion



1: R = R' = CH<sub>3</sub>; 2: R = CH<sub>3</sub>, R' = H; 3: R = R' = H

**Abb. 6**  
Gentamicin

sogenannter Nonsensproteine und schließlich zum Tod der Bakterien. Da der Wirkungsort dieser Antibiotika innerhalb der Zellen liegt, werden sie häufig in Kombination mit zellwandzerstörenden Antibiotika wie Penicillin verabreicht (Martindale und Reynolds, 1993). Seit ihrer Einführung in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts haben klinische Tests gezeigt, dass Aminoglykoside sowohl die Nieren als auch das Innenohr schädigen können (Schacht, 1998). Da sie wirkungsvolle Arzneistoffe bei schweren Infektionen sind und auch als Reservemittel bei der Tuberkulosebekämpfung eingesetzt werden, spielen sie klinisch auch heute noch eine große Rolle (Schacht, 1998).

Ähnlich wie bei Cisplatin zeigen sich die Nebenwirkungen dieser Arzneistoffe vorwiegend bei den Haarzellen, in der Cochlea besonders bei den äußeren Haarzellen der basalen Windung (Huizing und de Groot, 1987). Vergleichbar mit dem Effekt von Cisplatin auf äußere Haarzellen, verursachen auch Aminoglykoside zunächst einen reversiblen Hörschaden, vermutlich indem sie  $\text{Ca}^{2+}$  von der Plasmamembran verdrängen, wodurch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle gehemmt werden (Kaus, 1992). Erst im zeitlichen Verlauf danach tritt eine Zerstörung der Haarzellen auf, wodurch der Hörverlust irreversibel wird. Untersuchungen an isolierten Haarzellen haben gezeigt, dass Gentamicin, ebenso wie Cisplatin, erst nach einer Aktivierung durch Leberhomogenate toxisch wirkt (Crann et al., 1992). Aus weiteren Untersuchungen geht hervor, dass zur Aktivierung Eisenionen notwendig sind (Priuska und Schacht, 1995). Kernresonanzspektroskopiestudien lieferten Hinweise auf einen Gentamicin-Eisen-Komplex, wobei der 1:1-Komplex im Unterschied zum 2:1-Komplex zur Fenton-Chemie fähig zu sein scheint (Priuska et al., 1998). Der Gentamicin-Eisen-Komplex scheint sowohl im zellfreien (Priuska und Schacht, 1995) als auch im zellulären System (Sha und Schacht, 1999a; Sha und Schacht, 1999c) ROS zu produzieren. So gibt es Hinweise für eine Produktion von ROS während der Inkubation von Innenohrzellen mit Gentamicin, die sich auf Untersuchungen der Perilymphe mit Hilfe von ESR (Clerici et al., 1996) und auf *in vitro*-Versuche mit Fluoreszenzfarbstoffen (Hirose et al., 1997) stützen. Außerdem ist der protektive Effekt von Antioxidantien auf die Schädigung der Haarzellen durch Gentamicin (Garetz et al., 1994b; Lautermann et al., 1995) ein indirekter Hinweis auf die Beteiligung von ROS an der Gentamicintoxizität. Eisenchelatoren haben *in vivo* eine protektive Wirkung gegen die Zellschädigung durch Gentamicin bewiesen (Song und Schacht, 1996; Conlon et al., 1998), Eisenanreicherung dagegen erhöht die Gentamicintoxizität (Conlon und Smith, 1998). Trotz dieser Hinweise zur Beteiligung von Eisenionen an der Gentamicintoxizität gibt es keine direkten

Untersuchungen zum Einfluss von Gentamicin auf den chelatisierbaren Eisenpool der Innenohrzellen.

In den letzten Jahren gab es zunehmend Hinweise darauf, dass Aminoglykoside Apoptose in den Haarzellen auslösen können. So ergaben morphologische Untersuchungen (Forge, 1985) und Untersuchungen mittels des TUNEL-Tests, die DNA-Fragmentationen aufzeigen, Hinweise für einen solchen Zelltodmechanismus (Nakagawa et al., 1998; Vago et al., 1998). Zudem scheinen auch Mitochondrien eine Rolle bei der Aminoglykosidschädigung des Innenohres zu spielen, da eine Blockierung der mitochondrialen Proteinbiosynthese die Schädigung *in vivo* verstärkt (Hyde und Rubel, 1995). Genetische Untersuchungen an Patienten mit ausgeprägter Innenohrschädigung nach Aminoglykosidtherapien haben ein gehäuftes Auftreten einer Mutation der mitochondrialen DNA gezeigt (Hutchin und Cortopassi, 1994).

Zusammenfassend legt der Vergleich der bisherigen Befunde zur Innenohrschädigung durch Cisplatin und Gentamicin den Verdacht nahe, dass große Gemeinsamkeiten im pathogenetischen Mechanismus beider Schädigungsmodelle bestehen. Beide Wirkstoffe schädigen besonders Nieren- und Innenohrzellen und beide sind nicht toxisch für isolierte äußere Haarzellen, sondern verdrängen hier lediglich  $\text{Ca}^{2+}$  von der Plasmamembran. Zudem scheint die Toxizität beider Arzneistoffe *in vivo* durch die Produktion von ROS vermittelt zu werden, die das antioxidative Abwehrsystem der Zellen in ähnlicher Weise beeinträchtigen. Trotz dieser Parallelen gibt es nur wenige direkt vergleichende Untersuchungen zur Toxizität von Gentamicin und Cisplatin.

## 2. Fragestellung

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Schädigung des Innenohres, verursacht durch so unterschiedliche Schädigungsfaktoren wie Lärm, Hörsturz, Arzneistoffe oder Umweltgifte, deuten auf eine Beteiligung von ROS bei allen Schädigungstypen hin. Untersuchungen zum direkten Einfluss von ROS auf die Zellen des Innenohrs gibt es hingegen kaum. Dies liegt zum Teil daran, dass die Zellen des Innenohrs schwer zugänglich und darüber hinaus sehr empfindlich und schwer kultivierbar sind. Ziel dieser Studie ist es daher, zunächst ein Modell zu etablieren, an dem Toxizitätsstudien *in vitro* durchgeführt werden können.

Mit Hilfe dieses Modells soll dann am Beispiel von  $\text{H}_2\text{O}_2$  geklärt werden, wie die Zellen des neurosensorischen Epithels auf ROS reagieren und welche Rolle  $\text{Ca}^{2+}$ , der chelatisierbare Eisenpool und Antioxidantien bei dieser Schädigung spielen.

Des Weiteren soll exemplarisch an der Toxizität der Arzneistoffe Cisplatin und Gentamicin geklärt werden, welche Rolle ROS bei der Schädigung spielen und welchen Einfluss der chelatisierbare Eisenpool auf die Schädigung von Innenohrzellen hat. Außerdem sollen morphologische Untersuchungen zeigen, ob durch Gentamicin, Cisplatin, bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Nekrose oder eine Apoptose in den Zellen *in vitro* ausgelöst wird. Vergleiche zwischen der Toxizität beider Wirkstoffe sollen zeigen, ob die Schädigungsmechanismen wirklich so ähnlich sind, wie es nach dem Studium der Literatur erscheint.

## 4. Diskussion

### 4.1. Das *in vitro*-Modell des neurosensorischen Epithels

Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, ausgehend von Beschreibungen zur Isolation fixierter und unfixierter Cortischer Organe (Engstöm et al., 1966) die Isolation adulter Meerschweinchencocheleae weiterzuentwickeln. Das Meerschweinchen wurde als Versuchstier gewählt, weil es besonders viele Schneckenschichten mit sehr vielen großen Haarzellen besitzt (Zajic und Schacht, 1987) und mit einem funktionstüchtigen Innenohr geboren wird (Raphael et al., 1983). Dieses Modell eröffnet die Möglichkeit, verschiedene, vollständig differenzierte Zelltypen des neurosensorischen Epithels im Zellverband zu beobachten. Nach der Präparation waren die Zellen des neurosensorischen Epithels (äußere und innere Haarzellen sowie Deiters- und Hensen-Zellen) in HBSS für mindestens 6 h vital, so dass alle Versuche innerhalb eines Zeitraums von 6 h durchgeführt wurden. Im Zellverband waren die Haarzellen damit deutlich länger vital als isolierte Haarzellen (Zajic und Schacht, 1987), allerdings weniger lang als bei den Präparaten der pränatalen Rattencochelea (Kopke et al., 1997). Im Unterschied zu dem letzteren Modell handelt es sich bei dem neurosensorischen Epithel der Meerschweinchencochelea aber um vollständig differenzierte Zellen (siehe Einleitung). Die Vitalitätstests mit allen schädigenden Substanzen ( $H_2O_2$ , Cisplatin und Gentamicin) haben gezeigt, dass in dem von uns etablierten Modell des neurosensorischen Epithels, die äußeren Haarzellen die empfindlichsten Zellen sind, gefolgt von den inneren Haarzellen. Die Stützzellen, wie Deiters-Zellen und Hensen-Zellen, werden unter den hier gewählten Bedingungen offensichtlich nicht geschädigt. Dieses Schädigungsmuster entspricht dem Muster von Schädigungen *in vivo* durch Cisplatin (Estrem et al., 1981), Aminoglykosiden (Huizing und de Groot, 1987) sowie durch traumatischen Lärm (Theopold, 1978; Ide und Morimitsu, 1990). *In vivo* zeigen sich darüber hinaus Unterschiede zwischen den einzelnen Reihen der äußeren Haarzellen. Die innerste Reihe von Haarzellen in der basalen Windung ist von der jeweiligen Schädigung am stärksten betroffen (Theopold, 1978; Estrem et al., 1981; Huizing und de Groot, 1987; Ide und Morimitsu, 1990). Die Haarzellen in der inneren Reihe und in der medialen Windung des *in vitro*-Modells des neurosensorischen Epithels waren ebenfalls empfindlicher als Zellen in den äußeren Reihen oder in der apikalen Windung, wobei dieser

Unterschied allerdings nicht signifikant war. Die neurosensorischen Epithelien der basalen Windung wurden nicht entnommen, da die Präparation zu zeitaufwendig ist, obwohl die Unterschiede in der Empfindlichkeit der äußeren Haarzellen zwischen der apikalen und der basalen Windung deutlicher sind (Sha et al., 2001b). Zusammengefasst legen die hier erzielten Daten nahe, dass das isolierte neurosensorische Epithel geeignet ist, die *in vivo* Verhältnisse der Schädigungen zu simulieren.

## **4.2. Der Mechanismus der Zellschädigung durch Wasserstoffperoxid**

Trotz zahlreicher indirekter Hinweise auf eine Beteiligungen von ROS bei Innenohrschädigungen (siehe Einleitung), gibt es nur wenige Untersuchungen über die Schädigung der Innenohrzellen durch ROS. Diese haben gezeigt, dass isolierte äußere Haarzellen empfindlich auf ROS ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$ ) reagieren (Clerici et al., 1995) und dass ROS Funktionsstörungen des Innenohres auslösen, wenn sie in die Perilymphe freigesetzt werden (Clerici und Yang, 1996). Da  $H_2O_2$  eines der wenigen ROS ist das Zellmembranen passieren kann (Halliwell und Gutteridge, 1999), und damit nach extrazellulärer Zugabe auch intrazellulär schädigt (wie z. B. bei einer Schädigung durch Hypoxie/Reoxygenierung oder durch ROS-produzierende Toxine), wurden hier Versuche mit  $H_2O_2$  durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass  $H_2O_2$  eine konzentrationsabhängige Schädigung der äußeren und inneren Haarzellen verursacht. Die Schädigung der inneren Haarzellen war geringer als die der äußeren Haarzellen, zeigte aber ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit. Somit war das *in vitro* durch  $H_2O_2$  verursachte Schädigungsmuster durchaus vergleichbar mit den *in vivo*-Schädigungen durch Lärm sowie durch Toxine wie Trimethylzinn, Gentamicin und Cisplatin.

### **4.2.1. Morphologische Veränderungen während der Inkubation mit Wasserstoffperoxid**

Die morphologischen Veränderungen der Haarzellen des neurosensorischen Epithels hingen entscheidend von der  $H_2O_2$ -Konzentration ab. Zellen, die mit 200  $\mu M$   $H_2O_2$  inkubiert wurden, begannen vor dem Zelltod zu schwellen, wobei auch die Kerne dieser Zellen stark anschwellen. Diese morphologischen Veränderungen deuten auf eine Nekrose hin, bei der es

durch Toxine oder ROS zum Verlust der Ionenhomöostase und damit zu einem Wassereinstrom kommt, durch den die Zelle und auch deren Zellkompartimente - wie Mitochondrien und Kern - anschwellen (Buja et al., 1993; Raffray und Cohen, 1997).

Niedrigere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen ( $50 \mu\text{M}$ ) führten in den Haarzellen eher zu ausgeprägter Chromatinkondensation, ohne eine Kern- oder Zellschwellung. In Einzelfällen konnte oberhalb der Apikalplatte der äußeren Haarzellen die Bildung von Blebs beobachtet werden. Zusammen ergeben diese Veränderungen das Bild einer Apoptose, bei der es durch die Aktivierung von Endonukleasen und Caspasen zu solchen morphologischen Veränderungen kommen kann (Buja et al., 1993; Raffray und Cohen, 1997). Isolierte äußere Haarzellen, die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  geschädigt werden, zeigen eine Bleb-Bildung, die bei niedrigeren Konzentrationen ausgeprägter ist ( $100 \mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2$ ; Clerici et al., 1995).  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann somit in Haarzellen konzentrationsabhängig entweder eine Nekrose oder eine Apoptose auslösen, was auch für den Zelltod durch Toxine oder ROS in anderen Zellen schon gezeigt worden ist (Raffray und Cohen, 1997; Nicotera et al., 1999).

#### 4.2.2. Mediatoren der Wasserstoffperoxidtoxizität

Der Eisenchelator 2,2'-DPD zeigte eine protektive Wirkung gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung ( $200 \mu\text{M}$ ) in den äußeren Haarzellen, während sein nicht chelatisierendes Isomer, 4,4'-DPD, keinen Effekt hatte, so dass der protektive Effekt auf die chelatisierende und nicht auf eine unspezifische Eigenschaft von 2,2'-DPD zurückzuführen ist. Der protektive Effekt auch von anderen Eisenchelatoren gegenüber der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung ist für viele Zelltypen beschrieben (z.B. Starke und Farber, 1985; Kvietys et al., 1989; Lomonosova et al., 1998). Eisenionen katalysieren in der Fenton-Reaktion die Bildung vom  $\bullet\text{OH}$  aus dem weniger reaktiven  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Halliwell und Gutteridge, 1999). Das Hydroxylradikal wird für die Mehrzahl der Schäden an Makromolekülen wie Lipiden (Gutteridge, 1995), Proteinen (Grune und Davies, 1997; Halliwell und Gutteridge, 1999) oder der DNA (Henle und Linn, 1997; Linn, 1998) verantwortlich gemacht. Da  $\bullet\text{OH}$  nahezu sofort am Ort seiner Entstehung abreagiert, ist es notwendig, die Fenton-reaktiven  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -Ionen in den einzelnen Zellkompartimenten zu chelatisieren, wozu 2,2'-DPD weitgehend in der Lage zu sein scheint (Petrat et al., 2001).

Neben dem Eisenchelator 2,2'-DPD waren auch der Kalziumchelator Quin-2 AM und der Kalziumkanalblocker Nifedipin protektiv gegenüber der Schädigung äußerer

Haarzellen durch 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Es ist daher anzunehmen, dass neben zellulärem Eisen auch  $\text{Ca}^{2+}$  eine wichtige Rolle bei der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung der Haarzellen spielt. Es ist bekannt, dass es in Folge einer oxidativen Schädigung zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytosol kommen kann und dass damit zumindest ein Teil der Zellschädigung durch unspezifische Aktivierung von kalziumabhängigen Enzymen und Signalwegen vermittelt wird (Nicotera und Orrenius, 1998). Nifedipin, ein Blocker der Kalziumkanäle des L-Typs, die auch in äußeren Haarzellen des Meerschweinchens gefunden wurden (Nakagawa et al., 1991; Oshima et al., 1996), erwies sich auch bei einer durch  $\text{O}_2^-$  verursachten Schädigung isolierter Haarzellen (Ikeda et al., 1993) sowie bei Patienten mit Lärmtrauma und Hörsturz (Mann et al., 1987; Lenarz, 1989) als protektiv. Daher ist zu vermuten, dass während der ROS-Schädigung der Haarzellen  $\text{Ca}^{2+}$  durch Nifedipin beeinflussbare Kalziumkanäle in das Cytosol strömt und so zumindest einen Teil der Schädigung verursacht.

Sowohl der Kalzium- als auch der Eisenchelator hatten nur eine partielle Schutzwirkung auf die Zellschädigung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ). Die Kombination beider Chelatoren hingegen sorgte für einen fast vollständigen Schutzeffekt, so dass man vermuten darf, dass die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung parallel über beide Metallionen vermittelt wird. Es kommt hierbei sowohl zu einer eisenkatalysierten Generierung von  $\cdot\text{OH}$ , die mit zellulären Makromolekülen reagieren können, als auch zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytosol, wodurch verschiedene Enzyme aktiviert werden. In beiden Fällen kommt es schließlich zu einer Zerstörung zellulärer Makromoleküle, zum Verlust der zellulären Ionenhomöostase und letztendlich zum Zelltod.

Versuche mit der geringeren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) zeigten ebenfalls jeweils einen partiellen Schutzeffekt des Kalziumchelators Quin-2 AM und des Eisenchelators 2,2'-DPD. Es sind also, unabhängig ob die morphologischen Veränderungen auf eine Nekrose oder Apoptose hindeuten, sowohl Kalzium- als auch Eisenionen am Haarzelltod durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  beteiligt, wobei beide Ionen vermutlich unterschiedliche Rollen in der Apoptose und der Nekrose spielen (Raffray und Cohen, 1997; Nicotera und Orrenius, 1998).

Neben Kalzium- und Eisenionen spielte besonders das antioxidative Abwehrsystem der Zelle eine wichtige Rolle bei der Schädigung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Antioxidantien wie ACC und GSHe zeigten einen fast vollständigen Schutzeffekt gegen die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung (200  $\mu\text{M}$ ) der äußeren und inneren Haarzellen. GSHe kann, im Gegensatz zu GSH, von Zellen aufgenommen und in GSH umgewandelt werden (Anderson et al., 1985), das dann intrazellulär zur Verfügung steht. ACC wird ebenfalls von Zellen aufgenommen und kann dann Cystein zur Proteinsynthese und zur Synthese des Tripeptids GSH zur Verfügung

stellen. Zudem hat es auch direkte antioxidative Eigenschaften (Bock et al., 1983; Feddersen et al., 1993). GSH ist ein wichtiger Bestandteil des antioxidativen Abwehrsystems (Reed, 1990; de Groot, 1994) und die GSH-Peroxidasen gehören zu den wichtigsten Enzymen zur Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Für GSH konnte *in vivo* sogar ein Schutzeffekt gegen die Lärmschädigung belegt werden (Jacono et al., 1998). Der Redoxstatus der Zellen, der mit dem Verhältnis von reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion zusammenhängt, spielt auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Verhältnisses der reduzierten SH-Gruppen und oxidierten Disulfidbrücken in Proteinen und damit bei der Aktivität vieler Enzyme und Ionenkanäle (Reed, 1990; Halliwell und Gutteridge, 1999). Neben der GSH-Synthase gehört vor allem die GSH-Reduktase zu den Enzymen der Zelle, die den Status an reduziertem Glutathion aufrechterhalten (Reed, 1990). Der Gehalt an GSH variiert zwischen den Zellen verschiedener Organe erheblich, und somit vermutlich auch zwischen den einzelnen Zelltypen des neurosensorischen Epithels. Die äußeren Haarzellen scheinen weniger GSH zu besitzen als die Deiters-Zellen (Usami et al., 1996), was die Vermutung nahe legt, dass die unterschiedliche Empfindlichkeit dieser Zelltypen auf oxidativen Stress auf einen unterschiedlichen Gehalt an Antioxidantien wie Glutathion basiert.

### 4.3. Cisplatin

#### 4.3.1. Bedeutung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools für die Schädigung durch Cisplatin

Unter den gegebenen Umständen verursachte eine  $50 \mu\text{M}$  Cisplatinlösung als niedrigste getestete Konzentration eine signifikante Schädigung der Haarzellen. Die protektiven Effekte von 2,2'-DPD und von DFO belegen, dass Eisenionen an der Schädigung der Haarzellen durch Cisplatin beteiligt sind. 2,2'-DPD ist ein Chelator mit einer hohen Bindungsaffinität für  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $\log k(\text{Fe}^{\text{II}}) = 17,2$ ), der mit  $\text{Fe}^{\text{II}}$  einen redox-inaktiven 3:1 Komplex bildet (Martell, 1982). In Untersuchungen mit Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass 2,2'-DPD in der Lage ist, die PG SK-gebundenen intrazellulären Eisenionen nahezu vollständig zu komplexieren (Petrat et al., 1999), obwohl die chelatisierende Gruppe des Indikators PG SK (1,10-Phenanthrolin) eine höhere Bindungskapazität für  $\text{Fe}^{\text{II}}$  hat als 2,2'-DPD ( $\log k(\text{Fe}^{\text{II}}) = 21,0$  Martell, 1982). Die relativ

schnelle Wiederherstellung der PG SK-Fluoreszenz durch 2,2'-DPD zeigt, dass 2,2'-DPD gut in die Zellen gelangt, was durch seine hohe Lipophilie, und damit Membranpermeabilität, zu erklären ist. Da das nicht chelatisierende Isomer zu 2,2'-DPD, 4,4'-DPD, weder einen Effekt auf die Fluoreszenz von PG SK noch auf die Vitalität durch Cisplatin geschädigter äußerer Haarzellen hatte, kann man davon ausgehen, dass die Effekte von 2,2'-DPD (Wiederherstellung der Fluoreszenz von PG SK und Schutz vor Cisplatinintoxizität) auf seinen chelatisierenden Eigenschaften basieren.

DFO ist ein bekannter Fe<sup>III</sup>-Eisenchelator, der klinisch bei Eisenspeicherkrankheiten eingesetzt wird (Hershko, 1992; Hoffbrand und Wonke, 1997). Tierversuche haben darüber hinaus gezeigt, dass DFO z. B. auch bei cisplatinverursachten Nierenschäden protektiv wirkt (Baliga et al., 1998a). Da DFO in hohen Konzentrationen *in vivo* cytotoxisch werden kann (Olivieri et al., 1986), werden kultivierte Zellen *in vitro* üblicherweise nur mit DFO vorinkubiert (Rauen et al., 1997; Rauen et al., 1999). Ein hydrophiles Molekül, wie DFO, mit einer molekularen Masse > 500 Da, kann die Plasmamembran nur langsam passieren, und wird daher von Zellen nur langsam aufgenommen (Singh et al., 1995; Petrat et al., 1999). Trotz seiner hohen Eisenbindungs-Kapazität ( $\log k(\text{Fe}^{\text{III}}) = 31$ ; Singh et al., 1995) erfolgt die Wiederherstellung der PG SK-Fluoreszenz durch DFO deshalb nur sehr langsam und ist nach 1 h noch nicht vollständig. Die Tatsache, dass DFO ein Fe<sup>III</sup>-Chelator ist, PG SK und 2,2'-DPD aber Fe<sup>II</sup>-Chelatoren sind, spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle, da DFO durch Chelatisierung die Fe<sup>III</sup>-Ionen aus dem intrazellulären Gleichgewicht zwischen Fe<sup>II</sup> und Fe<sup>III</sup> entfernt und so die Oxidation von Fe<sup>II</sup> zu Fe<sup>III</sup> thermodynamisch begünstigt. Die geringeren Effekte von DFO auf die PG SK-Fluoreszenz und auf den Vitalitätsverlust der Haarzellen durch Cisplatin sind daher eher auf die geringere intrazelluläre Verfügbarkeit des Chelators zurückzuführen.

Salicylsäure und ihr Derivat DHB sind kleine, aber sehr hydrophile Substanzen, die Membranen ebenfalls schlecht passieren (Pearce et al., 1985). DHB ist zwar als starker Chelator für Fe<sup>III</sup> beschrieben ( $\log k(\text{Fe}^{\text{III}}) = 33,3$ ; Martell, 1982), hatte aber nahezu keinen Effekt auf die PG SK Fluoreszenz und somit auf den zellulären CIP. In den Vitalitätstests mit Cisplatin dagegen wurden äußere Haarzellen durch DHB sogar effektiver geschützt als durch 2,2'-DPD. Salicylsäure und ihre Derivate sind als Radikalfänger ( $\bullet\text{OH}$ ) bekannt und werden sogar für den Nachweis von  $\bullet\text{OH}$  eingesetzt (Bailey et al., 1997; Obata und Yamanaka, 1998). Im zellulären System ist es nur schlecht möglich, anhand von Vitalitätstests zwischen der eisenchelatisierenden und der radikalfangenden Eigenschaft dieser Substanzen zu unterscheiden, da die  $\bullet\text{OH}$ -Bildung eisenabhängig ist (Herbert et al.,

1994). Es ist bekannt, dass Cisplatin das antioxidative Abwehrsystem von Zellen stark beeinträchtigt, beispielsweise durch eine erhebliche Verringerung des Glutathiongehalts des Innenohrs (Lautermann et al., 1997). Deshalb liegt es nahe zu vermuten, dass DHB gegen die Schädigung durch Cisplatin als Antioxidans wirkt.

Die mit dem Fluoreszenzindikator PG SK ermittelten Konzentrationen des zellulären Eisens der Zellen des neurosensorischen Epithels variieren nur wenig zwischen den verschiedenen Zelltypen (1,3  $\mu\text{M}$  Fe in den inneren Haarzellen und 3,7  $\mu\text{M}$  Fe in den Hensen-Zellen). Damit korreliert die jeweilige Höhe des CIP nicht mit der sehr unterschiedlichen Empfindlichkeit der verschiedenen Zellen gegenüber Cisplatin oder  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Konzentrationen des zellulären chelatisierbaren Eisens verschiedener Säugetierzelltypen liegen im gleichen Konzentrationsbereich wie die der Innenohrzellen (Rattenhepatozyten:  $2.5 \pm 2.2 \mu\text{M}$  Eisen nach Petrat et al., 2000; 0.5-2.5  $\mu\text{M}$  Eisen nach Nielsen et al., 1993; und 3.5  $\mu\text{M}$  Eisen nach Cairo et al., 1995; Erythroleukämiezellen der Maus  $1.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$  Eisen nach Epsztejn et al., 1997; Nierenzellen 0.66  $\mu\text{M}$  Eisen nach Baliga et al., 1993). Diese sehr ähnlichen und niedrigen Konzentrationen sprechen für eine strenge Kontrolle des zellulären Eisenpools, die für einen der wichtigsten Mechanismen gegen oxidativen Stress gehalten wird (Rolfs und Hediger, 1999).

Die Zugabe von Cisplatin zu neurosensorischen Epithelien führte zu keiner Erhöhung des PG SK-detektierbaren CIP. Im Gegensatz dazu wurden in der Niere (Shenberg et al., 1994; Baliga et al., 1998a; Baliga et al., 1998b) und im Blutserum (Pollera et al., 1987; Kletter et al., 1988) eine Erhöhung der Eisenkonzentration nach Cisplatingabe festgestellt. In einigen dieser Studien wurde allerdings nicht ausschließlich der chelatisierbare, sondern der Gesamteisenpool gemessen (Pollera et al., 1987; Kletter et al., 1988; Shenberg et al., 1994). In Homogenaten der Niere, und ebenfalls im Zellüberstand von Nierenzellkulturen, wurde nach Cisplatininkubation eine Erhöhung des bleomycindetektierbaren CIP festgestellt (Baliga et al., 1998a; Baliga et al., 1998b). Messungen des CIP in Zell- und Gewebehomogenaten, wie etwa mit der Bleomycin-Methode (Gutteridge et al., 1981), neigen zu methodischen Fehlern, da durch die Zerstörung des Zellmaterials eine Freisetzung von Eisen, z. B. aus Eisenspeicherproteinen, verursacht werden kann (Petrat et al., 2002). Darüber hinaus lässt eine Messung von Eisen im Zellüberstand keine Aussage über die intrazellulären Bedingungen zu. Außerdem wurde als Ursache für den Anstieg des CIP der Nierenzellen angenommen, dass Eisen aus dem Cytochrom  $\text{P}_{450}$  freigesetzt wird (Baliga et al., 1998b). Die Konzentration an Cytochrom  $\text{P}_{450}$  im Innenohr ist nicht bekannt, wahrscheinlich ist sie aber nicht besonders hoch.

Zusammenfassend erklären diese Gründe möglicherweise, warum eine Erhöhung des CIP durch Cisplatin in der Niere, nicht aber in Zellen des Innenohres gemessen wurde.

#### **4.3.2. Die Rolle von Superoxidradikal-Anionen bei der Cisplatintoxizität**

Obwohl Cisplatin den CIP der Zellen des neurosensorischen Epithels nicht erhöht, verursachte Cisplatin doch eindeutig eine eisenabhängige Schädigung. Dieser Umstand kann möglicherweise durch die schon sehr früh stattfindende cisplatininduzierte Erhöhung der  $O_2^{\cdot-}$  Produktion erklärt werden. Cisplatin kann die Produktion von  $O_2^{\cdot-}$  auf verschiedenen Wegen erhöhen. So gibt es Hinweise auf eine  $O_2^{\cdot-}$  Produktion durch Interaktion von Cisplatin mit der DNA (Masuda et al., 1994). Außerdem bindet Cisplatin u. a. selektiv an Methionin-Gruppen des Cytochrom c (Lijuan et al., 1997) und kann die Atmungskette hemmen (Kruidering et al., 1997). Beides führt zu einer Erhöhung der  $O_2^{\cdot-}$  Produktion. Das Superoxidradikal-Anion kann spontan und auch enzymatisch katalysiert zu  $H_2O_2$  dismutieren. Es gibt Hinweise für eine Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration in Zellen bzw. in Flüssigkeiten des Innenohres nach Cisplatininkubation (Clerici et al., 1996; Kopke et al., 1997). Die Schädigung der Haarzellen des Innenohrs durch Cisplatin scheint also durch die erhöhte Produktion von  $O_2^{\cdot-}$  ausgelöst zu werden, die dann zu  $H_2O_2$  dismutieren und damit die  $H_2O_2$ -Konzentration in den Zellen erhöhen. Wie vorher schon gezeigt, ist zumindest ein Teil der von  $H_2O_2$  verursachten Zellschädigung eisenvermittelt, da  $Fe^{II}$   $H_2O_2$  reduziert, so dass  $\cdot OH$  und  $OH^-$  entstehen (Fenton-Reaktion; Halliwell und Gutteridge, 1999).

#### **4.3.3. Die Rolle von Kalzium bei der Schädigung durch Cisplatin**

Wie oben beschrieben, verursacht  $H_2O_2$  eine Schädigung der Haarzellen des neurosensorischen Epithels, die sowohl eine eisen- als auch eine kalziumabhängige Komponente hat. Auch bei der Schädigung durch Cisplatin ist der Kalziumchelator Quin-2 AM partiell protektiv und die Kombination von 2,2'-DPD mit Quin-2 AM deutlich protektiver als beide Chelatoren allein. Zur Rolle von  $Ca^{2+}$ -Ionen bei der Haarzellschädigung durch Cisplatin gibt es zwar keine weiteren Untersuchungen, aber Untersuchungen an Nierenzellen haben jedoch gezeigt, dass eine Erhöhung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration die Schädigung durch Cisplatin zumindest teilweise

vermittelt (Zhang und Lindup, 1994; Zhang und Lindup, 1996; Kim et al., 1997). Die Schädigung durch Cisplatin wird also, wie die Schädigung durch  $H_2O_2$ , teilweise durch Eisen- und teilweise durch Kalziumionen vermittelt, was die Vermutung, dass die Cisplatintoxizität durch eine Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration ausgelöst wird, stützt.

#### **4.3.4. Morphologische Veränderungen während der Cisplatininkubation**

Die morphologischen Veränderungen des neurosensorischen Epithels während der Inkubation mit Cisplatin deuten auf einen nekrotischen Zelltod hin, da bei den meisten äußeren und inneren Haarzellen sowie deren Kernen eine Schwellung aber keine Bildung von „Apoptotic Bodies“ beobachtet wurde. Nur bei wenigen Versuchsansätzen trat eine Kondensation des Chromatins auf. Morphologische Untersuchungen von neurosensorischen Epithelien des Meerschweinchens nach Inkubation mit Cisplatin *in vivo* zeigten Anzeichen für eine Apoptose der äußeren Haarzellen (Saito und Aran, 1994, Alam et al., 2000). Darüber hinaus ist in Haarzellen von Rattencochleae durch TUNEL-Tests *in vitro* DNA-Fragmentation nach Cisplatininkubation (30  $\mu$ M) nachgewiesen worden (Liu et al., 1998). In niedriger Konzentration scheint Cisplatin also eine Apoptose in den Haarzellen der Cochlea auslösen zu können, während die hier gewählte Konzentration eher eine Nekrose zur Folge hatte. Dieses dosisabhängige Umschalten von nekrotischem zu apoptotischem Zelltod ist sowohl für die Cisplatintoxizität der Niere bekannt (Lau, 1999; Okuda et al., 2000), als auch für die Haarzellschädigung durch  $H_2O_2$  hier gezeigt worden.

### **4.4. Gentamicin**

#### **4.4.1. Morphologische Veränderungen während der Schädigung durch Gentamicin**

Werden die neurosensorischen Epithelien mit verschiedenen Gentamicinkonzentrationen inkubiert, verursacht dieses eine dosisabhängige Schädigung, besonders der äußeren Haarzellen. Die geschädigten Zellen zeigten Merkmale des apoptotischen Zelltods wie Chromatinkondensation und chromatinhaltige Blebs oberhalb der Apikalplatte, bei denen es sich vermutlich um „Apoptotic Bodies“ handelte. Diese Hinweise auf einen

apoptotischen Zelltod der Haarzellen stehen im Einklang mit Befunden anderer Arbeitsgruppen. Untersuchungen zur Gentamicintoxizität *in vivo* mit Hilfe der Elektronenmikroskopie zeigen morphologische Veränderungen von Haarzellen der Cochlea (Forge, 1985; Vago et al., 1998) und des Vestibularorgans (Li et al., 1995; Zheng et al., 1999), die mit einer Apoptose in Verbindung gebracht werden. Außerdem konnte eine DNA-Fragmentation mit Hilfe des TUNEL-Tests in cochleären und vestibulären Haarzellen nachgewiesen werden (Lang und Liu, 1997; Nakagawa et al., 1997; Nakagawa et al., 1998; Forge und Li, 2000). Eine Apoptose von Haarzellen des Vestibularorgans des Huhns und des Meerschweinchens scheint eine Proliferation der Stützzellen hervorzurufen (Kil et al., 1997; Forge und Li, 2000), vermutlich um die Lücke der fehlenden Haarzellen zu schließen und damit die Lamina retikularis intakt zu halten (Ylikoski, 1974). Darüber hinaus konnte nach einer Schädigung des Innenohrs durch Gentamicin keine Entzündungsreaktion beobachtet werden, die im Falle einer Nekrose jedoch zu erwarten gewesen wäre.

Die hier verwendete Gentamicinkonzentration von 1 mM löste also eine Apoptose in den Haarzellen des neurosensorischen Epithels aus – bei einer Schädigung von ca. 55 % der äußeren Haarzellen nach 6 h Inkubation – während 50  $\mu$ M Cisplatin bei vergleichbarer Toxizität (ca. 60 % tote äußere Haarzellen nach 6 h) eine Nekrose auslöste. Es muss danach angenommen werden, dass der Schädigung durch Gentamicin bzw. Cisplatin unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen.

#### **4.4.2. Die Rolle des zellulären chelatisierbaren Eisenpools bei der Gentamicintoxizität**

Die Vitalitätstests mit den Eisenchelatoren 2,2'-DPD und DFO zeigten einen signifikanten Schutzeffekt dieser Substanzen gegenüber der Schädigung durch Gentamicin. Auch DHB schützte vor der Gentamicintoxizität, wenn auch nicht so ausgeprägt, wie gegen die Cisplatintoxizität. Antioxidantien scheinen bei der Schädigung durch Gentamicin eine geringere Rolle zu spielen als bei der Schädigung durch Cisplatin, da Gentamicin, im Gegensatz zu Cisplatin, die Konzentration an Glutathion im Innenohr nicht messbar verringert (Lautermann et al., 1997). Der geringere Schutzeffekt von DHB gegen die Schädigung durch Gentamicin ist dadurch erklärbar. Auch *in vivo* konnten DFO und auch DHB vor der Schädigung durch Gentamicin schützen (Song und Schacht, 1996; Sha und Schacht, 1999b), somit ist die Gentamicintoxizität, ebenso wie die Cisplatintoxizität, zumindest teilweise eisenvermittelt. In der vorliegenden Arbeit hatten die Eisenchelatoren

allerdings keinen Einfluss auf die durch Gentamicin hervorgerufene Kondensation des Chromatins. Das lässt vermuten, dass die von Gentamicin verursachten Prozesse, die zur Chromatinkondensation führen, nicht eisenabhängig sind, im Gegensatz zur Apoptose von Nierenzellen, bei der eine eisenabhängige Kernveränderung beobachtet wurde (Hagar et al., 1996).

Trotz der Tatsache, dass die Gentamicintoxizität teilweise eisenabhängig ist, hatte Gentamicin keinen signifikanten Einfluss auf den mit PG SK detektierbaren CIP der Zellen. Im Gegensatz dazu wurden in früheren Arbeiten erhöhte Eisenkonzentrationen in der Perilymphe des Innenohres nach systemischer Gabe von Gentamicin gemessen (Xu et al., 1995). Unklar bleibt bei diesen Untersuchungen allerdings, ob der Anstieg der Eisenkonzentration durch Gentamicin direkt hervorgerufen oder Eisen infolge des durch Gentamicin verursachten Vitalitätsverlusts, freigesetzt wurde. Auch für die Niere wird eine Erhöhung des Eisenpools postuliert, basierend auf dem Befund, dass während der Schädigung durch Gentamicin Eisen aus isolierten Nierenzellenmitochondrien freigesetzt wird (Ueda et al., 1993). Es wurde jedoch ebenfalls nicht differenziert, ob eine Erhöhung des extrazellulären Eisengehalts durch einen Vitalitätsverlust der Zellen bzw. der Mitochondrien oder durch Gentamicin direkt hervorgerufen wurde. Die Gesamteisenkonzentration der Niere steigt unter Gentamicineinfluss nicht an (Durak et al., 1995), so dass insgesamt eine Erhöhung der zellulären Eisenkonzentration durch Gentamicin eher unwahrscheinlich ist.

Außerdem konnten wir keine Verringerung des CIP durch Gentamicin feststellen, was im Widerspruch zu den Befunden steht, dass Gentamicin mit Eisen einen redox-aktiven Komplex bildet, also Eisen chelatisieren kann (Priuska und Schacht, 1995; Priuska et al., 1998). Die ermittelte Eisenbindungskonstante für den Gentamicin-Eisen-Komplex ist allerdings so niedrig (Fe-Gentamicin 1:1,  $\log k = 1,7$ ; Priuska et al., 1998), dass in der Konkurrenz zu zellulären Eisenchelatoren (z.B. ATP  $\log k = 6$ ; Browne et al., 1998) und PG SK ( $\log k(\text{Fe}^{\text{II}})$  von 1,10-Phenanthrolin = 21,0; Martell, 1982) die Bildung von Gentamicin-Eisen-Komplexen in nennenswerten Konzentrationen unwahrscheinlich ist. Auch wurde im zellfreien System gentamicingebundenes Eisen durch PG SK chelatisiert. Die Bildung dieser Gentamicin-Eisen-Komplexe soll Voraussetzung für eine toxische Wirkung von Gentamicin gegenüber isolierten Haarzellen sein, da natives Gentamicin nicht toxisch ist (Priuska und Schacht, 1995; Crann und Schacht, 1996). Angesichts der Tatsache, dass der cytosolische CIP der Haarzellen etwa so groß ist wie der der Stützzellen und auch anderer untersuchter Säugerzellen, kann ein Fehlen an Eisenionen nicht der Grund für die mangelnde Toxizität

von Gentamicin gegenüber isolierten Haarzellen sein. Eher ist anzunehmen, dass die Haarzellen, die den Stress der Isolation überstehen, resistenter gegenüber oxidativen Stress sind und deshalb innerhalb der Inkubationszeit von 1 h durch Gentamicin nicht geschädigt werden.

#### **4.4.3. Die Rolle von Kalzium bei der Gentamicintoxizität**

Kalzium spielt eine Rolle in diversen Modellen der Zellschädigung durch ROS oder Toxine (Suzuki et al., 1997; Nicotera und Orrenius, 1998). Weder für den apoptotischen Zelltod noch für eine MPT ist  $\text{Ca}^{2+}$  allerdings zwingend notwendig ( $\text{Ca}^{2+}$  kann aber beteiligt sein; Raffray und Cohen, 1997; Walker und Sikorska, 1997; Jacotot et al., 1999; Lemasters et al., 1999a). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Kalziumionen weder bei dem Vitalitätsverlust der Haarzellen durch Gentamicin noch bei den durch Gentamicin verursachten morphologischen Veränderungen der äußeren Haarzellen eine Rolle spielen. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige, aber  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -abhängige Apoptose konnte auch für andere Zelltypen, wie z. B. Astrozyten, gezeigt werden (Robb et al., 1999). Ebenso wie bezüglich des induzierten Zelltodmechanismus zeigte sich also auch bezüglich des Einflusses von  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Haarzellschädigung ein deutlicher Unterschied zwischen der Cisplatin- und der Gentamicintoxizität.

#### **4.4.4. Die Rolle der Superoxidradikal-Anionen bei der Gentamicintoxizität**

Eisenionen spielen eine Rolle bei der Schädigung der äußeren Haarzellen durch Gentamicin, was auch eine Beteiligung von ROS an dieser Schädigung nahe legt. Im chemischen System konnte gezeigt werden, dass Gentamicin in Gegenwart von Eisenionen ROS erzeugen kann (Priuska und Schacht, 1995) und auch im zellulären System scheint es die Produktion von ROS zu verstärken (Lopez-Gonzalez et al., 1999; Sha und Schacht, 1999a; Sha und Schacht, 1999c). Bei diesen Versuchen wurden die Zellen allerdings stimuliert und so schon ohne Gentamicin zu einer ROS-Produktion veranlasst. Ohne vorherige Stimulation konnte eine Erhöhung von  $\cdot\text{OH}$  in ESR-Messungen (Clerici et al., 1996), sowie von Peroxiden, gemessen durch den Fluoreszenzfarbstoff DCHF, gezeigt werden (Hirose et al., 1997). Außerdem schützt die Überexpression von SOD bei Mäusen

vor einer Innenohrschädigung durch Aminoglykoside (Sha et al., 2001a). Gentamicin scheint also die Produktion von ROS im Innenohr zu erhöhen. Im Gegensatz dazu konnten wir unter dem Einfluss von Gentamicin keine Erhöhung der  $O_2^{\cdot-}$ -Produktion in den Zellen des neurosensorischen Epithels feststellen, was aber nicht ausschließt, dass Gentamicin in der Lage sein könnte, die Produktion anderer ROS, wie z.B.  $H_2O_2$ , zu erhöhen. Auf Grund der Tatsache, dass sowohl in unseren Versuchen (Abb. 28) als auch in anderen Arbeiten (Garetz et al., 1994a; Sha und Schacht, 2000) Eisenchelatoren und Antioxidantien protektiv wirken, ist anzunehmen, dass zumindest ein Teil der Schädigung durch ROS, wie z. B.  $H_2O_2$ , vermittelt wird.

#### 4.4.5. Bedeutung von Mitochondrien für die Gentamicintoxizität

Einige Toxine und auch ROS können die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätspore fördern und damit eine MPT auslösen. Zum Nachweis einer MPT wurde von der Arbeitsgruppe um J.J. Lemasters eine Methode entwickelt, die auf der Umverteilung der Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM und TMRM in das bzw. aus dem mitochondrialen Kompartiment beruht, so dass der Permeabilitätsübergang am konfokalen Mikroskop beobachtet werden kann (siehe auch Kapitel 6.4.3.; Nieminen et al., 1995; Lemasters et al., 1999b). Da in Haarzellen Mitochondrien nicht als Aussparungen im von Calcein gefärbten Cytosol erkennbar waren, war diese Methode hier allerdings nicht anwendbar. Ein ähnliches Problem wurde auch schon für andere Zelltypen berichtet (Lemasters und Nieminen, 1999; Petronilli et al., 1999). Unsere Versuche mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRM zeigten, dass das mitochondriale Membranpotenzial ( $\Delta\Psi_m$ ) der äußeren Haarzellen bereits 1 h vor dem Zelltod, d. h. vor der Aufnahme von PI, verloren geht. In Vitalitätstests konnte zudem gezeigt werden, dass der MPT-Hemmstoff CsA gegen die Schädigung durch Gentamicin schützt. Obwohl wir eine MPT im Sinne der oben zitierten Methode nicht direkt zeigen konnten, sprechen unsere Ergebnisse dennoch dafür, dass die Schädigung der äußeren Haarzellen durch Gentamicin über eine MPT verläuft.

Auch in der Literatur findet man einige Daten, die dafür sprechen, dass die MPT *in vivo* bei der Gentamicintoxizität eine Rolle spielt. So wurde in früheren morphologischen Studien in Gentamicin geschädigten Haarzellen eine Schwellung und der Untergang von Mitochondrien beobachtet (Wersall et al., 1973), wobei beides ein spätes Stadium der MPT darstellen könnte. Außerdem konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass

Gentamicin in Haarzellen in der Nähe der Plasmamembran, des Kerns und der Mitochondrien lokalisiert ist (Tachibana et al., 1985), während andere Aminoglykoside sogar in der Lage waren, den Sauerstoffverbrauch des neurosensorischen Epithels zu verringern (Sato et al., 1969). Darüber hinaus wird Cytochrom *c* *in vivo* bei der Apoptose von vestibulären Haarzellen durch Aminoglykoside freigesetzt, wobei diese Freisetzung durch CsA gehemmt werden kann (Nakagawa und Yamane, 1999) und Gentamicin selbst eine Freisetzung von Cytochrom *c* und AIF aus Lebermitochondrien verursachen kann (Mather und Rottenberg, 2001).

In unseren Experimenten fand die Kondensation des nukleären Chromatins der äußeren Haarzellen vor der MPT statt und wurde auch durch CsA und Eisenchelatoren nicht verhindert. Es gibt Berichte über die Induzierung einer Apoptose durch eine direkte Schädigung der DNA des Zellkerns, die dann ihrerseits eine MPT auslöst und die Caspasenkaskade aktiviert (Robertson et al., 2000). Für Haarzellen konnte gezeigt werden, dass die c-Jun N-Terminal Kinase, die an rezeptorvermittelter Apoptose beteiligt ist, während der Gentamicintoxizität aktiviert wird (Pirvola et al., 2000). Da Gentamicin an Phospholipide der Plasmamembran bindet (Williams et al., 1987), ist eine Aktivierung dieses Signalwegs durch Veränderungen der Plasmamembran, die dann zu kernverändernden Prozessen führen, denkbar. Dies könnte bedeuten, dass Gentamicin eine Apoptose im Innenohr auslöst, indem es den Zellkern schädigt, was dann zu einer Dysfunktion der Mitochondrien führt. Auf der anderen Seite kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide Phänomene (MPT und Kernveränderungen) unabhängig voneinander durch Gentamicin ausgelöst werden und zusammen zum Zelltod führen.

## 5. Zusammenfassung

Um *in vitro* Einflussfaktoren der Innenohrschädigungen durch  $H_2O_2$ , Cisplatin und Gentamicin genauer erforschen zu können, wurde zunächst das *in vitro*-Modell des unfixierten neurosensorischen Epithels der Meerschweinchencochlea etabliert. Da die Vitalität der verschiedenen Zellen des Epithels in gepufferter Salzlösung (HBSS) mindestens 6 h erhalten blieb, wurden alle Untersuchungen innerhalb dieser Zeitspanne durchgeführt. Die empfindlichsten Zellen gegenüber allen eingesetzten Substanzen waren die äußeren Haarzellen, gefolgt von den inneren Haarzellen. Stützzellen (Hensen-Zellen und Deiters-Zellen) wurden nicht durch  $H_2O_2$ , Cisplatin oder Gentamicin geschädigt. Dieses Schädigungsmuster entspricht dem *in vivo* beobachteten Schädigungsverlauf nach Injektion von Cisplatin oder Gentamicin und auch nach traumatischen Lärm.

Aus Versuchen mit  $H_2O_2$  ging hervor, dass diese Sauerstoffspezies Haarzellen dosisunabhängig (200  $\mu M$  oder 50  $\mu M$ ) sowohl kalzium- als auch eisenabhängig schädigt. Auch Antioxidantien wie Glutathion oder N-Acetylcystein spielen bei der Schädigung durch  $H_2O_2$  (200  $\mu M$ ) eine wichtige Rolle. Die morphologischen Veränderungen der Haarzellen in Gegenwart der hohen  $H_2O_2$ -Konzentration deuteten auf einen nekrotischen, die in Gegenwart der niedrigeren Konzentration hingegen auf einen apoptotischen Zelltod hin. Das heißt, dass beide  $H_2O_2$ -induzierten Schädigungstypen sowohl durch Kalzium- als auch durch Eisenionen vermittelt werden.

Auch die Schädigung der äußeren Haarzellen durch Cisplatin war teilweise eisen- und teilweise kalziumabhängig. Die Rolle des zellulären chelatisierbaren Eisenpools wurde mit dem Fluoreszenzindikator Phen Green SK durch Laser Scanning-Mikroskopie genauer charakterisiert. Es zeigte sich, dass die Eisenchelatoren 2,2'-Dipyridyl und Deferoxamin den Phen Green SK-detektierbaren chelatisierbaren Eisenpool der Zellen komplexieren konnten. Dabei war das lipophile 2,2'-Dipyridyl deutlich effektiver als das hydrophile Deferoxamin, was sich auch in den Befunden der Vitalitätstests widerspiegelte. Die mittels quantitativer Laser Scanning-Mikroskopie bestimmten Konzentrationen des cytosolischen chelatisierbaren Eisens variierten in den verschiedenen Zelltypen nur geringfügig (zwischen  $1,3 \pm 0,4 \mu M$  Eisen in den inneren Haarzellen und  $3,7 \pm 1,7 \mu M$  Eisen in den Hensen-Zellen) und können die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelltypen für  $H_2O_2$ , Cisplatin und auch Gentamicin nicht erklären. Die Zugabe von Cisplatin zu neurosensorischen Epithelien bewirkte keine Veränderung des Phen Green SK-detektierbaren chelatisierbaren Eisenpools aller vier Zelltypen. Durch eine Reduktion von Nitrotetrazoliumblausäure konnte jedoch, besonders in den Haarzellen, eine Erhöhung der Superoxidradikal-Anionen-Produktion in Gegenwart von Cisplatin gezeigt werden. Die cisplatininduzierte Schädigung

der Haarzellen wird demnach durch eine erhöhte Produktion der Superoxidradikal-Anionen hervorgerufen, die dann teilweise eisen- und kalziumabhängig ohne detektierbare Veränderung des chelatisierbaren Eisenpools der Zellen verläuft. Die morphologischen Veränderungen der Zellen sprechen dafür, dass 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin eine Nekrose der Haarzellen auslöst.

Gentamicin verursachte eine konzentrationsabhängige Schädigung der Haarzellen des neurosensorischen Epithels, die bei niedrigeren Konzentrationen (0,5 mM und 1mM) eine eisenunabhängige Kondensation des Chromatins der Haarzellen zeigte. Dieser Hinweis sowie die Beobachtung von Blebs oberhalb der Apikalplatten der Haarzellen deuten auf einen apoptotischen Zelltod hin. Ähnlich der Schädigung durch Cisplatin konnte auch die durch Gentamicin verursachte Haarzellschädigung durch Eisenchelatoren teilweise gehemmt werden, während Kalziumionen keinen Einfluss auf die Toxizität hatten. Trotz einer teilweise eisenabhängigen Schädigung der Haarzellen durch Gentamicin konnte weder eine Veränderung des chelatisierbaren Eisenpools der Zellen des neurosensorischen Epithels noch eine Erhöhung der Superoxidradikal-Anionen-Produktion detektiert werden. Bereits 1 Stunde vor Eintritt des Todes der äußeren Haarzellen kam es aber zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials und Cyclosporin A, ein Inhibitor der mitochondrialen Permeabilitätspore, konnte vor dem durch Gentamicin verursachten Vitalitätsverlust der äußeren Haarzellen teilweise schützen. Zusammengefasst sind dies deutliche Hinweise dafür, dass Gentamicin eine Apoptose auslöst, bei der ein mitochondrialer Permeabilitätsübergang stattfindet.

Trotz der zahlreichen parallelen Vorbefunde der Literatur beruht die Toxizität von Gentamicin auf einem anderen Mechanismus als die von Cisplatin. Gentamicin scheint in den äußeren Haarzellen des neurosensorischen Epithels der Meerschweinchencochlea ausschließlich eisenabhängig eine Apoptose auszulösen, in deren Verlauf ein mitochondrialer Permeabilitätsübergang stattfindet. Cisplatin hingegen löst bei vergleichbarer Toxizität in den äußeren Haarzellen Nekrose aus, die durch eine erhöhte Produktion von Superoxidradikal-Anionen verursacht wird und sowohl eisen- als auch kalziumabhängig ist. Teilweise eisen- und kalziumabhängig ist auch die Toxizität von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , unabhängig davon, ob höhere Konzentrationen eine Nekrose oder niedrigere eine Apoptose verursachen. Die ermittelten Konzentrationen des chelatisierbaren Eisens der verschiedenen Zelltypen des neurosensorischen Epithels korrelierten nicht mit der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Cisplatin und Gentamicin und lieferten somit keine Erklärung für die höhere Empfindlichkeit der Haarzellen.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Material

#### 6.1.1. Versuchstiere

Das cochleäre neurosensorische Epithel wurde weiblichen Meerschweinchen des Stammes Tricolor, bezogen von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland), Charles River France (Saint-Aubin-Les-Elbeuf, Frankreich) und Charles River Czech (Prag, Tschechien), entnommen.

#### 6.1.2. Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Quellen bezogen:

Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Messer Griesheim, Krefeld, Deutschland
Hanks <sup>6</sup> Balanced Salt Solution (HBSS) und Gentamicin	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES), Dimethylsulfoxid (DMSO), Imidazolpuffersubstanz, Hypoxanthin, di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Natriumchlorid (NaCl) Natriumhydroxid (NaOH) und di-Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), N-Acetylcystein (ACC), Glutathionmonoethylester (GSHe) Bisbenzimid (H33342), 8-Hydroxychinolin, Eisen (III) Chlorid (FeCl <sub>3</sub> ), 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB), Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), Katalase, Nifedipin,	

2,2'-Dipyridyl (2,2'-DPD) und 4,4'-Dipyridyl (4,4'-DPD)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT)	Fluka, Buchs, Schweiz
Xanthinoxidase	Boehringer Mannheim, Deutschland
Propidiumjodid (PI), Quin-2 AM, Phen Green SK Diacetat (PG SK) Phen Green SK di-Kaliumsalz, SYTO Green 16, Calcein AM und Tetramethylrhodamin- methylester-perchlorat (TMRM) Niederlande	Molecular Probes Europe, Leiden,
Deferoxaminmesilat (Desferal <sup>®</sup> ; DFO)	Novartis Pharma, Nürnberg, Deutschland
Cisplatin (Platinex <sup>®</sup> ) Deutschland	Bristol Myers Squibb, München,
Cyclosporin A (CsA)	Sandoz, Nürnberg, Deutschland
Siliconelastomer (Sylgard SYLG 184)	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland

### 6.1.3. Sonstige Materialien

Für die Präparation wurden folgende Geräte benötigt:

Dumont Pinzette Nr. 4 und Nr. 5, Universalschere Deckgläschen, Ø 28 mm	Peter Oehmen GmbH, Essen, Deutschland
House-Lanzenmesser und Häkchen, halbspitz	Wepromed, Wesel, Deutschland
Fixierpinzette, Hohlmeisselzange Deutschland	Medicon Instrumente, Tuttlingen,
Mikrofederschere	Roeser, Essen, Deutschland
Stereomikroskop und Kaltlichtlampe	Leica, Wetzlar, Deutschland
Petrischalen 60 x 15 mm	Falcon <sup>®</sup> , Becton Dickinson Deutschland, Heidelberg

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden folgende Geräte benutzt:

modifizierte Pentz-Kammer	Technisches Zentrallabor, Universitätsklinik Essen
inverses Fluoreszenz- mikroskop (Axiovert 135 TV) und Laser Scanning-Mikroskop (LSM 510)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

## 6.2. Präparation des neurosensorischen Epithels

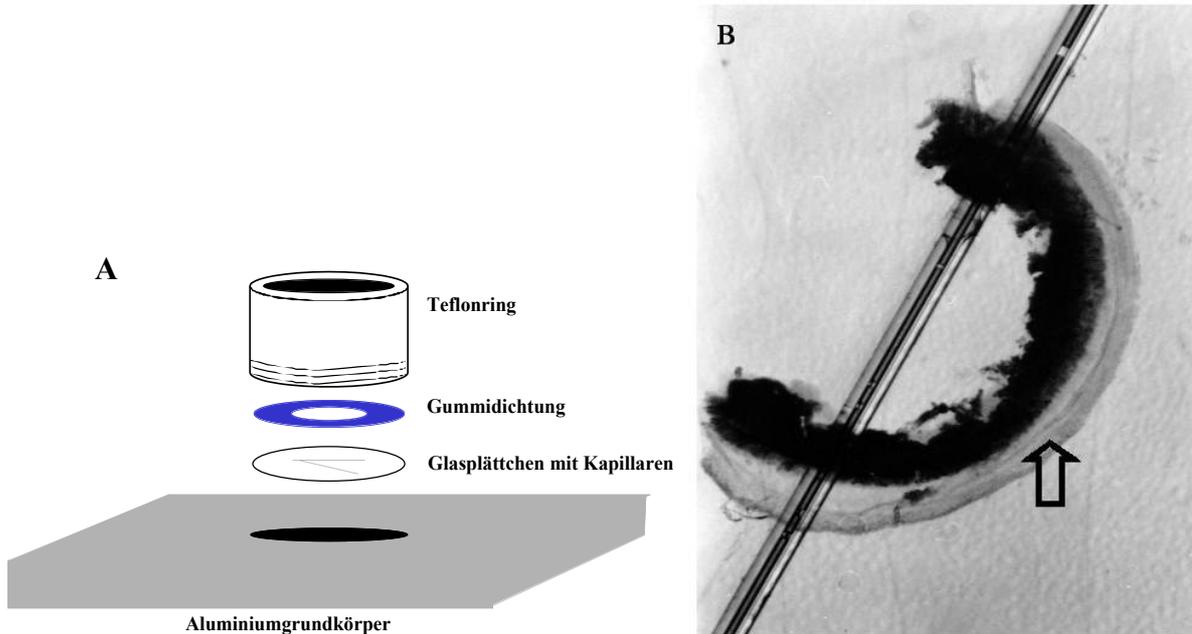
Alle Versuchstiere wurden nach der Lieferung eine Woche in den Räumen des Zentralen Tierversuchslabors des Universitätsklinikums Essen gehalten. Die Cortischen Organe wurden nur von solchen Tieren entnommen, die einen positiven Preyer Reflex zeigten. Nach einer zweiminütigen CO<sub>2</sub>-Betäubung wurden die Tiere dekapitiert. Die Felsenbeine wurden zügig entnommen, geöffnet und in HBSS überführt. Das HBSS wurde vorher mit 5 mM HEPES versetzt, mit Natronlauge auf pH 7,4 und mit 4 M NaCl auf 300 ± 2 mOsm eingestellt. Das neurosensorische Epithel der Cochlea wurde in etwa halbe Windungen umfassende Stücke

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)**

Substanz	Konzentration
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	0,95 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5,3 mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,44 mM
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O)	0,49 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	0,41 mM
Natriumchlorid (NaCl)	136,75 mM
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O)	0,34 mM
D-Glucose	10 mM
(HEPES)	5 mM, nachträglich zuge- setzt)

unterteilt und vorsichtig entnommen. Verwendet wurden die zwei Stücke der oberen (apikalen) und der mittleren (medialen) Windungen; die basale Windung wurde nicht entnommen. Die Epithelien wurden in 100 µl HBSS auf Deckgläsern überführt und unter einer Glaskapillare, die an einem Ende auf dem Deckgläschen mit einem Silikonelastomer

befestigt war, festgeklemmt. Die Deckgläschen wurden in modifizierte Pentz-Kammern eingespannt (Abb. 29A; Pentz et al., 1981), so dass die Häutchen am Mikroskop beobachtet werden konnten (Abb. 29B). Alle Arbeitsschritte wurden bei 37°C durchgeführt.



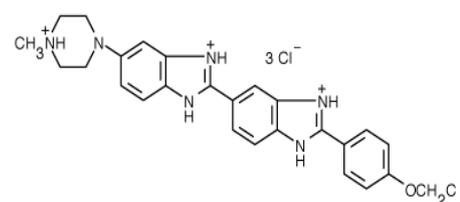
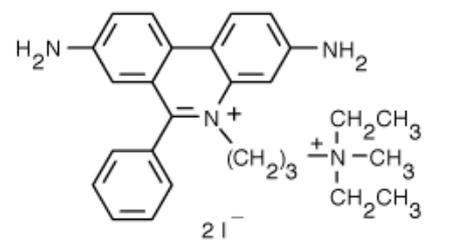
**Abb. 29**

A: Skizze einer Pentz-Kammer. In diese Kammern wurden die Glasplättchen, auf denen die neurosensorischen Epithelien unter den Glaskapillaren festgeklemmt wurden, eingespannt. Der Grundkörper der Kammer ist aus Aluminium, damit die Zellen auf dem Glasplättchen auf einer Wärmeplatte zügig auf 37°C erwärmt werden können.

B: Neurosensorisches Epithel (Pfeil), festgeklemmt unter einer Glaskapillare. Nach der Entnahme der Windungen des neurosensorischen Epithels einer Meerschweinchencochlea wurden diese in einem Tropfen HBSS auf einem Glasplättchen festgeklemmt.

### 6.3. Vitalitätstests

In Zellen mit intakter Zellmembran kann der Fluoreszenzfarbstoff PI (Abb. 30 oben) nicht eindringen und damit nicht in die DNA interkalieren. Für unsere Vitalitätstests haben wir uns diesen Umstand zunutze gemacht, indem wir die Zellen mit dem membranpermeablen Kernfarbstoff H33342 (Abb. 30 unten) und mit PI gefärbt haben. Kerne lebender Zellen erschienen im Fluoreszenzlicht dann durch H33342 blau bis



**Abb. 30**

oben: Propidiumjodid

unten: Bisbenzimid H33342



### 6.3.1. Vitalitätstests zur Untersuchung der Wasserstoffperoxidtoxizität

Die Zellschädigung des neurosensorischen Epithels durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde untersucht, indem die Epithelien des einen Ohres mit 200  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (in HBSS mit 100  $\mu\text{M}$  DTPA, um das Abreagieren von  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit extrazellulärem, kontaminierendem Eisen zu verhindern) bis zu 8 h inkubiert wurden. Kontrollen wurden mit den Epithelien des jeweils anderen Ohres in HBSS mit DTPA (100  $\mu\text{M}$ ) ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  durchgeführt. Die zuerst präparierten Epithelien wurden gleichmäßig auf die Proben- und die Kontrollgruppe verteilt. Nach 1, 2, 4, 6 oder 8 h wurden die Epithelien mit H33342 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und PI (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 10 min gefärbt, wobei jedes Epithel maximal dreimal gefärbt wurde. Die Stammlösungen beider Farbstoffe wurde 100fach konzentriert in Wasser (bidestilliert) angesetzt und jeweils direkt vor den Versuchen mit HBSS herunterverdünnt. Nach der Färbung wurden die Epithelien mit HBSS gewaschen und die Inkubationslösung (HBSS mit 100  $\mu\text{M}$  DTPA mit oder ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) wieder auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden am Fluoreszenzmikroskop mit einer Anregung von  $380 \pm 10$  nm und einem Emissionsfilter  $\geq 520$  nm die Kerne lebender und toter Zellen gezählt und der prozentuale Anteil der toten Zellen berechnet. Darüber hinaus wurden Protektionsversuche durchgeführt, bei denen die Epithelien des einen Ohres mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert wurden, während dem Puffer der Epithelien des anderen Ohres zusätzlich entweder Nifedipin (3  $\mu\text{M}$ ), 2,2'-DPD (0,1 mM; Abb. 31), 4,4'-DPD (0,1 mM; Abb. 31) oder ACC (10 mM) zugefügt wurden. In Versuchen mit Quin-2 AM (10  $\mu\text{M}$ ; Abb. 31) und GSHe (4 mM; Abb. 31) wurden die Epithelien 30 min mit der Substanz in HBSS alleine vorinkubiert und danach  $\text{H}_2\text{O}_2$  alleine zugesetzt. Bei der Kombination von Quin-2 AM und 2,2'-DPD wurden die Epithelien zunächst mit Quin-2 AM vorinkubiert und dann in Anwesenheit von 2,2'-DPD  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugesetzt. In allen Versuchen, bei denen DMSO als Lösungsmittel diente (siehe Tabelle 3), wurde als Kontrolle die entsprechende DMSO-Menge der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Kontrolle zugesetzt. Die Vitalität wurde wie oben beschrieben ermittelt.

### 6.3.2. Vitalitätstests zur Untersuchung der Cisplatintoxizität

Zur Ermittlung der Zellschädigung durch Cisplatin wurden die Epithelien in HBSS mit 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin inkubiert. Auch hier wurde die Schädigung der Epithelien des einen Ohres mit der der Epithelien des anderen Ohres unter Kontroll-

bedingungen verglichen. Nach 2, 4 und 6 h wurden die Epithelien mit H33342 und PI gefärbt und die Vitalität der verschiedenen Zelltypen wie beschrieben bestimmt. Um den Einfluss von Kalzium- und Eisenionen auf die Schädigung durch Cisplatin zu testen, wurden die Epithelien 6 h mit 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin in An- oder Abwesenheit des Eisenchelators 2,2'-DPD (100  $\mu\text{M}$ ), dessen Isomer 4,4'-DPD (100  $\mu\text{M}$ ) oder DHB (10 mM) inkubiert. Die Epithelien wurden ebenfalls nach 2, 4 und 6 h gefärbt und die Vitalität bestimmt. Für Versuche mit dem Eisenchelator DFO (10 mM; Abb. 31) und dem Kalziumchelator Quin-2 AM (10  $\mu\text{M}$ ) wurden die Epithelien 30 min mit den Chelatoren vorinkubiert und anschließend insgesamt 6 h mit Cisplatin inkubiert. Kontrollen wurden mit HBSS (mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für die Ansätze mit Quin-2 AM) vorinkubiert. Die Stammlösungen der hierfür eingesetzten Chemikalien sind in Tabelle 3 angegeben.

### 6.3.3. Vitalitätstests zur Untersuchung der Gentamicintoxizität

Der Einfluss von Gentamicin (0,5 mM, 1 mM oder 10 mM) auf die Vitalität der Zellen wurde wie unter 6.3.2. beschrieben bestimmt. Zusätzlich wurden Epithelien mit 1 mM Gentamicin in An- oder Abwesenheit des Eisenchelators 2,2'-DPD (100  $\mu\text{M}$ ), dessen Isomer 4,4'-DPD (100  $\mu\text{M}$ ), DHB (10 mM) oder CsA (5  $\mu\text{M}$ ) 6 h inkubiert. Für Versuche mit dem Eisenchelator DFO (10 mM; Abb. 31) und dem Kalziumchelator Quin-2 AM (10  $\mu\text{M}$ ) wurden die Epithelien 30 min mit den Chelatoren vorinkubiert und anschließend insgesamt 6 h mit 1 mM Gentamicin inkubiert. Kontrollen wurden mit HBSS (mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle für die Quin-2 AM-Ansätze) vorinkubiert. Die Stammlösungen der hierfür eingesetzten Chemikalien sind in Tabelle 3 angegeben.

## 6.4. Fluoreszenzmikroskopische Messungen

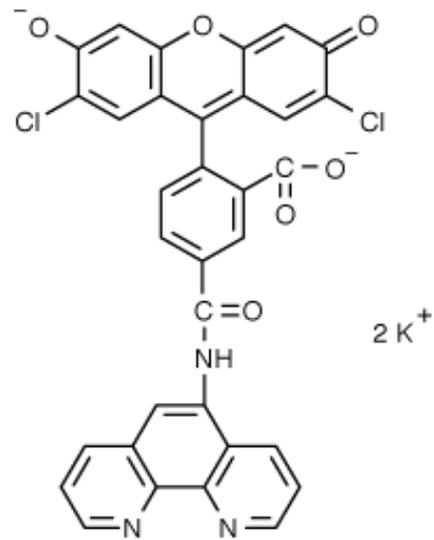
**Tabelle 4: eingesetzte Farbstoffe**

Farbstoff	Stammlösung	Endkonzentration
Phen Green SK (PG SK)	5 mM in DMSO	50 $\mu\text{M}$
Propidiumjodid (PI)	0,5 mg/ml	5 $\mu\text{g/ml}$
SYTO Green	1 mM in DMSO	1 $\mu\text{M}$
Calcein AM	100 $\mu\text{M}$ in DMSO	1 $\mu\text{M}$
Tetramethylrhodamin-methylester-perchlorat (TMRM)	50 $\mu\text{M}$ in DMSO	500 nM (Erhaltungsdosis 100 nM)

#### 6.4.1. Bestimmung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools mit Phen Green SK

Die meisten Methoden zur Bestimmung des zellulären chelatisierbaren Eisenpools, wie z.B. die Bleomycin-Methode (Gutteridge et al., 1981), sind für das neurosensorische Epithel nicht anwendbar, da das Gesamtvolumen der Innenohrzellen hierfür nicht ausreicht. Der chelatisierbare Eisenpool der einzelnen Zellen des neurosensorischen Epithels wurde daher mit einer Methode basierend auf dem Fluoreszenzfarbstoff PG SK (Abb. 32) und der Laser Scanning-Mikroskopie bestimmt (Petrat et al., 1999, Petrat et al., 2000). Die Epithelien wurden dazu 30 min mit 50  $\mu\text{M}$  PG SK (Stammlösung Tabelle 4) in HBSS beladen.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen, dann 2 ml HBSS auf den Epithelien belassen und die PG SK-Fluoreszenz mit einem Laser Scanning-Mikroskop aufgezeichnet. Der Farbstoff wurde bei 488 nm mit einem Argon-Laser angeregt und die Fluoreszenz durch einen Long-Pass-Filter ( $\geq 505$  nm) detektiert. Die Einstellungen für die Laserintensität und den digitalen Imagingprozeß wurden von Herrn Dr. Petrat übernommen (Petrat et al., 2000). Alle Messungen wurden im Modus „Expert Mode“ der LSM 510 Software mit einem Messintervall von 10 min durchgeführt. Um Fluoreszenzveränderungen auf Einzelzellebene quantifizieren und auswerten zu können, wurde die Software „Physiology Evaluation“ („Mean ROI“) des LSM 510 Systems genutzt. Die Messbereiche (ROI's) wurden für jeden Messzeitpunkt manuell repositioniert und somit Objektbewegungen im Verlauf einer Messung berücksichtigt. Nach Bestimmung der Ausgangsfluoreszenz wurden dem Zellüberstand (HBSS) entweder 2,2'-DPD (5 mM), das Isomer 4,4'-DPD (5 mM), DFO (10 mM), DHB (10 mM), 10  $\mu\text{M}$  Eisen(III)-Chlorid/8-Hydroxychinolin, 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin, 1 mM Gentamicin oder 50  $\mu\text{M}$  NaCl-Lösung als Lösungsmittelkontrolle zu Cisplatin bzw. 2,5 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung als Kontrolle zu Gentamicin, oder HBSS (als Negativkontrolle) zugegeben und die PG SK-Fluoreszenz über 1 h aufgezeichnet. Die Stammlösungen wurden wie in Tabelle 5 angegeben angesetzt. Am Ende jeder Messung wurde PI (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Stammlösung siehe Tabelle 4) zugegeben, um die



**Abb. 32**  
Phen Green SK (di-Kaliumsalz)

Vitalität der Zellen zu testen. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit dem Helium-Neon-Laser bei 543 nm angeregt und die Fluoreszenz durch einen Long-Passfilter ( $\geq 560$  nm) aufgezeichnet. Tote Zellen wurden von den Auswertungen ausgeschlossen.

**Tabelle 5: Zusätze in Versuchen mit Phen Green SK**

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
2,2'-DPD	500 mM in DMSO	5 mM
4,4'-DPD	50 mM in H <sub>2</sub> O	5 mM (pH-Wert neu eingestellt)
DFO	1 M in HBSS	10 mM
DHB	1 M in HBSS	10 mM
Eisen(III)-Chlorid/8-Hydroxychinolin	1 mM in DMSO	10 $\mu$ M

Der direkte Einfluss von Cisplatin und Gentamicin auf die PG SK Fluoreszenz wurde in einem zellfreien Puffersystem getestet. Dazu wurden 10 mM Imidazolpuffer auf pH 7,2 eingestellt und 11  $\mu$ M Phen Green SK di-Kaliumsalz zugegeben, da diese Konzentration der mittleren PG SK-Konzentration der äußeren Haarzellen entspricht. Die Indikatorfluoreszenz wurde am Laser Scanning-Mikroskop mit denselben Einstellungen wie für die zellulären Messungen aufgezeichnet. Nach Bestimmung der Ausgangsfluoreszenz wurde entweder Cisplatin, NaCl-Lösung, Gentamicin oder Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung, entsprechend den Versuchen mit den neurosensorischen Epithelien, zugesetzt und die PG SK-Fluoreszenz über 1 h aufgezeichnet.

Um den chelatisierbaren Eisenpool auf zellulärer Ebene zu bestimmen, wurde der membranpermeable Eisenchelator 2,2'-DPD im Überschuss (5 mM) zugegeben. Die zelluläre Ausgangsfluoreszenz des Indikators ergibt sich aus der Fluoreszenz des intrazellulär vorhandenen Indikators, die durch das zelluläre chelatisierbare Eisen partiell gelöscht ist. Durch einen Überschuss an 2,2'-DPD kommt es zu einer nahezu vollständigen Eisenumverteilung vom Indikator zum Chelator, wodurch die Intensität der Indikatorfluoreszenz ansteigt, d. h. die Fluoreszenz des Indikators wurde nahezu komplett wiederhergestellt. Die Differenz zwischen der Ausgangsfluoreszenz und der Fluoreszenz nach Zugabe von 2,2'-DPD ( $\Delta$  Fluoreszenz) ist daher ein Maß für die Konzentration des PG SK-detektierbaren zellulären chelatisierbaren Eisens. Die  $\Delta$  Fluoreszenzbeträge wurden anschließend mit der Fluoreszenzlöschung verglichen, die definierte Konzentrationen an Eisenionen in einer *ex situ*-Kalibrierung hervorgerufen haben (1  $\mu$ M Fe<sup>II</sup> löscht 178 Fluoreszenzeinheiten; Petrat et al., 2000). Pro Versuchsansatz wurden jeweils alle

Zellen in einem Gesichtsfeld (ca. 30 äußere Haarzellen, 10 innere Haarzellen und 10 Hensen-Zellen oder 10-20 Deiters-Zellen) ausgewertet. Zellen, deren Fluoreszenzintensität einen bestimmten Ausgangswert unterschritten, da die Fluoreszenz des Farbstoffs nahezu komplett gelöscht war, sowie Zellen, die nach der Messung PI-positiv waren, wurden aus der Kalkulation ausgeschlossen. Die Farbstoffkonzentration in den einzelnen Zellen wurde mit Hilfe einer zweiten *ex situ*-Eichung aus der maximalen Fluoreszenz nach Entquenchung mit 2,2'-DPD bestimmt (Petrat et al., 2000).

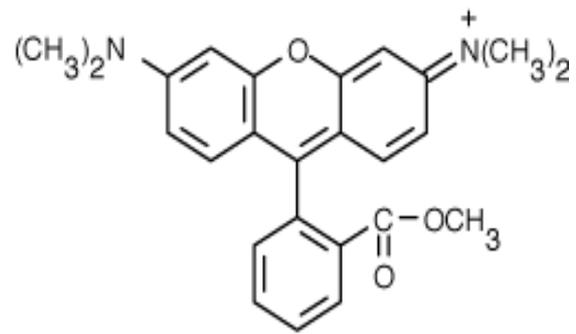
#### **6.4.2. Untersuchungen zur Kernmorphologie mit SYTO Green und Propidiumjodid**

Da am Laser Scanning-Mikroskop kein Laser für die Angerueung des Fluoreszenzfarbstoffs H33342 zur Verfügung stand, wurde SYTO Green verwendet, um detaillierte Aufnahmen der Kerne machen zu können. Die Epithelien wurden dazu 10 min mit SYTO Green (1  $\mu\text{M}$ ; Stammlösung Tabelle 4) gefärbt, gewaschen und anschließend 6 h mit PI (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in 2 ml HBSS inkubiert. Zusätzlich wurden entweder 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , 50  $\mu\text{M}$  Cisplatin oder 1 mM Gentamicin zugegeben, um die Schädigung auszulösen. SYTO Green wurde mit dem Argon-Laser bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz mit einem Band-Passfilter (505 – 550 nm) detektiert; PI wurde mit dem Helium-Neon-Laser bei 543 nm angeregt und die Fluoreszenz mit einem Long-Pass-Filter  $\geq 560$  nm aufgezeichnet. Die Einstellungen für die Laserintensität und den digitalen Imagingprozeß wurden für jeden Versuchsansatz mit der LSM-Software „Expert Mode“ optimiert. Darüber hinaus wurden einige Epithelien mit Calcein AM beladen, um das Cytosol anzufärben. Da beim Zelltod die Plasmamembran permeabel wird, kann PI in die Zellen und damit in den Zellkern eindringen, gleichzeitig leckt Calcein AM zusammen mit dem Cytosol aus der Zellen aus, so dass die Farbstoffumverteilung den Zelltod anzeigt. Die Calceinfluoreszenz (Stammlösung Tabelle 5) wurde mit den gleichen Einstellungen detektiert, die auch für die Fluoreszenzmessungen mit SYTO Green verwendet wurden.

#### **6.4.3. Nachweis eines mitochondrialen Permeabilitätsübergangs mittels Umverteilung von Fluoreszenzfarbstoffen**

Bei der MPT wird in der inneren mitochondrialen Membran eine durch CsA hemmbare Pore geöffnet, durch die ein Stoffaustausch zwischen dem Cytosol und der

mitochondrialen Matrix zustande kommt. Um diesen Vorgang am Laser Scanning-Mikroskop sichtbar zu machen, wurde in der Arbeitsgruppe von J. J. Lemasters eine Methode entwickelt, bei der die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Calcein AM, das in Zellen mit intakten Mitochondrien ausschließlich cytosolisch lokalisiert ist, und TMRM, das sich in Mitochondrien



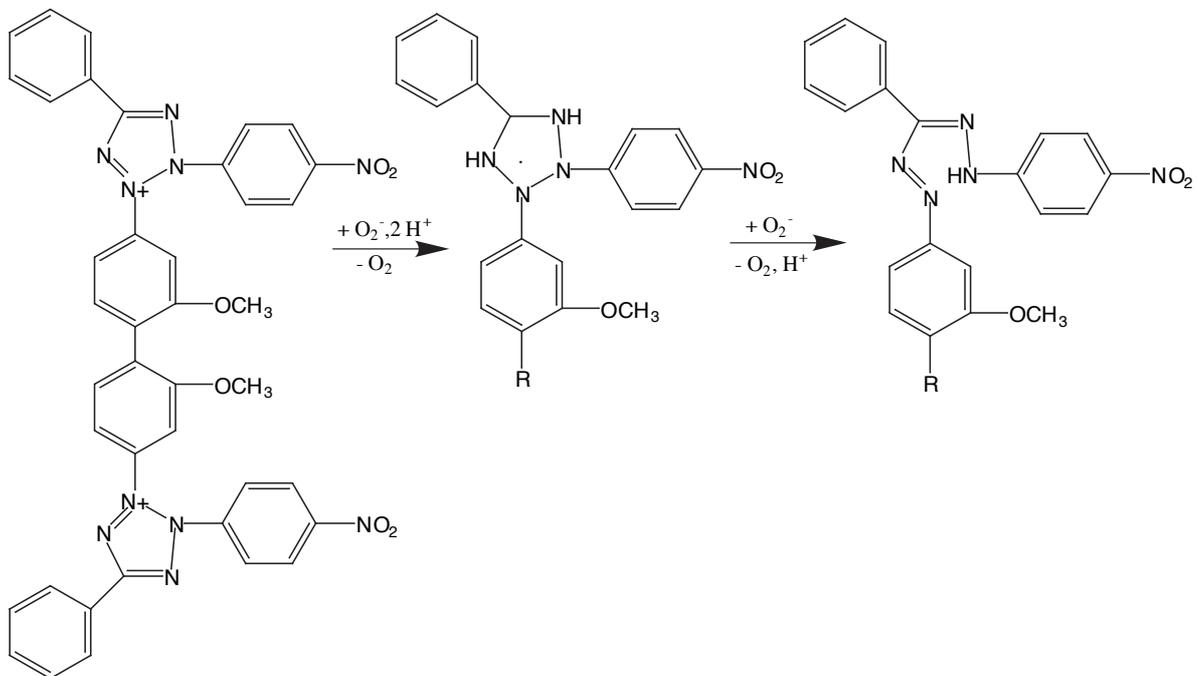
**Abb. 34**  
Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM)

mit einem intakten Membranpotenzial anreichert (Abb. 34), beladen werden (Nieminen et al., 1995; Lemasters et al., 1999b). Durch das Öffnen der Pore während der MPT verliert das Mitochondrium sein Membranpotenzial, so dass TMRM aus den Mitochondrien austritt, während Calcein durch die Pore in die mitochondriale Matrix diffundiert. Diese Indikatorverteilung kann mittels Laser Scanning-Mikroskopie verfolgt werden. In unseren Versuchen wurden die Epithelien 30 min mit Calcein AM (1  $\mu$ M), SYTO Green (1  $\mu$ M) und TMRM (500 nM) gefärbt und anschließend zweimal mit HBSS gewaschen. Die Stammlösungen der Fluoreszenzfarbstoffe sind in Tabelle 4 angegeben. Die Epithelien wurden dann 6 h mit TMRM (100 nM Erhaltungsdosis) und PI (5  $\mu$ g/ml) in 2 ml HBSS inkubiert. In den Schädigungsansätzen wurde zusätzlich 1 mM Gentamicin in den Puffer gegeben. Calcein und SYTO Green wurden mit dem Argon-Laser bei 488 nm angeregt und die Fluoreszenz unter Verwendung eines Band-Pass-Filters (505-550 nm) detektiert; PI und TMRM wurden mit dem Helium-Neon-Laser bei 543 nm angeregt und die Fluoreszenz mittels eines Long-Pass-Filters ( $\geq$  560 nm) aufgenommen. Es wurden mindestens alle 30 min Bilder aufgezeichnet. Die Einstellungen für die Laserintensität und den digitalen Imagingprozeß wurden für jeden Versuchsansatz mit der LSM-Software „Expert Mode“ optimiert.

## 6.5. Sonstige Messmethoden

### 6.5.1. Nachweis des Superoxidradikal-Anions durch Reduktion von Nitrotetrazoliumblauschwarz

Bei der Reduktion von Nitrotetrazoliumblauschwarz (NBT) durch Superoxidradikal-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) entsteht ein wasserunlösliches, farbiges Formazan, das sich am Entstehungsort ablagert (Abb. 35; Pick, 1986; Romero et al., 1997; Rauen et al., 2000). Wir haben diese Reaktion genutzt, um die Entstehung von  $O_2^{\cdot-}$  in den Zellen des neurosensorischen Epithels qualitativ nachzuweisen. Epithelien wurden mit 1 mg NBT pro ml HBSS inkubiert, zu dem in der Schädigungsgruppe 50  $\mu$ M Cisplatin oder 1 mM Gentamicin zugesetzt wurde. Nach  $1/2$ , 1, 2 und 4 h wurden die Epithelien an einem inversen Fluoreszenzmikroskop im Durchlicht untersucht und fotografiert. Um zu überprüfen, ob Gentamicin die Reduktion von NBT durch  $O_2^{\cdot-}$  direkt hemmt, wurde in einem zellfreien Phosphatpuffer die Reduktion von NBT durch  $O_2^{\cdot-}$  gemessen. Das  $O_2^{\cdot-}$  wurde von einem System aus der Xanthinoxidase, Hypoxanthin, und Katalase produziert, dem in einem Ansatz zusätzlich Gentamicin zugefügt wurde (siehe Tabelle 6).



**Abb. 35**

Reduktion von Nitrotetrazoliumblauschwarz (NBT) durch Superoxidradikal-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) zu Formazan

**Tabelle 6: O<sub>2</sub><sup>-</sup>-produzierendes System in Phosphatpuffer**

Substanz	Konzentration
di-Kaliumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat	100 mM
Xanthinoxidase	100 U/ml
Hypoxanthin	5 mM
Katalase	500 U/ml

## 6.6. Statistik

Alle Experimente wurden viermal mit Zellen von verschiedenen Tieren durchgeführt. Unterschiede in der Vitalität der Zellen zwischen der Versuchsgruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe wurden mit dem gepaarten Student's *t*-Test auf ihre statistische Signifikanz geprüft. Ein p-Wert von kleiner als 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Die dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die in den Abbildungen gezeigten Kurvenverläufe sind repräsentativ für alle entsprechenden durchgeführten Versuche.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aisen P, Wessling-Resnick M und Leibold EA (1999) Iron metabolism. *Bio-Inorganic Chemistry* **3**:200-206.
- al-Harbi MM, Osman AM, al-Gharably NM, al-Bekairi AM, al-Shabanah OA, Sabah DM und Raza M (1995) Effect of desferrioxamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in normal rats. *Chemotherapy* **41**:448-454.
- Alam SA, Ikeda K, Oshima T, Suzuki M, Kawase T, Kikuchi T und Takasaka T (2000) Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. *Hear Res* **141**:28-38.
- Anderson ME, Powrie F, Puri RN und Meister A (1985) Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione. *Arch Biochem Biophys* **239**:538-548.
- Anderson ME, Naganuma A und Meister A (1990) Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester. *FASEB J* **4**:3251-3255.
- Bailey S, Fauconnet, A-L, Reinke und LA (1997) Comparison of salicylate and D-phenylalanine for detection of hydroxyl radicals in chemical and biological reactions. *Redox Report* **3**:17-22.
- Baliga R, Ueda N und Shah SV (1993) Increase in bleomycin-detectable iron in ischaemia/reperfusion injury to rat kidneys. *Biochem. J.* **291**:901-905.
- Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N und Shah SV (1998a) *In vitro* and *in vivo* evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* **53**:394-401.
- Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N und Shah SV (1998b) Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* **54**:1562-1569.
- Bernardi P, Broekemeier KM und Pfeiffer DR (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* **26**:509-517.
- Bock GR, Yates GK, Miller JJ und Moorjani P (1983) Effects of N-acetylcysteine on kanamycin ototoxicity in the guinea pig. *Hear Res* **9**:255-262.
- Breuer W, Epsztejn S und Cabantchik ZI (1995) Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *J. Biol. Chem.* **270**:24209-24215.
- Browne P, Shalev O und Hebbel RP (1998) The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. *Free Radic Biol Med* **24**:1040-1048.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X und Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:269-290.
- Buja LM, Eigenbrodt ML und Eigenbrodt EH (1993) Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med* **117**:1208-1214.
- Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, Anzon E, Tomasi A und Bernelli-Zazzera A (1995) Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J Biol Chem* **270**:700-703.
- Cao W, Carney JM, Duchon A, Floyd RA und Chevion M (1988) Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci Lett* **88**:233-238.
- Chaney S (1995) The chemistry and biology of platinum complexes with the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand. *Int J Oncol* **6**:1291-1305.
- Chen CS und Saunders JC (1983) The sensitive period for ototoxicity of kanamycin in mice: morphological evidence. *Arch. Otorhinolaryngol.* **238**:217-223.

- Cheng AG, Huang T, Stracher A, Kim A, Liu W, Malgrange B, Lefebvre PP, Schulman A und Van de Water TR (1999) Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res* **850**:234-243.
- Chiodo AA und Alberti PW (1994) Experimental, clinical and preventive aspects of ototoxicity. *Eur Arch Otolaryngol* **251**:375-392.
- Clerici WJ, DiMartino DL und Prasad MR (1995) Direct effects of reactive oxygen species on cochlear outer hair cell shape *in vitro*. *Hear Res* **84**:30-40.
- Clerici WJ (1996) Effects of superoxide dismutase and U74389G on acute trimethyltin-induced cochlear dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol* **136**:236-242.
- Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL und Butterfield DA (1996) Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* **98**:116-124.
- Clerici WJ und Yang L (1996) Direct effects of intraperilymphatic reactive oxygen species generation on cochlear function. *Hear Res* **101**:14-22.
- Comis SD, Rhys-Evans PH, Osborne MP, Pickles JO, Jeffries DJ und Pearse HA (1986) Early morphological and chemical changes induced by cisplatin in the guinea pig organ of Corti. *J. Laryngol. Otol.* **100**:1375-1383.
- Conlon BJ, Perry BP und Smith DW (1998) Attenuation of neomycin ototoxicity by iron chelation. *Laryngoscope* **108**:284-287.
- Conlon BJ und Smith DW (1998) Supplemental iron exacerbates aminoglycoside ototoxicity *in vivo*. *Hear Res* **115**:1-5.
- Corti A (1851) Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères. *Zeits wiss Zool* **3**:109-169
- Coultas L und Strasser A (2000) The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* **5**:491-507.
- Crann SA, Huang MY, McLaren JD und Schacht J (1992) Formation of a toxic metabolite from gentamicin by a hepatic cytosolic fraction. *Biochem Pharmacol* **43**:1835-1839.
- Crann SA und Schacht J (1996) Activation of aminoglycoside antibiotics to cytotoxins. *Audiol Neuro-Otol* **1**:80-85.
- Dallos P und Corey ME (1991) The role of outer hair cell motility in cochlear tuning. *Curr Opin Neurobiol* **1**:215-220.
- Dallos P, Popper AN und Fay RR ed. (1996) *The Cochlea*, Springer-Verlag, New York
- de Groot H (1994) Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology* **41**:328-332.
- Durak I, Kavutcu M, Canbolat O, Ozturk S, Ulutepe S und Gokhun IH (1995) Effects of gentamicin on iron and copper contents of kidney tissue. *Nephron* **70**:380-381.
- el Barbary A, Altschuler RA und Schacht J (1993) Glutathione S-transferases in the organ of Corti of the rat: enzymatic activity, subunit composition and immunohistochemical localization. *Hear Res* **71**:80-90.
- Engstöm H, Ades H und Andersson A (1966) Material and Methods, in *Structural pattern of the organ of Corti* (Engstöm H, Ades H und Andersson A eds) pp 13-33, Almquist und Wiksell, Stockholm.
- Epsztejn S, Kakhlon O, Glickstein H, Breuer W und Cabantchik I (1997) Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem* **248**:31-40.
- Ernst A, Reuter G, Zimmermann U und Zenner HP (1994) Acute gentamicin ototoxicity in cochlear outer hair cells of the guinea pig. *Brain Res* **636**:153-156.
- Estrem SA, Babin RW, Ryu JH und Moore KC (1981) Cis-diamminedichloroplatinum (II) ototoxicity in the guinea pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* **89**:638-645.
- Evans EF (1992) Auditory processing of complex sounds: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **336**:295-306.

- Feddersen CO, Barth P, Puchner A und von Wichert P (1993) N-acetylcysteine decreases functional and structural, ARDS-typical lung changes in endotoxin-treated rats. *Med Klin* **88**:197-206.
- Forge A (1985) Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamicin treatment. *Hear Res* **19**:171-182.
- Forge A und Li L (2000) Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hear Res* **139**:97-115.
- Gabaizadeh R, Staecker H, Liu W und Van De Water TR (1997) BDNF protection of auditory neurons from cisplatin involves changes in intracellular levels of both reactive oxygen species and glutathione. *Brain Res Mol Brain Res* **50**:71-78.
- Garetz SL, Altschuler RA und Schacht J (1994a) Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pig *in vivo*. *Hear Res* **77**:81-87.
- Garetz SL, Rhee DJ und Schacht J (1994b) Sulfhydryl compounds and antioxidants inhibit cytotoxicity to outer hair cells of a gentamicin metabolite *in vitro*. *Hear Res* **77**:75-80.
- Grune T und Davies KJ (1997) Breakdown of oxidized proteins as a part of secondary antioxidant defenses in mammalian cells. *Biofactors* **6**:165-172.
- Gutteridge JM, Rowley DA und Halliwell B (1981) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Detection of 'free' iron in biological systems by using bleomycin-dependent degradation of DNA. *Biochem J* **199**:263-265.
- Gutteridge JM (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* **41**:1819-1828.
- Hagar H, Ueda N und Shah SV (1996) Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* **271**:F209-215.
- Halliwell B und Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.
- Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J und Long LH (2000) Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and *in vivo*? *IUBMB Life* **50**:251-257.
- Hambley T (1997) The influence of structure on the activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. *Coord Chem Rev* **166**:181-223.
- Harrison RV und Evans EF (1977) The effects of hair cell loss (restricted to outer hair cells) on the threshold and tuning properties of cochlear fibres in the guinea pig. pp. 105-24. In: *Inner ear biology*. Portmann M, Aran JM, ed., Paris, INSERM.
- Henle ES und Linn S (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **272**:19095-19098.
- Herbert V, Shaw S, Jayatilleke E und Stopler-Kasdan T (1994) Most free-radical injury is iron-related: it is promoted by iron, hemin, holoferritin and vitamin C, and inhibited by desferoxamine and apoferritin. *Stem Cells* **12**:289-303.
- Hershko C (1992) Iron chelators in medicine. *Molec. Aspects Med.* **13**:113-165.
- Hickman JA und Boyle CC (1997) Apoptosis and cytotoxins. *Br Med Bull* **53**:632-643.
- Hirose K, Hockenbery DM und Rubel EW (1997) Reactive oxygen species in chick hair cells after gentamicin exposure *in vitro*. *Hear Res* **104**:1-14.
- Hoffbrand AV und Wonke B (1997) Iron chelation therapy. *J Intern Med* **740:37-41**:37-41.
- Holley MC und Lawlor PW (1997) Production of conditionally immortalised cell lines from a transgenic mouse. *Audiol Neurootol* **2**:25-35.
- Hu BH, Zheng XY, McFadden SL, Kopke RD und Henderson D (1997) R-phenylisopropyladenosine attenuates noise-induced hearing loss in the chinchilla. *Hear Res* **113**:198-206.

- Huizing EH und de Groot JC (1987) Human cochlear pathology in aminoglycoside ototoxicity - a review. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* **436**:117-125.
- Hutchin T und Cortopassi G (1994) Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:2517-2520.
- Hyde GE und Rubel EW (1995) Mitochondrial role in hair cell survival after injury. *Otolaryngol Head Neck Surg* **113**:530-540.
- Ide M und Morimitsu T (1990) Long-term effects of intense sound on hair cells of Corti's organ and endocochlear DC potential. *Auris Nasus Larynx* **17**:61-67.
- Ikeda K, Sunose H und Takasaka T (1993) Effects of free radicals on the intracellular calcium concentration in the isolated outer hair cell of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **113**:137-141.
- Ikeda K, Sunose H und Takasaka T (1994) Ion transport mechanisms in the outer hair cell of the mammalian cochlea. *Prog Neurobiol* **42**:703-717.
- Jacono AA, Hu B, Kopke RD, Henderson D, Van De Water TR und Steinman HM (1998) Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla. *Hear Res* **117**:31-38.
- Jacotot E, Costantini P, Laboureau E, Zamzami N, Susin SA und Kroemer G (1999) Mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *Ann N Y Acad Sci* **887**:18-30.
- Jahnke K (1993) Hörsturz. *Klinik der Gegenwart* **10**:3-13.
- Jaramillo F (1995) Signal transduction in hair cells and its regulation by calcium. *Neuron* **15**:1227-1230.
- Kaim W und Schwederski B (1995) *Bioanorganische Chemie. Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen*. B. G. Teubner, Stuttgart.
- Kamimura T, Whitworth CA und Rybak LP (1999) Effect of 4-methylthiobenzoic acid on cisplatin-induced ototoxicity in the rat. *Hear Res* **131**:117-127.
- Kaus S (1992) The influence of calcium on the ototoxicity of aminoglycosides. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* **112**:83-87.
- Kil J, Warchol ME und Corwin JT (1997) Cell death, cell proliferation, and estimates of hair cell life spans in the vestibular organs of chicks. *Hear Res* **114**:117-126.
- Kim YK, Jung JS, Lee SH und Kim YW (1997) Effects of antioxidants and Ca<sup>2+</sup> in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol* **146**:261-269.
- Kletter G, Parks BR, Jr, Bhatnagar A und Iyer RV (1988) Elevated serum iron levels following administration of cisplatin. *Oncology* **45**:421-423.
- Kopke RD, Liu W, Gabaizadeh R, Jacono A, Feghali J, Spray D, Garcia P, Steinman H, Malgrange B, Ruben RJ, Rybak L und Van De Water TR (1997) Use of organotypic cultures of Corti's organ to study the protective effects of antioxidant molecules on cisplatin-induced damage of auditory hair cells. *Am J Otol* **18**:559-571.
- Kroemer G und Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**:513-519.
- Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ und Nagelkerke JF (1997) Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* **280**:638-649.
- Kvietys PR, Inauen W, Bacon BR und Grisham MB (1989) Xanthine oxidase-induced injury to endothelium: role of intracellular iron and hydroxyl radical. *Am J Physiol* **257**:H1640-H1646.
- Lai MT, Ohmichi T, Egusa K, Okada S und Masuda Y (1996) Immunohistochemical localization of manganese superoxide dismutase in the rat cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **253**:273-277.

- Lang H und Liu C (1997) Apoptosis and hair cell degeneration in the vestibular sensory epithelia of the guinea pig following a gentamicin insult. *Hear Res* **111**:177-184.
- Lau AH (1999) Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int* **56**:1295-1298.
- Lautermann J, McLaren J und Schacht J (1995) Glutathione protection against gentamicin ototoxicity depends on nutritional status. *Hear Res* **86**:15-24.
- Lautermann J, Crann SA, McLaren J und Schacht J (1997) Glutathione-dependent antioxidant systems in the mammalian inner ear: effects of aging, ototoxic drugs and noise. *Hear Res* **114**:75-82.
- Lemasters JJ und Nieminen AL (1999) Negative contrast imaging of mitochondria by confocal microscopy. *Biophys J* **77**:1747-1750.
- Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, Nishimura Y, Nieminen AL und Herman B (1999a) Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* **31**:305-319.
- Lemasters JJ, Qian T, Trost LC, Herman B, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA und Nieminen AL (1999b) Confocal microscopy of the mitochondrial permeability transition in necrotic and apoptotic cell death. *Biochem Soc Symp* **66**:205-222.
- Lenarz T (1989) Treatment of sudden deafness with the calcium antagonist nimodipine. Results of a comparative study. *Laryngorhinootologie* **68**:634-637.
- Li L, Nevill G und Forge A (1995) Two modes of hair cell loss from the vestibular sensory epithelia of the guinea pig inner ear. *J Comp Neurol* **355**:405-417.
- Lijuan J, Yu C, Guozi T und Wenxia T (1997) Studies on the interaction between cytochrome c and cis-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. *J Inorg Biochem* **65**:73-77.
- Linn S (1998) DNA damage by iron and hydrogen peroxide *in vitro* and *in vivo*. *Drug Metab Rev* **30**:313-326.
- Liu W, Staecker H, Stupak H, Malgrange B, Lefebvre P und Van De Water TR (1998) Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. *Neuroreport* **9**:2609-2614.
- Lomonosova EE, Kirsch M und de Groot H (1998) Calcium vs. iron-mediated processes in hydrogen peroxide toxicity to L929 cells: effects of glucose. *Free Radic Biol Med* **25**:493-503.
- Lopez-Gonzalez MA, Delgado F und Lucas M (1999) Aminoglycosides activate oxygen metabolites production in the cochlea of mature and developing rats. *Hear Res* **136**:165-168.
- Mann W, Pilgramm M, Lohle E und Beck C (1987) Calcium antagonists and damage to the organ of Corti in acoustic trauma. *HNO* **35**:203-207.
- Martell A (1982) *Critical Stability Constants*. Plenum Press, New York.
- Martindale W und Reynolds JE (1993) *The Extra Pharmacopoeia*. Pharmaceut. Press, London.
- Masuda H, Tanaka T und Takahama U (1994) Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun* **203**:1175-1180.
- Mates M (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**:83-104.
- Mather M und Rottenberg H (2001) Polycations induce the release of soluble intermembrane mitochondrial proteins. *Biochim Biophys Acta* **1503**:357-368.
- Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K und Hishida A (1998) The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* **131**:518-526.
- Meyer zum Gottesberge A (1965) Unterschiede im Metabolismus der einzelnen Schreckenwindungen. *Acta Oto-Laryng* **59**:116-123.

- Nakagawa T, Kakehata S, Akaike N, Komune S, Takasaka T und Uemura T (1991) Calcium channel in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. *Neuroscience Letters* **125**:81-84.
- Nakagawa T, Yamane H, Shibata S und Nakai Y (1997) Gentamicin ototoxicity induced apoptosis of the vestibular hair cells of guinea pigs. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **254**:9-14.
- Nakagawa T, Yamane H, Takayama M, Sunami K und Nakai Y (1998) Apoptosis of guinea pig cochlear hair cells following chronic aminoglycoside treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **255**:127-131.
- Nakagawa T und Yamane H (1999) Cytochrome c redistribution in apoptosis of guinea pig vestibular hair cells. *Brain Res* **847**:357-359.
- Nicotera P und Orrenius S (1998) The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* **23**:173-180.
- Nicotera P, Leist M und Ferrando-May E (1999) Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. *Biochem Soc Symp* **66**:69-73.
- Niedzielski AS und Schacht J (1991) Phospholipid metabolism in the cochlea: differences between base and apex. *Hear Res* **57**:107-112.
- Nielsen P, Dullmann J, Wulfhekel U und Heinrich HC (1993) Non-transferrin-bound-iron in serum and low-molecular-weight-iron in the liver of dietary iron-loaded rats. *J Biochem* **25**:223-232.
- Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B und Lemasters JJ (1995) Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J* **307**:99-106.
- Obata T und Yamanaka Y (1998) Effect of .OH scavenging action by non-SH-containing angiotensin converting enzyme inhibitor imidaprilat using microdialysis. *J Physiol Paris* **92**:1-4.
- Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, Hashimoto Y und Inui K (2000) Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* **59**:195-201.
- Olivieri NF, Buncic JR, Chew E, Gallant T, Harrison RV, Keenan N, Logan W, Mitchell D, Ricci G, Skarf B und et al. (1986) Visual and auditory neurotoxicity in patients receiving subcutaneous deferoxamine infusions. *N Engl J Med* **314**:869-873.
- Osako S, Tokimoto T und Matsuura S (1979) Effects of kanamycin on the auditory evoked responses during postnatal development of the hearing of the rat. *Acta Otolaryngol* **88**:359-368.
- Oshima T, Ikeda K, Furukawa M, Ueda N, Suzuki H und Takasaka T (1996) Distribution of Ca<sup>2+</sup> channels on cochlear outer hair cells revealed by fluorescent dihydropyridines. *Am J Physiol* **271**:C944-C949.
- Pearce RA, Finley RJ, Mustard RA, Jr und Duff JH (1985) 2,3-Dihydroxybenzoic acid. Effect on mortality rate in a septic rat model. *Arch Surg* **120**:937-940.
- Pentz S, Vergani G, Amthor S, Horler H und Rich I (1981) A method for electron microscopic preparation of cultured cells (monolayer) in a new test chamber (TCSC-1). *Microsc Acta* **84**:117-120.
- Petrat F, Rauen U und de Groot H (1999) Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology* **29**:1171-1179.
- Petrat F, de Groot H und Rauen U (2000) Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. *Arch Biochem Biophys* **376**:74-81.
- Petrat F, de Groot H und Rauen U (2001) Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem J* **356**:61-69.

- Petrat F, de Groot H, Sustmann R und Rauen U (2002) The transition iron pool in living cells. A methodically defined quantity. *Biol Chem* in review.
- Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P und Di Lisa F (1999) Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* **76**:725-734.
- Pick E (1986) Microassays for superoxide and hydrogen peroxide production and nitroblue tetrazolium reduction using an enzyme immunoassay microplate reader, in *Methods Enzymol* (G. Disaboto und J. Everse eds) pp 407-421., Academic Press Inc., Orlando.
- Pierson MG und Gray BH (1982) Superoxide dismutase activity in the cochlea. *Hear Res* **6**:141-151.
- Pirvola U, Xing-Qun L, Virkkala J, Saarma M, Murakata C, Camoratto AM, Walton KM und Ylikoski J (2000) Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation *J Neurosci* **20**:43-50
- Pollack S und Campana T (1981) Early events in guinea pig reticulocyte iron uptake. *Biochim Biophys Acta* **673**:366-373.
- Pollera CF, Ameglio F, Reina S, Nardi M, Abbolito MR und Parracino C (1987) Changes in serum iron levels following very high-dose cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* **19**:257-260.
- Priuska EM und Schacht J (1995) Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* **50**:1749-1752.
- Priuska EM, Clark-Baldwin K, Pecoraro VL und Schacht J (1998) NMR studies of iron-gentamicin complexes and the implications for aminoglycoside toxicity. *Inorganica Chimica Acta* **273**:85-91.
- Pryor GT (1994) Assessment of Auditory Dysfunction, in *Principles of Neurotoxicology* (Chang LW eds) pp 345-371, Marcel Dekker Inc., New York.
- Puel JL (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* **47**:449-476.
- Puschner B und Schacht J (1997) Energy metabolism in cochlear outer hair cells *in vitro*. *Hear Res* **114**:102-106.
- Quirk WS, Shivapuja BG, Schwimmer CL und Seidman MD (1994) Lipid peroxidation inhibitor attenuates noise-induced temporary threshold shifts. *Hear Res* **74**:217-220.
- Raffray M und Cohen GM (1997) Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol Ther* **75**:153-177.
- Raphael Y, Ohmura M, Kanoh N, Yagi N und Makimoto K (1983) Prenatal maturation of endocochlear potential and electrolyte composition of inner ear fluids in guinea pigs. *Arch Otorhinolaryngol* **237**:147-152.
- Rarey KE und Yao X (1996) Localization of Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in the rat cochlea. *Acta Otolaryngol.* **116**:833-835.
- Rauen U, Elling B, Gizewski ER, Korth HG, Sustmann R und de Groot H (1997) Involvement of reactive oxygen species in the preservation injury to cultured liver endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **22**:17-24.
- Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG und de Groot H (1999) Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* **13**:155-168.
- Rauen U, Petrat F, Li T und de Groot H (2000) Hypothermia injury/ cold-induced apoptosis-evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *FASEB J* **14**:1953-1964.
- Ravi R, Somani SM und Rybak LP (1995) Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol Toxicol* **76**:386-394.

- Reed DJ (1990) Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**:603-631.
- Richardson GP und Russell IJ (1991) Cochlear cultures as a model system for studying aminoglycoside induced ototoxicity. *Hear Res* **53**:293-311.
- Robb SJ, Gaspers LD, Scaduto RC, Thomas AP und Connor JR (1999) Influence of calcium and iron on cell death and mitochondrial function in oxidatively stressed astrocytes. *J Neurosci Res* **55**:674-686.
- Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B und Orrenius S (2000) Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide. *J Biol Chem* **275**:32438-32443.
- Rolfs A und Hediger MA (1999) Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications. *J Physiol* **518**:1-12.
- Romero M, Mosquera J und Rodriguez-Iturbe B (1997) A simple method to identify NBT-positive cells in isolated glomeruli. *Nephrol Dial Transplant* **12**:174-179.
- Ross M (1989) The Ear, in *Histology, a text and atlas* (Ross MH, Romrell LJ ed) pp 739-766, Williams und Wilkins, Baltimore, Maryland.
- Rothman RJ, Serroni A und Farber JL (1992) Cellular pool of transient ferric iron, chelatable by deferoxamine and distinct from ferritin, that is involved in oxidative cell injury. *Mol Pharmacol* **42**:703-710.
- Rybak LP, Ravi R und Somani SM (1995) Mechanism of protection by diethyldithiocarbamate against cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Fundam. Appl Toxicol* **26**:293-300.
- Rybak LP, Husain K, Morris C, Whitworth C und Somani S (2000) Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol* **21**:513-520.
- Saito T, Moataz R und Dulon D (1991) Cisplatin blocks depolarization-induced calcium entry in isolated cochlear outer hair cells. *Hear Res* **56**:143-147.
- Saito T und Aran JM (1994) Comparative ototoxicity of cisplatin during acute and chronic treatment. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **56**:315-320.
- Saito T, Yamamoto T, Zhang ZJ, Yamada T, Manabe Y und Saito H (1995) Transplatin blocks voltage-dependent calcium current in isolated cochlear outer hair cells but is not ototoxic *in vivo*. *Brain Res* **697**:276-279.
- Saito T, Yamada T, Manabe Y, Yamamoto T und Saito H (1996) Cisplatin metabolites and their toxicity on isolated cochlear outer hair cells *in vitro*. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **116**:561-565.
- Saito T, Zhang ZJ, Yamada T, Yamamoto T, Shibamori Y und Saito H (1997) Similar pharmacokinetics and differential ototoxicity after administration with cisplatin and transplatin in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* **117**:61-65.
- Sato Y, Mizukoshi O und Daly JF (1969) Microrespirometry of the membranous cochlea and ototoxicity *in vitro*. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **78**:1201-1209.
- Schacht J (1998) Aminoglycoside ototoxicity: prevention in sight? *Otolaryngol Head Neck Surg* **118**:674-677.
- Seidman MD und Quirk WS (1991) The protective effects of tirilated mesylate (U74006F) on ischemic and reperfusion-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* **105**:511-516.
- Seidman MD, Quirk WS, Nuttall AL und Schweitzer VG (1991) The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase- polyethylene glycol on ischemic and reperfusion-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* **105**:457-463.
- Seidman MD, Shivapuja BG und Quirk WS (1993) The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. *Otolaryngol Head Neck Surg* **109**:1052-1056.
- Sha SH und Schacht J (1999a) Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin. *Free Radic Biol Med* **26**:341-347.

- Sha SH und Schacht J (1999b) Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity. *Lab Invest* **79**:807-813.
- Sha SH und Schacht J (1999c) Stimulation of free radical formation by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res* **128**:112-118.
- Sha SH und Schacht J (2000) Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation *in vitro* and ototoxicity *in vivo*: D-methionine is a potential protectant. *Hear Res* **142**:34-40.
- Sha SH, Zajic G, Epstein CJ und Schacht J (2001a) Overexpression of copper/zinc-superoxide dismutase protects from kanamycin-induced hearing loss. *Audiol Neurootol* **6**:117-123.
- Sha SH, Taylor R, Forge A und Schacht J (2001b) Differential vulnerability of basal and apical hair cells is based on intrinsic susceptibility to free radicals. *Her Res* **155**:1-8
- Shenberg C, Boazi M, Cohen J, Klein A, Kojler M und Nyska A (1994) An XRF study of trace elements accumulation in kidneys of tumor-bearing mice after treatment with cis-DDP with and without selenite and selenocistamine. *Biol Trace Elem Res* **40**:137-149.
- Singh S, Khodr H, Taylor MI und Hider RC (1995) Therapeutic iron chelators and their potential side-effects. *Biochem Soc Symp* **61**:127-37:127-137.
- Somani SM, Ravi R und Rybak LP (1995) Diethyldithiocarbamate protection against cisplatin nephrotoxicity: antioxidant system. *Drug Chem Toxicol* **18**:151-170.
- Song BB und Schacht J (1996) Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig *in vivo*. *Hear Res* **94**:87-93.
- Spicer SS, Thomopoulos GN und Schulte BA (1998) Cytologic evidence for mechanisms of K<sup>+</sup> transport and genesis of Hensen bodies and subsurface cisternae in outer hair cells. *Anat Rec* **251**:97-113.
- Starke PE und Farber JL (1985) Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Evidence for the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber- Weiss reaction. *J Biol Chem* **260**:10099-10104.
- Sun AH, Xiao SZ, Li BS, Li ZJ, Wang TY und Zhang YS (1987a) Iron deficiency and hearing loss. Experimental study in growing rats. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **49**:118-122.
- Sun AH, Xiao SZ, Zheng Z, Li BS, Li ZJ und Wang TY (1987b) A scanning electron microscopic study of cochlear changes in iron- deficient rats. *Acta Otolaryngol (Stockh)* **104**:211-216.
- Sun AH, Li JY, Xiao SZ, Li ZJ und Wang TY (1990) Changes in the cochlear iron enzymes and adenosine triphosphatase in experimental iron deficiency. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **99**:988-992.
- Suzuki YJ, Forman HJ und Sevanian A (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* **22**:269-285.
- Symonds MCR und Gutteridge JC (1998) Superoxide, peroxides, and iron in biological systems, in *Free Radicals and Iron: Chemistry, Biology, and Medicine* (M.C.R. S und J.M.C. G eds) pp 113-137, Oxford University Press, New York.
- Tachibana M, Morioka H, Machino M und Mizukoshi O (1985) Binding sites of an aminoglycoside in the cochlea examined by immunocytochemistry. *Histochemistry* **83**:237-240.
- Theopold HM (1978) The acoustic trauma in animal experiment: I. Morphological reaction in the guinea pig cochlea after traumatization by shots (a scanning microscopical study) (author's transl). *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* **57**:706-716.
- Thress K, Kornbluth S und Smith JJ (1999) Mitochondria at the crossroad of apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* **31**:321-326.

- Trimmer EE und Essigmann JM (1999) Cisplatin. *Essays Biochem* **34**:191-211.
- Ueda N, Guidet B and Shah SV (1993) Gentamicin-induced mobilization of iron from renal cortical mitochondria. *Am.J.Physiol.* **265**:F435-F439.
- Usami S, Hjelle OP und Ottersen OP (1996) Differential cellular distribution of glutathione, an endogenous antioxidant, in the guinea pig inner ear. *Brain Res* **743**:337-340.
- Vago P, Humbert G und Lenoir M (1998) Amikacin intoxication induces apoptosis and cell proliferation in rat organ of Corti. *Neuroreport* **9**:431-436.
- Walker PR und Sikorska M (1997) New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cell Biol* **75**:287-299.
- Wangemann P, Schacht, J (1996) Homeostatic Mechanisms in the Cochlea, in *The Cochlea* (Dallos P, Popper AN und Fay, RR ed) pp 130-185, Springer Verlag, New York.
- Watanabe K, Jinnouchi K und Yagi T (2001) Detection of single-stranded DNA (ssDNA) in the vestibule of guinea pigs after the application of cisplatinum (CDDP). *Anticancer Res* **21**:1135-1138.
- Weidauer H (1969) Histochemical demonstration of vitamin C in the guinea pig cochlea. *Archive für klinische und experimentelle Ohren, Nasen, und Kehlkopfheilkunde* **194**:395-399.
- Wersall J, Bjorkroth B, Flock A und Lundquist PG (1973) Experiments on ototoxic effects of antibiotics. *Adv Otorhinolaryngol* **20**:14-41.
- Williams SE, Zenner HP und Schacht J (1987) Three molecular steps of aminoglycoside ototoxicity demonstrated in outer hair cells. *Hear Res* **30**:11-18
- Xu M, Fan Y, Gao Z, Chen J und Li J (1995) Hearing loss and trace elements Fe<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in the perilymph. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **57**:245-249.
- Yamamoto T, Kakehata S, Saito T, Saito H und Akaike N (1994) Cisplatin blocks voltage-dependent calcium current in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *Brain Res.* **648**:296-298.
- Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Iguchi H, Nakagawa T und Kojima A (1995a) Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise- induced acoustic trauma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **252**:504-508.
- Yamane H, Nakai Y, Takayama M, Konishi K, Iguchi H, Nakagawa T, Shibata S, Kato A, Sunami K und Kawakatsu C (1995b) The emergence of free radicals after acoustic trauma and strial blood flow. *Acta Otolaryngol Suppl (Stockh)* **519**:87-92.
- Yamasoba T, Nuttall AL, Harris C, Raphael Y und Miller JM (1998) Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain Res* **784**:82-90.
- Yamasoba T, Schacht J, Shoji F und Miller JM (1999) Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor *in vivo*. *Brain Res* **815**:317-325.
- Ylikoski J (1974) Guinea-pig hair cell pathology from ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol Suppl* **326**:5-22.
- Zajic G und Schacht J (1987) Comparison of isolated outer hair cells from five mammalian species. *Hear Res* **26**:249-256.
- Zenner HP, Gitter A, Zimmermann U, Schmitt U und Fromter E (1985) The isolated living hair cell. A new model for the study of hearing function. *Laryg Rhinol Otol* **64**:642-648.
- Zenner HP (1986) Active movements of the hair cells: a new mechanism in hearing. *HNO* **34**:133-138.
- Zhang JG und Lindup WE (1994) Cisplatin nephrotoxicity: decreases in mitochondrial protein sulphhydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* **47**:1127-1135.

- Zhang JG und Lindup WE (1996) Cisplatin-induced nephrotoxicity *in vitro*: increases in cytosolic calcium concentration and the inhibition of cytosolic and mitochondrial protein kinase C. *Toxicol Lett* **89**:11-17.
- Zheng JL, Keller G und Gao WQ (1999) Immunocytochemical and morphological evidence for intracellular self-repair as an important contributor to mammalian hair cell recovery. *J Neurosci* **19**:2161-2170.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Membranpotenzial
•OH	Hydroxylradikal
2,2'-DPD	2,2'-Dipyridyl
4,4'-DPD	4,4'-Dipyridyl
ACC	N-Acetylcystein
AIF	Apoptose induzierender Faktor
ATP	Adenosin-5-triphosphat
CIP	chelatisierbarer Eisenpool; engl. <u>chelatable iron pool</u>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CsA	Cyclosporin A
DFO	Deferoxaminmesilat
DHB	2,3-Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure; engl. <u>acid</u>
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz Spektrometrie
Fe <sup>II/III</sup>	Eisenionen des Übergangspools
GSH	Glutathion (reduziert)
GSHe	Glutathionethylester
GSSG	Glutathion (oxidiert)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H33342	Bisbenzimid
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HC	Hensen-Zellen
HEPES	2[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-ethansulfonsäure
IHC	innere Haarzellen
LSM	Laser Scanning-Mikroskop
MPT	mitochondrialer Permeabilitätsübergang; engl. <u>mitochondrial permeability transition</u>
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidradikal-Anion
OH <sup>-</sup>	Hydroxylion
OHC	äußere Haarzellen
PG SK	Phen Green SK Diacetat
PI	Propidiumjodid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies; engl. <u>reactive oxygen species</u>
SOD	Superoxiddismutase
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester-perchlorat
TUNEL-Methode	terminal deoxynukleotidtransferase mediated dUTP-fluorescein nick-end labelling-Methode

## **8.2. Literaturliste eigener Veröffentlichungen**

**Dehne N**, Lautermann J, ten Cate W-J F, Rauhen U, de Groot H (2000) *In vitro* Effects of Hydrogen Peroxide on the Cochlear Neurosensory Epithelium of the Guinea Pig; Hearing Research **143**, 162-170

**Dehne N**, Lautermann J, Petrat F, Rauhen U, de Groot H (2001) Cisplatin Ototoxicity: Involvement of Iron and Enhanced Formation of Superoxide Anion Radicals; Toxicology and Applied Pharmacology **174**, 27-34

**Dehne N**, Rauhen U, de Groot H, Lautermann J (2002) Involvement of the Mitochondrial Permeability Transition in Gentamicin Ototoxicity; Hearing Research (in review)